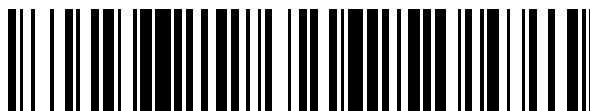


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 314**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

C12P 19/34 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2012 E 18170777 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3421601**

54 Título: **Fabricación y uso de ARN monocatenario sintetizado in vitro para introducción en células de mamífero para inducir un efecto biológico o bioquímico**

30 Prioridad:

30.12.2011 US 201161582050 P

30.12.2011 US 201161582080 P

25.05.2012 US 201261651738 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.07.2020

73 Titular/es:

CELLSCRIPT, LLC (100.0%)

726 Post Road

Madison, WI 53713, US

72 Inventor/es:

MEIS, JUDITH;

PERSON, ANTHONY D.;

CHIN, CYNTHIA S.;

JENDRISAK, JEROME y

DAHL, GARY A.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 770 314 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

Fabricación y uso de ARN monocatenario sintetizado *in vitro* para introducción en células de mamífero para inducir un efecto biológico o bioquímico

Campo de la invención

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

La presente invención se refiere a composiciones de ARN, sistemas, kits y procedimientos de fabricación y uso de composiciones de ARN que comprenden ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* para inducir un efecto biológico o bioquímico en células humanas o de otros mamíferos, en los que la composición de ARN se introduce de manera repetida o continua. En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones de ARN y a procedimientos de fabricación y uso de las mismas para inducir efectos biológicos o bioquímicos en células que están en cultivo *ex vivo* o células que están *in vivo* en un tejido, órgano u organismo, en las que el efecto biológico se puede inducir en las células, o en un tejido, órgano u organismo que contenga las células. En determinadas realizaciones, las composiciones de ARN están "sustancialmente libres", "casi libres", "esencialmente libres", "prácticamente libres", "extremadamente libres" o "absolutamente libres" de ARN bicatenario. En algunas realizaciones, el efecto biológico o bioquímico comprende reprogramar células que presentan un primer estado diferenciado o fenotipo a células que presentan un segundo estado diferenciado o fenotipo, tal como reprogramar células somáticas humanas a células madre pluripotentes, o inducir células fibroblásticas humanas a células neuronales.

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 homeostática 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 indujo 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"). Tras este informe original, las células madre pluripotentes también se indujeron mediante la transformación de células somáticas humanas con genes codificantes de los factores proteicos humanos similares (OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC) (Takahashi y col. 2007), o mediante la transformación de células somáticas humanas con genes codificantes de los factores humanos OCT4 y SOX2 más genes codificantes de otros dos factores humanos, NANOG y LIN28 (homólogo A de Lin-28) (Yu y col., 2007). Todos estos procedimientos usaron retrovirus o lentivirus para integrar los genes codificantes de 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 es muy prometedora como un posible medio 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 del enfermo con menor riesgo debido al rechazo inmune. Aún más, la generación de células iPS a partir de células somáticas específicas de la enfermedad parece ser prometedora como medio de estudio y desarrollo de fármacos para tratar estados patológicos específicos (Ebert y col. 2009, Lee y col. 2009, Maehr y col., 2009).

La administración vírica de genes codificantes de factores de reprogramación proteicos (o factores "iPSC") proporciona una manera muy eficaz de 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 se pueden crear células iPS (con menor eficacia) usando otros procedimientos que no requieren la integración en el 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 generan células iPS (Okita y col. 2008). También se generaron células madres pluripotentes inducidas a partir de células somáticas humanas mediante la introducción de un plásmido que expresaba genes codificantes de OCT4, SOX2, c-MYC, KLF4, NANOG y LIN28 (Yu y col. 2009). Otros enfoques exitosos para generar células iPS incluyen tratar células somáticas con: factores de reprogramación proteicos recombinantes (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 usando estas técnicas de administración no vírica para administrar factores de reprogramación es extremadamente ineficaz. Los futuros procedimientos de generación de células iPS para posibles aplicaciones clínicas necesitarán aumentar la velocidad y la eficacia de la formación de células iPS a la vez que se mantenga la integridad del genoma.

Robertson y col., 2009 desvelan ARN que contiene muestras tratadas con RNasa III para digerir contaminantes de ARN bicatenario mediante la incubación en $MgCl_2$ 10 mM. La presente invención como se define en las reivindicaciones aplica una concentración de cationes de magnesio de aproximadamente 1-4 mM y una sal que

proporciona una fuerza iónica equivalente a al menos aproximadamente 50-300 mM de acetato de potasio o glutamato de potasio que proporciona una digestión más completa de ARN bicatenario, a la vez que mantiene mejor la integridad del ARN monocatenario.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones de ARN, sistemas, kits y procedimientos de fabricación y uso de composiciones de ARN que comprenden ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* para inducir un efecto biológico o bioquímico en células humanas o de otros mamíferos, en los que la composición de ARN se introduce de manera repetida o continua. En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones de ARN y a procedimientos de fabricación y uso de las mismas para inducir efectos biológicos o bioquímicos en células que están en cultivo *ex vivo* o células que están *in vivo* en un tejido, órgano u organismo, en las que el efecto biológico se puede inducir en las células, o en un tejido, órgano u organismo que contenga las células.

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 homeostática 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 indujo 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"). Tras este informe original, las células madre pluripotentes también se indujeron mediante la transformación de células somáticas humanas con genes codificantes de los factores proteicos humanos similares (OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC) (Takahashi y col. 2007), o mediante la transformación de células somáticas humanas con genes codificantes de los factores humanos OCT4 y SOX2 más genes codificantes de otros dos factores humanos, NANOG y LIN28 (homólogo A de Lin-28) (Yu y col., 2007). Todos estos procedimientos usaron retrovirus o lentivirus para integrar los genes codificantes de 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 es muy prometedora como un posible medio 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 del enfermo con menor riesgo debido al rechazo inmune. Aún más, la generación de células iPS a partir de células somáticas específicas de la enfermedad parece ser prometedora como medio de estudio y desarrollo de fármacos para tratar estados patológicos específicos (Ebert y col. 2009, Lee y col. 2009, Maehr y col., 2009).

La administración vírica de genes codificantes de factores de reprogramación proteicos (o factores "iPSC") proporciona una manera muy eficaz de 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 se pueden crear células iPS (con menor eficacia) usando otros procedimientos que no requieren la integración en el 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 generan células iPS (Okita y col. 2008). También se generaron células madres pluripotentes inducidas a partir de células somáticas humanas mediante la introducción de un plásmido que expresaba genes codificantes de OCT4, SOX2, c-MYC, KLF4, NANOG y LIN28 (Yu y col. 2009). Otros enfoques exitosos para generar células iPS incluyen tratar células somáticas con: factores de reprogramación proteicos recombinantes (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 usando estas técnicas de administración no vírica para administrar factores de reprogramación es extremadamente ineficaz. Los futuros procedimientos de generación de células iPS para posibles aplicaciones clínicas necesitarán aumentar la velocidad y la eficacia de la formación de células iPS a la vez que se mantenga la integridad del genoma.

Inmediatamente después de las divulgaciones de los laboratorios de K. Yamanaka (Takahashi K y col., 2007) y J. A. Thomson (Yu J y col. 2007), informando de la inducción de las células iPS a partir de células somáticas humanas mediante vectores víricos o plasmídicos que expresaban genes codificantes de ciertos factores de inducción de iPSC, uno de los solicitantes concibió que podría ser posible inducir células iPSC transfectando repetidamente células somáticas humanas o animales con ARNm sintetizados *in vitro* codificantes de dichos factores de inducción de iPSC.

La introducción de ARNm sintetizado *in vitro* en células y organismos eucariotas por medios tales como microinyección, electroporación y transfección mediada por lípidos se ha usado para expresar proteínas codificadas desde la introducción de los sistemas de transcripción *in vitro* de SP6, T7 y T3 aproximadamente hace 30 años (por ejemplo, Krieg, PA y Melton, DA, 1984). Dicho trabajo, que, en general, incluye introducciones únicas en células eucariotas de un ARNm codificante de una proteína de interés codificada por un determinado gen, seguidas de ensayos y/o análisis de las proteínas expresadas, han proporcionado información importante sobre el procesamiento del ARNm, la expresión y las actividades de genes, y la traducción *in vitro* e *in vivo* de las proteínas codificadas. Sin embargo, también se percibió que el ARNm tiene ciertas desventajas. Por ejemplo, los científicos perciben que el ARN es más lábil que el ADN, y creen que se ha de tener mucho cuidado en evitar la degradación del ARN por una

amplia variedad de ribonucleasas ubicuas, según lo ilustrado por RNasas en la piel humana (Probst J y col., 2006).

Aún más, muchos científicos han descubierto que la transfección repetida de las células con ARNm sintetizado *in vitro* fue citotóxica para las células y produjo la muerte celular. Por ejemplo, aunque Plews y col. (Plews J. R. y col., 2010) observaron que los genes de pluripotencia se activaron tras la transfección de células fibroblásticas humanas con ARNm codificantes de las proteínas KLF4, c-MYC, OCT4 y SOX2, y LT, no pudieron generar estirpes de iPSC longevas, porque, como afirman, "en todos los casos, muy pocas células sobrevivieron y normalmente sufrieron la senescencia en el transcurso de una semana después del tratamiento". Cuando también hicieron breves tratamientos de las células con ciertas moléculas pequeñas tales como ácido valproico tras la transfección del ARNm, observaron un aumento de la activación de los genes de pluripotencia en comparación con la transfección de ARNm solo, pero afirmaron que "durante nuestro intento de múltiples series de transfección por microporación, dicho tratamiento causó muerte celular masiva". Plews y col. también mostraron escepticismo sobre los resultados de Yakubov y col. (Yakubov y col., 2010), cuando afirmaron que "Yakubov y sus colegas obtuvieron colonias positivas en AP similares a las nuestras, sin embargo, no se realizaron análisis de diferenciación, por lo que es difícil evaluar la pluripotencia de las células iPS".

Ugur Sahin y col. (Sahin U y col., 2011) también descubrieron grandes problemas con la citotoxicidad y la viabilidad celular durante los intentos de reprogramar células somáticas a iPSC con ARNm. Tras electroporar células somáticas con ARNm transcritos *in vitro* protegidos con ARCA codificantes de los cuatro factores de transcripción OCT4, SOX2, KLF4 y cMYC diariamente durante varios días, se observó que los ARNm se tradujeron y que se indujeron algunos marcadores para las iPSC. Sin embargo, señalaron que "la electroporación repetitiva se asocia con una pérdida de viabilidad celular que se hizo evidente solo después de la segunda electroporación. La viabilidad disminuyó aún más con cada electroporación siguiente". Intentaron "rescatar" las células que estaban siendo electroporadas mediante la adición continua de más células del mismo tipo a medida que realizaba la electroporación, pero no establecieron cómo podían distinguir las células previamente electroporadas de las nuevas células entre las células viables al final de sus electroporaciones. Apparently, no obtuvieron colonias de iPSC que pudieran propagarse o diferenciarse en otros tipos de células, que son características de las iPSC, porque concluyeron su descripción del experimento al afirmar que "la excrecencia de las colonias pluripotentes de estas células todavía está en investigación".

De forma similar, en un artículo reciente sobre la administración repetida de ARNm codificantes de los factores de reprogramación KLF4, c-MYC, Oct4 y Sox2 en fibroblastos humanos, K. Drews y col. (Drews K. y col., 2012) informaron que "tras transfecciones repetidas, los ARNm indujeron una pérdida grave de la viabilidad celular como lo demuestran los ensayos de citotoxicidad de MTT. Los datos del transcriptoma derivados de micromatrices revelaron que la baja supervivencia celular se debió principalmente a la respuesta inmune innata desencadenada por los ARNm exógenos. Los presentes inventores validaron la influencia de la transfección de ARNm en los niveles clave de transcripción asociada con la respuesta inmune, incluyendo IFNB1, RIG-I, PKR, IL12A, IRF7 y CCL5, mediante PCR cuantitativa, y estos se compararon directamente con los niveles inducidos por otros procedimientos publicados previamente para mediar la reprogramación en células somáticas".

Dicha citotoxicidad y muerte celular producidas como consecuencia de introducciones repetidas o continuas de ARNm sintetizado *in vitro* en células puede deberse a la inducción de sensores de ARN y mecanismos de respuesta inmune innata. Las células humanas y animales poseen una amplia selección de sensores de ARN y mecanismos de respuesta inmune innata que reconocen y responden a las moléculas de ARN exógenas que pueden entrar en las células. Tal como durante una infección vírica o bacteriana. Estos sensores de ARN celulares y los mecanismos de respuesta inmune innata, si se activan, pueden producir la inhibición de la síntesis de proteínas, citotoxicidad y muerte celular programada a través de la señalización apoptótica.

En apoyo de esta idea, Angel y Yanik (2010) mostraron que la transfección de células con ARNm sintetizado *in vitro* activó la inmunidad innata que causó una muerte celular significativa, y que la inhibición de genes de respuesta inmune innata usando ARNip contra IFN-beta, STAT2 y EIFAK2 (PKR) permitió la transfección frecuente de fibroblastos humanos con ARNm codificante de proteínas sintetizado *in vitro*.

Kariko y Weissman (Kariko, y col., 2005; Kariko, y col., 2008; Kariko, y col., 2012) descubrieron que los ARNm modificados sintetizados *in vitro*, en los que se reemplazaron nucleósidos canónicos por ciertos nucleósidos modificados (por ejemplo, pseudouridina = ψ y, por ejemplo, nucleósidos de 5-metilcitidina = m^5C), eran mucho menos inmunogénicos, y se expresaron en proteínas a niveles superiores en comparación con los correspondientes ARNm no modificados sintetizados *in vitro*. Este trabajo también respalda la idea de que la respuesta inmune innata debe reducirse para expresar proteínas codificadas por ARNm transfectado repetidamente.

L. Warren y col. (Warren y col., 2010) informaron de la reprogramación de células somáticas humanas a colonias de iPSC que pudieron cultivarse de manera continua en cultivo y diferenciarse en células que comprendían las 3 capas germinales. Hicieron esta reprogramación mediante la transfección repetida de células somáticas con ARNm modificados con (ψ y m^5C) tratados con fosfatasa con protección terminal con ARCA codificantes de los factores de transcripción KMOS o KMOSL, en los que K = KLF4, M = MYC, O = OCT4, S = SOX2, L = LIN28, en medio que contiene la proteína B18R como un inhibidor del interferón. Por lo tanto, Warren y col. usaron múltiples procedimientos para tratar de evadir o contrarrestar los sensores de ARN celular y los mecanismos de respuesta

innate, including the fabrication of mRNA with two modified nucleotides, that Kariko and col. have demonstrated that it leads to a lower innate immune response, phosphorylating the mRNA to eliminate the 5' triphosphate of 20 % of the mRNA molecules that were not protected with a cap during the transcription *in vitro*, and also protein B18R added as an inhibitor of the innate immune response. mRNA synthesized *in vitro* and similar procedures, with some improvements, were used in a subsequent publication (Warren and col., 2012).

Kariko and col. (Kariko and col., 2011A) revealed the expression of transcription factors KMO5L (N = NANOG) and the reprogramming of human somatic cells (for example, fibroblasts or keratinocytes) to iPS cells using mixtures of modified mRNA with ψ synthesized *in vitro* purified or treated (or mRNA that included other modified nucleotides) codifying some of these transcription factors, without the use of an inhibitor of the innate immune response. The use of pseudouridine instead of uridine reduced the innate immune response, increased the expression of the proteins of transcription factors codified by the mRNA, and even then, the purification or the treatment of the mRNA was necessary for a satisfactory reprogramming. This work indicated that it was also important and beneficial to avoid or reduce the innate immune response with the aim of eliminating or reducing the cytotoxicity and cell death and inducing the reprogramming of iPS cells by the repeated introduction of mRNA codifying proteins in somatic cells. The applicants believe that it is fundamental for a satisfactory reprogramming or the induction of other biological or biochemical effects that the mRNA synthesized *in vitro* that are going to be introduced repeatedly or continuously in human and animal cells among other uses, must avoid the induction and activation of the numerous sensors of RNA and mechanisms of innate immune response that protect against pathogens that comprehend RNA.

Nevertheless, in a recent article, Lee and col. (Lee J., 2012), reviewed by L. A. J O'Neill (2012), argues the opposite: it requires the activation of the innate immunity by the modified mRNA codifying the proteins KMO5 for the effective reprogramming of somatic cells to iPS cells. These authors believe that their data shows that the activation of the pathways mediated by the Toll receptor of type 3 (TLR3) (for example, the induction of IFN of type I) is necessary for the effective induction of genes of pluripotency and the induction of human iPS cells.

The resolution of this problem is important. Despite an intense investigation, it is not yet known completely in the technique how or why the cells recognize and tolerate the endogenous mRNA molecules, but they do not tolerate the repeated cellular introduction of mRNA molecules synthesized by transcription *in vitro*, terminal protection and polyadenylation. J. Eberwine and collaborators (Sul J-Y and col., 2012), who have focused on trying to use transcriptomes of mRNA isolated from cells to direct the phenotypic conversion of a cell to a cell, remain perplexed about the reason for which the scientists who were working on reprogramming using mRNA had problems with the cytotoxicity and cell death, and the use of modified mRNA to reduce these effects, in view of the fact that they did not observe similar effects using isolated mRNA from the cells.

For this reason, it is not known what specific chemical and structural characteristics of the synthesized *in vitro* mRNA are recognized by the cellular RNA sensors of human or mammalian cells to avoid such repeated cellular introductions. The identification of these characteristics and the search for ways of being able to introduce in a repeated or continuous manner these mRNA synthesized *in vitro* in human and animal cells would allow the use of mRNA to induce biological or biochemical effects in the cells, not only for the reprogramming, but also for a wide variety of other important applications (for example, for clinical investigation or for regenerative or immunotherapy) in cellular biology, agriculture and medicine.

The reprogramming of human somatic cells or animals to iPS cells by the repeated or continuous introduction of mRNA synthesized *in vitro* codifying transcription factors iPS provides an excellent model system to identify which characteristics of the mRNA synthesized *in vitro* are detected and which cellular RNA sensors and the mechanisms of innate immune response induce cytotoxicity and cell death. Reprogramming is an excellent model, because it requires daily transfections of multiple mRNA in a period of approximately 8 to approximately 18 days. The knowledge obtained from the experiments of reprogramming will lead to a cellular reprogramming that is easier, faster, more efficient and more effective, and will also lead to better procedures to induce many other biological or biochemical effects *ex vivo* in cells in culture or *in vivo* in cells of tissues, organs or organisms that contain them by the repeated or continuous introduction of mRNA synthesized *in vitro* codifying one or more proteins.

For this reason, the applicants believe that the procedures and the compositions developed for this model system of reprogramming can lead to: procedures of fabrication of compositions of RNA that comprehend RNA monocatenary for the introduction in cells of mammalian cells to induce a biological or biochemical effect; new compositions of RNA that are more effective to induce a biological or biochemical effect after their introduction in mammalian cells; new procedures of reprogramming of cells from a first state of differentiation or phenotype to a second state of differentiation or phenotype (which includes dedifferentiation, transdifferentiation and differentiation or redifferentiation); and new procedures of induction of other biological or biochemical effects in human cells or animals *ex vivo* in culture or *in vivo* in cells of tissues, organs or organisms by the repeated or continuous introduction of mRNA synthesized *in vitro* codifying one or more proteins of interest in the cells.

What is needed in the technique is a better understanding of what chemical and structural

específicas de los ARNm sintetizados *in vitro* son reconocidas por los sensores de ARN celular y los mecanismos de respuesta inmune innata para evitar introducciones celulares repetidas de los ARNm. Lo que se necesita en la técnica son nuevos procedimientos, composiciones y kits para fabricar, purificar y tratar ARNm sintetizados *in vitro* para que puedan ser introducidos de manera repetida o continua en células humanas o animales (por ejemplo, de mamífero) *ex vivo* en cultivo o en células humanas o animales (por ejemplo, de mamífero) *in vivo* en tejidos, órganos u organismos que contengan las células sin activar los sensores de ARN o inducir una respuesta inmune innata que produzca una citotoxicidad significativa, muerte celular o inhibición del efecto bioquímico o biológico deseado para el que los ARNm sintetizados *in vitro* se introducen en dichas células. Lo que se necesita son nuevas composiciones de ARN, nuevos procedimientos de fabricación de dichas composiciones de ARN que comprenden ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codificante de una o más proteínas, procedimientos de uso de dichas composiciones de ARN para transfectar de manera repetida o continua células humanas o animales (por ejemplo, de mamífero) para causar un efecto biológico o bioquímico (por ejemplo, para reprogramar una célula que presente un primer estado de diferenciación que comprenda una célula somática a una célula que presente un segundo estado de diferenciación que comprenda una célula iPS) con mayor eficacia y sin inducir citotoxicidad significativa o muerte celular.

Poco o nada se sabe acerca de los resultados que se podrían obtener al introducir dichas composiciones de ARN tratado o purificado en células vivas en cultivo o en sujetos humanos o animales. Lo que se necesita en la técnica son mejores procedimientos para generar composiciones de ARN que comprendan ARN monocatenario o ARNm para la introducción repetida o continua en células *ex vivo* en cultivo o *in vivo* en sujetos humanos o animales (por ejemplo, para investigación biológica y clínica, agricultura o aplicaciones clínicas).

La introducción repetida o continua de ARNm en células para inducir un efecto biológico o bioquímico (por ejemplo, para la reprogramación) puede proporcionar beneficios frente a la introducción de moléculas de ADN o de proteínas. Por ejemplo, la introducción de ARNm en una célula tiene menor probabilidad que el ADN de producir inserciones genómicas o modificaciones genéticas, con efectos permanentes relacionados para las células. Además, puede ser más fácil introducir ARNm en una célula, en la que se modifica adecuadamente después de la traducción para la expresión óptima, que producir y administrar proteínas con una determinada glucosilación u otra modificación posterior a la traducción apropiada para la célula en particular. Por lo tanto, lo que se necesita son procedimientos eficaces para fabricar, para introducir de forma repetida o continua y para expresar ARNm en células vivas con el fin de inducir efectos biológicos o bioquímicos (por ejemplo, en los campos de uso biológico, agrícola y clínico, por ejemplo, para su uso en medicina regenerativa, reprogramación celular, terapias basadas en células, terapias de reemplazo enzimático, trasplante o reparación de células, tejidos y órganos, ingeniería de tejidos u órganos e inmunoterapias).

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a realizaciones de composiciones, mezclas de reacción, kits y procedimientos que comprenden o usan uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* (ARN monocatenarios) o ARN mensajeros (ARNm) (a veces también denominados ARNm_c o moléculas de ARNm). Con respecto a la presente invención, un "ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro*", en el presente documento, significa y se refiere a ARN monocatenario o ARNm que se sintetiza o se prepara usando un procedimiento que comprende la transcripción *in vitro* de uno o más moldes de ADN por una ARN polimerasa. Aún más, a menos que se establezca específicamente lo contrario, los términos "ARN monocatenario" o "ARNm", cuando se usan en el presente documento con referencia a una realización de la presente invención, significarán un "ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro*" como se ha definido anteriormente. En realizaciones preferidas, el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codifica (o presenta una secuencia codificante de) al menos una proteína o un polipéptido. En algunas realizaciones preferidas, el ARN monocatenario o ARNm codifica al menos una proteína que es capaz de producir un efecto biológico o bioquímico cuando se introduce de manera repetida o continua en una célula humana o animal (por ejemplo, una célula de mamífero). En algunas realizaciones preferidas, la invención comprende una composición que comprende ARN monocatenario o ARNm y, a menos que se establezca específicamente lo contrario, la expresión "composición de ARN" significará una composición de ARN que comprende o consiste en ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro*. En algunas realizaciones preferidas, la invención comprende una composición de ARN que comprende o consiste en ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* que codifica una proteína o un polipéptido. En algunas realizaciones preferidas, la invención comprende una composición de ARN que comprende o que consiste en una mezcla de múltiples ARN monocatenarios o ARNm sintetizados *in vitro*, cada uno de los cuales codifica una proteína diferente. Otras realizaciones de la invención comprenden una composición de ARN que comprende o consiste en ARN monocatenario sintetizado *in vitro* que no codifica una proteína o un polipéptido, sino que muestra la secuencia de al menos un ARN largo no codificante (ARNnc). Otras realizaciones más comprenden diversas mezclas de reacción, kits y procedimientos que comprenden o usan una composición de ARN.

Una realización de la presente invención es un procedimiento de tratamiento de ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* para generar una composición de ARN que está "sustancialmente libre de ARN bicatenario", "casi libre de ARN bicatenario", "esencialmente libre de ARN bicatenario", "prácticamente libre de ARN bicatenario", "extremadamente libre de ARN bicatenario", o "absolutamente libre de ARN bicatenario", lo que significa, respectivamente, que menos del aproximadamente: 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,001 % o 0,0002 % de la masa del ARN de la composición de ARN monocatenario tratado es ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases, (o superior a aproximadamente 30 pares de bases), comprendiendo el

procedimiento: poner en contacto el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* con la proteína RNasa III en una solución acuosa tamponada que comprende cationes de magnesio a una concentración de aproximadamente 1-4 mM; y una sal que proporciona una fuerza iónica al menos equivalente a aproximadamente 50 mM de acetato de potasio o glutamato de potasio; e incubar en condiciones en las que se genere la composición de ARN.

Por lo tanto, una realización de la presente invención es un procedimiento de tratamiento de ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* para generar una composición de ARN tratado, en la que menos del aproximadamente: 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,001 % o 0,0002 %, respectivamente, de la masa del ARN de la composición de ARN tratado es ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases (o superior a aproximadamente 30 pares de bases), comprendiendo el procedimiento: poner en contacto el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* con la proteína RNasa III en una solución acuosa tamponada que comprende cationes de magnesio a una concentración de aproximadamente 1-4 mM; y una sal que proporciona una fuerza iónica al menos equivalente a aproximadamente 50 mM de acetato de potasio o glutamato de potasio; e incubar en condiciones en las que se genere la composición de ARN tratado. Sin embargo, a menos que sea evidente a partir de la descripción o se indique específicamente, cuando se dice que se usa una "composición de ARN" en un procedimiento descrito en el presente documento, en el que la composición de ARN se pone en contacto de manera repetida o continua con o se introduce en una célula humana o animal (por ejemplo, una célula de mamífero) para inducir un efecto biológico o bioquímico (por ejemplo, para reprogramar una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo a un segundo estado diferenciado o fenotipo), significa (y se entenderá) que dicha composición de ARN bien es una composición de ARN tratado que se generó usando el procedimiento descrito en el presente documento, o es una composición de ARN purificado, en la que menos del: 0,01 %, 0,001 % o 0,0002 % (o un porcentaje específicamente indicado) de la masa del ARN de la composición de ARN purificado es ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases (o superior a aproximadamente 30 pares de bases), incluso cuando dicha composición de ARN no se denomina una "composición de ARN tratado" o una "composición de ARN purificado".

Una realización de la invención es una mezcla de reacción de tratamiento de ARN que comprende: a) un ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* (por ejemplo, que codifica una o más proteínas o uno o más ARN largos no codificantes (ARNnc); b) una proteína endorribonucleasa III (endoRNasa III o RNasa III) específica del ARN bicatenario (ARNbc); c) cationes de magnesio a una concentración de aproximadamente 1-4 mM; y d) una sal que proporciona una fuerza iónica al menos equivalente a 50 mM de acetato de potasio o glutamato de potasio; en la que dicha mezcla de reacción de tratamiento de ARN está prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, lo que significa que menos del 0,01 %, menos del 0,001 % o menos del 0,0002 %, respectivamente, del ARN de la mezcla de reacción de tratamiento de ARN es ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases (o superior a aproximadamente 30 pares de bases).

Antes de la presente invención, dicha mezcla de reacción de tratamiento de ARN y dicho procedimiento de fabricación de una composición de ARN tratado en la que menos del 0,01 %, menos del 0,001 % o menos del 0,0002 % del ARN de la mezcla de reacción de tratamiento de ARN o la composición de ARN era ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases no se conocía en la técnica, como se evidencia por los EJEMPLOS desvelados en el presente documento. Por ejemplo, el tratamiento de una composición de ARN que comprende ARN monocatenario GAUC sin modificar transcrito *in vitro* (por ejemplo, ARNm codificantes de factores de inducción iPSC) usando RNasa III como se describe en la técnica (por ejemplo, Robertson, 1968) no generó una composición de ARN tratado que produjera la reprogramación de fibroblastos humanos a iPSC al introducir repetidamente la composición de ARN tratado en las células fibroblásticas (por ejemplo, véanse los resultados de la reprogramación usando tratamientos con RNasa III con acetato de magnesio 10 mM en la Tabla del EJEMPLO 10), mientras que el procedimiento de tratamiento con RNasa III de la presente invención dio lugar a una reprogramación satisfactoria (por ejemplo, véanse los resultados de la reprogramación usando tratamientos de RNasa III con aproximadamente 1-4 mM de acetato de magnesio en la Tabla del EJEMPLO 10). Este resultado sorprendente e inesperado se explicó además por los resultados de otros experimentos (por ejemplo, véase el EJEMPLO 22). Por ejemplo, la Tabla del EJEMPLO 22 muestra que la adición de ARN bicatenario a un nivel de solo aproximadamente el 0,001 % o más del ARN total de una composición de ARN que comprende una mezcla de ARN monocatenarios no modificados altamente purificados (por ejemplo, ARNm codificantes de factores de inducción iPSC) es suficiente para inhibir eficazmente la reprogramación de fibroblastos humanos en cultivo a iPSC.

Por lo tanto, algunas realizaciones del procedimiento de tratamiento de ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro*, generan una composición de ARN que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario.

Las realizaciones preferidas de la presente invención comprenden composiciones de ARN que comprenden ARN monocatenario o ARNm que están al menos prácticamente libres de ARN bicatenario (por ejemplo, composiciones práctica, extrema o absolutamente libres de ARN bicatenario), procedimientos y kits de fabricación de composiciones al menos prácticamente libres de ARN bicatenario, y kits y procedimientos que comprenden y/o de uso de composiciones al menos prácticamente libres de ARN bicatenario.

Una realización particular de la invención es una composición de ARN que está al menos prácticamente libre de ARN bicatenario, en la que dicha composición de ARN comprende ARN bicatenario sintetizado *in vitro* (por ejemplo, ARNnc o ARNm (por ejemplo, codificante de una o más proteínas), y en la que dicha composición de ARN está:

"prácticamente libre de ARN bicatenario", "extremadamente libre de ARN bicatenario", o "absolutamente libre de ARN bicatenario", lo que significa, respectivamente, que menos del: 0,01 %, 0,001 % o 0,0002 % del ARN en la composición de ARN comprende ARN bicatenario de un tamaño superior a 40 pares de bases. Por ejemplo, una realización particular de la invención es una composición de ARN que comprende uno o más ARN monocatenarios o ARNm sintetizados *in vitro* codificantes de uno o más factores de transcripción de proteínas, en la que la composición de ARN está prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario. Otra composición de ARN de la invención es una mezcla de reacción que comprende una mezcla de reacción de tratamiento de ARN que comprende: a) un ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* que codifica uno o más factores de transcripción de proteínas; b) una proteína endorribonucleasa III específica del ARN bicatenario (ARNbc) (endoRNasa III o RNasa III); c) cationes de magnesio a una concentración de aproximadamente 1-4 mM; y d) una sal que proporciona una fuerza iónica al menos equivalente a 50 mM de acetato de potasio o glutamato de potasio; en la que dicha mezcla de reacción de tratamiento de ARN está prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, lo que significa que menos del 0,01 %, menos del 0,001 % o menos del 0,0002 %, respectivamente, del ARN de la mezcla de reacción de tratamiento de ARN es ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases.

En algunas realizaciones, las cantidades y las cantidades relativas de ARN bicatenario con respecto al ARN monocatenario o ARNm no contaminante se determinan usando un anticuerpo específico del ARN bicatenario como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, las cantidades y cantidades relativas de moléculas de ARNm no contaminantes y moléculas de ARN contaminantes (o un contaminante de ARN particular) se pueden determinar mediante HPLC u otros procedimientos usados en la técnica para separar y cuantificar moléculas de ARN.

Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos de síntesis de una composición de ARN transcrito *in vitro* (IVT), y de posterior puesta en contacto de la composición de ARN IVT con una RNasa específica del ARN bicatenario, tal como la RNasa III, en condiciones en las que el ARN bicatenario contaminante puede ser digerido de forma reproducible y se pueden generar de forma fiable moléculas de ARN monocatenario que no inducen ni activan una vía de respuesta inmune innata de ARN bicatenario o sensor de ARN.

Cuando los solicitantes intentaron usar RNasa III según lo descrito en la técnica (por ejemplo, por Robertson y col., 1968, y por Mellits y col., 1990) como una posible solución para tratar ARN monocatenario que comprende moléculas de ARNm para la traducción en células vivas, los solicitantes se sorprendieron al descubrir que los ARN monocatenarios tratados con RNasa III eran tóxicos. Por lo tanto, las células humanas que se transfectaron con diversas dosis de ARN monocatenarios tratados con RNasa III, bien diariamente o cada dos días durante hasta 3 semanas, parecían cada vez menos sanas en el transcurso de dicha introducción y, finalmente, murieron. Además, los solicitantes descubrieron que los ARN monocatenarios tratados con RNasa III obtenidos usando el protocolo originalmente descrito por Robertson y col. permanecieron contaminados con cantidades significativas de ARN bicatenario basado en inmunoensayos de transferencia de puntos usando dos anticuerpos específicos del ARN bicatenario diferentes (anticuerpos J2 y K1; English and Scientific Consulting, Szirák, Hungría).

Por consiguiente, los solicitantes descubrieron que el ARN monocatenario tratado con RNasa III preparado como se describe en la técnica no se pudo introducir en células humanas para la traducción *in vivo*. Aún más, la ampliación del tiempo de incubación de la reacción de la RNasa III tampoco redujo notablemente la toxicidad del ARN monocatenario a las células ni redujo la cantidad de ARN bicatenario contaminante por debajo de los niveles de detección de los anticuerpos específicos del ARN bicatenario. El aumento del tiempo de reacción también pareció dar como resultado una mayor degradación del ARN monocatenario, basándose en la tinción de geles de electroforesis, y una menor expresión del ARN monocatenario.

Mellits y col. (1990) proporcionaron directrices relacionadas con el protocolo de la RNasa III que puede ser necesario para "optimizar las condiciones de digestión con respecto a la proporción de enzima/sustrato, la concentración de sal y la temperatura para un determinado ARN".

Por consiguiente, los presentes solicitantes modificaron el protocolo de la RNasa III variando la cantidad de RNasa III en relación con una cantidad constante de ARN tratado. Sin embargo, el aumento o reducción de la cantidad de enzima con relación a la cantidad de ARN no afectó a la cantidad de ARN bicatenario que quedaba después del protocolo.

A continuación, los presentes solicitantes evaluaron cuidadosamente si el cambio de la concentración o del tipo de sal monovalente (incluyendo otras sales diferentes a la sal de NH₄Cl) enseñado con respecto al protocolo convencional de ensayo de RNasa III de Robertson afectaría positivamente a los resultados. Siempre que la concentración de sal monovalente fue suficiente para mantener el estado dúplex del ARN bicatenario (por ejemplo, al menos 50 mM o superior, las diferentes concentraciones no dieron lugar a un aumento de la digestión de las moléculas de ARN bicatenario contaminantes. A altas concentraciones de sal monovalente, pareció haber una ligera inhibición de la actividad RNasa III. Los tiempos de reacción de RNasa III más largos o las temperaturas de reacción más altas parecieron aumentar la degradación del ARN monocatenario de interés sin aumentar la digestión del ARN bicatenario contaminante.

Seguidamente, los presentes solicitantes diseñaron un sustrato de ARN que comprendía tanto las partes monocatenarias como la parte bicatenaria con el fin de evaluar con mayor exactitud y precisión tanto la actividad específica del ARN bicatenario como la especificidad de la digestión por el ARN bicatenario en lugar del ARN monocatenario, pues se pudieron ensayar las diversas condiciones de reacción de la RNasa III usando este único sustrato (FIG. 1). Como se muestra en la FIG. 1, cabría esperar que la correcta digestión de este sustrato de ARN produjera la digestión completa de la parte de ARN bicatenario central de 1.671 pares de bases, dejando intactas las colas de ARN monocatenario de 136 bases y 255 bases. Este sustrato resultó ser una herramienta valiosa en los presentes estudios.

Usando este sustrato, muy sorprendente e inesperadamente, los presentes solicitantes descubrieron una mejora espectacular tanto de la actividad como de la especificidad de la RNasa III al reducir la concentración de cationes de magnesio divalentes en aproximadamente 10 veces en comparación con la concentración enseñada en la técnica (por ejemplo, Robertson y col., 1968). Por lo tanto, a una concentración de cationes de magnesio divalentes de 1 mM, las colas monocatenarias del sustrato permanecieron intactas y la parte central de ARN bicatenario se digirió por completo. El sustrato se usó entonces para valorar con precisión el intervalo óptimo de concentraciones de magnesio divalente. De forma sorprendente, mientras que la literatura (por ejemplo, Robertson y col., 1968) había informado que "el [m]agnesio estimula la actividad en un amplio intervalo entre 0,005 M y 0,1 M", los presentes solicitantes descubrieron que era necesario usar una concentración de magnesio divalente de aproximadamente 4 mM o inferior, y preferentemente de aproximadamente 1-3 mM o 1-2 mM para digerir suficientemente el ARN bicatenario de modo que la composición de ARN que comprendiera moléculas de ARN monocatenario no indujera o activara una respuesta inmune innata específica del ARN bicatenario o vías de sensor de ARN que produjeran una disminución sustancial en la síntesis de proteínas, un aumento de la toxicidad celular o muerte celular. Aún más, a este intervalo de concentraciones inferior de cationes de magnesio, el rendimiento de las moléculas de ARN monocatenario intactas aumentó. Ambos efectos - la reducción de los niveles de ARN bicatenario y el aumento de los niveles de ARN monocatenario intacto - produjeron niveles superiores de traducción de ARNm codificantes de una variedad de proteínas diferentes que comprenden factores de reprogramación y mucha menos toxicidad para las células, como se refleja en los niveles mucho más bajos de expresión celular de varios genes relacionados con la respuesta inmune innata (basados en el análisis cuantitativo de RT-PCR).

Específicamente, el protocolo de la RNasa III enseñado en la técnica desde aproximadamente 1968 ha enseñado a usar acetato de magnesio a 10 mM. Sin embargo, los presentes solicitantes descubrieron que una concentración de 10 mM de acetato de magnesio produjo toxicidad para las células debido a la inducción y/o activación de una potente respuesta inmune innata. Sin embargo, de forma sorprendente e inesperada, los presentes solicitantes descubrieron que el tratamiento del ARN monocatenario con RNasa III en una mezcla de reacción que comprendía solo aproximadamente 1-4 mM, y más preferentemente aproximadamente 1-3 mM de acetato de magnesio, produjo ARN monocatenario que estaba intacto (sin manchas visibles de la banda de ARN monocatenario en la electroforesis) y con mucho menos ARN bicatenario (que más tarde se determinó que estaba al menos prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario), cuyo ARN monocatenario también produjo mucha menos toxicidad y muerte celular al introducirse repetidamente en células humanas o animales.

La evidencia de la digestión más completa del ARN bicatenario, manteniendo a la vez mejor la integridad del ARN monocatenario durante la digestión con RNasa III se muestra en el EJEMPLO 1 y la FIG. 2. Como se muestra en la FIG. 2, a concentraciones de acetato de magnesio de entre 1 y 4 mM, la región de ARN bicatenario de 1.671 pares de bases del sustrato de ARN fue completamente digerida, y los dos fragmentos de ARN monocatenario de 255 y 136 nucleótidos permanecieron intactos. A una concentración de 5 mM de acetato de magnesio, los ARN monocatenarios fueron notablemente más degradados, como se observa por la mancha bajo las bandas de ARN monocatenario, y esta degradación aumentó al aumentar la concentración de acetato de magnesio de 6 a 10 mM de acetato de magnesio, con manchas muy significativas a 10 mM.

Los ensayos transferencia de puntos de la digestión de cantidades variables de ARN bicatenario por RNasa III en presencia de diferentes concentraciones de acetato de magnesio divalente usando un anticuerpo específico del ARN bicatenario, como se muestra en el EJEMPLO 2 y EJEMPLO 3 (FIG. 3 y FIG. 4, respectivamente) confirmó que el ARN bicatenario se digirió más eficazmente mediante el tratamiento con RNasa III en una mezcla de reacción que comprendía una concentración final de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 4 mM de acetato de magnesio, y más preferentemente, entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de acetato de magnesio. Cuando el tratamiento con RNasa III de ARN monocatenario sintetizado *in vitro* se realizó en este intervalo de concentraciones, los presentes solicitantes descubrieron en otros experimentos que la toxicidad del ARN monocatenario tratado tras la transfección diaria repetida en células se redujo significativamente en comparación con el ARN monocatenario tratado a concentraciones de catión de magnesio superiores a 4 mM (por ejemplo, a 10 mM como lo enseña Mellits y col., 1990), y esta reducción de la toxicidad del ARN monocatenario durante transfecciones repetidas fue fundamental para poder reprogramar con éxito las células somáticas humanas a células madre pluripotentes inducidas (iPS).

Por consiguiente, se descubrió que el procedimiento desarrollado por los presentes solicitantes es esencial, eficaz y reproducible para lograr la reprogramación satisfactoria de células somáticas humanas usando ARN monocatenarios codificantes de factores de reprogramación. El procedimiento es capaz de tratar cantidades tanto pequeñas como

grandes de ARN eliminando los contaminantes de ARN bicatenario generados durante la transcripción *in vitro* mientras se mantiene la integridad del ARN monocatenario.

Se ha demostrado que el procedimiento es inesperadamente exitoso para reducir la inducción y/o activación de las vías de señalización de la respuesta inmune innata y sensores de ARN (por ejemplo, inducción de interferón mediada por TLR3) en células humanas en respuesta a la introducción de ARN monocatenario sintetizado *in vitro* en las células, incluso después de múltiples (por ejemplo, diarias) transfecciones durante hasta aproximadamente 21 días. Por ejemplo, si no se realiza una purificación o un tratamiento con RNasa III para eliminar el ARN bicatenario, no es posible reprogramar con éxito los fibroblastos BJ a células iPS. Esto se debe a que las cantidades incluso pequeñas de ARN bicatenario contaminante, cuando se transfectan todos los días durante varios días (por ejemplo, diariamente durante > 2 días, > 3 días, > 5 días, > 8 días, > 10 días, > 12 días, > 14 días, > 16 días, > 18 días o > 20 días) generan una alta toxicidad para las células. Por ejemplo, los presentes solicitantes han observado que la mayoría o todas las células fibroblásticas mueren si se transfectan durante más de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 días con ARNm transcritos *in vitro* codificantes de factores de inducción iPSC que no se han purificado o tratado para eliminar el ARN bicatenario (con tiempo de supervivencia dependiendo de la dosis de los ARN monocatenarios transfectados, las células particulares, el reactivo de transfección o el procedimiento usado, y otros factores). Sin embargo, usando el procedimiento de tratamiento de RNasa III descrito en el presente documento, que comprende el uso de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM de cationes divalentes de magnesio para digerir las moléculas de ARN bicatenario contaminantes en ARN monocatenario sintetizado *in vitro* (por ejemplo, ARNm), reduciendo así la respuesta inmune innata mediada por TLR3, fue posible reprogramar de manera eficaz fibroblastos BJ humanos a células madre pluripotentes inducidas (iPSC), transfectando las células con ARN monocatenarios no modificados tratados con RNasa III que comprendían ARNm protegidos con caperuza en 5' con cap1 que tenían aproximadamente 150 bases de colas de poli (A), cuyos ARNm codifican factores de inducción iPSC, diariamente durante hasta 18 días (por ejemplo, véase el EJEMPLO 10); por el contrario, no se observó la reprogramación de los fibroblastos BJ a iPSC en el EJEMPLO 10 cuando los mismos ARN monocatenarios sin modificar se trataron con RNasa III en presencia de cationes de magnesio divalentes 10 mM. Aún más, los ARN monocatenarios no modificados tratados con RNasa III en presencia de cationes de magnesio divalentes 1-4 mM produjeron mucha menos toxicidad y muerte de los fibroblastos BJ en comparación con los mismos ARN monocatenarios no modificados tratados con RNasa III en presencia de cationes de magnesio divalentes 10 mM. Por ejemplo, en este experimento en particular, este es un factor principal de por qué se indujeron más de 100 iPSC en fibroblastos BJ transfectados todos los días durante 13 días con los 1,2 microgramos de una mezcla molar 3: 1: 1: 1: 1 de los ARN monocatenarios sin modificar codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y cMYC(T58A), respectivamente, que se trataron con RNasa III en presencia de cationes de magnesio divalentes 1 mM y acetato de potasio 200 mM como sal monovalente, mientras que no se observó la reprogramación de los fibroblastos BJ a iPSC cuando los mismos ARN monocatenarios sin modificar se trataron con RNasa III en presencia de cationes de magnesio divalentes 10 mM. Los expertos en la materia reconocerán especialmente el poder del presente procedimiento de tratamiento de RNasa III para preparar ARN monocatenario transcrito *in vitro* que es capaz de inducir un efecto biológico o bioquímico tras la introducción repetida o continua en células, en vista del hecho de que, se cree que, antes del trabajo descrito en el presente documento, nadie había informado o descrito en la técnica el uso de ARNm GAUC no modificados codificantes de factores iPSC para reprogramar células somáticas a células iPS que pudieran cultivarse en estirpes de células iPS y diferenciarse en otros tipos de células que representarían las tres capas germinales (como se describe en el presente documento). Por lo tanto, el procedimiento de tratamiento con RNasa III descrito en el presente documento proporciona, por primera vez, un procedimiento simple y directo para eliminar incluso cantidades mínimas de ARN bicatenario contaminante de ARNm sintetizado *in vitro*, resolviendo con ello satisfactoriamente el problema de toxicidad celular y muerte celular que resulta del uso de ARNm sintetizado *in vitro* no purificado o no tratado.

Como se desvela en Kariko y col. (Kariko y col., 2011), los Doctores Weissman y Kariko demostraron que se podía usar la HPLC para purificar ARNm sintetizado *in vitro* que comprendían nucleótidos modificados, tales como pseudouridina o pseudouridina y 5-metilcitidina, y, trabajando con los presentes solicitantes, mostraron que los ARNm modificados purificados por HPLC codificantes de factores de inducción iPSC se pueden usar para reprogramar células somáticas a células iPS. Los presentes solicitantes muestran en el presente documento que el procedimiento de tratamiento con RNasa III desvelado es aproximadamente equivalente a la purificación por HPLC para eliminar ARN bicatenario de ARNm sintetizado *in vitro* basándose en una comparación cuantitativa del número de células iPS inducidas a partir de fibroblastos usando ARNm modificados codificantes de factores de inducción iPSC purificados por HPLC o tratados con el tratamiento de RNasa III descrito en el presente documento (por ejemplo, véanse las tablas en los resultados para el EJEMPLO 15 y el EJEMPLO 27). Si bien la presente invención no se limita a ningún mecanismo o teoría en particular, y no es necesaria una comprensión del mecanismo o de la teoría para poner en práctica con éxito la presente invención, dado que los ARNm se purificaron como máximos únicos por HPLC, el hallazgo de los presentes inventores de que los ARNm tratados con RNasa III y purificados por HPLC parecen ser cuantitativamente equivalentes en la inducción de células iPS a partir de células somáticas sugiere con fuerza que el ARN bicatenario generado durante la reacción de transcripción *in vitro* es el único contaminante en los ARNm modificados con pseudouridina de cola de poli(A) con CAP1 que indujo las respuestas inmunes innatas que los presentes inventores observaron cuando no se purificaron los ARNm por HPLC ni se trataron usando el tratamiento de RNasa III descrito en el presente documento. Aún más, en vista de la equivalencia del tratamiento de RNasa III con la HPLC en términos de eliminación del contaminante de ARN bicatenario, los

expertos en la materia reconocerán las ventajas y los beneficios del procedimiento de tratamiento de RNasa III frente a la purificación por HPLC. Por ejemplo, el procedimiento de tratamiento con RNasa III descrito en el presente documento no requiere que los científicos aprendan cómo operar ni comprar equipos costosos, columnas y reactivos, y no requiere el lavado de columnas ni generar residuos de disolventes orgánicos, como ocurre con la HPLC. El tratamiento con RNasa III es mucho más rápido y sencillo que la HPLC, requiere un tiempo mínimo de práctica y solo unos 30 minutos para el tratamiento en sí, más una pequeña cantidad de tiempo adicional para la extracción orgánica, precipitación con acetato de amonio, lavados con etanol del precipitado, seguido del almacenamiento en forma de microgránulo seco o, si se desea, la suspensión en una solución acuosa. Cuando se realiza como se describe para el tratamiento convencional con RNasa III, los solicitantes han descubierto que el procedimiento es sumamente fiable y reproducible con al menos un par de docenas de ARNm diferentes. Por ejemplo, los solicitantes han usado rutinariamente el procedimiento de tratamiento con RNasa III para la preparación de ARNm codificantes de diferentes factores de transcripción que se transfectaron de forma repetida o continua en células humanas o animales para su uso en la reprogramación de las células de un estado de diferenciación a otro, sin encontrar problemas inesperados. Los solicitantes se sorprendieron de que, como se describe en el EJEMPLO 23, el tratamiento con RNasa III fue necesario para la reprogramación de células madre mesenquimales de ratón a mioblastos usando ARNm modificado codificante de MYOD. Por lo tanto, aunque solo se necesitaron dos transfecciones diarias para la reprogramación usando ARNm preparado usando el tratamiento con RNasa III, no se indujeron mioblastos por ARNm codificante de MYOD que no se había preparado usando el tratamiento de RNasa III descrito en el presente documento. Esto indica que los sensores de ARN o las respuestas inmunes innatas pueden inhibir un efecto biológico o bioquímico deseado incluso cuando solo se necesita una breve cantidad de tiempo y un pequeño número de transfecciones.

Los solicitantes también han usado el procedimiento de tratamiento de RNasa III para preparar otros ARNm para la transfección repetida o continua en células humanas o animales con el fin de inducir efectos biológicos o bioquímicos distintos de la reprogramación de células de un estado de diferenciación a otro, y han descubierto que los ARNm tratados con RNasa III resultantes eran menos tóxicos y se traducían en proteína a niveles más altos que los mismos ARNm que no se habían tratado con RNasa III.

En general, debido a la simplicidad del protocolo, el procedimiento de tratamiento de RNasa III también se puede usar para tratar muchos en ARN sintetizados *in vitro* simultáneamente en paralelo y, puesto que implica etapas simples, tales como el pipeteo, el procedimiento también se puede automatizar con el uso de un robot, o ampliarse a escala para el tratamiento de cualquier cantidad deseada de ARN.

Si la protección terminal y la poliadenilación de los ARN monocatenarios transcritos *in vitro* se realiza después de la traducción usando una enzima de protección terminal que comprende ARN guaniltransferasa y una polimerasa de poli (A), preferentemente, el tratamiento con RNasa III se realiza después de la transcripción *in vitro* y antes de la protección terminal y la poliadenilación. Sin embargo, los presentes inventores también han logrado buenos resultados (por ejemplo, para la reprogramación de células somáticas a iPSC) al aplicar el tratamiento con RNasa III a ARN monocatenarios después de la protección terminal o la poliadenilación. Como se muestra en el presente documento, el tratamiento con RNasa III también fue exitoso para eliminar el ARN bicatenario del ARN monocatenario transcrito *in vitro* que se protegió con caperuza durante la transcripción usando un análogo de caperuza dinucleotídico (por ejemplo, un ARCA) y/o se poliadenilizó durante la transcripción *in vitro* de un molde de ADN que también codificaba la cola de poli (A).

Como se ha mencionado anteriormente y en otra parte del presente documento, la reprogramación de fibroblastos a células iPS usando ARN monocatenario transcrito *in vitro* modificado o no modificado con pseudouridina no se observó a menos que se purificara el ARN monocatenario (por ejemplo, mediante un procedimiento tal como cromatografía (por ejemplo, HPLC), electroforesis, o se tratara usando el tratamiento con RNasa III descrito en el presente documento). Sin quedar ligados a teoría alguna, los presentes inventores creen que esto se debe a que las cantidades incluso pequeñas de ARN bicatenario contaminante, cuando se transfectan todos los días durante 18 días, producirían una alta toxicidad para las células. Por ejemplo, incluso pequeñas cantidades de ARN bicatenario contaminante inducen altos niveles de interferones de tipo I, que, a su vez, inhiben la traducción en las células en un mecanismo dependiente de PKR. Además, los interferones de tipo I inducen a miles de genes a defender las células contra la invasión por el ARN bicatenario, que es el mismo mecanismo que usa la célula para protegerse contra los virus de ARN bicatenario patógenos. Aún más, se ha informado que los interferones de tipo I y tipo II pueden sensibilizar a las células hacia la citotoxicidad inducida por ARN bicatenario, lo que podría inclinar la balanza de la necrosis a la apoptosis (Stewart II, WE y col., 1972; Kalai, M. y col. 2002. Por lo tanto, el hecho de que los ARN monocatenarios se introduzcan en las células todos los días durante varios días (por ejemplo, hasta 18 o más días para inducir células iPS) puede ser un factor importante en la citotoxicidad y la apoptosis. La respuesta inmune innata es inducida, lo que lleva a la producción de interferón, que, a su vez, hace que la traducción de proteínas disminuya o se desactive durante un tiempo más prolongado y, finalmente, las vías de señalización apoptótica se activen, lo que conduce a la muerte celular.

Por lo tanto, los presentes inventores creen que los procedimientos descritos en el presente documento son importantes, ya que reducen los niveles de ARN bicatenario contaminante de manera que se pueden introducir ARN monocatenarios purificados o tratados en las células sin inducir citotoxicidad ni muerte celular, incluyendo la introducción repetida de ARN monocatenarios purificados o tratados en células vivas humanas o animales (por

ejemplo, diariamente durante varios días o varias semanas para células en cultivo o, potencialmente, diariamente o semanalmente durante varias semanas, meses o incluso años cuando se introducen en células de un organismo humano o animal).

5 En algunas realizaciones, los procedimientos de tratamiento con RNasa III son útiles para la preparación de cualquier ARN monocatenario para la traducción o expresión en células humanas o animales, y se pueden realizar en múltiples muestras simultáneamente en menos de una hora, con solo minutos de manipulación. Debido a la simplicidad de los procedimientos, también son susceptibles de automatización y aumento a escala (por ejemplo, para aplicaciones de alto rendimiento).

10 Sorprendente e inesperadamente, cuando se usó este procedimiento para ARN monocatenarios tratados generados a partir de ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* que comprendían o que consistían en bien solo ribonucleósidos no modificados (G, A, C, U) o ribonucleósidos modificados con Ψ - y/o m⁵C codificantes de factores de inducción de iPSC (por ejemplo, OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y bien c-MYC, c-MYC(T58A) o L-MYC), los ARN monocatenarios tratados fueron altamente eficaces en la reprogramación de células somáticas humanas (por ejemplo, fibroblastos o queratinocitos) a células madre pluripotentes (iPSC) cuando se introdujeron en las células
15 una vez al día durante de ~10 a ~21 días, sin usar ningún agente que redujera la expresión de proteínas en una vía de respuesta inmune innata (por ejemplo, sin proteína B18R). Tras la creación de estirpes de iPSC estables (es decir, estirpes celulares que mantienen marcadores de células iPSC y la capacidad de diferenciarse en células de las 3 capas germinales durante un período de tiempo prolongado) de colonias de iPSC, se confirmó que se trataba de iPSC basadas en inmunotinción para marcadores de iPSC y se diferenciaron en células que representaban las
20 tres capas germinales usando un ensayo de diferenciación de cuerpos embrioides. La inducción de iPSC usando ARN monocatenarios sin un inhibidor o agente (por ejemplo, proteína B18R) que reduzca la expresión de una vía de respuesta inmune innata o usando ARN monocatenario que consista solo en ribonucleósidos canónicos no modificados no ha sido publicado por otros, y se cree y se muestra claramente el potencial del procedimiento para elaborar ARN monocatenario codificante de proteínas tratado para la traducción en células humanas o animales.

25 En determinadas realizaciones, los ARN monocatenarios tratados usando RNasa III comprenden una o más moléculas de ARN monocatenario diferentes que se tratan con la enzima RNasa III en un tampón de reacción que comprende cationes de magnesio divalentes a una concentración final de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM. En ciertas realizaciones preferidas, se tratan uno o más ARN monocatenarios diferentes usando un procedimiento de tratamiento de RNasa III con enzima RNasa III en un tampón de reacción que
30 comprende cationes de magnesio divalentes a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mM, más preferentemente de aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 2 mM o aproximadamente 3 mM. En algunas realizaciones, el procedimiento genera ARN monocatenario que está sustancialmente libre de ARN bicatenario, lo que significa que, después del tratamiento con RNasa III y de la limpieza, más del aproximadamente 99,5 % del ARN es ARN monocatenario y menos del aproximadamente 0,5% del ARN es ARN bicatenario de más
35 de aproximadamente 40 pb (o más de aproximadamente 30 pb). En algunas realizaciones, el procedimiento genera ARN monocatenario que está casi libre de ARN bicatenario, lo que significa que, después del tratamiento con RNasa III y de la limpieza, más del aproximadamente 99,9 % del ARN es ARN monocatenario y menos del aproximadamente 0,1% del ARN es ARN bicatenario de más de aproximadamente 40 pb (o más de aproximadamente 30 pb). En algunas realizaciones, el procedimiento genera ARN monocatenario que está
40 esencialmente libre de ARN bicatenario, lo que significa que, después del tratamiento con RNasa III y de la limpieza, más del aproximadamente 99,95 % del ARN es ARN monocatenario y menos del aproximadamente 0,05% del ARN es ARN bicatenario de más de aproximadamente 40 pb (o más de aproximadamente 30 pb). En algunas realizaciones, el procedimiento genera ARN monocatenario que está prácticamente libre de ARN bicatenario, lo que significa que, después del tratamiento con RNasa III y de la limpieza, más del aproximadamente 99,99 % del ARN es
45 ARN monocatenario y menos del aproximadamente 0,01% del ARN es ARN bicatenario de más de aproximadamente 40 pb (o más de aproximadamente 30 pb). En algunas realizaciones, el procedimiento genera ARN monocatenario que está extremadamente libre de ARN bicatenario, lo que significa que, después del tratamiento con RNasa III y de la limpieza, más del aproximadamente 99,999 % del ARN es ARN monocatenario y menos del aproximadamente 0,001% del ARN es ARN bicatenario de más de aproximadamente 40 pb (o más de
50 aproximadamente 30 pb). En algunas realizaciones, el procedimiento genera ARN monocatenario que está absolutamente libre de ARN bicatenario, lo que significa que, después del tratamiento con RNasa III y de la limpieza, más del aproximadamente 99,9998 % del ARN es ARN monocatenario y menos del aproximadamente 0,0002% del ARN es ARN bicatenario de más de aproximadamente 40 pb (o más de aproximadamente 30 pb).

55 En algunas realizaciones, la RNasa específica del ARN bicatenario es la RNasa III, y el procedimiento comprende tratar ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* con la RNasa III en una mezcla de reacción que comprende cationes divalentes de magnesio a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM, y luego retirar los productos de la digestión con RNasa III y los componentes de la mezcla de reacción para generar los ARN monocatenarios tratados que están sustancialmente, casi, esencial, práctica, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario.

60 En ciertas realizaciones preferidas, los ARN monocatenarios tratados con RNasa III generados usando los procedimientos no dan lugar a una respuesta inmune innata que produce la inhibición sustancial de la síntesis de proteínas celulares o la apoptosis inducida por ARN bicatenario tras la introducción de los ARN monocatenarios

tratados en las células al menos dos veces o al menos tres veces. En una realización preferida, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* codifican factores de inducción de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), las células que presentan un primer estado diferenciado son células somáticas humanas o animales, y los ARN monocatenarios tratados o ARN monocatenarios purificados se introducen en dichas células en cada uno de

5

aproximadamente 15 a aproximadamente 21 días (por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 días) para generar células que presentan un segundo estado diferenciado o fenotipo de una célula iPS.

Una realización de la invención es un procedimiento de fabricación de ARN monocatenarios tratados para su uso en la reprogramación de células eucariotas que presentan un primer estado diferenciado o fenotipo a células que

10

presentan un segundo estado diferenciado o fenotipo, introduciendo dichos ARN monocatenarios en dichas células al menos tres veces durante un período de al menos tres días, comprendiendo dicho procedimiento: (i) tratar uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro*, cada uno de los cuales codifica un factor de reprogramación, con RNasa III en una mezcla de reacción que comprende cationes de magnesio divalentes a una concentración de

15

aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM durante un tiempo suficiente y en condiciones en las que el ARN bicatenario es digerido para generar ARN monocatenarios tratados; e (ii) limpiar los ARN monocatenarios tratados para retirar los componentes de la mezcla de reacción de RNasa III y los productos de la digestión de ARN bicatenario para generar ARN monocatenarios que estén al menos esencial, práctica, extrema o absolutamente libres de ARN bicatenario.

En algunas realizaciones, los cationes divalentes de magnesio están a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM, o preferentemente, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM, o más

20

preferentemente, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3 mM, o lo más preferentemente, de aproximadamente 2 mM.

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además una sal monovalente a una concentración suficiente en la que las cadenas complementarias de ARN bicatenario contaminante permanecen hibridadas (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 mM, preferentemente, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100

25

mM, más preferentemente, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, o lo más preferentemente aproximadamente 200 mM). En algunas realizaciones, se puede usar una sal divalente en lugar de una sal monovalente, aunque no se prefiere una sal divalente. Por ejemplo, en algunas realizaciones de los procedimientos, la sal monovalente se selecciona del grupo que consiste en cloruro de amonio, acetato de amonio, glutamato de potasio, cloruro de potasio, acetato de potasio, acetato de sodio, clorato de sodio, cloruro de litio, cloruro de rubidio y

30

cloruro de sodio. Sin embargo, la invención no se limita a una sal monovalente en particular o a otra sal, aunque se prefieren algunas sales monovalentes, tales como el glutamato de potasio y el acetato de potasio. Cualquier sal que mantenga la fuerza iónica para mantener la naturaleza bicatenaria del ARN bicatenario contaminante durante el tratamiento con RNasa III, y en la que la RNasa III sea activa y el ARN monocatenario no se degrade, se puede usar para el procedimiento.

35

En algunas realizaciones, el tampón de reacción tiene un pH en el que el ARN monocatenario sintetizado *in vitro* es estable y la RNasa III es activa (por ejemplo, un pH entre ~7 y ~9).

De acuerdo con una realización, la presente invención proporciona un procedimiento que comprende: incubar una RNasa específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III) con una composición de ARN que comprende una o

40

más moléculas diferentes de ARN monocatenario y moléculas de ARN bicatenario contaminantes; y luego limpiar las moléculas de ARN monocatenario en la preparación tratada por precipitación salina, electroforesis en gel de agarosa o PAGE, cromatografía en columna (incluyendo el uso de una columna giratoria o columna de HPLC) o cualquier otro procedimiento conocido en la técnica, eliminando las moléculas de ARN bicatenario contaminantes digeridas y obteniéndose una composición de ARN purificado o tratado que comprende moléculas de ARN monocatenario.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas anteriormente están envasadas en un kit.

45

En algunas de las realizaciones de la invención, el procedimiento comprende además: introducir los ARN monocatenarios purificados o tratados, en el que dichos ARN monocatenarios purificados o tratados codifican proteínas específicas de una afección (por ejemplo, específicas del cáncer), en células inmunes humanas o animales *ex vivo* en cultivo (por ejemplo, linfocitos T o células presentadoras de antígenos tales como células

50

dendríticas) que presentan un primer estado diferenciado o fenotipo (bien en cultivo o en un sujeto humano o animal); y cultivar las células en condiciones en las que las células presenten un segundo estado diferenciado o fenotipo en el que expresen las proteínas o los péptidos específicos de la afección derivados.

En otras realizaciones más, la composición de ARN purificado o tratado, los ARN monocatenarios o ARNm creados usando un procedimiento de tratamiento con RNasa III de la invención, o que comprenden una composición de

55

mezcla de reacción o ARN de la invención, o que se usan en un procedimiento para inducir un efecto biológico o bioquímico (por ejemplo, para la reprogramación) codifican uno o más factores de transcripción, factores de crecimiento, citocinas, agrupamiento de moléculas de diferenciación (CD), interferones, interleucinas, proteínas de señalización celular, receptores de proteínas, hormonas proteicas, moléculas de anticuerpos o ARN largos no codificantes implicados en la diferenciación celular o en el mantenimiento de la misma.

En algunas realizaciones, la composición biológica que comprende la composición de ARN, o ARN monocatenario o ARNm que está sustancialmente, casi, esencial, práctica, extremada o absolutamente libre de moléculas de ARN bicatenario generada usando el procedimiento comprende o consiste en ARN monocatenario o ARNm que codifica una proteína en la superficie de las células humanas, que se clasifica como un agrupamiento de diferenciación o agrupamiento de moléculas de designación (CD), seleccionado del grupo que consiste en: CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD1e; CD2; CD3d; CD3e; CD3g; CD4; CD5; CD6; CD7; CD8a; CD8b; CD9; CD10; CD11a; CD11b; CD11c; CD11d; CDw12; CD14; CD16a; CD16b; CD18; CD19; CD20; CD21; CD22; CD23; CD24; CD25; CD26; CD27; CD28; CD29; CD30; CD31; CD32; CD33; CD34; CD35; CD36; CD37; CD38; CD39; CD40; CD41; CD42a; CD42b; CD42c; CD42d; CD44; CD45; CD46; CD47; CD48; CD49a; CD49b; CD49c; CD49d; CD49e; CD49f; CD50; CD51; CD52; CD53; CD54; CD55; CD56; CD57; CD58; CD59; CD61; CD62E; CD62L; CD62P; CD63; CD64; CD66a; CD66b; CD66c; CD66d; CD66e; CD66f; CD68; CD69; CD70; CD71; CD72; CD74; CD79a; CD79b; CD80; CD81; CD82; CD83; CD84; CD85a; CD85c; CD85d; CD85e; CD85f; CD85g; CD85h; CD85i; CD85j; CD85k; CD86; CD87; CD88; CD89; CD90; CD91; CD92; CD93; CD94; CD95; CD96; CD97; CD98; CD99; CD100; CD101; CD102; CD103; CD104; CD105; CD106; CD107a; CD107b; CD108; CD109; CD110; CD111; CD112; CD113; CD114; CD115; CD116; CD117; CD118; CD119; CD120a; CD120b; CD121a; CD121b; CD122; CD123; CD124; CD125; CD126; CD127; CD129; CD130; CD131; CD132; CD133; CD134; CD135; CD136; CD137; CD138; CD139; CD140a; CD140b; CD141; CD142; CD143; CD144; CD146; CD147; CD148; CD150; CD151; CD152; CD153; CD154; CD155; CD156a; CD156b; CD157; CD158a; CD158b1; CD158b2; CD158c; CD158d; CD158e; CD158f1; CD158g; CD158h; CD158i; CD158j; CD158k; CD158z; CD159a; CD159c; CD160; CD161; CD162; CD163; CD163b; CD164; CD165; CD166; CD167a; CD167b; CD168; CD169; CD170; CD171; CD172a; CD172b; CD172g; CD173; CD177; CD178; CD179a; CD179b; CD180; CD181; CD182; CD183; CD184; CD185; CD186; CD191; CD192; CD193; CD194; CD195; CD196; CD197; CDw198; CDw199; CD200; CD201; CD202b; CD203a; CD203c; CD204; CD205; CD206; CD207; CD208; CD209; CD210; CDw210b; CD212; CD213a1; CD213a2; CD214; CD215; CD217; CD218a; CD218b; CD220; CD221; CD222; CD223; CD224; CD225; CD227; CD228; CD229; CD230; CD231; CD232; CD233; CD234; CD235a; CD235b; CD236; CD238; CD239; CD240CE; CD240D; CD241; CD242; CD243; CD244; CD245; CD246; CD247; CD248; CD249; CD252; CD253; CD254; CD256; CD257; CD258; CD261; CD262; CD263; CD264; CD265; CD266; CD267; CD268; CD269; CD270; CD271; CD272; CD273; CD274; CD275; CD276; CD277; CD278; CD279; CD280; CD281; CD282; CD283; CD284; CD286; CD288; CD289; CD290; CD292; CDw293; CD294; CD295; CD296; CD297; CD298; CD299; CD300a; CD300b; CD300c; CD300d; CD300e; CD300f; CD300g; CD301; CD302; CD303; CD304; CD305; CD306; CD307a; CD307b; CD307c; CD307d; CD307e; CD309; CD312; CD314; CD315; CD316; CD317; CD318; CD319; CD320; CD321; CD322; CD324; CD325; CD326; CD327; CD328; CD329; CD331; CD332; CD333; CD334; CD335; CD336; CD337; CD338; CD339; CD340; CD344; CD349; CD350; CD351; CD352; CD353; CD354; CD355; CD357; CD358; CD360; CD361; CD362; y CD363. En realizaciones preferidas, el agrupamiento de molécula de diferenciación está al menos prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario.

En algunas realizaciones de las composiciones, las mezclas de reacción, el sistema, los kits y procedimientos de la invención para usar cualquiera de lo anterior, el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codifica una proteína seleccionada 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 citocina seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF-beta1), factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF), hormona estimulante de alfa-melanocitos (alfa-MSH); factor de crecimiento de tipo insulínico I (IGF-I); IL-4; IL-13; e IL-10; óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); una proteína de choque térmico; regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR); una enzima con actividad antioxidante seleccionada de entre catalasa, fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa-1 y superóxido dismutasa-2; tirosina quinasa de Bruton; adenosina desaminasa; ecto-nucleósido trifosfato difosfodilolasa; 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; DIOL; DISCI; DPYD; EKV; ENOI; 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; MY-OC; 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; TALI; TNFSF6; TNNT2; TPM3; TSHB; UMPK; UOX; UROD; USH2A; VMGLOM; VWS; WS2B; ABCB11; ABCG5; ABCG8; ACADL; ACP1; AGXT; AHRH; ALMS1; ALPP; ALS2; APOB; BDE; BDMR; BJS; BMPR2; CHRNA1; CMCWTD; CNGA3; COL3A1; COLA3; 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; ZFH1B; ACAA1; AGS1; AGT1; AHS; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTG; 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;
 AGA; AIH2; ALB; ASMD; BFHD; CNGA1; CRBM; DCK; DSPP; DTD2; ELONG; ENAM; ETFDH; EVC; F11; FABP2;
 5 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; 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; 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; IGAD1; IGF2R; ISCW; LAMA2; LAP; LCA5; LPA; MCDR1; MOCS1; MUT; MYB; NEU1; NKS1; NYS2; OA3;
 15 ODDD; OFC0; PARK2; PBCA; PBCRA1; PDB1; PEX3; PEX6; PEX7; PKHD1; PLA2G7; PLG; POLH; PAP;
 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;
 20 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;
 25 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;
 30 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;
 CPT1A; CTSC; DDB1; DDB2; DHCR7; DLAT; DRD4; ECB2; ED4; EVR1; EXT2; F2; FSHB; FTH1; G6PT1; G6PT2;
 35 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; OTTB1; 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;
 40 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; 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;
 45 RHOK; SCZD7; SGCG; SLC10A2; SLC25A15; STARP1; ZNF198; ACHM1; ARVD1; BCH; CTAA1; DAD1; DFNB5;
 EML1; GALT; GCH1; IBGC1; IGH@; grupo IGHC; IGHG1; IGHM; IGHR; IV; LTBP2; MJD; MNG1; MPD1; MPS3C;
 MYH6; MYH7; NP; NPC2; PABPN1; PSEN1; PYGL; RPRIP1; 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;
 50 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;
 PMM2; PXE; SALL1; SCA4; SCNN1B; SCNN1G; SLC12A3; TAT; TSC2; VDI; WT3; ABR; ACACA; ACADVL; ACE;
 55 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; NABP; NF1; NME1;
 P4HB; PAFAH1B1; PECAM1; PEX12; PHB; PMP22; PRKAR1A; PRKCA; PRKWNK4; PRP8; PRPF8; PTLAH;
 60 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; 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;
 65 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; AHD5; 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; FDPSL5; FGD1; FGS1; FMR1; FMR2; G6PD; GABRA3; GATA1; GDI1; GDX; GJB1; GK; GLA; GPC3; GRPR; GTD; GUST; HMS1; HPRT1; HPT; HTC2; HTR2c; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; INDX; IP1; IP2; JMS; KALI; KFSD; L1CAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MECP2; MF4; MGC1; MIC5; MIDI; MLLT7; MLS; MRSD; MRX14; MRX1; MRX20; MRX2; MRX3; MRX40; MRXA; MSD; MTM1; MYCL2; MYP1; NDP; NHS; NPHL1; NSOB1; 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; MTE; MTTG; MTTI; MTK; MTTL1; MTTL2; MTTN; MTP; 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; MTTT1488; MTTT1489; MTTT1490; MTTT1491; MTTT1492; MTTT1493; MTTT1494; MTTT1495; MTTT

proteína celular o apoptosis inducida por ARN bicatenario cuando dicha introducción de la composición de ARN purificado en una célula, o sujeto humano o animal vivo se repite al menos 3 veces (por ejemplo, cuando se introduce diariamente durante varias semanas, o diaria o semanalmente durante varias semanas, meses o años). En realizaciones preferidas del procedimiento de reprogramación de una célula somática humana o animal a una célula

5 IPS, la composición de ARN purificado o tratado no genera una respuesta inmune innata que sea suficiente para provocar una inhibición sustancial de la síntesis de proteína celular o apoptosis inducida por ARN bicatenario cuando dicha introducción de la composición de ARN purificado o tratado en una célula humana o animal viva se repita diariamente durante aproximadamente de 10-18 o más días.

10 En algunas realizaciones, se introducen los ARN monocatenarios purificados o tratados diariamente o dos veces al día, teniendo lugar dicha introducción aproximadamente 1 vez a la semana, 2 veces a la semana, 3 veces a la semana, 4 veces a la semana, 5 veces a la semana, 6 veces a la semana, o diariamente durante un período que consiste en: (i) hasta aproximadamente 4 semanas para las células en cultivo; o (ii) durante un período de semanas, meses o años para el sujeto humano o animal vivo.

15 En determinadas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para tratar, reducir o eliminar un síntoma o una enfermedad de un sujeto humano o animal que presente un estado patológico, que comprende: administrar al sujeto humano o animal una dosis eficaz de ARN monocatenarios purificados o tratados, mediante lo que el síntoma o la enfermedad se reduce o se elimina.

20 En algunas realizaciones, el ARN monocatenario tratado, o el ARN monocatenario purificado o tratado se usa para: reprogramar células que presentan un primer estado diferenciado o fenotipo a células que presentan un segundo estado diferenciado o fenotipo; compensar por una proteína carente o defectuosa; expresar una proteína deseada tal como un factor de transcripción, proteína de señalización celular, factor de crecimiento, interferón, interleucina, agrupamiento de molécula de diferenciación (CD) (por ejemplo, véase <http://www.uniprot.org/docs/cdlist.txt>), hormona proteica, receptor de proteína o un anticuerpo; expresar una molécula de ARN

25 larga no codificante implicada en la diferenciación (por ejemplo, ARN intergénico no codificante "HOTAIR" u HOX; Wan Y. y Chang H. Y., 2010); o modular o desencadenar una respuesta inmune específica de la enfermedad.

30 En determinadas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento de reprogramación de una célula eucariota que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo a una célula que presenta un segundo estado diferenciado o fenotipo. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el procedimiento comprende además: introducir los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados en una célula humana o animal que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo y cultivar la célula en condiciones en las que la célula presente un segundo estado diferenciado o fenotipo. En una realización preferida de este procedimiento, los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados son ARN monocatenarios purificados que codifican una proteína. En una realización preferida de este procedimiento, los ARN monocatenarios purificados codifican factores de inducción de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), las células que presentan un primer estado

35 diferenciado son células somáticas humanas o animales, y los ARN monocatenarios purificados se introducen en dichas células diariamente durante aproximadamente 7 a aproximadamente 21 días para generar células que presentan un segundo estado diferenciado o fenotipo que comprende iPSC.

40 En determinadas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para reducir o eliminar un síntoma o una enfermedad de un sujeto humano o animal que presente un estado patológico, que comprende: administrar, introduciéndola en el sujeto, la célula que presenta el segundo estado diferenciado o fenotipo, mediante lo que el síntoma o la enfermedad se reduce o se elimina.

45 En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos, el uno o más en ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* y/o los ARN monocatenarios purificados presentan al menos una secuencia UTR 5' heteróloga, secuencia de Kozak, secuencia IRES, o la secuencia UTR 3' que da lugar a una mayor traducción a la proteína codificada cuando dichos respectivos ARN monocatenarios se introducen en células eucariotas en comparación con los mismos ARN monocatenarios que no muestran dicha secuencia UTR 5' respectiva, secuencia de Kozak, secuencia IRES o secuencia UTR 3'. En algunas realizaciones preferidas particulares, la UTR 5' o UTR 3' es una secuencia presentada por un ARNm de alfa- (α)-globina o beta- (β)-globina de *Xenopus* o humano, o en las que la UTR 5' es una secuencia presentada por el ARN del virus del ataque químico del tabaco (TEV).

50 En algunas realizaciones de los procedimientos, los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados presentan una caperuza 5' que comprende 7-metilguanina o un análogo de caperuza antiinverso (ARCA). En algunas realizaciones, los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados comprenden además una caperuza 5' que tiene una estructura cap1, en la que el hidroxilo 2' de la ribosa del penúltimo nucleótido 5' se metila (por ejemplo, usando ARN 2'-O-metiltransferasa por ejemplo, usando el kit de 2'-O-metiltransferasa

55 SCRIPTCAP™, CELLSRIPT, Inc.).

En algunas realizaciones, en las que los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados presentan una caperuza 5', el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* usados en dicho procedimiento para dicho procedimiento presentan la caperuza en 5' (es decir, antes de dicho tratamiento). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* usados para dicho tratamiento comprenden

ARN monocatenarios protegidos con caperuza. En algunas de estas realizaciones, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* que presentan la caperuza 5' se sintetizaron antes de su uso para dicho tratamiento: (i) durante la transcripción mediante la incorporación de un análogo de caperuza (por ejemplo, un análogo de caperuza antiinverso o ARCA) durante la transcripción *in vitro* de (por ejemplo, usando el kit de transcripción MESSAGEMAX™ T7 ARCA-capped message o el kit de transcripción de ARN con 5^mC- y Ψ INCOGNITO™ T7 ARCA, CELLSRIPT, Inc., Madison, WI, EE.UU.); o (ii) tras la transcripción, incubando moléculas de ARN monocatenario transcritas *in vitro* con un sistema enzimático de protección con caperuza que comprende ARN guaniltransferasa en condiciones en las que las moléculas de ARN monocatenario transcritas *in vitro* son protegidas con caperuza 5', incluyendo cuando el sistema enzimático de protección con caperuza genera la metilación del hidroxilo 2' de la ribosa en el penúltimo nucleótido 5' (por ejemplo, usando el sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™, o usando un sistema de transcripción *in vitro* separado, tal como el kit de IVT de ARN convencional T7-SCRIBE™, el kit de transcripción de ARN con Ψ INCOGNITO™ T7 o el kit de transcripción de ARN con Ψ y 5mC INCOGNITO™ T7 para obtener ARN monocatenario, y el sistema de protección con caperuza de m⁷G SCRIPTCAP™ para obtener ARN cap0 (todos de CELLSRIPT, Inc.); en algunas realizaciones, el sistema enzimático de protección con caperuza produce además la metilación del hidroxilo 2' de la ribosa en el penúltimo nucleótido 5' para generar el ARN cap1, y el procedimiento comprende además: incubar con ARN 2'-O-metiltransferasa (por ejemplo, usando el kit de 2'-O-metiltransferasa SCRIPTCAP™, CELLSRIPT, Inc.).

En algunas realizaciones preferidas, en las que los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados presentan caperuza 5', el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* usados en dicho procedimiento para dicho tratamiento no están protegidos con caperuza, y el procedimiento comprende además: tras la transcripción, proteger con caperuza los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados para generar ARN monocatenarios tratados protegidos con caperuza en 5' o ARN monocatenarios purificados protegidos con caperuza 5'. En algunas realizaciones, dicha protección con caperuza después de la transcripción de los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados se realiza como se ha descrito anteriormente y/o como se describe en la literatura del producto proporcionada con el sistema de protección con caperuza de m⁷G SCRIPTCAP™, el kit de 2'-O-metiltransferasa SCRIPTCAP™ o el sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™ con respecto a los componentes del sistema enzimático de protección con caperuza (todos de CELLSRIPT, Inc., Madison, WI, EE.UU.).

En algunas realizaciones preferidas, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* usados para dicho tratamiento están sustancialmente libres de ARN no protegidos con caperuza que presentan un grupo trifosfato 5' (que se considera que es un tipo de "moléculas de ARN contaminantes" en el presente documento). En algunas realizaciones preferidas, los ARN monocatenarios tratados y/o los ARN monocatenarios purificados generados a partir de un procedimiento están sustancialmente libres de ARN no protegidos con caperuza que presentan un grupo trifosfato 5'. En determinadas realizaciones, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* usados para dicho tratamiento, los ARN monocatenarios tratados y/o los ARN monocatenarios purificados consisten en una población de moléculas de ARN monocatenario que tienen: (i) más del 90 % de moléculas de ARN monocatenario protegido con caperuza; (ii) más del 95 % de moléculas de ARN monocatenario protegido con caperuza; (iii) más del 99 % de moléculas de ARN monocatenario protegido con caperuza; o (iv) más del 99,9 % de moléculas de ARN monocatenario protegido con caperuza. En algunas realizaciones en las que la población de moléculas de ARN monocatenario también comprende moléculas contaminantes de ARN no protegido con caperuza que presentan un trifosfato 5', el procedimiento comprende además: incubar el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* usados para dicho tratamiento, o los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados generados a partir del procedimiento con una fosfatasa alcalina (por ejemplo, NTPPhosphatase™, epicentre technologies, Madison, WI, EE. UU.) o con ARN polifosfatasa 5' (epicentre technologies) para eliminar los grupos trifosfato de los ARN monocatenarios no protegidos con caperuza contaminantes; en algunas realizaciones, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* usados para dicho tratamiento, o los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados que se incuban con ARN polifosfatasa 5' se incuban además con nucleasa dependiente de fosfato 5' TERMINATOR™ o exorribonucleasa de Xrn1 (por ejemplo, de *Saccharomyces cerevisiae*) para digerir dichos ARN monocatenarios no protegidos con caperuza contaminantes. Estos procedimientos de incubación con fosfatasa alcalina o con ARN polifosfatasa 5' y con nucleasa dependiente de fosfato 5' TERMINATOR™ o exorribonucleasa de Xrn1 son particularmente útiles para eliminar los ARN monocatenarios no protegidos con caperuza de los ARN monocatenarios protegidos con caperuza que se crearon mediante la protección con caperuza durante la transcripción mediante la incorporación de un análogo de caperuza durante una reacción de transcripción *in vitro*.

En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro*, los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados se poliadenilan. En algunas realizaciones, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro*, los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados presentan una cola de poli A de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 nucleótidos. Sin embargo, la cola de poli A no está limitada con respecto al número de nucleótidos, y la cola de poli A puede presentar más de 200 o menos de 50 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro*, los ARN monocatenarios tratados y/o los ARN monocatenarios purificados presentan una cola de poli A de 50 a 100 nucleótidos, de 100 a 200 nucleótidos, de 150 a 200 nucleótidos o de más de 200 nucleótidos. En algunas realizaciones preferidas, el uno o

más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro*, los ARN monocatenarios tratados y/o los ARN monocatenarios purificados presentan una cola de poli A de 150 a 200 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* se poliadenilan mediante la transcripción *in vitro* de un molde de ADN que comprende una secuencia oligo (dT) terminal que es complementaria a la cola de poli-A. En algunas realizaciones preferidas, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro*, los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados se poliadenilan mediante poliadenilación posterior a la transcripción, usando una poli (A) polimerasa o poli-A polimerasa (por ejemplo, poli-A polimerasa derivada de *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*; o una poli-A polimerasa de origen comercial, por ejemplo, poli(A) polimerasa A-PLUS™, CELLSRIPT, Inc., Madison, WI 53713, EE.UU.). Sin embargo, a menos que se establezca específicamente con respecto a un procedimiento particular, la invención no se limita al uso de una poli(A) polimerasa particular, y se puede usar cualquier poli A) polimerasa adecuada. Una "poli(A) polimerasa" o "poli-A polimerasa" o "PAP", cuando se usa en el presente documento, significa una ARN polimerasa independiente del molde que se encuentra en la mayoría de los eucariotas, procariotas y virus eucariotas, que usa selectivamente ATP para incorporar restos de AMP a extremos 3'-hidroxilados de ARN. Dado que las enzimas PAP que se han estudiado en plantas, animales, bacterias y virus catalizan la misma reacción global (por ejemplo, véase Edmonds, M, 1990), están altamente conservadas estructuralmente (por ejemplo, véase Gershon, P, 2000) y carecen de especificidad intrínseca por secuencias o tamaños de moléculas de ARN particulares si la PAP se separa de las proteínas que reconocen las señales de poliadenilación AAUAAA (Wilusz, J y Shenk, T, 1988), se pueden usar enzimas PAP recombinantes y de tipo silvestre purificadas de cualquiera de una variedad de fuentes en los kits y procedimientos de la presente invención. La invención tampoco se limita a los procedimientos de poliadenilación del uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro*, los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados descritos en el presente documento, y se puede usar cualquier otro procedimiento adecuado en la técnica para dicha poliadenilación.

En algunas realizaciones de los procedimientos, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* comprenden al menos un ribonucleósido modificado seleccionado del grupo que consiste en pseudouridina (Ψ), 1-metil-pseudouridina ($m^1\Psi$), 5-metilcitidina (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 parte del correspondiente ribonucleósido canónico sin modificar. En algunas realizaciones en las que uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* comprenden al menos un ribonucleósido modificado, el al menos un ribonucleósido modificado se selecciona del grupo que consiste en: (i) pseudouridina (Ψ), 1-metil-pseudouridina ($m^1\Psi$), 5-metiluridina (m^5U), 2'-O-metiluridina (Um o $m^{2'O}U$), y 2-tiouridina (s^2U) en lugar de todos o sustancialmente todos los restos de uridina canónicos; (ii) 5-metilcitidina (m^5C) en lugar de todos o sustancialmente todos los restos de citidina canónicos; y/o (iii) N^6 -metiladenosina (m^6A) en lugar de todos o sustancialmente todos los restos de adenosina canónicos. En algunas realizaciones preferidas en las que uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* comprenden al menos un ribonucleósido modificado, el al menos un ribonucleósido modificado consiste en pseudouridina (Ψ) o 1-metil-pseudouridina ($m^1\Psi$) en lugar de todos o sustancialmente todos los restos de uridina canónicos, y/o 5-metilcitidina (m^5C) en lugar de todos o sustancialmente todos los restos de citidina canónicos. En algunas realizaciones preferidas, en las que los ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* comprenden pseudouridina (Ψ) o 1-metil-pseudouridina ($m^1\Psi$) en lugar de todos o sustancialmente todos los restos de uridina canónicos, los ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* también comprenden 5-metilcitidina (m^5C) en lugar de todos o sustancialmente todos los restos de citidina canónicos.

En algunas realizaciones de los procedimientos en las que uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* comprenden al menos un ribonucleósido modificado, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* se sintetizan mediante transcripción *in vitro* (IVT) de un molde de ADN que codifica cada uno de dichos al menos un factor de reprogramación proteico o polipeptídico usando una ARN polimerasa que inicia dicha transcripción a partir de un promotor de ARN polimerasa afín que está unido a dicho molde de ADN y ribonucleósidos trifosfato 5' (NTP) que comprenden al menos un ribonucleósido trifosfato 5' modificado seleccionado del grupo que consiste en pseudouridina 5' trifosfato (ΨTP), 1-Metil-pseudouridina 5' trifosfato ($m^1\Psi TP$), 5-metilcitidina 5' trifosfato (m^5CTP), 5-metiluridina 5' trifosfato (m^5UTP), 2'-O-metiluridina 5' trifosfato ($UmTP$ o $m^{2'O}UTP$), 2-tiouridina 5' trifosfato (s^2UTP) y N^6 -metiladenosina 5' trifosfato (m^6ATP); en algunas realizaciones preferidas, se usa el NTP modificado en lugar de todo o sustancialmente todo el NTP no modificado correspondiente en la reacción de IVT (por ejemplo, ΨTP , $m^1\Psi TP$, m^5UTP , $m^{2'O}UTP$ o s^2UTP en lugar de UTP ; m^5CTP en lugar de CTP ; o m^6ATP en lugar de ATP).

En algunas realizaciones de los procedimientos, uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* están sustancialmente libres de ribonucleósidos modificados (distintos de aquellos ribonucleósidos que comprenden la estructura de caperuza 5', si hay presente una caperuza 5', incluyendo el penúltimo nucleósido 5' cuando el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* presentan una estructura de caperuza cap1). En algunas realizaciones de los procedimientos, a excepción de los ribonucleósidos que comprenden la caperuza 5', si está presente, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* comprenden solo los ribonucleósidos canónicos G, A, C y U. En algunas realizaciones de los procedimientos, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* que codifican cada uno de dichos al menos un factor de reprogramación proteico o polipeptídico se sintetizaron mediante la transcripción *in vitro* de un molde de ADN mediante una ARN polimerasa usando los NTP canónicos: GTP, ATP, CTP y UTP.

En algunas de las realizaciones del procedimiento de fabricación de ARN monocatenarios purificados en el que el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* comprenden bien uno o más ribonucleósidos modificados (por

ejemplo, Ψ y/o m^5C) o solo ribonucleósidos no modificados (G, A, C y U) y codifican uno o más factores de reprogramación proteico o polipeptídico, el procedimiento comprende además: introducir los ARN monocatenarios purificados o tratados en una célula eucariota que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo al menos tres veces durante un período de al menos tres días; y cultivar las células en condiciones en las que las células presentan un segundo estado diferenciado o fenotipo. En algunas de estas realizaciones, la célula eucariota que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo es una célula somática humana o animal, los ARN monocatenarios purificados o tratados codifican factores de reprogramación que comprenden factores de inducción de células madre pluripotentes (células iPS) y las células que presentan un segundo estado diferenciado o fenotipo son células iPS; en estas realizaciones, la introducción de los ARN monocatenarios purificados o tratados al menos tres veces durante un período de al menos tres días significa aproximadamente al menos siete veces durante al menos siete días hasta aproximadamente al menos 21 veces durante al menos 21 días.

Sorprendente e inesperadamente, los presentes solicitantes descubrieron que este procedimiento de reprogramación de células eucariotas mediante la introducción en las células de ARN monocatenarios purificados o tratados codificantes de factores de inducción de células iPS dio lugar a la reprogramación de células somáticas humanas o animales (por ejemplo, fibroblastos, queratinocitos) a células iPS, tanto cuando se usaron ARN monocatenarios purificados o tratados que comprendían ribonucleósidos modificados tales como Ψ y/o m^5C , como cuando se usaron ARN monocatenarios purificados o tratados que consistían solamente en ribonucleósidos canónicos no modificados, G, A, C y U. Antes de los resultados de los presentes solicitantes, se cree que solo se usaban ARN monocatenarios modificados para reprogramar células. Antes de los resultados de los presentes solicitantes, se cree que nadie había mostrado nunca la reprogramación de células somáticas humanas o animales a células iPS con ARN monocatenarios que consistían únicamente en ribonucleósidos canónicos no modificados.

Aún más, antes de la obra desvelada en la presente solicitud, se cree que nadie había demostrado nunca la reprogramación de una célula somática humana o animal a una célula iPS usando ARN monocatenarios modificados sin poner en contacto las células con un inhibidor de la vía de señalización del interferón, tal como la proteína B18R como inhibidor del interferón de tipo I, antes de introducir dichos ARN monocatenarios codificantes de los factores de inducción de células iPS. Por lo tanto, la capacidad de los procedimientos de la presente invención para generar ARN monocatenarios purificados o tratados que produzcan la inducción eficaz de células iPS a partir de células somáticas humanas o animales demuestra además la importancia y la amplitud de este procedimiento para fabricar ARN monocatenarios purificados o tratados para la traducción en células vivas.

La capacidad de los procedimientos de la presente invención para generar ARN monocatenarios tratados que no activen los sensores de ARN o las vías de señalización de ARN, tales como las vías de TLR3, y que no induzcan las vías de la apoptosis, incluso tras la introducción de los ARN monocatenarios tratados en las células 18 o más veces durante al menos 18 días, demuestra además el poder de los procedimientos de la presente invención, y la ventaja comparativa de estos procedimientos frente a otros procedimientos conocidos en la técnica.

En determinadas realizaciones, los procedimientos de tratamiento de ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* con RNasa III se pueden realizar en menos de una hora, con solo unos cuantos minutos de tiempo de manipulación, y pudiéndose tratar simultáneamente muchos ARN monocatenarios diferentes, haciendo el procedimiento fácilmente adaptable a la producción de alto rendimiento de ARN monocatenarios purificados. Dado que, en determinadas realizaciones, ciertos procedimientos descritos en el presente documento comprenden principalmente una etapa enzimática, que puede, por ejemplo, realizarse mediante etapas de pipeteo simples, en algunas realizaciones, el presente procedimiento se realiza sin supervisión usando un robot de laboratorio. Por lo tanto, la invención proporciona, en determinadas realizaciones, un procedimiento automático de fabricación de ARN monocatenarios purificados para reprogramar células somáticas humanas o animales a células iPS o para reprogramar un tipo de célula somática a otro tipo de célula somática.

Además de lo anterior, los presentes solicitantes han descubierto también que los ARN monocatenarios purificados que comprenden nucleósidos modificados que se purifican mediante un procedimiento de purificación de HPLC también se pueden usar para la reprogramación de células somáticas humanas a células iPS, como se desvela en el presente documento. Sin embargo, los presentes procedimientos que usan el tratamiento con RNasa III son mucho más fáciles, más rápidos y más económicos en términos de tiempo, materiales y reactivos que los procedimientos de purificación por HPLC para generar ARN monocatenarios purificados para reprogramar células somáticas eucariotas a células iPS o para otras aplicaciones.

En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la invención, la composición de ARN tratado que comprende ARN monocatenario o ARNm se pone en contacto de manera repetida o continua con o se introduce de manera repetida o continua en una célula humana o animal (por ejemplo, de mamífero) que está *ex vivo* en cultivo o *in vivo* en un organismo, de modo que la composición de ARN es capaz de inducir un efecto biológico o bioquímico (por ejemplo, la reprogramación de la célula de un primer estado diferenciado o fenotipo a un segundo estado diferenciado o fenotipo). Por lo tanto, una realización de la invención es un procedimiento para inducir un efecto biológico o bioquímico en una célula humana o animal (por ejemplo, célula de mamífero), que comprende: introducir de manera repetida o continua una composición de ARN que comprenda uno o más ARN monocatenarios o ARNm codificantes de una o más proteínas (por ejemplo, uno o más factores de reprogramación proteicos, por ejemplo, uno o más factores de transcripción) en una célula humana o animal en

cultivo; y cultivar en condiciones en las que se induzca el efecto biológico o bioquímico.

En algunas realizaciones, el efecto biológico comprende la reprogramación de una célula eucariota que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo a una célula que presenta un segundo estado diferenciado o fenotipo. En algunas realizaciones, la célula humana o de mamífero que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo es una célula somática (por ejemplo, un fibroblasto, queratinocito o célula sanguínea), los ARN monocatenarios o ARNm codifican uno o más factores de reprogramación o factores de inducción de iPSC seleccionados del grupo que consiste en OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y una proteína de la familia MYC escogida entre c-MYC de tipo silvestre, c-MYC mutante (T58A) y L-MYC, y la célula que presenta el segundo estado diferenciado o fenotipo es una célula iPS. En algunas realizaciones, en las que la célula humana o de mamífero que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo es una célula somática (por ejemplo, un fibroblasto), dicho cultivo comprende cultivar las células en ausencia de células alimentadoras en presencia de al menos un inhibidor de molécula pequeña del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta o TGFβ), al menos un inhibidor de molécula pequeña de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK/ERK quinasa o MEK), o al menos un inhibidor de molécula pequeña para TGF-beta y MEK; en algunas de estas realizaciones, las células se cultivan: (i) en células alimentadoras; (ii) en un sustrato biológico que no comprende células alimentadoras vivas (por ejemplo, un extracto de matriz extracelular, por ejemplo, una mezcla de proteínas gelatinosa secretada por células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), por ejemplo, comercializada con nombres comerciales tales como MATRIGEL™ o CULTREX BME (BD Biosciences); o una o más biomoléculas, por ejemplo, proteína vitronectina humana purificada); (iii) directamente en la superficie de una placa de cultivo a la que el primer tipo de células se adhiere y crece para formar una monocapa en ausencia de células alimentadoras o de un sustrato biológico.

Otra realización de la presente invención es un medio de reprogramación libre de alimentador que consiste en medio Eagle modificado de Dulbecco con mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12; Invitrogen) complementado con sustitución de suero KNOCKOUT™ al 20 % (Invitrogen), GLUTAMAX™-I 2 mM (Invitrogen), solución de aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Invitrogen) e inhibidor de la vía de señalización de MEK 0,5-15 micromolar (por ejemplo, STEMOLE-CULE™ PD0325901, Stemgent, Cambridge, MA, EE.UU.). En algunas realizaciones, el medio de reprogramación libre de alimentador comprende además el inhibidor del factor de crecimiento transformante β (TGFβ) (por ejemplo, STEMOLECULE™ SB431542, Stemgent™). En algunas realizaciones, el medio de reprogramación libre de alimentador comprende además aproximadamente 100 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos recombinante humano básico. En algunas realizaciones, el medio de reprogramación libre de alimentador comprende además antibióticos de penicilina y estreptomina.

Como se muestra en el EJEMPLO 23, cuando se añadió ARN bicatenario de GAUC Luc2 sin modificar o ARN bicatenario de GAψC modificado diariamente durante dos días con el respectivo ARNm de GAUC o ARNm de GAψC codificante de ARNm de MYOD, la reprogramación de las células madre mesenquimales de ratón a mioblastos solo se indujo cuando la cantidad de ARN bicatenario de Luc2 añadida fue inferior al aproximadamente 0,01 % de la masa total de ARN usada para la reprogramación. Sin embargo, cuando se añadió ARN bicatenario de GAψm⁵C Luc2 diariamente durante dos días con ARNm de GAψm⁵C codificante de ARNm de MYOD, se indujeron mioblastos cuando el ARN bicatenario de Luc2 fue inferior al aproximadamente 0,1 % de la masa total de ARN de la composición de ARN.

Por lo tanto, una realización de la invención es un procedimiento de reprogramación de una célula no mioblástica humana o de mamífero (por ejemplo, una célula madre mesenquimal de ratón) a un mioblasto que comprende: diariamente, durante al menos dos días, introducir en células no mioblásticas una composición de ARN que comprende ARNm de GAUC sintetizado *in vitro* o ARNm de GAψC codificante de la proteína MYOD o un fragmento funcional o variante de la misma, en el que dicha composición de ARN está al menos prácticamente libre de ARN bicatenario; y cultivar en condiciones en las que al menos una parte de dichas células no mioblásticas se reprogramen o se diferencien en mioblastos.

Por lo tanto, otra realización de la invención es un procedimiento de reprogramación de una célula mioblástica humana o de mamífero (por ejemplo, una célula madre mesenquimal de ratón) a un mioblasto que comprende: diariamente, durante al menos dos días, introducir en células no mioblásticas una composición de ARN que comprenda ARNm sintetizado *in vitro* de GAψm⁵C codificante de la proteína MYOD o un fragmento funcional o variante de la misma, en la que dicha composición de ARN está al menos casi libre, esencialmente libre o más preferentemente prácticamente libre de ARN bicatenario; y cultivar en condiciones en las que al menos una parte de dichas células no mioblásticas se reprograma o diferencia en mioblastos.

Cuando se añadió ARN bicatenario de GAUC Luc2 sin modificar diariamente con los ARNm de GAψC codificantes de los factores de reprogramación ASCL1, MYT1L, NEUROD1 y POU3F2 (AMNP), las neuronas solo se indujeron cuando la cantidad de ARN bicatenario de GAUC Luc2 no modificado fue inferior al aproximadamente 0,01 % de la masa total de ARN usada para la reprogramación, y se generaron números significativos de neuronas solo si la cantidad de ARN bicatenario de GAUC Luc2 no modificado añadida fue inferior al aproximadamente 0,001 % de la masa total de ARN usada para la reprogramación. Cuando se añadió ARN bicatenario de GAψC Luc2 modificado diariamente con los ARNm de GAψC codificantes de los factores de reprogramación de AMNP, las neuronas se indujeron solo si la el ARN bicatenario de GAψC Luc2 modificado con pseudouridina fue inferior al aproximadamente 0,02 % de la masa total de ARN usada para la reprogramación, y se generaron números significativos de neuronas

solo si la cantidad de ARN bicatenario de GAUC Luc2 no modificado añadida fue inferior al aproximadamente 0,004 % de la masa total de ARN usada para la reprogramación. Estos resultados muestran, para ciertas realizaciones, que el ARN bicatenario, en general, se debe reducir a niveles inferiores (por ejemplo, usando los procedimientos de tratamiento con RNasa III descritos en el presente documento) para reprogramar fibroblastos humanos a células neuronales como se muestra en el EJEMPLO 24.

Por lo tanto, otra realización de la invención es un procedimiento de reprogramación de células somáticas no neuronales (por ejemplo, células fibroblásticas humanas) a células neuronales, comprendiendo el procedimiento: diariamente, durante varios días (por ejemplo, durante aproximadamente seis o más días), introducir, en células somáticas no neuronales *ex vivo* en cultivo, una composición de ARN que comprenda ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codificante de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en: ASCL1, MYT1L, NEUROD1 y POU3F2 o un fragmento funcional o variante de cualquiera de las mismas, en el que dicha composición de ARN está al menos prácticamente libre, o más preferentemente, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario; y cultivar en condiciones en las que al menos una parte de dichas células somáticas no neuronales se reprogramme o transdiferencie en células neuronales.

Otra realización de la invención es un procedimiento de reprogramación de un fibroblasto no cardíaco humano o de mamífero a un fibroblasto cardíaco, comprendiendo el procedimiento: diariamente, durante varios días, introducir, en fibroblastos humanos o de mamífero *ex vivo* en cultivo, una composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codificante de al menos un factor de transcripción o factor de reprogramación proteico seleccionado del grupo que consiste en: ETS2, MESP1, GATA4, HAND2, TBX5 y MEF2C, o un fragmento funcional o variante de cualquiera de los mismos, en el que la composición de ARN está prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario; y cultivar en condiciones en las que los fibroblastos no cardíacos se reprogramen a fibroblastos cardíacos.

Una realización de la invención es un procedimiento de reprogramación de un fibroblasto humano o de mamífero a células neuronales dopaminérgicas, comprendiendo el procedimiento: diariamente, durante varios días, introducir, en fibroblastos humanos o de mamífero *ex vivo* en cultivo, una composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codificante de al menos un factor de transcripción o factor de reprogramación proteico seleccionado del grupo que consiste en: ASCL1, EN1, FOXA2, LMX1A, NURR1 y PITX3, o un fragmento funcional o variante de cualquiera de los mismos; en el que la composición de ARN está extremadamente libre o está absolutamente libre de ARN bicatenario; y cultivar en condiciones en las que los fibroblastos se reprogramen a células neuronales dopaminérgicas.

Una realización de la invención es un procedimiento de reprogramación de un fibroblasto humano o de mamífero a hepatocitos, comprendiendo el procedimiento: diariamente, durante varios días, introducir, en fibroblastos humanos o de mamífero *ex vivo* en cultivo, una composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codificante de al menos un factor de transcripción o factor de reprogramación proteico seleccionado del grupo que consiste en: HNF1 α o un fragmento funcional o una variante del mismo, HNF4 α , FOXA1, FOXA2, FOXA3 y GATA4, o un fragmento funcional o una variante de cualquiera de los mismos; en el que la composición de ARN está absolutamente libre de ARN bicatenario; y cultivar en condiciones en las que los fibroblastos se reprogramen a hepatocitos.

En algunas realizaciones preferidas, la composición de ARN, o el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* que compone la composición de ARN que está prácticamente libre de ARN bicatenario, extremadamente libre de ARN bicatenario o absolutamente libre de ARN bicatenario es menos inmunogénica (o induce una respuesta inmune de manera detectable inferior o una respuesta inmune innata de manera detectable inferior) en dicha célula o en un tejido, órgano u organismo humano o animal (por ejemplo, de mamífero) que contiene dicha célula en comparación con una composición de ARN, o el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* que compone la composición de ARN que no está prácticamente libre de ARN bicatenario, extremadamente libre de ARN bicatenario o absolutamente libre de ARN bicatenario. En algunas realizaciones, la composición de ARN, o el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* que componen la composición de ARN se analiza para inducir una respuesta inmune innata de manera detectable inferior según lo detectado mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en: (i) detectar que la puesta en contacto repetida de la célula de mamífero con una cantidad del ARN modificado que da lugar a la expresión detectable de la proteína codificada después de un solo contacto no reduce de manera detectable la expresión de la proteína, mientras que la puesta en contacto repetida de la célula de mamífero con misma cantidad del ARN no modificado sí reduce de manera detectable la expresión de la proteína codificada; (ii) detectar que el ARN modificado da lugar a un nivel inferior de autofosforilación de la proteína quinasa activada por ARN (PKR) y/o de fosforilación del factor de inicio de la traducción eucariota (eIF2 α) en comparación con la misma cantidad del homólogo de ARN no modificado basado en ensayos de fosforilación *in vitro*; (iii) detectar que la cantidad de una o más citocinas inducidas por la célula de mamífero en respuesta al ARN no modificado es superior a la cantidad de dicha una o más citocinas inducidas por la célula de mamífero en respuesta a dicho homólogo de ARN modificado; (iv) detectar una diferencia en el nivel de expresión de uno o más marcadores de activación de células dendríticas (DC) en respuesta al ARN no modificado en comparación con el nivel de expresión de dicho uno o más marcadores de activación de DC en respuesta a la misma cantidad de dicho ARN modificado; (v) detectar una mayor capacidad relativa de dicho ARN modificado para actuar como un adyuvante para una respuesta inmune adaptativa en comparación con la misma cantidad de homólogo de ARN no modificado; (vi)

detectar un mayor nivel de activación de las moléculas de señalización del receptor de tipo Toll (TLR) en respuesta al ARN no modificado en comparación con la misma cantidad de dicho ARN modificado; y/o (vii) determinar la cantidad del ARN modificado para generar una respuesta inmune medida en cualquiera de las células (i) vi) en comparación con la cantidad de ARN no modificado para generar la misma respuesta inmune; en particular, en el que: dicha una o más citocinas de (iii) se seleccionan del grupo que consiste en: IL-12, IFN-alfa, TNF-alfa, RANTES, MIP-1alfa, MIP-1beta, IL-6, IFN-beta e IL-8; dichos marcadores de activación de DC de (iv) se seleccionan del grupo que consiste en: CD83, HLA-DR, CD80 y CD86; y/o dichas moléculas de señalización de TLR de (vi) se seleccionan del grupo que consiste en: moléculas de señalización detectable de la inmunogenicidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, la respuesta inmune innata inferior de manera detectable inducida por dicha composición de ARN, o por el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* que compone la composición de ARN que está prácticamente libre de ARN bicatenario, extremadamente libre de ARN bicatenario o absolutamente libre de ARN bicatenario en comparación con dicha composición de ARN o con el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* que compone la composición de ARN que no está prácticamente libre de ARN bicatenario, extremadamente libre de ARN bicatenario o absolutamente libre de ARN bicatenario es al menos 2 veces inferior usando al menos una de dichas células para determinar o medir dicha reducción detectable de la inmunogenicidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición de ARN, o el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* que compone la composición de ARN que está práctica, extrema o absolutamente libre de ARN bicatenario se analiza para inducir una respuesta inmune innata inferior de manera detectable como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20110143397, en particular, como se describe en el párrafo [0262] y en "Materiales y procedimientos para los Ejemplos 35-38" y/o como se describe y se muestra para las FIG. 22-24 del mismo.

Una realización de la invención es un procedimiento de preparación de una composición biológica (por ejemplo, una composición de ARN) que está al menos prácticamente libre de ARN bicatenario, comprendiendo el procedimiento: tratar la composición biológica (por ejemplo, una composición de ARN, o ARN monocatenario o ARNm que compone una composición de ARN) con una proteína específica del ARN bicatenario en una solución tamponada en condiciones en las que la proteína específica del ARN bicatenario se une y/o reacciona con los contaminantes de ARN bicatenario; y luego retirar la proteína específica del ARN bicatenario y los contaminantes de ARN bicatenario unidos o reaccionados para generar un preparado de ARN tratado (o ARN monocatenario o ARNm tratado que compone la composición de ARN) que esté al menos prácticamente libre de ARN bicatenario. Con respecto a los procedimientos, las composiciones o los kits de la presente invención, una "proteína específica del ARN bicatenario" en el presente documento significa una proteína que no es un anticuerpo, proteína que se une y/o reacciona con ARN bicatenario con una afinidad y especificidad mucho mayor que la que se une y/o reacciona con otras biomoléculas que no sean ARN bicatenario. En algunas realizaciones específicas, la proteína específica del ARN bicatenario es una ribonucleasa específica del ARN bicatenario (RNasa). En algunas realizaciones preferidas, la RNasa específica del ARN bicatenario es una endorribonucleasa (endoRNasa). Lo más preferentemente, la endoRNasa de los procedimientos, las composiciones o los kits de la invención es RNasa III.

Una realización preferida de la invención, en la que la proteína específica del ARN bicatenario es RNasa III, es un procedimiento de preparación de una composición biológica (por ejemplo, una composición de ARN) que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, comprendiendo el procedimiento: poner en contacto una composición biológica (por ejemplo, una composición de ARN, o ARN monocatenario o ARNm que compone una composición de ARN) con RNasa III en una solución tamponada que contiene una sal de magnesio que comprende cationes de magnesio a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM en condiciones en las que la RNasa III se une y/o reacciona con el ARN bicatenario que está presente en la solución para generar una composición biológica tratada que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario. Cuando se usa para fabricar una composición de ARN que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, este procedimiento a veces se denomina "tratamiento con RNasa III" o "procedimiento de tratamiento con RNasa III" en el presente documento. En algunas realizaciones preferidas del procedimiento de tratamiento con RNasa III, o realizaciones de las composiciones o los kits que comprenden o ponen en práctica el procedimiento de tratamiento con RNasa III, la solución tamponada comprende un tampón de Tris (por ejemplo, Tris-acetato 33 mM, pH 8) como tampón. En algunas otras realizaciones, se usa un tampón diferente que mantiene el pH a aproximadamente pH 7,5-8. En algunas realizaciones, se usa un tampón diferente o un pH diferente algo fuera del intervalo de pH 7,5-8. En realizaciones preferidas, la solución comprende además una sal monovalente a una concentración de al menos aproximadamente 50 mM, y más preferentemente, la solución comprende además una sal monovalente a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, y lo más preferentemente, la solución comprende además una sal monovalente a una concentración de aproximadamente 150 mM o superior a 150 mM. En algunas realizaciones del procedimiento, el procedimiento comprende además limpiar la composición biológica de la RNasa III y otros componentes de la solución. Algunas realizaciones de la invención comprenden una composición biológica (por ejemplo, una composición de ARN) o un kit que comprende una composición biológica (por ejemplo, una composición de ARN) que se genera usando los procedimientos de tratamiento con RNasa III descritos en el presente documento, en las que la composición biológica (por ejemplo, una composición de ARN, o ARN monocatenario o ARNm que compone una composición de ARN) está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario.

Algunas realizaciones preferidas de la invención en las que la composición biológica es una composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm son: (i) el procedimiento de fabricación de una composición biológica que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario; (ii) una composición biológica que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario fabricada usando el procedimiento; (iii) un kit que comprende una composición biológica que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario; o (iv) un kit para fabricar una composición biológica que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, en las que dicha composición de ARN está sustancialmente libre de ARN bicatenario, casi libre de ARN bicatenario, esencialmente libre de ARN bicatenario, prácticamente libre de ARN bicatenario, extremadamente libre de ARN bicatenario o absolutamente libre de ARN bicatenario, lo que significa, respectivamente, que menos del aproximadamente: 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,001 % o 0,0002 % del ARN de la composición de ARN comprende ARN bicatenario de un tamaño superior a 40 pares de bases (o superior a aproximadamente 30 pares de bases). En algunas realizaciones preferidas, la composición biológica comprende o consiste en una composición de ARN que comprende uno o más ARN monocatenarios o ARNm sintetizados *in vitro* (o el uno o más ARN monocatenarios o ARNm sintetizados *in vitro*) y el procedimiento comprende: poner en contacto la composición de ARN, o uno o más ARN monocatenarios o ARNm con RNasa III en una solución tamponada que comprende cationes de magnesio divalentes a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM y una sal monovalente a una concentración de al menos 50 mM; e incubar en condiciones en las que la RNasa III se una al ARN bicatenario y sea enzimáticamente activa; y luego limpiar la composición de ARN o los ARN monocatenarios o ARNm de la RNasa III y el resto de componentes, incluyendo los productos de la digestión con la RNasa III, para generar una composición de ARN tratado, o ARN monocatenarios o ARNm tratados que esté/n sustancialmente libre/s, casi libre/s, esencialmente libre/s, prácticamente libre/s, extremadamente libre/s o absolutamente libre/s de ARN bicatenario. En realizaciones preferidas de este procedimiento, la composición de ARN tratado, o los ARN monocatenarios o ARNm tratados está/n prácticamente libre/s, extremadamente libre/s o absolutamente libre/s de ARN bicatenario. En algunas realizaciones preferidas de este procedimiento, la sal monovalente tiene una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM. En algunas realizaciones preferidas del procedimiento, dicha limpieza de los ARN monocatenarios o ARNm comprende al menos una etapa seleccionada de: extracción con disolvente orgánico (por ejemplo, fenol y/o cloroformo), precipitación de los ARN monocatenarios o ARNm con acetato de amonio y lavado del precipitado con alcohol (por ejemplo, etanol al 70 %). En realizaciones preferidas, la limpieza no comprende una columna cromatográfica o un dispositivo de gel electroforético. En algunas realizaciones, dicha limpieza comprende una columna de centrifugación de filtración en gel (por ejemplo, dextrano reticulado). En determinadas realizaciones preferidas de este procedimiento, la solución tamponada comprende cationes de magnesio divalentes a una concentración de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 3,0 mM, o más preferentemente, de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM.

En algunas realizaciones del procedimiento de fabricación de una composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, el procedimiento comprende además al menos una etapa seleccionada de entre precipitación con acetato de amonio, precipitación con alcohol y extracción orgánica (por ejemplo, extracción con fenol y/o cloroformo), (por ejemplo, cada una como se describe en uno o más de los ejemplos presentados en el presente documento). En algunas realizaciones preferidas, la composición de ARN comprende ARN monocatenario o ARNm codificante de una o más proteínas. En algunas realizaciones preferidas del procedimiento de fabricación de una composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, el procedimiento no comprende ninguna cromatografía en columna (ya sea por gravedad o bajo presión, por ejemplo, HPLC o FPLC), electroforesis u otra etapa de separación que comprenda el uso de una resina, gel o membrana. Por lo tanto, algunas ventajas del presente procedimiento de preparación de una composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario son que no existe dicha separación, cromatografía, electroforesis ni se requiere instrumentación especial, requiriendo todo ello una formación especial, materiales (por ejemplo, columnas, membranas), trabajo y tiempo adicional (por ejemplo, empaquetamiento de columnas, lavado de columnas, procedimientos analíticos especiales), y por tanto, costes correspondientes, y necesidad de tiempo y procedimientos analíticos especiales. Por lo tanto, el presente procedimiento de preparación de composiciones de ARN es mucho más fácil, rápido y económico que otros procedimientos, mientras que genera composiciones de ARN que son iguales o mejores para su uso en procedimientos que comprenden poner en contacto las composiciones de ARN con una célula humana o animal (por ejemplo, inducir un efecto biológico o bioquímico, por ejemplo, para reprogramar una célula de un primer estado diferenciado o fenotipo a un segundo estado diferenciado o fenotipo). En vista de estas ventajas y beneficios frente a los procedimientos de purificación que comprenden un dispositivo de separación (por ejemplo, HPLC o electroforesis preparativa, se cree que el procedimiento descrito en el presente documento para preparar una composición de ARN tratado acelerará significativamente el trabajo en los procedimientos de uso de composiciones de ARN que comprenden ARN monocatenario o ARNm codificante de una o más proteínas, composiciones de ARN que están prácticamente libres, extremadamente libres o absolutamente libres de ARN bicatenario, para inducir un efecto

biológico o bioquímico mediante la introducción repetida o continua de dicha composición de ARN en una célula humana o animal (por ejemplo, de mamífero) (por ejemplo, una célula que está en cultivo *ex vivo* o *in vivo* en un tejido, órgano u organismo).

En otras realizaciones de las composiciones, de las mezclas de reacción, de los kits y procedimientos de la invención, el ARN monocatenario sintetizado *in vitro* no codifica una proteína o un polipéptido, sino que comprende al menos un ARN largo no codificante (ARNnc). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el ARN monocatenario presenta una secuencia de al menos un ARNnc largo. En algunas realizaciones de las composiciones, de las mezclas de reacción, de los kits y procedimientos de la invención, el ARN monocatenario sintetizado *in vitro* presenta una secuencia de al menos un ARNnc largo que es capaz de producir un efecto biológico o bioquímico tras su introducción repetida o continua en una célula humana o animal (por ejemplo, una célula de mamífero). En alguna realización de las composiciones, de los kits y procedimientos de la invención, el ARN monocatenario es al menos un ARNnc largo referido a "ARN intergénico no codificante HOX" (Woo C. J. y Kingston R. E., 2007), también conocido como "HOTAIR", "HOXAS", "HOXC-AS4", "HOXC11-AS1" o "NCRNA00072".

Algunas realizaciones de la invención comprenden (i) un procedimiento de preparación de una composición biológica (por ejemplo, una composición de ARN) que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario; o (ii) una mezcla de reacción o composición biológica (por ejemplo, una mezcla de reacción) que se genera usando el procedimiento de preparación de una composición biológica que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario; o (iii) un kit que comprende una composición biológica que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario; o (iv) un kit para fabricar una composición biológica que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, en las que la composición biológica no comprende una composición de ARN, o ARN monocatenario o ARNm que componga una composición de ARN. Con respecto a estas realizaciones de la invención, "sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario", pretende significar que la composición biológica de la solución final en la que se pone en contacto con células humanas o animales contiene: menos de aproximadamente 5 nanogramos de ARN bicatenario por ml de solución, menos de aproximadamente 1 nanogramo de ARN bicatenario por ml de solución, menos de aproximadamente 500 picogramos de ARN bicatenario por ml de solución, menos de aproximadamente 100 picogramos de ARN bicatenario por ml de solución, menos de aproximadamente 10 picogramos de ARN bicatenario por ml de solución o menos de aproximadamente 2 picogramos de ARN bicatenario por ml de solución, respectivamente. En realizaciones particulares del procedimiento, de la composición biológica o del kit que comprende una composición biológica que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, la composición biológica comprende uno o más productos biológicos seleccionados del grupo que consiste en: ADN bicatenario (ADNbc), ADN monocatenario (ADNmc), proteínas, hidratos de carbono, lípidos, glicoproteínas, lipoproteínas, factores de crecimiento, citocinas, extractos celulares, matrices extracelulares, suero, fluidos biológicos, membranas biológicas y medios.

En algunas realizaciones del procedimiento de fabricación de una composición biológica (por ejemplo, una composición de ARN) que está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, el procedimiento comprende además poner en contacto la solución con una o más desoxirribonucleasas (DNasas) para generar una composición biológica que esté casi libre, prácticamente libre o extremadamente libre de ADN, lo que significa que la composición biológica de la solución final en la que se pone en contacto con células humanas o animales contiene menos de aproximadamente un nanogramo de ADN por ml de solución, menos de aproximadamente 100 picogramos de ADN por ml de solución, o menos de aproximadamente 10 picogramos de ADN por ml de solución. En algunas realizaciones, la DNasa es una "DNasa de tipo I", es decir, una endodesoxirribonucleasa que digiere ADN monocatenario y bicatenario a oligonucleótidos cortos que tienen un grupo fosfato 5' y un hidroxilo 3' (por ejemplo, DNasa I pancreática humana, bovina o porcina). En algunas realizaciones, la DNasa es una exodesoxirribonucleasa 3' a 5' específica monocatenario que carece de actividad ribonucleasa, pero que digiere los oligodesoxirribonucleótidos que tienen un grupo hidroxilo 3' libre a 5'-monodesoxirribonucleótidos (por ejemplo, exonucleasa I de *Escherichia coli*). En algunas realizaciones, se usan DNasas múltiples. Por lo tanto, en algunas realizaciones de las composiciones biológicas o de los kits que comprenden una composición biológica que está sustancialmente libre de ARN bicatenario, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre de ARN bicatenario, extremadamente libre de ARN bicatenario o absolutamente libre de ARN bicatenario, la composición biológica o el kit también está casi libre, prácticamente libre o extremadamente libre de ADN.

En determinadas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la invención, la composición de ARN se trata o se purifica para que esté al menos casi libre de ARN bicatenario (por ejemplo, casi libre de ARN bicatenario, prácticamente libre de ARN bicatenario, extremadamente libre de ARN bicatenario o absolutamente libre de ARN bicatenario) mediante la separación del ARN monocatenario o ARNm de contaminantes de ARN que comprenden dicha composición de ARN usando uno o más medios de separación cromatográfica o electroforética (por ejemplo, usando un procedimiento de separación cromatográfica o electroforética mencionado en otra parte del presente documento). En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos, de las

composiciones o de los kits, la composición de ARN se purifica para que esté al menos casi libre de ARN bicatenario (por ejemplo, casi libre de ARN bicatenario, prácticamente libre de ARN bicatenario, extremadamente libre de ARN bicatenario o absolutamente libre de ARN bicatenario) mediante la separación del ARN monocatenario o ARNm de los contaminantes de ARN por HPLC. En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos, de las composiciones o de los kits, el ARN bicatenario o ARNm sintetizado *in vitro* que compone la composición de ARN se purificó (por ejemplo, para estar casi libre de ARN bicatenario, prácticamente libre de ARN bicatenario, extremadamente libre de ARN bicatenario o absolutamente libre de ARN bicatenario) mediante HPLC, y se analizó su pureza e inmunogenicidad como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20110143397, en particular, como se describe en el párrafo [0262] y en "Materiales y procedimientos para los Ejemplos 35-38" y/o como se describe y se muestra para las FIG. 22-24 del mismo.

Otra realización más de la invención es un procedimiento para inducir un efecto biológico o bioquímico en una célula humana o de otro mamífero, bien *ex vivo* en cultivo o *in vivo* en un organismo humano o de mamífero, que comprende: poner en contacto de manera repetida o continua la célula con la composición de ARN al menos prácticamente libre de ARN bicatenario durante varios días en condiciones en las que la composición de ARN se introduce en la célula y se induce un efecto biológico o bioquímico. En algunas realizaciones, la composición de ARN al menos prácticamente libre de ARN bicatenario comprende ARN monocatenario o ARNm que codifica uno o más factores de reprogramación, y el efecto biológico o bioquímico comprende reprogramar las células de un primer estado diferenciado o fenotipo a un segundo estado diferenciado o fenotipo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento rápido y eficaz para cambiar el estado de diferenciación o fenotipo de una célula humana o de mamífero. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de ARN al menos prácticamente libres de ARN bicatenario que comprenden ARN monocatenario o ARNm y procedimientos para su uso en la reprogramación de células somáticas humanas o de mamífero a células madre pluripotentes. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones al menos prácticamente libres de ARN bicatenario usadas para dicho procedimiento están prácticamente libres de ARN bicatenario, extremadamente libres de ARN bicatenario o absolutamente libres de ARN bicatenario.

Ciertas realizaciones de la presente invención proporcionan procedimientos *ex vivo*, y composiciones y kits para reprogramar rápida y eficazmente células humanas o animales en cultivo de un primer estado diferenciado o fenotipo a un segundo estado diferenciado o fenotipo introduciendo de forma repetida o continua ARNm sintetizados *in vitro* purificados o tratados codificantes de múltiples proteínas (por ejemplo, factores de reprogramación) en las células durante varios días, mediante lo que se induce el segundo estado diferenciado o fenotipo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se reprogramaron (se desdiferenciaron) células somáticas humanas, tales como fibroblastos o queratinocitos, a células madre pluripotentes inducidas mediante la introducción repetida de ARNm sintetizados *in vitro* codificantes de múltiples proteínas de factores de reprogramación de iPSC en las células diariamente durante varios días. En otras realizaciones, se reprogramaron (se transdiferenciaron) células somáticas no neuronales humanas, tales como fibroblastos, a células neuronales mediante la introducción repetida de ARNm codificante de múltiples proteínas de factores de reprogramación de células neuronales diariamente durante varios días. En otras realizaciones más, se reprogramaron (se diferenciaron) células madre mesenquimales de ratón a mioblastos mediante la introducción de ARNm codificante de la proteína MYOD diariamente durante dos días. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona procedimientos generales para reprogramar células de un primer estado diferenciado a un segundo estado diferenciado mediante la introducción repetida o continua de ARNm codificante de una o más proteínas en las células diariamente durante 2 o más días.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para inducir un efecto biológico o bioquímico en una célula humana o animal (por ejemplo, una célula de mamífero; por ejemplo, una célula en cultivo o *in vivo*, o en un tejido, órgano u organismo que las contenga) que comprende: introducir de forma repetida o continua dichos ARNm sintetizados *in vitro* tratados y/o purificados codificantes de una o más proteínas que son capaces de inducir el efecto biológico o bioquímico deseado en dichas células. En algunas realizaciones de los procedimientos, El efecto biológico o bioquímico comprende la reprogramación de una célula de un primer estado de diferenciación o fenotipo a un segundo estado de diferenciación o fenotipo. En algunas realizaciones de los procedimientos, la célula es una célula del sistema inmune humano o animal (por ejemplo, de mamífero), el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codifica una o más proteínas que comprenden la superfamilia de las inmunoglobulinas, y el efecto biológico o bioquímico comprende la unión de una o más proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresadas en la superficie de las células del sistema inmune a una o más proteínas o polipéptidos exógenos, proteínas o polipéptidos exógenos que bien están libres o están en o sobre la superficie de una célula que no es del sistema inmune, iniciando así un mecanismo de respuesta inmune en respuesta a dicha proteína o polipéptido exógeno. En algunas realizaciones de los procedimientos, la célula es una célula presentadora de antígeno (APC), tal como una célula dendrítica humana o de mamífero, y el efecto biológico o bioquímico comprende la presentación de un péptido derivado de dicha una o más proteínas codificadas por el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* en la superficie de la APC; en ciertas realizaciones preferidas, la composición que comprende ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* no da lugar a la producción de interferón. En otras realizaciones de los procedimientos, la célula es una célula humana o de mamífero que contiene un gen mutante codificante de una proteína defectuosa, y el efecto biológico o bioquímico comprende expresar una o más proteínas codificadas por el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* en dichas células, sustituyendo o compensando así la proteína defectuosa.

En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la presente invención, el ARN monocatenario o ARNm codifica una proteína. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la presente invención, el ARN monocatenario o ARNm codifica una proteína funcional, en las que el término "funcional" significa que la proteína es capaz de causar un cambio bioquímico o un efecto biológico (por ejemplo, tratamiento terapéutico, tal como la reducción de síntomas en un sujeto), ya sea directa o indirecta (por ejemplo, a través de una vía de señalización), en una célula en la que está presente la proteína o en otra célula afectada por la proteína o por la célula en la que se expresa la proteína. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la presente invención, el ARN monocatenario o ARNm codifica un factor de transcripción. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la presente invención, el ARN monocatenario o ARNm codifica una enzima. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la presente invención, el ARN monocatenario o ARNm codifica un agrupamiento de diferenciación o molécula CD. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la presente invención, el ARN monocatenario o ARNm codifica un anticuerpo. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la presente invención, el ARN monocatenario o ARNm codifica una proteína que está presente sobre o en una membrana celular. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la presente invención, el ARN monocatenario o ARNm codifica una proteína que comprende un receptor para una vía de señalización. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la presente invención, el ARN monocatenario o ARNm codifica una proteína efectora inmune. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la presente invención, el ARN monocatenario o ARNm codifica una proteína de complemento de un sistema inmune de vertebrado. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la presente invención, el ARN monocatenario o ARNm comprende una multiplicidad de moléculas de ARNm diferentes que codifican una multiplicidad de diferentes proteínas.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones, kits y procedimientos rápidos y eficaces para cambiar el estado de diferenciación de una célula eucariota humana o animal. Por ejemplo, la presente invención proporciona moléculas de ARN monocatenario o ARNm y procedimientos para su uso en la reprogramación de células, tales como en la reprogramación de células somáticas humanas o animales a células madre pluripotentes.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o estado diferenciado o fenotipo de una célula humana o animal que comprende: introducir ARNm codificante de al menos un factor de reprogramación en una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo para generar una célula reprogramada que presente un segundo estado diferenciado o fenotipo (y composiciones y kits para ello). En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o estado diferenciado o fenotipo de una célula humana o animal (por ejemplo, una célula de mamífero) que comprende: de forma repetida o continua, durante un período de al menos dos días, introducir ARNm codificante de al menos un factor de reprogramación proteico en una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo para generar una célula reprogramada que presente un segundo estado diferenciado o fenotipo (y composiciones y kits para ello). En realizaciones particulares, la introducción comprende introducir ARNm codificante de una pluralidad de factores de reprogramación en la célula. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para cambiar el estado diferenciado o estado de diferenciación de una célula que comprende: introducir un ARNm codificante de un factor de inducción de células iPS en una célula somática para generar una célula reprogramada (y composiciones y kits para ello). En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para cambiar el estado diferenciado o estado de diferenciación de una célula que comprende: de forma repetida o continua, durante un período de al menos dos días, introducir un ARNm codificante de al menos una proteína que comprende un factor de inducción de células iPS en una célula somática para generar una célula reprogramada (y composiciones y kits para ello). En determinadas realizaciones, la introducción comprende administrar el ARNm a la célula somática con un reactivo de transfección. En determinadas realizaciones, la introducción comprende administrar el ARNm a la célula somática mediante electroforesis. En algunas realizaciones, la introducción se repite diariamente durante al menos 3 días. En algunas realizaciones, la introducción se repite diariamente durante al menos 4-8 días. En algunas realizaciones, la introducción se repite diariamente durante al menos 8-10 días. En algunas realizaciones preferidas, la introducción se repite diariamente durante de al menos 10 a 18 días. En algunas realizaciones, la introducción se repite diariamente durante más de 18 días. En algunas realizaciones, la célula reprogramada es una célula desdiferenciada, y el proceso que ocurre en este procedimiento se denomina "desdiferenciación". Una realización de una célula desdiferenciada es una célula madre pluripotente inducida o célula iPS (o iPSC). En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos, la célula reprogramada es una célula iPS. En realizaciones adicionales de los procedimientos, la célula reprogramada es una célula transdiferenciada, y el proceso que ocurre en este procedimiento se denomina "transdiferenciación". En otras realizaciones, la célula que presenta el segundo estado de diferenciación o fenotipo es una célula somática diferenciada o rediferenciada, y el proceso que tiene lugar en este procedimiento se denomina "diferenciación" o "rediferenciación". En algunas realizaciones, la introducción se repite diariamente durante al menos 2 días, el ARNm codifica la proteína MYOD, la célula que presenta el primer estado de diferenciación o primer estado diferenciado es una célula somática (por ejemplo, un fibroblasto o un queratinocito) o una célula madre mesenquimal, y la célula que presenta el segundo estado diferenciado es un mioblasto. En estas realizaciones, si la célula que presenta el primer estado diferenciado es una célula somática (por

ejemplo, un fibroblasto o queratinocito), el proceso es la transdiferenciación, mientras que si la célula que presenta el primer estado diferenciado es una célula madre mesenquimal, el proceso es la diferenciación. En algunas realizaciones, en las que la introducción se repite diariamente durante al menos 4-9 días, el ARNm codifica las proteínas ASCL1, MYT1L, NEUROD1 y POU3F2, la célula que presenta el primer estado de diferenciación o primer estado diferenciado es una célula somática (por ejemplo, un fibroblasto o un queratinocito), y la célula que presenta el segundo estado diferenciado es una célula neuronal; en esta realización, el proceso es la transdiferenciación. En algunas realizaciones, en las que la introducción se repite diariamente durante al menos 4-8 días, al menos 8-10 días, al menos de 10 a 18 días o durante más de 18 días, el ARNm codifica las proteínas OCT4, SOX2, KLF4 y al menos una proteína MYC seleccionada del grupo que consiste en c-MYC larga de tipo silvestre, c-MYC(T58A) mutante, c-MYC corta de tipo silvestre y L-MYC, la célula que presenta el primer estado de diferenciación o primer estado diferenciado es una célula somática (por ejemplo, un fibroblasto o un queratinocito), y la célula que presenta el segundo estado diferenciado es una célula iPS, y el proceso es la desdiferenciación o inducción de células iPS; en algunas de estas realizaciones, el ARNm codifica además una o ambas proteínas LIN28 y NANOG. En algunas realizaciones en las que se usan ARNm codificantes de múltiples proteínas diferentes, la introducción comprende introducir una mezcla de ARNm codificantes de todas las proteínas, en la que cada ARNm codificante de una proteína particular está presente en la misma cantidad molar que cada uno de los otros ARNm codificantes de otras proteínas. En algunas otras realizaciones, uno o más ARNm están presentes en una proporción molar diferente a los otros ARNm codificantes de otras proteínas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones en las que los ARNm codifican OCT4, SOX2, KLF4, una o ambas LIN28 y NANOG, y al menos una proteína MYC seleccionada del grupo que consiste en c-MYC larga de tipo silvestre, c-MYC(T58A) mutante, c-MYC corta de tipo silvestre y L-MYC, el ARNm codificante de OCT4 está presente en la mezcla de ARNm aproximadamente en un exceso molar del triple en comparación con los ARNm particulares introducidos codificantes de SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y la al menos una proteína de la familia MYC; en algunas otras realizaciones, además del exceso molar superior de ARNm codificante de OCT4, el ARNm codificante de KLF4 está presente en la mezcla de ARNm aproximadamente en un exceso molar de 1,5 veces a 3,5 veces en comparación con los ARNm particulares introducidos codificantes de SOX2, LIN28, NANOG y la al menos una proteína de la familia MYC.

En ciertas realizaciones preferidas de los procedimientos para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o fenotipo de una célula, el procedimiento se realiza sin el uso de ninguna proteína exógena, ARNip o agente de molécula pequeña que inhiba o reduzca la activación, la inducción o la expresión de una o más proteínas en una vía de respuesta inmune innata. Por ejemplo, en algunas realizaciones de los procedimientos para cambiar o reprogramar el estado diferenciado o fenotipo de una célula humana o animal, no se usa ARNip ni proteína (por ejemplo, proteína B18R), anticuerpo o inhibidor de molécula pequeña de una vía de respuesta inmune innata para dicha reprogramación. En otras realizaciones, los procedimientos comprenden además: tratar las células que presentan el primer estado diferenciado o fenotipo con una proteína, ARNip o agente de molécula pequeña que inhiba o reduzca la activación, la inducción o la expresión de uno o más sensores de ARN o proteínas en una vía de respuesta inmune innata, en los que dicho tratamiento se produce antes y/o durante dicha introducción de un ARNm codificante de un factor de reprogramación. En algunas realizaciones, el agente que inhibe o reduce la activación, la inducción o la expresión de uno o más sensores de ARN o proteínas en una vía de respuesta inmune innata es proteína B18R. En algunas otras realizaciones, el agente es un ARNm codificante de una proteína que inhibe o reduce la activación, la inducción o la expresión de una o más proteínas que comprenden un sensor de ARN o una vía de respuesta inmune innata. En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor es un ARNm codificante de la proteína B18R. En algunas otras realizaciones preferidas, el inhibidor es un ARNm codificante de la proteína del gen E3L del virus Vaccinia; en realizaciones preferidas, el ARNm codificante de la proteína del gen E3L del virus Vaccinia se introduce en la célula al mismo tiempo que se introducen los ARNm codificantes de uno o más factores de reprogramación o factores de inducción de células iPS.

En ciertas realizaciones preferidas de los procedimientos para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o fenotipo de una célula, el procedimiento de reprogramación se realiza añadiendo un inhibidor de RNasa (por ejemplo, inhibidor de RNasa SCRIPTGUARD™, CELLSRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.) a los medios o las composiciones que comprenden ARN monocatenario o ARNm usados para dicha reprogramación. Además, algunas realizaciones preferidas de las composiciones o de los kits para dicha reprogramación comprenden además un inhibidor de RNasa.

En algunas realizaciones preferidas de las composiciones, de los kits y de los procedimientos de la invención, el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* comprende una caperuza 5' o caperuza (por ejemplo, una caperuza que comprende 7-metilguanina) en su extremo 5' y una cola de poli (A) en su extremo 3'. En algunas realizaciones, la caperuza 5' se incorpora al ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* de forma durante la transcripción mediante el uso de un análogo de caperuza dinucleotídico durante la transcripción *in vitro*. En algunas realizaciones, la caperuza 5' se incorpora al ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* después de la transcripción, mediante la incubación de ARN monocatenario no protegido con caperuza obtenido a partir de una reacción de transcripción *in vitro* con una enzima de protección con caperuza que comprende actividad ARN guaniltransferasa. En algunas realizaciones, la caperuza 5' comprende además un penúltimo nucleótido 5'-terminal que presenta un grupo 2'-O-metilo en su fracción de ribosa; en algunas de estas realizaciones, el grupo 2'-O-metilo se incorpora al ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* usando ARN 2'-O-metiltransferasa. En algunas realizaciones preferidas, el ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* presenta además una o más secuencias seleccionadas entre una

región no traducida o UTR (por ejemplo, una UTR que potencia más la traducción de proteínas en una célula en la que se introduce el ARN monocatenario o ARNm, por ejemplo, la UTR 5' y/o UTR 3' de ARNm de alfa- (α -)globina o beta- (β -)globina de *Xenopus*, humano o de otro mamífero, o una secuencia UTR presentada por el ARN del virus del ataque químico del tabaco (TEV)), una secuencia de KOZAK, un codón de inicio de la traducción y un codón de terminación de la traducción.

En realizaciones particulares de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la invención, el ARN monocatenario o ARNm está poliadenilado. En algunas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm comprende una cola de poli-A de aproximadamente 50-200 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm comprende una cola de poli-A de 100-200 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm comprende una cola de poli-A de más de 200 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones preferidas, el ARN monocatenario o ARNm comprende una cola de poli-A de aproximadamente 150-200 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el ARN monocatenarios o ARNm se crea sinterizando la cola de poli-A mediante la transcripción *in vitro* de un molde de ADN que comprende una secuencia oligo (dT) terminal que es complementaria a la cola de poli-A. En algunas realizaciones preferidas, el ARN monocatenario o ARNm se prepara mediante la poliadenilación posterior a la transcripción del extremo 3' del ORF del ARNm a partir de una reacción de IVT usando una poli(A) polimerasa (por ejemplo, poli(A) polimerasa derivada de *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*; o una poli(A) polimerasa de origen comercial, por ejemplo, poli(A) polimerasa A-PLUS™, CELLSRIPT, INC., Madison, WI 53713, EE.UU.). A menos que se establezca específicamente lo contrario con respecto a un procedimiento particular, la invención no se limita al uso de una poli(A) polimerasa particular, y se puede usar cualquier poli A) polimerasa adecuada. La invención no se limita a los procedimientos particulares descritos en el presente documento para poliadenilar un ARN monocatenario para su uso en un procedimiento, o para preparar una composición o kit de la invención. Se puede usar cualquier procedimiento adecuado en la técnica para dicha poliadenilación.

En realizaciones adicionales de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la invención, el ARN monocatenario o ARNm comprende un ARNm protegido con caperuza. En ciertas realizaciones preferidas de los procedimientos, de las composiciones y de los kits, el ARN monocatenario o ARNm es una población de moléculas de ARN monocatenario o ARNm, teniendo la población más del 99 % de ARN monocatenario o ARNm protegido con caperuza. En realizaciones preferidas de los procedimientos, el ARNm protegido con caperuza presenta una caperuza con una estructura cap1, en la que la posición 2' de la ribosa del penúltimo nucleótido con respecto al nucleótido de la caperuza 5' está metilada.

En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la invención (por ejemplo, para reprogramar una célula humana o animal), el ARN monocatenario o ARNm presenta una caperuza 5' que comprende 7-metilguanosina o 7-metilguanina. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits, el ARN monocatenario o ARNm presenta un análogo de caperuza antiinverso (ARCA). En algunas realizaciones, el ARNm presenta un análogo de caperuza de fosforotioato, también denominado "tio-ARCA" en el presente documento (Grudzien-Nogalska E.y col., 2007; Kowalska J y col. 2008). En algunas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm comprende además una caperuza 5' que tiene una estructura cap1, en la que el hidroxilo 2' de la ribosa del penúltimo nucleótido 5' se metila (por ejemplo, obtenida mediante la metilación usando un kit de 2'-O-metiltransferasa SCRIPTCAP™ o usando uno de los componentes de 2'-O-metilación del sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™ (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.). En algunas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm que presenta dicha caperuza 5' se sintetiza: (i) durante la transcripción, mediante la incorporación de un análogo de caperuza antiinverso (ARCA) durante la transcripción *in vitro* de las moléculas de ARN monocatenario (por ejemplo, usando un kit de transcripción MESSAGEMAX™ T7 ARCA-capped message, CELLSRIPT, INC.); o (ii) tras la transcripción (por ejemplo, usando el sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™, CELLSRIPT, INC.) con un sistema enzimático de protección con caperuza, mediante la incubación de moléculas de ARN monocatenario transcritas *in vitro* en condiciones en las que las moléculas de ARN monocatenario transcritas *in vitro* se protegen con caperuza 5', incluyendo el caso en el que el sistema enzimático de protección con caperuza da lugar a la metilación del hidroxilo 2' de la ribosa del penúltimo nucleótido 5'. En algunas realizaciones preferidas, las moléculas de ARN monocatenario se protegen con caperuza usando una enzima de protección con caperuza que comprende guaniltransferasa y ARN 2'-O-metiltransferasa. En algunas realizaciones preferidas, el ARN monocatenario o ARNm está significativamente libre de moléculas de ARN no protegidas con caperuza que presentan un grupo trifosfato 5' (que se consideran un tipo de "moléculas de ARN contaminantes" en el presente documento). En determinadas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm consiste en una población de moléculas de ARN monocatenario o ARNm, teniendo la población: (i) más del 80 % de moléculas de ARN monocatenario o ARNm protegido con caperuza; (ii) más del 90 % de moléculas de ARN monocatenario o ARNm protegido con caperuza; (iii) más del 95 % de moléculas de ARN monocatenario o ARNm protegido con caperuza; (iv) más del 98 % de moléculas de ARN monocatenario o ARNm protegido con caperuza; (v) más del 99 % de moléculas de ARN monocatenario o ARNm protegido con caperuza; o (vi) más del 99,9 % de moléculas de ARN monocatenario o ARNm protegido con caperuza. En algunas realizaciones de las composiciones, los kits o procedimientos en los que el ARN monocatenario o ARNm también comprende moléculas contaminantes de ARN no protegido con caperuza que presentan un grupo trifosfato 5' (por ejemplo, en realizaciones en las que el ARN monocatenario o ARNm usado para dicha introducción de ARN monocatenario o ARNm codificante de al menos un factor de reprogramación en

una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo se protege con caperuza durante la transcripción usando un análogo de caperuza), el ARN monocatenario o ARNm usado en el procedimiento para dicha introducción se incubo primero con una fosfatasa alcalina (por ejemplo, NTPPhosphatase™, Epicentre Technologies, Madison, WI, EE.UU.) o con ARN 5'polifosfatasa (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI o Epicentre Technologies) para retirar el grupo trifosfato 5' de las moléculas contaminantes de ARN no protegido con caperuza; en algunas de estas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm que se trata con ARN 5'-polifosfatasa se trata además con la exonucleasa dependiente de fosfato 5' TERMINATOR™ (Epicentre Technologies) o la exorribonucleasa Xnrl para digerir moléculas contaminantes de ARN no protegido con caperuza que presentan un grupo monofosfato 5'.

En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos, de las composiciones y de los kits de la invención para reprogramar una célula humana o animal, el ARN monocatenario o ARNm presenta al menos una secuencia heteróloga UTR 5', secuencia de Kozak, secuencia IRES o secuencia UTR 3' que da lugar a una mayor traducción del ARNm en al menos un factor de reprogramación proteico en las células humanas o animales en comparación con el mismo ARNm que no presenta dicha secuencia respectiva. En algunas realizaciones particulares de los procedimientos, de las composiciones y de los kits, la UTR 5' o UTR 3' es una secuencia presentada por un ARNm de alfa- (α)-globina o beta- (β)-globina de *Xenopus* o humano, o en las que la UTR 5' es una secuencia presentada por el ARN del virus del ataque químico del tabaco (TEV).

En determinadas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la invención, a excepción de los nucleótidos que comprenden la caperuza, el ARN monocatenario o ARNm solo comprende los ribonucleósidos canónicos G, A, C y U. En realizaciones adicionales, el ARN monocatenario o ARNm comprende pseudouridina en lugar de uridina. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits para reprogramar una célula humana o animal, el ARN monocatenario o ARNm comprende al menos un ribonucleósido modificado seleccionado del grupo que consiste en pseudouridina (Ψ), 1-metil-pseudouridina ($m^1\Psi$), 5-metilcitidina (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 parte del correspondiente ribonucleósido canónico sin modificar. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la invención en los que el ARN monocatenario o ARNm comprende al menos un ribonucleósido modificado, el al menos un ribonucleósido modificado se selecciona del grupo que consiste en: (i) pseudouridina (Ψ), 1-metil-pseudouridina ($m^1\Psi$), 5-metiluridina (m^5U), 2'-O-metiluridina (Um o $m^{2'O}U$) y 2-tiouridina (s^2U) en lugar de todos o casi todos los restos de uridina canónicos; (ii) 5-metilcitidina (m^5C) en lugar de todos o casi todos los restos de citidina canónicos; y/o (iii) N^6 -metiladenosina (m^6A) en lugar de todos o casi todos los restos de adenosina canónicos. En otras realizaciones, solo una parte de un ribonucleósido canónico se reemplaza por el ribonucleósido modificado correspondiente, en las que una parte significa 1-25 %, se reemplaza el 25-50 % o 50-99 % del ribonucleósido canónico. En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la invención en los que las moléculas de ARN monocatenario o ARNm comprenden al menos un ribonucleósido modificado, el al menos un ribonucleósido modificado consiste en pseudouridina (Ψ) en lugar de todos o casi todos los restos de uridina canónicos, y/o 5-metilcitidina (m^5C) en lugar de todos o casi todos los restos de citidina canónicos. En algunas otras realizaciones, solo se reemplaza una parte de los restos de uridina canónicos por restos pseudouridina y/o solo una parte de los restos de citidina canónicos se reemplaza por restos de 5-metilcitidina, en las que una parte significa 1-25 %, se reemplaza el 25-50 % o 50-99 % de uno o ambos ribonucleósidos canónicos.

En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits en los que el ARN monocatenario o ARNm comprende al menos un ribonucleósido modificado, el ARN monocatenario o ARNm sintetizado mediante transcripción *in vitro* (IVT) de un molde de ADN que codifica cada uno de dichos al menos un factor de reprogramación proteico o polipeptídico usando un ARN polimerasa que inicia dicha transcripción a partir de un promotor de ARN polimerasa afín que está unido a dicho molde de ADN y ribonucleósidos trifosfato 5' (NTP) que comprenden al menos un ribonucleósido trifosfato 5' modificado seleccionado del grupo que consiste en pseudouridina 5' trifosfato (ΨTP), 1-metil-pseudouridina 5' trifosfato ($m^1\Psi TP$), 5-metilcitidina 5' trifosfato (m^5CTP), 5-metiluridina 5' trifosfato (m^5UTP), 2'-O-metiluridina 5' trifosfato ($UmTP$ o $m^{2'O}UTP$), 2-tiouridina 5' trifosfato (s^2UTP) y N^6 -metiladenosina 5' trifosfato (m^6ATP). En algunas realizaciones preferidas, se usa el NTP modificado en lugar de todo o casi todo el NTP no modificado correspondiente en la reacción de IVT (por ejemplo, ΨTP , $m^1\Psi TP$, m^5UTP , $m^{2'O}UTP$ o s^2UTP en lugar de UTP ; m^5CTP en lugar de CTP ; o m^6ATP en lugar de ATP) (por ejemplo, usando un sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™ (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.), en las que el NTP canónico se reemplaza por el correspondiente NTP modificado).

En otras realizaciones preferidas de los procedimientos, de las composiciones o de los kits para reprogramar una célula humana o animal, el ARN monocatenario o ARNm no contiene un ribonucleósido que comprenda una base de ácido nucleico modificada, que no sea la base de ácido nucleico modificada (por ejemplo, la base de 7-metilguanina) que comprende el nucleótido de caperuza 5' (o, por ejemplo, si el ARN monocatenario o ARNm se sintetizó usando un análogo de caperuza dinucleotídico, que incluyera posiblemente también una base modificada en el penúltimo nucleósido 5'). Por lo tanto, en algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits para reprogramar una célula humana o animal, a excepción del/de los ribonucleósido/s que comprende/n la caperuza 5', el ARN monocatenario o ARNm solo comprende los ribonucleósidos canónicos G, A, C y U. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits para reprogramar una célula humana o animal, el ARN monocatenario o ARNm se sintetiza mediante transcripción *in vitro* (IVT) de un molde de ADN que codifica cada uno de dichos al menos un factor de reprogramación proteico o polipeptídico usando los NTP

canónicos: GTP, ATP, CTP y UTP (por ejemplo, usando un sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™ (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.).

Por lo tanto, una realización preferida de la invención es un procedimiento de reprogramación de una célula eucariota (por ejemplo, una célula humana o animal, por ejemplo, una célula de mamífero) que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo a una célula que presenta un segundo estado diferenciado o fenotipo, que comprende: introducir de manera repetida o continua una composición que comprende ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codificante de un factor de reprogramación en una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo para generar una célula reprogramada que presenta un segundo estado diferenciado o fenotipo, ARN monocatenario o ARNm que solo consiste principalmente en bases de ácidos nucleicos no modificadas (es decir, bases de ácidos nucleicos canónicas: guanina, adenina, citosina y uracilo), a excepción de la base que comprende el nucleótido con caperuza 5' o, potencialmente, la base del penúltimo nucleósido 5' que está enlazado al nucleótido con caperuza. Dicho de otra manera, en estas realizaciones del procedimiento, el ARN monocatenario o ARNm consiste predominantemente solo en los nucleósidos canónicos guanosina, adenosina, citidina y uridina, a excepción del nucleótido con caperuza 5', y el penúltimo nucleósido 5' cuando las moléculas de ARN monocatenario o ARNm presentan una estructura de caperuza cap1 (por ejemplo, en la que el ARN monocatenario, ARNm o precursor del mismo se sintetizó usando solo o predominantemente GTP, ATP, CTP y UTP durante la transcripción *in vitro*). En algunas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm se sintetiza *in vitro*. En algunas realizaciones de este procedimiento, la célula que presenta el segundo estado diferenciado o fenotipo es una célula iPS. En realizaciones preferidas de los procedimientos, de las composiciones o de los kits que usan ARN monocatenario o ARNm no modificado, ARN monocatenario o ARNm está absolutamente libre de ARN bicatenario. En realizaciones adicionales, aunque el ARNm comprenda ribonucleósidos casi completamente no modificados excepto la caperuza 5', el ARN monocatenario o ARNm puede comprender ciertas modificaciones para un fin particular, incluyendo un enlace internucleosídico modificado, tal como un enlace fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenato o fosforodiselenato (por ejemplo, para proporcionar resistencia de las moléculas de ARNm a nucleasas u otras enzimas que sean capaces de degradar enlaces de fosfato canónicos).

"Sustancialmente libre de ARN bicatenario" significa que menos del aproximadamente 0,5 % de la masa o del peso total del ARN monocatenario (o del ARNm, por ejemplo, codificante de uno o más factores de reprogramación o de un factor de inducción de células iPS) se compone de ARN bicatenario de un tamaño superior aproximadamente 40 pares de bases de longitud. "Casi libre de ARN bicatenario" significa que menos del aproximadamente 0,1 % de la masa o del peso total del ARN que comprende el ARN monocatenario o ARNm (por ejemplo, codificante de uno o más factores de reprogramación o un factor de inducción de células iPS) se compone de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud. "Esencialmente libre de ARN bicatenario" significa que menos del 0,05 % de la masa o del peso total del ARN monocatenario (o del ARNm, por ejemplo, codificante de uno o más factores de reprogramación o un factor de inducción celular iPS) se compone de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud. "Prácticamente libre de ARN bicatenario" significa que menos del aproximadamente 0,01 % de la masa o del peso total del ARN que comprende el ARN monocatenario o ARNm (por ejemplo, codificante de uno o más factores de reprogramación o un factor de inducción de células iPS) se compone de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud. "Extremadamente libre de ARN bicatenario" significa que menos del aproximadamente 0,001 % de la masa o del peso total del ARN que comprende el ARN monocatenario o ARNm (por ejemplo, codificante de uno o más factores de reprogramación o un factor de inducción de células iPS) se compone de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud. "Absolutamente libre de ARN bicatenario" significa que menos del aproximadamente 0,0002 % de la masa o del peso total del ARN que comprende el ARN monocatenario o ARNm (por ejemplo, codificante de uno o más factores de reprogramación o un factor de inducción de células iPS) se compone de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud. En algunas realizaciones, la cantidad de ARN bicatenario (por ejemplo, la cantidad de ARN bicatenario detectable) de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud se ensaya mediante inmunoensayo de transferencia de puntos usando un anticuerpo específico del ARN bicatenario (por ejemplo, el anticuerpo específico del ARN bicatenario J2 o el anticuerpo específico del ARN bicatenario K1 de English & Scientific Consulting, Szirák, Hungría) usando patrones de cantidad conocida de ARN bicatenario, como se describe en el presente documento, o usando otro ensayo que dé resultados equivalentes al ensayo descrito en el presente documento. Se entenderá en el presente documento que los resultados de los inmunoensayos de transferencia de puntos que usan el anticuerpo específico del ARN bicatenario J2 se basarán en la comparación de los resultados del ensayo del ARN monocatenario o ARNm que se pretende introducir en una célula, un organismo o un sujeto humano o animal con los resultados de ensayo de los inmunoensayos de transferencia de puntos del anticuerpo específico de ARN bicatenario J2 realizados al mismo tiempo con patrones de ARN bicatenario que comprenden cantidades conocidas de ARN bicatenario del mismo tamaño o de un tamaño equivalente y la unión del anticuerpo J2.

En algunas otras realizaciones, las cantidades y cantidades relativas de moléculas no contaminantes de ARNm y moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular, por ejemplo, un contaminante de ARN bicatenario) se pueden determinar mediante HPLC u otros procedimientos usados en la técnica para separar y cuantificar moléculas de ARN. En algunas otras realizaciones, las cantidades y cantidades relativas de moléculas no contaminantes de ARNm y moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular, por ejemplo, un contaminante de ARN bicatenario) se determinan usando un ensayo cuantitativo específico para un determinado

contaminante (por ejemplo, ARN bicatenario) en un conocimiento sobre el ARN total. En algunas otras realizaciones, la cantidad de contaminantes de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud se determina basándose en la medición de la absorbancia A_{260} de todas las fracciones de cromatografía en columna o todas las fracciones de electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida de cromatografía o electroforesis, respectivamente, de un cantidad suficiente de ARN monocatenario sintetizado *in vitro* o transcrito *in vitro*, de manera que la absorbancia de los contaminantes de ARN bicatenario de todas las fracciones que comprenden ARN de un tamaño diferente a la fracción o fracciones confirme que contienen solo ARN del tamaño y secuencia correctos como el ARN monocatenario o ARNm de interés para poderse medir el nivel de pureza apropiado (por ejemplo, sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre). En realizaciones preferidas de los procedimientos, de las composiciones o de los kits, el ARN monocatenario o ARNm codificante de un factor de reprogramación o un factor de inducción de células iPS está extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario.

En realizaciones preferidas de los procedimientos, de las composiciones o de los kits, incluyendo aquellas en las que el ARN monocatenario o ARNm comprende un ribonucleósido modificado o, a excepción de la caperuza, solo ribonucleósidos no modificados, el ARN monocatenario o ARNm (por ejemplo, el codificante de un factor de reprogramación o un factor de inducción de células iPS) está casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario detectable.

En general, el nivel de ARN bicatenario contaminante en la composición de ARN que comprende ARNm codificante de al menos una proteína que da lugar a una respuesta inmune innata, toxicidad celular o muerte celular depende de varios factores, tales como la duración del período de la puesta en contacto repetida o continua de la célula con la composición de ARN que comprende el ARNm requerido para generar el efecto biológico o bioquímico, la cantidad de ARNm en dicha composición y los nucleótidos que componen dicho ARNm (por ejemplo, si el ARNm comprende nucleótidos modificados, por ejemplo, el ARNm comprende nucleótidos GA ψ C o GA ψ m⁵C, o solo nucleótidos GAUC sin modificar).

Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención es un procedimiento para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o estado diferenciado o fenotipo de una célula humana o animal que comprende: introducir ARN monocatenario o ARNm codificante de un factor de reprogramación, ARN monocatenario o ARNm que está absolutamente libre de ARN bicatenario, en una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo para generar una célula reprogramada que presente un segundo estado diferenciado o fenotipo. Otra realización preferida es un procedimiento para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o estado diferenciado o fenotipo de una célula humana o animal que comprende: introducir ARN monocatenario o ARNm codificante de un factor de reprogramación, ARN monocatenario o ARNm que está prácticamente libre de ARN bicatenario, en una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo para generar una célula reprogramada que presente un segundo estado diferenciado o fenotipo. Otra realización preferida más es un procedimiento para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o estado diferenciado o fenotipo de una célula humana o animal que comprende: introducir ARN monocatenario o ARNm codificante de un factor de reprogramación, ARN monocatenario o ARNm que está extremadamente libre de ARN bicatenario, en una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo para generar una célula reprogramada que presente un segundo estado diferenciado o fenotipo. Otra realización preferida más es un procedimiento para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o estado diferenciado o fenotipo de una célula humana o animal que comprende: introducir ARN monocatenario o ARNm codificante de un factor de reprogramación, ARN monocatenario o ARNm que está absolutamente libre de ARN bicatenario, en una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo para generar una célula reprogramada que presente un segundo estado diferenciado o fenotipo. En realizaciones particulares de los procedimientos, la introducción comprende introducir ARN monocatenario o ARNm codificante de una pluralidad de factores de reprogramación en la célula. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para cambiar el estado diferenciado o estado de diferenciación de una célula que comprende: introducir ARN monocatenario o ARNm codificante de al menos un factor de inducción de células iPS, ARN monocatenario o ARNm que está casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, en una célula somática para generar una célula reprogramada. En determinadas realizaciones de los procedimientos, la introducción comprende administrar el ARN monocatenario o ARNm a la célula somática con un reactivo de transfección. En algunas realizaciones, la introducción se repite diariamente durante al menos 3 días. En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos, la introducción se repite diariamente durante de al menos 4 a 8 días, de 8 a 10 días o durante de 10 a 18 días. En algunas realizaciones, la introducción se repite diariamente durante más de 18 días. En algunas realizaciones, la célula reprogramada es una célula desdiferenciada, y el proceso que ocurre en este procedimiento se denomina "desdiferenciación". Una realización de una célula desdiferenciada es una célula madre pluripotente inducida o célula iPS (o iPSC). En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos, la célula reprogramada es una célula iPS. En realizaciones adicionales de los procedimientos, la célula reprogramada es una célula transdiferenciado, y el proceso que ocurre en este procedimiento se denomina "transdiferenciación". En otras realizaciones, la célula que presenta el segundo estado de diferenciación o fenotipo es una célula somática diferenciada o rediferenciada, y el proceso que tiene lugar en este procedimiento se denomina "diferenciación" o "rediferenciación". En ciertas realizaciones preferidas de los procedimientos para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o fenotipo de una célula, el procedimiento se realiza sin el uso de ninguna proteína exógena, ARNip o agente de molécula pequeña que inhiba o reduzca la activación, la inducción o la expresión de una o más

proteínas en una vía de respuesta inmune innata. Por lo tanto, en algunas realizaciones de los procedimientos para cambiar o reprogramar el estado diferenciado o fenotipo de una célula humana o animal, no se usa ARNip ni proteína (por ejemplo, proteína B18R), anticuerpo o inhibidor de molécula pequeña de una vía de respuesta inmune innata para dicha reprogramación. En otras realizaciones, los procedimientos comprenden además: tratar las células que presentan el primer estado diferenciado o fenotipo con una proteína, ARNip o agente de molécula pequeña que inhiba o reduzca la activación, la inducción o la expresión de uno o más sensores de ARN o proteínas en una vía de respuesta inmune innata, en los que dicho tratamiento se produce antes y/o durante dicha introducción de un ARNm codificante de un factor de reprogramación. En algunas realizaciones, el agente que inhibe o reduce la activación, la inducción o la expresión de uno o más sensores de ARN o proteínas en una vía de respuesta inmune innata es proteína B18R.

En algunas otras realizaciones, el agente es un Agente de ARNm codificante de una proteína que inhibe o reduce la activación, la inducción o la expresión de una o más proteínas que comprenden un sensor de ARN o una vía de respuesta inmune innata. En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor es un Agente de ARNm codificante de la proteína B18R. En algunas otras realizaciones preferidas, el inhibidor es un agente de ARNm codificante de la proteína del gen E3L del virus Vaccinia; en realizaciones preferidas, el Agente de ARNm codificante de la proteína del gen E3L del virus Vaccinia se introduce en la célula al mismo tiempo que se introducen los ARNm codificantes de uno o más factores de reprogramación o factores de inducción de células iPS. En realizaciones preferidas de estos procedimientos, el Agente de ARNm está protegido con caperuza. En algunas realizaciones, más del 90 % de las moléculas de ARN que comprenden el Agente de ARNm están protegidas con caperuza. En realizaciones preferidas, más del 99% de las moléculas de ARN que comprenden el Agente de ARNm están protegidas con caperuza. En algunas realizaciones preferidas de estas realizaciones, el Agente de ARNm presenta una caperuza con una estructura cap1, lo que significa que los hidroxilos 2' de la ribosa del penúltimo nucleótido 5' de las moléculas de ARN que comprenden el Agente de ARNm están metilados. En algunas realizaciones de estos procedimientos, el Agente de ARNm está poliadenilado. En realizaciones preferidas de estos procedimientos, el Agente de ARNm presenta una cola de poli-A que consiste en al menos 50 restos de aminoácido. En algunas realizaciones preferidas de estos procedimientos, la cola de poli-A consiste en al menos 100-200 restos de aminoácido. En algunas realizaciones preferidas de estos procedimientos, el Agente de ARNm presenta al menos una secuencia heteróloga UTR 5', secuencia de Kozak, secuencia IRES o secuencia UTR 3' que da lugar a una mayor traducción del ARNm en al menos un factor de reprogramación proteico en las células humanas o animales en comparación con el mismo Agente de ARNm que no presenta dicha secuencia respectiva. En algunas realizaciones particulares de estos procedimientos, la UTR 5' o UTR 3' es una secuencia presentada por un ARNm de alfa- (α)-globina o beta- (β)-globina de *Xenopus* o humano, o en las que la UTR 5' es una secuencia presentada por el ARN del virus del ataque químico del tabaco (TEV). En algunas realizaciones preferidas de estos procedimientos, el Agente de ARNm comprende o consiste en al menos un nucleósido modificado seleccionado del grupo que consiste en pseudouridina (Ψ), 1-metil-pseudouridina ($m^1\Psi$), 5-metilcitidina (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 parte del correspondiente ribonucleósido canónico sin modificar. En algunas realizaciones preferidas, el al menos un ribonucleósido modificado se selecciona del grupo que consiste en: (i) pseudouridina (Ψ), 1-metil-pseudouridina ($m^1\Psi$), 5-metiluridina (m^5U), 2'-O-metiluridina (Um o $m^{2'}O U$) y 2-tiouridina (s^2U) en lugar de todos o casi todos los restos de uridina canónicos; (ii) 5-metilcitidina (m^5C) en lugar de todos o casi todos los restos de citidina canónicos; y/o (iii) N^6 -metiladenosina (m^6A) en lugar de todos o casi todos los restos de adenosina canónicos. En otras realizaciones de estos procedimientos, solo una parte de un ribonucleósido canónico se reemplaza por el ribonucleósido modificado correspondiente, en las que una parte significa 1-25 %, se reemplaza el 25-50 % o 50-99 % del ribonucleósido canónico. En otras realizaciones preferidas, el al menos un ribonucleósido modificado consiste en pseudouridina (Ψ) en lugar de todos o casi todos los restos de uridina canónicos, y/o 5-metilcitidina (m^5C) en lugar de todos o casi todos los restos de citidina canónicos. En algunas otras realizaciones, solo se reemplaza una parte de los restos de uridina canónicos por restos pseudouridina y/o solo una parte de los restos de citidina canónicos se reemplaza por restos de 5-metilcitidina, en las que una parte significa 1-25 %, se reemplaza el 25-50 % o 50-99 % de uno o ambos ribonucleósidos canónicos. En otras realizaciones preferidas de estos procedimientos, excepto en lo relativo a los nucleósidos que comprenden la caperuza 5', El ARNm solo consiste en los nucleósidos G, A, C y U canónicos no modificados.

En realizaciones preferidas de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la invención, el ARNm está extremada o absolutamente libre de ARN bicatenario. Por lo tanto, dado que el ARNm usado en los procedimientos del presente documento (o un precursor del ARNm, tal como el ARN transcrito *in vitro* (o ARN IVT) antes de la protección con caperuza y/o la poliadenilación) es preferentemente ARN monocatenario, los presentes inventores a veces se refieren en el presente documento al ARNm como una "composición de ARN que comprende moléculas de ARN monocatenario", una "composición de ARN" o "moléculas de ARN monocatenario"; por lo tanto, Siempre que se usen en el presente documento las expresiones "composición de ARN que comprende moléculas de ARN monocatenario", "composición de ARN" o "moléculas de ARN monocatenario" con respecto a un procedimiento, una composición o un kit que comprende o para reprogramar una célula somática a una célula iPS, dichas expresiones significarán el "ARNm codificante de un factor de reprogramación o un factor de inducción de células iPS", incluyendo los casos en los que el ARNm codifica una pluralidad de factores de reprogramación o un factor de inducción de células iPS. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, la composición de ARN, o el ARN monocatenario o ARNm está absolutamente libre de ARN bicatenario, lo que significa, por ejemplo, que por cada

microgramo o 1.000.000 de picogramos de ARN de la composición de ARN, más de 999,998 picogramos comprenden ARN monocatenario y menos de 2 picogramos son ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud (por ejemplo, cuando se analiza mediante inmunoensayo usando el anticuerpo específico del ARN bicatenario J2 (English & Scientific Consulting, Szirák, Hungría), como se describe en el presente documento o usando otro ensayo que dé resultados equivalentes al ensayo descrito en el presente documento).

En algunas realizaciones específicas, la RNasa específica del ARN bicatenario es una exorribonucleasa (exoRNasa). En algunas realizaciones específicas, la RNasa específica del ARN bicatenario es una exorribonucleasa (por ejemplo, exorribonucleasa 3' a 5', por ejemplo, una exoRNasa del virus Lassa, Qi X y col., 2010; o exoRNasa del corona-virus, Hastie K. M. y col., 2011).

Sin quedar ligados a teoría alguna, los solicitantes descubrieron que, en las condiciones usadas, ciertos anticuerpos comerciales (por ejemplo, Schönborn J- y col., 1991, Lukacs N. 1994, Lukacs N. 1997; por ejemplo, el anticuerpo J2 de English & Scientific Consulting, Szirák, Hungría) se unen a ARN bicatenario, aunque son muy útiles para ciertos ensayos específicos del ARN bicatenario, no parecieron eliminar sistemáticamente cantidades suficientes de ARN bicatenario del ARN monocatenario o ARNm o un precursor del mismo para su uso en un procedimiento de preparación de una composición de ARN purificado o tratado para una composición, un kit o un procedimiento de la presente invención, y, por lo tanto, dichos anticuerpos específicos del ARN bicatenario no están incluidos dentro de la definición de una proteína específica del ARN bicatenario en el presente documento. Sin embargo, sin quedar ligados a teoría alguna, los solicitantes creen que puede ser posible generar uno o más anticuerpos específicos del ARN bicatenario distintos, que podrían usarse potencialmente, por separado o en combinación para preparar una composición de ARN purificado o tratado.

En algunas realizaciones, se usa una combinación de cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. Por lo tanto, se puede usar uno o más procedimientos particulares para generar ARNm que esté sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario además o junto con cualquier otro procedimiento de generación de ARNm que esté sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario. Por lo tanto, por ejemplo, aunque un procedimiento que comprende poner en contacto un ARN monocatenario sintetizado *in vitro* con un anticuerpo específico del ARN bicatenario no parece generar un ARN monocatenario que esté sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario en las condiciones usadas en el presente documento, en algunas realizaciones, dicho procedimiento se usa además de un procedimiento que comprende HPLC o el procedimiento de tratamiento con RNasa III descrito en el presente documento para generar ARN bicatenario (por ejemplo, ARNm) que esté sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre.

En algunas realizaciones preferidas en las que la proteína específica del ARN bicatenario es RNasa III, el procedimiento comprende: poner en contacto el ARNm (o precursor del mismo) con RNasa III en una solución tamponada que comprende cationes de magnesio divalentes a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM y una sal monovalente a una concentración de al menos 50 mM; e incubar en condiciones en las que la RNasa III se una al ARN bicatenario y sea enzimáticamente activa; y luego limpiar el ARNm (o precursor del mismo) de la RNasa III y el resto de componentes, incluyendo los productos de la digestión con la RNasa III, para generar un ARNm tratado (o precursor del mismo) que esté sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario. En determinadas realizaciones preferidas de este procedimiento, la solución tamponada comprende cationes de magnesio divalentes a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM, de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 4,0 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3 mM, o de aproximadamente 2 mM. En algunas realizaciones preferidas de este procedimiento, la sal monovalente tiene una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM. Aún más, el ARNm (o precursor del mismo) se puede extraer con fenol-cloroformo, precipitarse usando acetato de amonio o purificarse mediante cromatografía u otros medios descritos en otra parte del presente documento.

En algunas realizaciones preferidas (por ejemplo, en las que la proteína específica del ARN bicatenario es RNasa III, el procedimiento comprende: poner en contacto el ARN monocatenario o ARNm (o precursor del mismo) con la proteína específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III) en una solución tamponada que contiene una sal monovalente a una concentración de al menos 50 mM (y más preferentemente, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 300 mM), pero que carece de cationes de magnesio divalentes; e incubar en condiciones en las que la proteína específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III) se una al ARN bicatenario, pero no se active enzimáticamente; y luego limpiar el ARN bicatenario o ARNm (o precursor del mismo) de la proteína específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III), estando al menos parte unida al ARN bicatenario, y de otros componentes, para generar ARN bicatenario o ARNm que esté sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario. En esta realización, los presentes investigadores utilizan la unión muy estrecha y específica de la proteína específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III) hacia el ARN

bicatenario, mientras se realiza la incubación en ausencia de cationes de magnesio divalentes, de modo que la proteína específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III) no es enzimáticamente activa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la proteína específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III) se usa como un agente de unión para el ARN bicatenario, que luego se retira del ARNm (o precursor del mismo) mediante uno de varios medios (por ejemplo, usando un anticuerpo que se une a la proteína específica del ARN bicatenario [por ejemplo, RNasa III] y/o un anticuerpo que se une al ARN bicatenario [por ejemplo, un anticuerpo específico del ARN bicatenario, tal como el anticuerpo J2; English and Scientific Consulting, Szirák, Hungría], que, a su vez, puede precipitarse usando partículas disponibles en el mercado (por ejemplo, partículas o perlas magnéticas) a las que se une la proteína A o la proteína G para hacer precipitar el anticuerpo que está unido a la proteína específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III), purificando de este modo el ARNm (o precursor del mismo). En algunas realizaciones en las que una proteína específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III) se usa como un agente de unión para el ARN bicatenario, la proteína específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III) se derivatiza covalentemente con una molécula de unión por afinidad (por ejemplo, biotina, o por ejemplo, cualquier otra molécula pequeña de unión por afinidad [por ejemplo, preferentemente una molécula pequeña] conocida en la técnica), cuya derivatización covalente no suprime la unión del ARN bicatenario por la proteína o cambie la especificidad de la proteína específica del ARN bicatenario hacia la unión al ARN bicatenario. En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits, la proteína específica del ARN bicatenario derivatizada (por ejemplo, proteína específica del ARN bicatenario biotinilada o derivatizada con biotina, por ejemplo, RNasa III biotinilada) se retira al poner en contacto una solución que contiene la proteína específica del ARN bicatenario derivatizada con una superficie (por ejemplo, partículas o perlas magnéticas) que comprende otra molécula que se une estrecha y específicamente a la proteína específica del ARN bicatenario derivatizada, incluyendo la proteína específica del ARN bicatenario derivatizada que está unida a los contaminantes de ARN bicatenario; por ejemplo, en una realización específica, una solución que contiene RNasa III biotinilada que se puso en contacto con una composición de ARN que comprendía ARN monocatenario o ARNm y ARN bicatenario contaminante (derivatizado con biotina (o biotinilado) se pone en contacto además con una superficie a la que se une covalentemente estreptavidina o avidina, uniendo así la RNasa III biotinilada, incluyendo RNasa III biotinilada unida al ARN bicatenario contaminante; tras retirarse de la solución de la superficie a la que la estreptavidina o avidina está unida covalentemente, la solución está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario. Por lo tanto, en estas realizaciones, dicha purificación del ARN monocatenario o ARNm (o precursor del mismo), comprende poner en contacto la solución que comprende la composición de ARN y la proteína específica del ARN bicatenario derivatizada (por ejemplo, la RNasa III biotinilada) con una superficie a la que se une la proteína específica del ARN bicatenario derivatizada, y retirar la superficie de dicha solución.

En algunas realizaciones preferidas en las que la proteína específica del ARN bicatenario es exorribonucleasa 3' a 5', el procedimiento comprende: poner en contacto el ARN monocatenario o ARNm (o precursor del mismo) con la exorribonucleasa 3' a 5' en una solución tamponada con Tris (por ejemplo, 20 mM; pH 7,5) que comprende cationes de magnesio divalentes (por ejemplo, 5 mM) y una sal monovalente a una concentración de al menos 50 mM (por ejemplo, NaCl 150 mM); e incubar en condiciones en las que la exorribonucleasa se une al ARN bicatenario y es enzimáticamente activa; y luego limpiar el ARNm (o precursor del mismo) de la exorribonucleasa y el resto de componentes, incluyendo los productos de la digestión con la exorribonucleasa, para generar ARNm tratado (o precursor del mismo) que esté sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario.

En algunas realizaciones en las que se usa un procedimiento de purificación que comprende un dispositivo de separación para generar ARN monocatenario o ARNm al menos parcialmente purificado (por ejemplo, un procedimiento de purificación que comprende cromatografía de flujo por gravedad o de baja presión, HPLC o electroforesis preparativa), además de dicho procedimiento de purificación, el procedimiento comprende además (ya sea antes o después de dicho procedimiento de purificación): poner en contacto el ARN monocatenario o ARNm (o precursor del mismo) con una proteína específica del ARN bicatenario. En algunas realizaciones, la proteína específica del ARN bicatenario es RNasa III en una solución tamponada que contiene cationes de magnesio a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM y una sal monovalente a una concentración de al menos aproximadamente 100 mM (preferentemente, al menos aproximadamente 100-300 mM) para generar ARNm tratado (o precursor del mismo) que esté sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario. En realizaciones preferidas, el ARNm tratado (o precursor del mismo) está prácticamente libre de ARN bicatenario.

En algunas otras realizaciones, la proteína específica del ARN bicatenario es un anticuerpo específico del ARN bicatenario (por ejemplo, el anticuerpo J2 o K1 de English and Scientific Consulting, Szirák, Hungría) en una solución tamponada que contiene una sal monovalente a una concentración de al menos aproximadamente 100 mM (preferentemente, al menos aproximadamente 100-300 mM); e incubar en condiciones en las que el anticuerpo específico de ARN bicatenario se une al ARN bicatenario; y luego limpiar el ARNm (o precursor del mismo) del anticuerpo específico del ARN bicatenario, estando al menos parte unido al ARN bicatenario, y el resto de componentes para generar ARNm purificado (o precursor del mismo) que esté sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre; en algunas realizaciones, el anticuerpo específico del ARN bicatenario se usa para analizar la cantidad de ARN bicatenario presente en el ARN

monocatenario (por ejemplo, ARNm o precursor del mismo). En algunas de estas realizaciones, el anticuerpo específico del ARN bicatenario puede retirarse del ARNm (o precursor del mismo) mediante uno de varios medios (por ejemplo, usando partículas disponibles en el mercado tales como partículas o perlas magnéticas a las que se une la proteína A o la proteína G) para hacer precipitar el anticuerpo específico del ARN bicatenario).

- 5 Aún más, en algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos anteriores, el ARN monocatenario o ARNm (o precursor del mismo) tratado o purificado se limpia además usando el procedimiento de limpieza rápida de ARN que comprende extracción orgánica (por ejemplo, fenol-cloroformo), precipitación con acetato de amonio, precipitación con alcohol y/o lavado con alcohol del precipitado (por ejemplo, lavado con etanol al 70 %). En algunas otras realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm (o precursor del mismo) se limpia o se purifica además usando
- 10 un procedimiento de filtración rápida en gel con un dextrano reticulado (por ejemplo, Sephadex, por ejemplo, una columna de centrifugación Sephadex) para separar moléculas de bajo peso molecular, tales como sales, tampones, nucleótidos y oligonucleótidos pequeños, disolventes (por ejemplo, fenol, cloroformo) o detergentes del ARN monocatenario o ARNm. En algunas otras realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm se purifica o se purifica en mayor profundidad mediante cromatografía u otros medios descritos en otra parte del presente documento.
- 15 Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona procedimientos de síntesis de una composición de ARN transcrito *in vitro* (IVT), y de posterior puesta en contacto de la composición de ARN IVT con una RNasa específica del ARN bicatenario, tal como la RNasa III, en condiciones en las que el ARN bicatenario contaminante puede ser digerido de forma reproducible y se pueden generar de forma fiable moléculas de ARN monocatenario que no inducen ni activan una vía de respuesta inmune innata de ARN bicatenario o sensor de ARN.
- 20 En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits para reprogramar una célula eucariota, tal como una célula humana o animal, el ARN monocatenario o ARNm (o un precursor del ARNm, tal como ARN de IVT antes de la protección con caperuza y/o de la poliadenilación) se purifica o se trata usando al menos un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en: (i) un procedimiento que comprende tratar el ARNm (o un precursor del mismo) con una o más enzimas que digieren específicamente una o más moléculas
- 25 contaminantes de ARN o moléculas contaminantes de ADN; (ii) cromatografía en una columna de flujo por gravedad o de HPLC y una solución eluyente que produzca la eliminación de moléculas de ARN contaminantes (en particular, moléculas de ARN bicatenario contaminantes); e (iii) un procedimiento que comprenda tratar el ARNm (o un precursor del mismo) con una RNasa específica del ARN bicatenario en una mezcla de reacción en condiciones en las que se digiera el ARN bicatenario; en algunas realizaciones, el procedimiento comprende además: purificar el
- 30 ARNm de los componentes de la mezcla de reacción de RNasa específica del ARN bicatenario y los productos de digestión de ARN bicatenario. En algunas realizaciones preferidas del procedimiento que comprende tratar el ARN monocatenario o ARNm con una RNasa específica del ARN bicatenario, la RNasa específica del ARN bicatenario es una endorribonucleasa (endoRNasa). En algunas realizaciones preferidas, la endoRNasa es RNasa III (por ejemplo, RNasa III de *E. coli*). En algunas otras realizaciones, la RNasa específica del ARN bicatenario es una
- 35 exorribonucleasa (exoRNasa). En algunas realizaciones, la exoRNasa es una proteína que presenta actividad exoRNasa 3' a 5' específica del ARN bicatenario.

- En algunas realizaciones, la invención también proporciona un procedimiento de preparación de las composiciones de ARN purificado que comprenden moléculas de ARN monocatenario que están sustancialmente libres, casi libres, esencialmente libres, prácticamente libres, extremadamente libres o absolutamente libres de ARN bicatenario,
- 40 comprendiendo el procedimiento: tratar ARN sintetizado *in vitro* que comprende una o más moléculas de ARN monocatenario diferentes y moléculas de ARN bicatenario contaminantes con una RNasa específica del ARN bicatenario en una mezcla de reacción en condiciones en las que se digiera el ARN bicatenario; y luego purificar las moléculas de ARN monocatenario de los componentes de la mezcla de reacción de RNasa específica del ARN bicatenario y los productos de la digestión del ARN bicatenario. En algunas realizaciones, la RNasa específica del
 - 45 ARN bicatenario es RNasa III y la mezcla de reacción comprende cationes de magnesio divalentes a una concentración inferior a aproximadamente 5 mM, preferentemente, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM, y lo más preferentemente, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3 mM, o 2 mM. En algunas realizaciones de este procedimiento, las moléculas de ARN monocatenario están sustancialmente libres, casi libres, esencialmente libres, prácticamente libres, extremadamente libres o absolutamente libres de moléculas de ARN
 - 50 bicatenario contaminantes que activen un sensor de ARN o una respuesta de interferencia de ARN (ARNi); en realizaciones particulares, el sensor de ARN se selecciona del grupo que consiste en proteína quinasa dependiente de ARN (PKR), gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I), receptor de tipo Toll (TLR)3, TLR7, TLR8, proteína del gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5) y 2'-5'oligoadenilato sintetasa (2'-5'OAS u OAS). En determinadas realizaciones, las composiciones o preparaciones de ARN purificado no generan una respuesta
 - 55 inmune significativa mediada por el receptor de tipo Toll (TLR3) cuando se introducen en la célula.

- En otras realizaciones, el factor de inducción de células iPS se selecciona del grupo que consiste en KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2. En realizaciones particulares, la introducción comprende introducir ARNm codificante de una pluralidad de factores de inducción de células iPS. En realizaciones adicionales, la pluralidad de factores de inducción de células iPS comprende cada uno de KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2. En realizaciones
- 60 adicionales, la pluralidad de factores de inducción de células iPS comprende OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y al menos una proteína MYC seleccionada del grupo que consiste en c-MYC larga de tipo silvestre, c-MYC(T58A), c-MYC corta de tipo silvestre y L-MYC. En realizaciones adicionales, la pluralidad de factores de inducción de células

iPS comprende LIN28 o NANOG. En realizaciones preferidas, la proteína MYC de la pluralidad de factores de inducción de células iPS es c-MYC(T58A). En algunas realizaciones, el ARNm codifica uno o más factores de reprogramación o factores de inducción de células iPS seleccionados del grupo que consiste en OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG, c-MYC larga de tipo silvestre, c-MYC(T58A) (Wang X y col., 2011; Wasylishen A. R., y col., 2011), c-MYC corta de tipo silvestre y L-MYC. En algunas realizaciones, el ARNm codifica OCT4, SOX2, KLF4 y al menos una proteína MYC seleccionada del grupo que consiste en c-MYC larga de tipo silvestre, c-MYC(T58A), c-MYC corta de tipo silvestre y L-MYC. En algunas realizaciones preferidas, la proteína MYC codificada por el ARNm es c-MYC(T58A). En algunas otras realizaciones preferidas, la proteína MYC codificada por el ARNm es c-MYC corta de tipo silvestre. En algunas otras realizaciones preferidas, la proteína MYC codificada por el ARNm es L-MYC. En algunas realizaciones, el ARNm codifica además la proteína NANOG. En algunas realizaciones, el ARNm usado para la reprogramación de células somáticas humanas o animales a una célula desdiferenciada o una célula iPS codifica OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y al menos una proteína MYC seleccionada del grupo que consiste en c-MYC larga de tipo silvestre, c-MYC(T58A), c-MYC corta de tipo silvestre y L-MYC.

En realizaciones adicionales, la célula es un fibroblasto. En otras realizaciones, la célula reprogramada es una célula madre pluripotente. En otras realizaciones, la célula desdiferenciada expresa NANOG y TRA-1-60. En realizaciones adicionales, la célula está *in vitro*. En realizaciones adicionales, la célula reside en cultivo. En realizaciones particulares, las células residen en medio acondicionado MEF. En algunas realizaciones preferidas, se añade un inhibidor de RNasa (por ejemplo, inhibidor de RNasa SCRIPT-GUARD™, CELLSSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.) al medio de cultivo si el medio contiene suero, medio acondicionado o un extracto celular. En algunas realizaciones preferidas, la célula se cultiva en medio sobre una matriz extracelular (por ejemplo, una matriz de tipo MATRIGEL™) en ausencia de una capa de alimentación. En otras realizaciones, las células residen en un sujeto humano o animal.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden un ARNm codificante de un factor de reprogramación o un factor de inducción de células iPS, teniendo el ARNm pseudouridina o 1-metil-pseudouridina en lugar de uridina. En ciertas realizaciones en las que el ARNm codificante de un factor de reprogramación o un factor de inducción de iPSC comprende pseudouridina o 1-metil-pseudouridina en lugar de uridina, el ARNm también comprende además 5-metilcitidina en lugar de citidina. En otras realizaciones, la composición comprende ARNm codificante de una pluralidad de factores de inducción de células iPS, seleccionados del grupo que consiste en KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2. En realizaciones adicionales, la pluralidad comprende tres o más, o cuatro o más, o cinco o más, o seis factores de inducción de células iPS.

En determinadas realizaciones, las composiciones descritas anteriormente están envasadas en un kit. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden un reactivo de transfección y un ARNm codificante de un factor de reprogramación o un factor de inducción de células iPS.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones o sistemas o kits que comprenden: a) ARN monocatenario (ARNmc) codificante de una proteína, en las que el ARN monocatenario es un producto de la transcripción *in vitro* de un molde de ADN por una ARN polimerasa; b) una proteína endorribonucleasa III específica del ARN bicatenario (ARNbc) (endoRNasa III) (u otra proteína específica del ARN bicatenario); y c) cationes de magnesio presentes a una concentración de aproximadamente 1-4 mM. En realizaciones particulares, los cationes de magnesio están presentes a una concentración de aproximadamente 1-3 mM. En determinadas realizaciones, los iones de magnesio están presentes a una concentración de entre aproximadamente 1-3 mM (por ejemplo, aproximadamente 1,0... 1,3... 1,6... 1,9... 2,2... 2,5... 2,8... y 3,0 mM). En realizaciones particulares, las composiciones y sistemas comprenden además una sal que proporciona una fuerza iónica al menos equivalente a 50 mM de acetato de potasio o glutamato de potasio (por ejemplo, al menos 50 mM... al menos 75 mM... al menos 100 mM... al menos 150 mM o más). En algunas realizaciones, el ARN monocatenario: muestra una secuencia de ARN terapéutica, es un ARNm codificante de una proteína terapéutica, es un ARNm codificante de una proteína indicadora o es un ARNm codificante de un factor de reprogramación celular.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona composiciones o sistemas que comprenden: a) un ARN monocatenario o ARNm codificante de un factor de reprogramación, y b) iones de magnesio presentes a una concentración de aproximadamente 1-4 mM (por ejemplo, aproximadamente 1,0... 1,3... 1,6... 1,9... 2,2... 2,5... 2,8... 3,0... 3,4... 3,8... 4,2... 4,8 mM).

En determinadas realizaciones, la proteína específica del ARN bicatenario es una RNasa específica del ARN bicatenario, una endorribonucleasa o RNasa III, o una exorribonucleasa 3' a 5'.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para generar un preparado de ARN (o composición de ARN) que comprenden: poner en contacto el ARN transcrito *in vitro* con una composición que comprende a) una proteína endorribonucleasa III específica del ARN bicatenario (específica del ARNbc) (endoRNasa III); y b) cationes de magnesio presentes a una concentración de aproximadamente 1-4 mM; de manera que se genera un preparado de ARN.

En determinadas realizaciones, el preparado de ARN está prácticamente libre, extremadamente libre, absolutamente libre de ARN bicatenario. En realizaciones adicionales, los procedimientos comprenden además limpiar el preparado de ARN retirando al menos una de las endoRNasa III o nucleótidos, del preparado de ARN. En determinadas

realizaciones, los procedimientos comprenden además: (i) extraer el preparado de ARN con disolventes orgánicos (por ejemplo, tales como fenol y/o cloroformo); (ii) hacer precipitar el ARN monocatenario transcrito *in vitro* con acetato de amonio; y/o (iii) lavar el precipitado de acetato de amonio con un alcohol tal como etanol al 70 %. En realizaciones particulares, la limpieza emplea un anticuerpo específico del ARN bicatenario. En otras realizaciones, la limpieza comprende además: usar un anticuerpo que se une a la endonuclease III y/o el anticuerpo específico del ARN bicatenario; y luego hacer precipitar el anticuerpo con partículas o perlas magnéticas a las que se une la proteína A o la proteína G.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para obtener la traducción de al menos una proteína de interés en una célula humana o animal que comprende: introducir de manera repetida o continua en la célula una composición de ARN que comprende ARNm codificante de la al menos una proteína de interés, en los que la composición de ARN se ha tratado con RNasa III, por lo que la composición de ARN está prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario (por ejemplo, lo que significa que menos del 0,01 %, menos del 0,001 % o menos del 0,0002 %, respectivamente, del ARN de la composición es ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud); y cultivar la célula en condiciones en las que la célula sobrevive y crece, y en las que se traduce el ARNm. En determinadas realizaciones, la célula está *ex vivo* en cultivo o *in vivo*. En realizaciones adicionales, la composición no genera sustancialmente respuesta inmune mediada por el receptor de tipo Toll 3 (TLR3) cuando se introduce o se pone en contacto con o se inyecta en una célula o sujeto humano o animal.

En otras realizaciones, la composición no genera una respuesta inmune innata que sea suficiente para provocar una inhibición sustancial de la síntesis de proteína celular o apoptosis inducida por ARN bicatenario cuando la composición de ARN tratado se introduce repetidamente en una célula humana o animal viva. En algunas realizaciones, la célula es una célula somática, una célula madre mesenquimal, una célula reprogramada, una célula no reprogramada u otro tipo de célula. En realizaciones particulares, el procedimiento se realiza sin el uso de ninguna proteína exógena (por ejemplo, B18R), ARNip o agente de molécula pequeña que inhiba o reduzca la activación, la inducción o la expresión de una o más proteínas en una vía de respuesta inmune innata.

En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende además: tratar la célula con una proteína, ARNip, ARNm (por ejemplo, codificante de B18R o virus Vaccinia E3L o K3L) o agente de molécula pequeña que inhibe o reduce la activación, la inducción o la expresión de uno o más sensores de ARN o proteínas en una vía de respuesta inmune innata, en el que el tratamiento es antes y/o durante la introducción.

En algunas realizaciones, la célula presenta un primer estado diferenciado o fenotipo antes de la introducción, y presenta un segundo estado diferenciado o fenotipo después de la introducción.

En algunas realizaciones, la célula, antes de la introducción es una célula no reprogramada y después de la introducción es una célula reprogramada, en las que la célula reprogramada es una célula desdiferenciada, una célula madre pluripotente inducida, una célula transdiferenciada, una célula somática diferenciada o rediferenciada. En realizaciones adicionales, la introducción se repite diariamente durante al menos 2 días. En realizaciones particulares, la introducción se repite diariamente durante al menos 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días... 30 días... 50 días o más.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones o sistemas que comprenden: a) un tampón u otra solución acuosa; y b) moléculas de ARN monocatenario codificantes de al menos una proteína, en las que: i) la al menos una proteína es un factor de reprogramación; y/o ii) en las que las moléculas de ARN monocatenario contienen al menos una base modificada que reduce la activación de una vía de respuesta inmune innata en una célula en comparación con las moléculas de ARN monocatenario que presentan la misma secuencia, pero que carecen de al menos una base modificada, y en las que la composición está prácticamente libre de moléculas de ARN bicatenarias.

En determinadas realizaciones, el ARN monocatenario se caracteriza por al menos uno (o al menos dos, o al menos tres, o al menos cuatro, o al menos cinco, o todos) de los siguientes: i) codifica un factor de reprogramación; ii) codifica una proteína CD, que significa una proteína identificada en el agrupamiento del sistema de diferenciación; iii) codifica una enzima; iv) codifica una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas; v) codifica una citocina o quimioquina; vi) codifica una proteína receptora de la superficie celular; vii) codifica una proteína de una vía de señalización celular; viii) codifica un anticuerpo; ix) codifica un receptor de linfocitos T; x) codifica una proteína que reduce o suprime una respuesta inmune innata que comprende producción o respuesta de interferón (IFN); xi) codifica una proteína indicadora; xii) contiene una o más bases modificadas; xiii) presenta una estructura de caperuza; xiv) presenta una estructura Cap I en la que el penúltimo nucleótido 5' comprende un grupo 2'-O-metil-ribosilo; xv) presenta una cola poli A; xvi) no contiene ninguna base modificada aparte de un nucleótido de caperuza 5', si está presente; xvii) presenta al menos una secuencia heteróloga seleccionada entre: una secuencia de UTR 5', secuencia de Kozak, una secuencia IRES y secuencia UTR 3'; e xviii) codifica un factor de inducción de células iPS.

En determinadas realizaciones, el indicador se selecciona de entre medusa aequorina *Aequorea victoria*; una luciferasa (por ejemplo, codificante de una luciferasa seleccionada del grupo que consiste en: luciferasa de *Photinus*

pyralis o de luciérnaga de América del Norte); luciferasa de *Luciola cruciata* o de luciérnaga japonesa o Genji-botaru; luciferasa de *Luciola italic* o de luciérnaga italiana); luciferasa de *Luciola lateralis* o de luciérnaga japonesa o luciferasa Heike; luciferasa de *Luciola mingrellica* o de luciérnaga de Europa del Este; luciferasa de *Photuris pennsylvanica* o de luciérnaga de Pensilvania; luciferasa de *Pyrophorus plagiophthalmus* o de elatérico; luciferasa de *Phrixothrix hirtus* o de gusano del ferrocarril; luciferasa de *Renilla reniformis* o *Renilla* de tipo silvestre; luciferasa de mutante Rluc8 de *Renilla reniformis*; luciferasa de *Renilla* verde *Renilla reniformis*; luciferasa de *Gaussia* de tipo silvestre *Gaussia princeps*; luciferasa de *Gaussia princeps Gaussia-Dura*; luciferasa de *Cypridina noctiluca* o de *Cypridina*; luciferasa de *Cypridina hilgendorffii* o de *Cypridina* o Vargula; luciferasa de *Metridia longa* o de *Metridia*; y luciferasa de *Oplophorus graciliorostris* o de OLuc; o codificante de 2 luciferasas diferentes seleccionadas del grupo que consiste en la luciferasa de luciérnaga nativa y la luciferasa de *Renilla*; luciferasa de luciérnaga roja y luciferasa de *Renilla* de tipo silvestre; luciferasa de luciérnaga roja y luciferasa de *Renilla* verde; luciferasa de *Gaussia* y luciferasa de *Renilla*; luciferasa de *Gaussia* y luciferasa de *Renilla* verde; luciferasa de *Gaussia* y luciferasa de luciérnaga; luciferasa de *Gaussia* y luciferasa de luciérnaga roja; luciferasa de *Gaussia* y luciferasa de *Cypridina*; luciferasa de *Cypridina* y luciferasa de *Renilla*; luciferasa de *Cypridina* y luciferasa de *Renilla* verde; luciferasa de *Cypridina* y luciferasa de luciérnaga roja; o codificante de 3 luciferasas diferentes seleccionadas del grupo que consiste en: luciferasa de *Cypridina*, luciferasa de *Gaussia* y cualquier luciferasa de luciérnaga; y luciferasa de *Cypridina*, cualquier luciferasa de *Renilla* y luciferasa de luciérnaga); y una proteína fluorescente (por ejemplo, codificante de una proteína fluorescente seleccionada del grupo que consiste en: una ficobiliproteína (por ejemplo, R-ficoeritrina (R-PE), B-ficoeritrina (B-PE), C-fitocianina (CPC) y alofococianina (APC)); una proteína verde fluorescente de *Aequorea*; una proteína azul fluorescente de *Aequorea* (BFP); una proteína cian fluorescente de *Aequorea* (CFP); una proteína amarilla fluorescente de *Aequorea* (YFP); una proteína verde fluorescente excitable por violeta *Aequorea* (Sapphire); una proteína verde fluorescente potenciada por cian de *Aequorea* (EGFP); proteína roja fluorescente de *Discosoma*; una variante de la proteína roja fluorescente de *Discosoma* monomérica, denominada proteína fluorescente (m por monomérica) "mFruits" de *Discosoma* [por ejemplo, proteína amarilla fluorescente de *Discosoma* (mHoneydew); proteína azul fluorescente de *Discosoma* (mBlueberry); proteína naranja fluorescente de *Discosoma* (mOrange)]; proteína amarilla fluorescente de *Zoanthus*; proteínas verdes fluorescentes de *Obelia*; proteínas verdes fluorescentes de pensamiento de mar *Renilla reniformis*; proteínas fluorescentes de antozoos; proteína fluorescente lanceolada; proteína fluorescente de crustáceos codépodos; proteína roja lejano fluorescente de *Entacmaea quadricolor*; proteína roja fluorescente de *Anemonia sulcata*; proteína roja fluorescente de *Trachyphyllia geoffroyi* "Kaede"; proteína fluorescente de *Lobophyllia hemprichii*; proteína fluorescente de *Dendronephthya*; una proteína fluorescente de cnidarios; proteína fluorescente de artrópodos; y proteína fluorescente de cordados; una proteína fluorescente de *Galaxea* monomérica; una proteína fluorescente de *Fungia concinna* monomérica; una proteína fluorescente de *Lobophyllia hemprichii* monomérica; una proteína fluorescente de *Pectiniidae* monomérica; una proteína fluorescente de *Dendronephthya* monomérica; una proteína fluorescente de *Montipora* monomérica; y una proteína fluorescente de *Clavularia* monomérica).

En realizaciones particulares, el ARN monocatenario presenta una estructura de caperuza que comprende: i) una estructura cap1, en la que el hidroxilo 2' de la ribosa del penúltimo nucleótido 5' está metilado; ii) una caperuza 5' que comprende 7-metilguanina; y/o iii) un análogo de caperuza antiinversa (ARCA). En realizaciones adicionales, la molécula de ARN monocatenario presenta una cola poli-A compuesta de al menos 50 restos de aminoácido o al menos 100-200 restos de aminoácido (por ejemplo, al menos 50... 75... 100... 150... 200... o más). En realizaciones particulares, la UTR 5' o UTR 3' presentada por un ARN monocatenario es una secuencia presentada por un ARNm de alfa- (α)-globina o beta- (β)-globina de *Xenopus* o humano, o en las que la UTR 5' es una secuencia presentada por el ARN del virus del ataque químico del tabaco (TEV).

En otras realizaciones, el ARN monocatenario comprende o consiste en al menos un nucleósido modificado seleccionado del grupo que consiste en pseudouridina (Ψ), 1-metil-pseudouridina ($m^1\Psi$), 5-metilcitidina (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 parte del correspondiente ribonucleósido canónico sin modificar. En realizaciones particulares, a excepción del nucleótido con caperuza 5', si está presente, el ARN monocatenario solo contiene las bases de ácido nucleico canónicas G, A, C y U.

En algunas realizaciones, el ARN monocatenario comprende al menos un ribonucleósido modificado, siendo el al menos un ribonucleósido modificado seleccionado del grupo que consiste en: (i) pseudouridina (Ψ), 1-metil-pseudouridina ($m^1\Psi$), 5-metiluridina (m^5U), 2'-O-metiluridina (Um o $m^{2'O}U$) y 2-tiouridina (s^2U) en lugar de todos o casi todos los restos de uridina canónicos; (ii) 5-metilcitidina (m^5C) en lugar de todos o casi todos los restos de citidina canónicos; y/o (iii) N^6 -metiladenosina (m^6A) en lugar de todos o casi todos los restos de adenosina canónicos.

En realizaciones adicionales, solo una parte de un ribonucleósido canónico se reemplaza por el ribonucleósido modificado correspondiente (por ejemplo, en las que una parte significa que 1-25 %, 25-50 % o 50-99 % del ribonucleósido canónico se reemplaza).

En determinadas realizaciones, el al menos un ribonucleósido modificado comprende o consiste en pseudouridina (Ψ) o 1-metil-pseudouridina ($m^1\Psi$) en lugar de todos o casi todos los restos de uridina canónicos, y/o 5-metilcitidina (m^5C) en lugar de todos o casi todos los restos de citidina canónicos.

En otras realizaciones, solo se reemplaza una parte de los restos de uridina canónicos por restos pseudouridina o 1-metil-pseudouridina y/o solo una parte de los restos de citidina canónicos se reemplaza por restos de 5-metilcitidina (por ejemplo, en las que una parte significa que 1-25 %, 25-50 % o 50-99 % de uno o ambos ribonucleósidos canónicos se reemplaza).

En determinadas realizaciones, excepto en lo relativo a las bases de ácido nucleico que comprenden la caperuza 5', El ARNm solo se compone de (o consiste en) bases de ácido nucleico G, A, C y U canónicas no modificadas. En otras realizaciones, la proteína codificada por el ARN monocatenario que reduce o suprime una respuesta inmune innata que comprende la producción o respuesta de interferón (IFN) se selecciona entre proteína E3L, proteína K3L y proteína B18R, o un fragmento funcional o variante de cualquiera de las mismas. En determinadas realizaciones, la composición está prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario.

En algunas realizaciones, el ARN monocatenario codifica al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en: MYOD, ASCL1, MYT1L, NEUROD1, POU3F2, OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG, MYC, c-MYC, c-MYC(T58A), L-MYC, ETS2, MESP1 GATA4, HAND2, TBX5, MEF2C, ASCL1, EN1, FOXA2, LMX1A, NURR1, PITX3, HNF1α, HNF4α, FOXA1, FOXA2, FOXA3, GATA4, eritropoyetina y una proteína CD; o un fragmento funcional o variante de cualquiera de las anteriores.

En realizaciones adicionales, la proteína CD se selecciona entre: un receptor de superficie celular, un ligando para un receptor de superficie celular, una molécula de señalización celular, una molécula de adhesión celular, una molécula coestimulante, una proteína del sistema del complemento, una proteína que comprende un antígeno principal de histocompatibilidad de clase I o clase II, un inhibidor de una molécula de señalización celular, un transportador de una molécula de señalización celular y una molécula efectora de una respuesta inmune innata o adaptativa. En otras realizaciones, la proteína CD se selecciona entre: CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD1e; CD2; CD3d; CD3e; CD3g; CD4; CD5; CD6; CD7; CD8a; CD8b; CD9; CD10; CD11a; CD11b; CD11c; CD11d; CDw12; CD14; CD16a; CD16b; CD18; CD19; CD20; CD21; CD22; CD23; CD24; CD25; CD26; CD27; CD28; CD29; CD30; CD31; CD32; CD33; CD34; CD35; CD36; CD37; CD38; CD39; CD40; CD41; CD42a; CD42b; CD42c; CD42d; CD44; CD45; CD46; CD47; CD48; CD49a; CD49b; CD49c; CD49d; CD49e; CD49f; CD50; CD51; CD52; CD53; CD54; CD55; CD56; CD57; CD58; CD59; CD61; CD62E; CD62L; CD62P; CD63; CD64; CD66a; CD66b; CD66c; CD66d; CD66e; CD66f; CD68; CD69; CD70; CD71; CD72; CD74; CD79a; CD79b; CD80; CD81; CD82; CD83; CD84; CD85a; CD85c; CD85d; CD85e; CD85f; CD85g; CD85h; CD85i; CD85j; CD85k; CD86; CD87; CD88; CD89; CD90; CD91; CD92; CD93; CD94; CD95; CD96; CD97; CD98; CD99; CD100; CD101; CD102; CD103; CD104; CD105; CD106; CD107a; CD107b; CD108; CD109; CD110; CD111; CD112; CD113; CD114; CD115; CD116; CD117; CD118; CD119; CD120a; CD120b; CD121a; CD121b; CD122; CD123; CD124; CD125; CD126; CD127; CD129; CD130; CD131; CD132; CD133; CD134; CD135; CD136; CD137; CD138; CD139; CD140a; CD140b; CD141; CD142; CD143; CD144; CD146; CD147; CD148; CD150; CD151; CD152; CD153; CD154; CD155; CD156a; CD156b; CD157; CD158a; CD158b1; CD158b2; CD158c; CD158d; CD158e; CD158f1; CD158g; CD158h; CD158i; CD158j; CD158k; CD158z; CD159a; CD159c; CD160; CD161; CD162; CD163; CD163b; CD164; CD165; CD166; CD167a; CD167b; CD168; CD169; CD170; CD171; CD172a; CD172b; CD172g; CD173; CD177; CD178; CD179a; CD179b; CD180; CD181; CD182; CD183; CD184; CD185; CD186; CD187; CD188; CD189; CD190; CD191; CD192; CD193; CD194; CD195; CD196; CD197; CDw198; CDw199; CD200; CD201; CD202b; CD203a; CD203c; CD204; CD205; CD206; CD207; CD208; CD209; CD210; CDw210b; CD212; CD213a1; CD213a2; CD214; CD215; CD217; CD218a; CD218b; CD220; CD221; CD222; CD223; CD224; CD225; CD227; CD228; CD229; CD230; CD231; CD232; CD233; CD234; CD235a; CD235b; CD236; CD238; CD239; CD240CE; CD240D; CD241; CD242; CD243; CD244; CD245; CD246; CD247; CD248; CD249; CD252; CD253; CD254; CD256; CD257; CD258; CD261; CD262; CD263; CD264; CD265; CD266; CD267; CD268; CD269; CD270; CD271; CD272; CD273; CD274; CD275; CD276; CD277; CD278; CD279; CD280; CD281; CD282; CD283; CD284; CD286; CD288; CD289; CD290; CD292; CDw293; CD294; CD295; CD296; CD297; CD298; CD299; CD300a; CD300b; CD300c; CD300d; CD300e; CD300f; CD300g; CD301; CD302; CD303; CD304; CD305; CD306; CD307a; CD307b; CD307c; CD307d; CD307e; CD309; CD312; CD314; CD315; CD316; CD317; CD318; CD319; CD320; CD321; CD322; CD324; CD325; CD326; CD327; CD328; CD329; CD331; CD332; CD333; CD334; CD335; CD336; CD337; CD338; CD339; CD340; CD344; CD349; CD350; CD351; CD352; CD353; CD354; CD355; CD357; CD358; CD360; CD361; CD362; e CD363; o un fragmento funcional o variante de cualquiera de las anteriores.

En realizaciones adicionales, el ARNbc transcrito *in vitro* codifica una pluralidad de factores de reprogramación. En realizaciones adicionales, el preparado de RNA no genera sustancialmente respuesta inmune mediada por el receptor de tipo Toll 3 (TLR3) cuando se introduce o se pone en contacto con o se inyecta en una célula o sujeto humano o animal. En realizaciones adicionales, el preparado de ARN no genera una respuesta inmune innata que sea suficiente para provocar una inhibición sustancial de la síntesis de proteína celular o apoptosis inducida por ARN bicatenario cuando la composición de ARN tratado se introduce repetidamente en una célula humana o animal viva.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos de fabricación de un preparado de ARN que comprenden: a) procesar ARN transcrito *in vitro* mediante: i) la exposición a una proteína endoribonucleasa III específica del ARN bicatenario en una mezcla de reacción que comprende una sal que da lugar a una fuerza iónica al menos tan alta como la del acetato de potasio a una concentración de aproximadamente 50-300 mM y una concentración final de magnesio de aproximadamente 1-4 mM; y/o ii) el paso a través de un dispositivo de separación cromatográfica o electroforética; en los que el procesamiento del ARN transcrito *in vitro* genera un

preparado de ARN que está prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario, y en los que el ARN transcrito *in vitro* codifica al menos una proteína, en los que: i) la al menos una proteína es un factor de reprogramación; y/o ii) en los que el ARN transcrito *in vitro* contiene al menos una base modificada que reduce la inducción o activación de un sensor de ARN o vía de respuesta inmune innata en una célula.

- 5 En realizaciones particulares, el dispositivo de separación cromatográfica es una columna de flujo por gravedad o HPLC. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos de fabricación de un preparado de ARN que comprenden: a) poner en contacto una composición que contiene ARN monocatenario (ARNmc) y ARN bicatenario (ARNbc) con una solución que contiene RNasa III y una sal monovalente a la concentración de al menos 50 mM, pero que carece de cationes divalentes de magnesio, de modo que se genera una mezcla; b) incubar la mezcla en condiciones tales que la RNasa III se una al ARN bicatenario pero que, en general, no sea enzimáticamente activa; y c) limpiar el ARN monocatenario de la RNasa III, estando al menos parte unida al ARN bicatenario, para generar un preparado de ARN que contenga ARN monocatenario y esté sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre o prácticamente libre de ARN bicatenario (por ejemplo, lo que significa, respectivamente, que menos del: 0,5 %, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,001 % o 0,0002 % de la masa del ARN de la composición de ARN monocatenario tratado es ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases).

- En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para obtener la expresión de al menos una proteína de interés en una célula que comprende: poner en contacto una célula con una composición de ARN que comprende ARN monocatenario sintetizado *in vitro* codificante de al menos una proteína de interés tal que la al menos una proteína de interés se expresa en la célula, en los que la puesta en contacto: a) se realiza al menos una vez al día durante una pluralidad de días; o b) se realiza una pluralidad de tiempo durante al menos 24 horas; y en los que el contacto no induce una respuesta inmune innata que: i) mate a la célula; ii) sea suficiente para inhibir la síntesis de proteínas en el doble o más; y/o iii) induzca o active proteínas implicadas en una vía de apoptosis.

- En determinadas realizaciones, la al menos una proteína de interés es un factor de reprogramación, y en las que la pluralidad de días es suficiente número de días para reprogramar la célula. En determinadas realizaciones, la pluralidad de días es al menos 2 días, al menos 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días... 30 días... 50 días o más. En realizaciones particulares, el ARN monocatenario comprende al menos uno de los siguientes: una caperuza 5', una región no traducida 5', una secuencia de Kozak 5', Una región no traducida 3' y una cola de poli(A). En realizaciones adicionales, la composición está al menos prácticamente libre de ARN bicatenario. En realizaciones adicionales, la célula está ubicada en un sujeto o está ubicada *ex vivo* en cultivo. En algunas realizaciones, la composición está libre de una proteína, ARNip o agente de molécula pequeña que inhiba o reduzca la activación, la inducción o la expresión de uno o más sensores de ARN o proteínas en una vía de respuesta inmune innata.

- En determinadas realizaciones, la célula está presente en un medio de cultivo, en las que el medio de cultivo: i) está libre de células alimentadoras; y/o ii) comprende al menos un reactivo seleccionado del grupo que consiste en: un inhibidor de TGF-beta y un inhibidor de MEK. En otras realizaciones, la célula está presente en un medio de cultivo que carece de un sustrato biológico.

- En algunas realizaciones, la molécula de ARN es una secuencia de ARN terapéutica, un ARNm codificante de una proteína terapéutica, un ARNm codificante de una proteína indicadora o un ARNm codificante de un factor de reprogramación celular.

- En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos un componente adicional seleccionado entre: i) una sal monovalente a una concentración de al menos 50 mM; ii) una célula; iii) una proteína, ARNip o agente de molécula pequeña que inhiba o reduzca la activación, la inducción o la expresión de uno o más sensores de ARN o proteínas en una vía de respuesta inmune innata; e iv) una proteína de unión a ARN bicatenario. En algunas realizaciones, la célula es una célula somática, una célula madre mesenquimal, una célula reprogramada, una célula no reprogramada. En realizaciones particulares, antes de la puesta en contacto, la composición se trata con una RNasa específica del ARN bicatenario de forma que se digiere prácticamente o prácticamente todo el ARN bicatenario contaminante.

- En realizaciones particulares, la célula antes del contacto durante una pluralidad de días presenta un primer estado diferenciado o fenotipo, y después del contacto durante una pluralidad de días, presenta segundo estado diferenciado o fenotipo.

- En realizaciones particulares, la presente invención proporciona un procedimiento de fabricación de ARN monocatenarios para su uso en la reprogramación de células eucariotas que presentan un primer estado diferenciado o fenotipo a células que presentan un segundo estado diferenciado o fenotipo, introduciendo los ARN monocatenarios en las células al menos tres veces durante un período de al menos tres días, comprendiendo el procedimiento: (i) sintetizar uno o más ARN monocatenarios mediante transcripción *in vitro*, cada uno de los cuales codifica un factor de reprogramación; e (ii) tratar los ARN monocatenarios de la etapa (i) con RNasa III en una solución tamponada que tiene un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, una sal monovalente que tiene una concentración de aproximadamente 100 mM o superior, cationes de magnesio divalentes a una concentración

de aproximadamente 1 mM a menos de 10 mM durante un tiempo suficiente y en condiciones en las que se digiera el ARN bicatenario y se generen ARN monocatenarios que estén sustancialmente libres de ARN bicatenario; en otras realizaciones, dicha introducción es durante al menos aproximadamente: tres días, ... 6 días, ... 8 días, ... 10 días, ... 15 días, ... 18 días, ... 21 días, ... 28 días, ... 35 días, ... 42 días, ...50 días, ...o más de 50 días.

- 5 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones, kits o sistemas que comprenden: a) una célula y/o ARN codificante de al menos una proteína, en los que: i) la al menos una proteína es un factor de reprogramación; y/o ii) en los que el ARN contiene al menos una base modificada que reduce la activación de una vía de respuesta inmune innata en una célula; y b) un medio de cultivo, en los que el medio de cultivo: i) comprende al menos un reactivo seleccionado del grupo que consiste en: un inhibidor de TGF-beta y un inhibidor de MEK; y/o ii)
- 10 comprende un sustrato biológico para la célula, y está libre de células alimentadoras; y/o iii) no comprende ni una matriz extracelular u otro sustrato biológico ni células alimentadoras. En algunas realizaciones, en las que el medio de cultivo no comprende ni una matriz extracelular u otro sustrato biológico ni células alimentadoras, la placa de cultivo o recipiente presenta una superficie tratada sobre la que las células se adhieren y crecen en forma de una capa confluyente.
- 15 En determinadas realizaciones, la composición o el sistema comprende tanto la célula como el ARN, en las que el ARN está presente dentro de la célula. En realizaciones particulares, la célula es una célula reprogramada. En determinadas realizaciones, la célula reprogramada es una célula desdiferenciada, una célula madre pluripotente inducida o una célula transdiferenciada. En algunas realizaciones, el sustrato biológico comprende proteína vitronectina y/o la mezcla de proteína gelatinosa secretada por células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS).
- 20

En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona procedimientos de cultivo de una célula que comprenden: cultivar células en el medio de cultivo descrito anteriormente o en el presente documento, en las que las células comprenden el ARN descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, las células presentan un primer estado diferenciado o fenotipo antes del cultivo, y presentan un segundo estado diferenciado o fenotipo

25 después del cultivo. En realizaciones adicionales, las células, antes del cultivo, son células no reprogramadas y después del cultivo son células reprogramadas, en las que las células reprogramadas son células desdiferenciadas, células madre pluripotentes inducidas, células transdiferenciadas, células somáticas diferenciadas o rediferenciadas. En realizaciones particulares, el cultivo continúa durante al menos 2 días, 3 días, ... 10 días... 20 días o más, o durante 10-18 días o durante 2-25 días.

- 30 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones, kits y sistemas que comprenden: una mezcla de ARNm codificantes de factores de reprogramación de iPSC que comprenden KLF4 (K), MYC (M), OCT4 (O) y SOX2 (S), en las que la concentración molar de ARNm codificante de O es aproximadamente 3 veces superior a la concentración molar de ARNm codificante de M y S, y en las que el ARNm codificante de K está entre aproximadamente 1 vez y aproximadamente 3 veces la concentración molar de M y S, en las que la composición de ARN está prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario. En realizaciones
- 35 particulares, los ARNm codifican además LIN28 (L) o NANOG (N) o ambos, en las que la concentración molar de ARNm codificante de L o N, si está presente, es la misma o aproximadamente la misma que la concentración molar de M y S.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones y sistemas que comprenden: a) una

40 primera mezcla de diferentes moléculas de ARN codificantes de diez combinaciones diferentes de las siguientes proteínas: KLF4, o un fragmento funcional o una variante de la misma (K), MYC, o un fragmento funcional o una variante de la misma (M), OCT4, o un fragmento funcional o una variante de la misma (O), SOX2, o un fragmento funcional o una variante de la misma (S), LIN28, o un fragmento funcional o una variante de la misma (L), y NANOG, o un fragmento funcional o una variante de la misma (N), en las que las diferentes moléculas de ARN están

45 presentes en la composición o en el sistema en una proporción molar aproximada seleccionada del grupo que consiste en: $KMO_{2,5-3,5}SLN$; $KMO_{2,5-3,5}S$; $KMO_{2,5-3,5}SL$; $K_{1,5-2,5}MO_{2,5-3,5}SLN$; $K_{2,5-3,5}MO_{2,5-3,5}SLN$; $K_{1,5-2,5}MO_{2,5-3,5}SL$; $K_{2,5-3,5}MO_{2,5-3,5}SL$; $K_{1,5-2,5}MO_{2,5-3,5}S$; $K_{2,5-3,5}MO_{2,5-3,5}S$; o $K_{1,5-10,0}LMS$; y/o b) una segunda mezcla de diferentes moléculas de ARN codificante de KLF4, c-MYC, OCT4 y SOX2, en las que no hay presentes otros genes de reprogramación en la composición o en el sistema.

- 50 En realizaciones particulares, no hay presentes otras secuencias de ARN de reprogramación en la composición o en el sistema diferentes de las mencionadas en las diez combinaciones diferentes. En realizaciones particulares, las composiciones comprenden además una célula. En determinadas realizaciones, la célula es una célula reprogramada. En realizaciones adicionales, MYC es c-MYC, L-MYC o c-MYC(T58A). En realizaciones adicionales, las proporciones molares aproximadas se seleccionan entre: KMO_3SLN ; KMO_3S ; KMO_3SL ; K_2MO_3SLN ; K_3MO_3SLN ;
- 55 K_2MO_3SL ; K_3MO_3SL ; K_2MO_3S ; K_3MO_3S ; o $K_{1,5-2,5}LMS$.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o estado diferenciado o fenotipo de una célula que comprenden: introducir una pluralidad de moléculas de ARN diferentes en una célula, de modo que las células presentan un primer estado diferenciado o fenotipo antes de la introducción y presentan un segundo estado diferenciado o fenotipo después de la introducción,

60 y la introducción da lugar a una proporción molar aproximada de las diferentes moléculas de ARN en la célula

seleccionada del grupo que consiste en: KMO_{2,5-3,5}SLN; KMO_{2,5-3,5}S; KMO_{2,5-3,5}SL; K_{1,5-2,5}MO_{2,5-3,5}SLN; K_{2,5-3,5}MO_{2,5-3,5}SLN; K_{1,5-2,5}MO_{2,5-3,5}SL; K_{2,5-3,5}MO_{2,5-3,5}SL; K_{1,5-2,5}MO_{2,5-3,5}S; K_{2,5-3,5}MO_{2,5-3,5}S; o K_{1,5-10,0}LMS; en las que K es KLF4 o un fragmento funcional de la misma, M es MYC o un fragmento funcional de la misma, O es OCT4 o un fragmento funcional de la misma, S es SOX2 o un fragmento funcional de la misma, L es LIN28 o un fragmento funcional de la misma y N es NANOG o un fragmento funcional de la misma. En realizaciones particulares, la MYC es c-MYC, L-MYC o c-MYC(T58A).

En otras realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o estado diferenciado o fenotipo de una célula que comprenden: introducir en una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo: i) un primer ARNm codificante de KLF4, o fragmento funcional de la misma; ii) un segundo ARNm codificante de c-MYC, o fragmento funcional de la misma; iii) un tercer ARNm codificante de OCT-4, o fragmento funcional de la misma; e iv) un cuarto ARNm codificante de SOX2, o fragmento funcional de la misma, en las que la introducción genera una célula reprogramada que presenta un segundo estado diferenciado o fenotipo, y en las que no se usan otros factores de reprogramación, además del primer, segundo, tercer y cuarto ARNm para reprogramar la célula.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación o estado diferenciado o fenotipo de una célula que comprenden: introducir en una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo una molécula de ARN codificante de c-MYC (T58A) de modo que se genera una célula reprogramada que presenta un segundo estado diferenciado o fenotipo.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para reducir o eliminar un síntoma o una enfermedad de un sujeto eucariota que presente un estado patológico, que comprende: administrar al sujeto una dosis eficaz de una composición de ARN que comprende ARN monocatenario codificante de al menos una proteína terapéutica, en las que dicha composición de ARN está al menos sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre o prácticamente libre de ARN bicatenario contaminante, mediante lo que el síntoma o la enfermedad se reduce o se elimina. En algunas realizaciones, la composición de ARN está prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario. En realizaciones adicionales, la composición de ARN no genera una respuesta inmune innata en el sujeto que sea suficiente para provocar una inhibición sustancial de la síntesis de proteína celular o apoptosis inducida por ARN bicatenario cuando la composición de ARN se administra de manera repetida o continua al sujeto. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es eritropoyetina, o una versión truncada o mutada de la misma. En determinadas realizaciones, la administración se realiza al menos una vez durante al menos dos días. En algunas realizaciones, la administración se realiza al menos diariamente al menos 1-7 veces a la semana durante al menos 1 semana (por ejemplo, al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, ... 10 semanas... 52 semanas o más).

En otras realizaciones, la administración se realiza diariamente o dos veces al día, teniendo lugar la administración aproximadamente 1 vez a la semana, 2 veces a la semana, 3 veces a la semana, 4 veces a la semana, 5 veces a la semana, 6 veces a la semana, o diariamente durante un período de semanas, meses o años.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones o sistemas que comprenden: a) un mioblasto reprogramado o diferenciado, en las que el mioblasto comprende una molécula de ARN exógena codificante de la proteína MYOD o fragmento funcional de la misma; y/o b) una célula neuronal reprogramada o transdiferenciada, en las que la célula neuronal comprende moléculas de ARN exógenas codificantes de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en: ASCL1 o un fragmento funcional de la misma, MYT1L o un fragmento funcional de la misma, NEUROD1 o un fragmento funcional de la misma y POU3F2 o un fragmento funcional de la misma.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para reprogramar una célula no mioblástica a una célula mioblástica que comprenden: a) diariamente, durante al menos dos días, introducir en una célula no mioblástica una composición que comprende ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codificante de la proteína MYOD, o un fragmento funcional o variante de la misma, en las que la composición está al menos prácticamente libre de ARN bicatenario; y b) cultivar en condiciones en las que al menos una parte de las células no mioblásticas se reprogramen o se diferencien en mioblastos.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona procedimientos para reprogramar células somáticas no neuronales a células neuronales que comprenden: a) diariamente, durante varios días, introducir en células somáticas no neuronales una composición que comprenda ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codificante de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en: ASCL1 o un fragmento funcional de la misma, MYT1L o un fragmento funcional de la misma, NEUROD1 o un fragmento funcional de la misma y POU3F2 o un fragmento funcional de la misma, en las que la composición está prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario; y b) cultivar en condiciones en las que al menos una parte de las células somáticas no neuronales se reprogramme o transdiferencie en células neuronales. En determinadas realizaciones, la introducción se realiza al menos una vez al día durante al menos dos días, tres días... 10 días... 365 días o más.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos que comprenden poner en contacto una pluralidad de células cultivadas con una dosis diaria total (y no más que la dosis diaria total) de una composición que

comprende ARN monocatenarios codificantes de al menos un factor de reprogramación, en las que dicho contacto se repite durante un número de días suficiente para que al menos una parte de dicha pluralidad de células cultivadas se reprogramme de un primer estado diferenciado o fenotipo a un segundo estado diferenciado o fenotipo, en las que dicha dosis diaria total está entre aproximadamente 0,1 microgramos y aproximadamente 1,2 microgramos de dichos ARN monocatenarios por 10.000 a 100.000 células sembradas inicialmente (por ejemplo, por 2 ml de medio de cultivo). En algunas realizaciones, la dosis diaria total se administra una vez al día. En algunas realizaciones, la dosis diaria total se administra como dos dosis cada 24 horas... 4 dosis cada 24 horas, 8 dosis cada 24 horas. En algunas realizaciones, la mezcla de ARN monocatenarios codificantes de factores de reprogramación se introduce de manera continua (por ejemplo, en el medio de cultivo) usando un dispositivo robótico o microfluídico para dicha introducción. En algunas realizaciones, la mezcla de ARN monocatenarios codificantes de factores de reprogramación se introduce de forma continua (por ejemplo, en el medio de cultivo), y la composición de los factores de reprogramación proteicos codificados por la mezcla de ARNm se varía a lo largo del tiempo. En realizaciones particulares, la dosis diaria total es de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 o aproximadamente 1,2 microgramos de dicho ARN monocatenario.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones o sistemas que comprenden: a) un tampón u otra solución acuosa; y b) moléculas de ARN codificantes de al menos una proteína, en las que: i) dicha al menos una proteína es un factor de reprogramación; y/o ii) en las que dichas moléculas de ARN contienen al menos una base modificada que reduce la activación de una vía de respuesta inmune innata en una célula, y en las que dicha composición está libre de moléculas de ARN bicatenario a un nivel proporcionado mediante la purificación por HPLC, y en las que dicha composición generaría una respuesta inmune mediada por el receptor 3 de tipo Toll (TLR3) no detectable al introducirse o ponerse en contacto con o inyectarse en una célula o un sujeto humano o animal.

Descripción de las figuras

Las siguientes FIGURAS forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar mejor ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a una o más de estas FIGURAS en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La **FIG. 1** es un diagrama esquemático que representa la construcción, hibridación y digestión con RNasa III de un sustrato de ARN que comprende una región de ARN bicatenario de 1.671 pb flanqueada por colas de ARN monocatenario 3'-terminales de 255 bases y 136 bases. Como se muestra en la FIG. 1, cabría esperar que la digestión correcta de este sustrato de ARN mediante una endoRNasa específica del ARN bicatenario, tal como RNasa III, produjera una digestión completa de la parte de ARN bicatenario central de 1.671 pb, dejando intactas las colas de ARN monocatenario de 136 bases y 255 bases.

La **FIG. 2** muestra que la capacidad de RNasa III para digerir ARN bicatenario mientras se mantiene la integridad del ARN monocatenario varía en función de la concentración de cationes de magnesio divalentes en la reacción. El gel de electroforesis representa la digestión de un microgramo del sustrato de ARN que se muestra en la FIG. 1 por RNasa III a una concentración de 20 nM en una mezcla de reacción que contiene Tris-acetato 33 mM, pH 8, acetato de potasio 200 mM y diferentes concentraciones de acetato de magnesio ($\text{Mg}(\text{OAc})_2$). Carril M) marcadores millennium de ARN (0,5 kb, 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3; 4; 5; 6; 9 kb); Carril 1): sin control de RNasa III con el sustrato de ARN intacto; Carriles 2)-15): RNasa III + $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ a: 2) 0 mM; 3) 0,1 mM; 4) 0,25 mM; 5) 0,5 mM; 6) 1 mM; 7) 2 mM; 8) 3 mM; 9) 4 mM; 10) 5 mM; 11) 6 mM; 12) 7 mM; 13) 8 mM; 14) 9 mM; y 15) 10 mM.

La **FIG. 3** muestra que la digestión de diferentes cantidades de partida de ARN bicatenario de Luc2 por RNasa III, detectada en transferencias de puntos usando el anticuerpo monoclonal específico del ARN bicatenario J2, varía con la $[\text{Mg}^{2+}]$ usada para el tratamiento con RNasa III. Fila: 1) Poli I:C; 2) ARN bicatenario de LIN28; 3) ARN bicatenario de Luc2 menos RNasa III más $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1,0 mM; Columnas: 4)-17) representan ARN bicatenario de Luc2 más RNasa III más $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ a: 4) 0 mM; 5) 0,1 mM; 6) 0,25 mM; 7) 0,5 mM; 8) 1 mM; 9) 2 mM; 10) 3 mM; 11) 4 mM; 12) 5 mM; 13) 6 mM; 14) 7 mM; 15) 8 mM; 16) 9 mM; 17) 10 mM; Fila: 18) ARN bicatenario de cMYC más RNasa III más $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM.

La **FIG. 4** muestra que la digestión de diferentes cantidades de partida de ARN bicatenario de Luc2 por RNasa III, detectada en transferencias de puntos usando el anticuerpo monoclonal específico del ARN bicatenario K1, también varía con la $[\text{Mg}^{2+}]$ usada para el tratamiento con RNasa III. Fila: 1) Poli I:C; 2) ARN bicatenario de LIN28; 3) ARN bicatenario de Luc2 menos RNasa III más $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1,0 mM; Columnas: 4)-17) representan ARN bicatenario de Luc2 más RNasa III más $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ a: 4) 0 mM; 5) 0,1 mM; 6) 0,25 mM; 7) 0,5 mM; 8) 1 mM; 9) 2 mM; 10) 3 mM; 11) 4 mM; 12) 5 mM; 13) 6 mM; 14) 7 mM; 15) 8 mM; 16) 9 mM; 17) 10 mM; y Fila: 18) ARN bicatenario de cMYC más RNasa III más $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM.

La **FIG. 5** muestra que el tratamiento con RNasa III puede digerir eficazmente ARN bicatenario sin afectar a la integridad del ARN monocatenario pequeño (255 nt y 156 nt) ni grande (955 nt) presente en la misma composición. El gel de electroforesis muestra la digestión con RNasa III de una mezcla del sustrato de ARN que comprende una región de ARN bicatenario de 1.671 pb y colas de ARN monocatenario de 255 bases y 136

bases, y un sustrato de ARN monocatenario de 955 nucleótidos en presencia de diferentes concentraciones de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$. Carriles M) marcadores millennium de ARN (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3; 4; 5; 6; 9 kb); Carriles 1)-13) RNasa III en presencia de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ a: 1) 0 mM; 2) 0,1 mM; 3) 0,25 mM; 4) 1 mM; 5) 2 mM; 6) 3 mM; 7) 4 mM; 8) 5 mM; 9) 6 mM; 10) 7 mM; 11) 8 mM; 12) 9 mM; y 13) 10 mM.

La **FIG. 6** muestra un análisis realizado sobre los efectos de diferentes concentraciones de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ sobre la plenitud de la digestión del ARN bicatenario y la integridad del ARN monocatenario cuando se realizó el tratamiento con RNasa III usando glutamato de potasio 200 mM como una sal monovalente. Se trata de un ejemplo de un tipo de análisis que también se realizó con otras sales monovalentes. El gel de electroforesis muestra la digestión con RNasa III de una mezcla del sustrato de ARN que comprende una región de ARN bicatenario de 1.671 pb y colas de ARN monocatenario de 255 bases y 136 bases, y un sustrato de ARN monocatenario de 955 nucleótidos en presencia de diferentes concentraciones de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$. Carril M) marcadores millennium de ARN (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3; 4; 5; 6; 9 kb); Carril 1) control sin RNasa III con tampón patrón de Tris-OAc a pH 8 + sal KOAc; Carril 2) RNasa III en tampón patrón de Tris-OAc a pH 8 + $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM + sal KOAc; Carriles 3)-16) RNasa III en tampón patrón de Tris-OAc a pH 8 + sal de glutamato de K 200 mM en presencia de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ a: 3) 0 mM; 4) 0,1 mM; 5) 0,25 mM; 6) 0,5 mM; 7) 1 mM; 8) 2 mM; 9) 3 mM; 10) 4 mM; 11) 5 mM; 12) 6 mM; 13) 7 mM; 14) 8 mM; 15) 9 mM; y 16) 10 mM.

La **FIG. 7** muestra la actividad de RNasa III en una mezcla de sustratos tanto de ARN bicatenario como de ARN monocatenario en presencia de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM y diferentes concentraciones de glutamato de potasio como sal monovalente. Carril M) marcadores millennium de ARN (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3; 4; 5; 6; 9 kb); Carril 1) RNasa III 20 nM en tampón patrón de Tris-OAc a pH 8 + $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM + sal KOAc 200 mM; Carril 2) control sin RNasa III con tampón patrón de Tris-OAc a pH 8 + $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM + sal KOAc 200 mM; Carriles 3)-9) RNasa III en tampón patrón de Tris-OAc a pH 8 + $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM + sal de glutamato de K a: 3) 0 mM; 4) 50 mM; 5) 100 mM; 6) 150 mM; 7) 200 mM; 8) 250 mM; y 9) 300 mM.

La **FIG. 8** muestra la actividad de RNasa III en reacciones separadas que contienen bien un sustrato de ARN bicatenario (carriles 1-8) o un sustrato de ARN monocatenario (carriles 10-17) en presencia de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM y diferentes concentraciones de sal de acetato de potasio (KOAc). Carriles M) y 9) marcadores millennium de ARN (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3; 4; 5; 6; 9 kb); Carril 1) sustrato de ARN bicatenario en control sin RNasa III en tampón patrón de Tris-OAc a pH 8 + $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM + sal KOAc 200 mM; Carriles 2)-8) sustrato de ARN bicatenario + RNasa III en tampón patrón de Tris-OAc a pH 8 + $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM + sal KOAc a: 2) 0 mM; 3) 50 mM; 4) 100 mM; 5) 150 mM; 6) 200 mM; 7) 250 mM; y 8) 300 mM; Carril 10) sustrato de ARN monocatenario en control sin RNasa III en tampón patrón de Tris-OAc a pH 8 + $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM + sal KOAc 200 mM; Carriles 11)-17) sustrato de ARN monocatenario + RNasa III en tampón patrón de Tris-OAc a pH 8 + $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM + sal KOAc a: 11) 0 mM; 12) 50 mM; 13) 100 mM; 14) 150 mM; 15) 200 mM; 16) 250 mM; y 17) 300 mM.

La **FIG. 9** muestra la plenitud de la digestión de un sustrato de ARN bicatenario mediante tratamiento con RNasa III en una mezcla de reacción que consiste en RNasa III 20 nM en tampón de Tris-OAc 33 mM, pH 8, con KOAc 200 mM como sal monovalente y $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM durante 10 minutos a 37 °C, cuando la cantidad de ARN bicatenario varió de 1 microgramo a 20 microgramos. Carril M) marcadores millennium de ARN (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3; 4; 5; 6; 9 kb); Carril 1) 1 microgramo de sustrato de ARN bicatenario en el control sin RNasa III en tampón patrón de Tris-OAc a pH 8 + $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM + sal KOAc 200 mM; Carriles 2)-8) +RNasa III y ARN bicatenario a: 2) 1 microgramo; 3) 2 microgramos; 4) 4 microgramos; 5) 8 microgramos; 6) 12 microgramos; 7) 16 microgramos; y 8) 20 microgramos.

La **FIG. 10** muestra que el ARNm de luciferasa de luciérnaga sometido al tratamiento con RNasa III en presencia de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 2 mM durante 30 minutos presentó niveles de traducción *in vivo* varios veces mayores al transfectarse en fibroblastos BJ en comparación con el mismo ARNm sometido al tratamiento con RNasa III en presencia de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 10 mM durante 30 minutos. Tras el tratamiento con RNasa III, se limpió el ARNm de luciferasa de luciérnaga usando el procedimiento de limpieza rápida de ARN descrito en el presente documento, y se transfectó a fibroblastos BJ en pocillos por triplicado. 18 horas después de la transfección, las células se lisaron y se analizaron para determinar la cantidad de actividad de luciferasa producida. La cantidad de actividad de luciferasa (medida en unidades de luz relativa, ULR) se promedió para los ensayos duplicados de las muestras por triplicado (n = 6), y se normalizó por la cantidad de proteína del lisado celular.

La **FIG. 11** muestra una imagen de contraste de fase de una colonia de iPSC reprogramada en el EJEMPLO 11 a partir de un fibroblasto BJ humano sin el uso de una capa alimentadora y sin el uso de proteína B18R ni cualquier otro inhibidor o agente que reduzca la expresión de una vía de respuesta inmune innata. Se muestra la colonia de iPSC de dentro de una capa confluyente de fibroblastos BJ tras 18 días de la transfección con factores de inducción de iPSC de ARNm codificantes de: las proteínas OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A).

La **FIG. 12** muestra un ejemplo de células iPS candidatas teñidas con fosfatasa alcalina generadas a partir de fibroblastos BJ humanos usando un procedimiento de la invención en el que los fibroblastos BJ se transfectaron y cultivaron en pocillos sin alimentadoras recubiertos con una matriz MATRIGEL™ GFR en un medio que comprendía: A) el medio de reprogramación sin alimentadoras del EJEMPLO 11 de la presente invención sin proteína LIF o inhibidores de molécula pequeña de TGFβ o MEK; B) el medio de reprogramación sin

alimentadoras del EJEMPLO 11 de la presente invención con proteína LIF y los inhibidores de molécula pequeña, inhibidor de TGF β SB431542 e inhibidor de MEK PD0325901; y C) un medio de reprogramación comercial PLURITON™ sin adición adicional de LIF ni ningún inhibidor de molécula pequeña. Los ejemplos de colonias de tinción positiva se indican con las flechas. (Nota: en experimentos posteriores, los presentes inventores descubrieron que el procedimiento de reprogramación de células que presentan un primer estado diferenciado o fenotipo que comprenden fibroblastos humanos a células que presentan un segundo estado diferenciado o fenotipo que comprenden iPSC podría realizarse en ausencia de células alimentadoras (es decir, reprogramación sin alimentadoras) si el procedimiento comprende además la etapa de añadir un inhibidor de molécula pequeña de TGF β y/o un inhibidor de molécula pequeña de MEK (por ejemplo, inhibidor de TGF β SB431542 e inhibidor de MEK PD0325901) al medio durante las etapas de dicha introducción repetida o continua de la composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm codificante de los factores de reprogramación (por ejemplo, factores de reprogramación de iPSC); en estas realizaciones, no fue necesario añadir proteína LIF.

La **FIG. 13** muestra que las células que se originaron a partir de una colonia de iPSC que se reprogramaron en el EJEMPLO 11 a partir de fibroblastos BJ humanos en ausencia de células alimentadoras se tiñeron positivamente para los marcadores de pluripotencia OCT4, NANOG, SSEA4, SOX2 y TRA-1-60. En esta realización, se indujeron células iPSC en ausencia de células alimentadoras, pero el ARNm codificante de la proteína B18R también se transfectó a los fibroblastos BJ al mismo tiempo que los ARNm del factor de reprogramación de iPSC.

La **FIG. 14** muestra que el tratamiento con RNasa III del ARN reduce en gran medida los niveles de ARN bicatenario detectables por el anticuerpo JS. Todos los ARN mostrados se crearon usando ψ TP en lugar de UTP.

La **FIG. 15** muestra que los fibroblastos BJ transfectados durante 18 días seguidos con factores de reprogramación de ARNm expresaron el marcador de células madre Tra-1-60. Los fibroblastos BJ se transfectaron con la proporción molar de cinco factores (5F) 3:1:1:1:1 de 5mC/ ψ TP tratado con RNasa III (OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC o c-MYC (T58A)) a una dosis total de 12 μ g de ARNm por transfección durante 18 días. En algunos de los tratamientos, se usó B18R a 200 ng/ml.

La **FIG. 16** muestra que las colonias de iPSC reprogramadas a partir de fibroblastos BJ humanos usando factores de reprogramación de ARNm muestran una expresión estable marcadores de células madre. Las colonias de iPSC se recogieron manualmente y se pasaron cinco veces sobre capas de alimentación Nuff en medios de iPSC que contenían 100 ng/ml de hFGF2. Las colonias de iPSC se fijaron y se procesaron para determinar la inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocen los marcadores de células madre OCT4, SOX2 y NANOG.

La **FIG. 17** A-C muestra que las colonias clónicas de iPSC generadas mediante la reprogramación de fibroblastos BJ humanos a células iPS usando factores de reprogramación de ARNm codificantes de los factores de inducción de iPSC que se seleccionaron y clonaron se diferenciaron en las tres capas germinales. Las colonias de iPSC se pasaron 7 veces y se dejó que se diferenciaron en un protocolo de diferenciación espontánea de cuerpos embrioides. Las células diferenciadas expresaron marcadores de endodermo (AFP y SOX17), mesodermo (SMA y Desmin) y ectodermo (beta-tubulina de clase III, también conocido como β III-tubulina) tras fijarse y procesarse para determinar la inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocieron esos marcadores. La Figura 17A muestra los resultados del clon 2, la Figura 17B muestra los resultados del clon 3 y la Figura 17C muestra los resultados del clon 4.

La **FIG. 18** muestra que las colonias de iPSC que se obtuvieron mediante la reprogramación de fibroblastos BJ humanos a células iPS usando factores de reprogramación de ARNm codificantes de los factores de inducción de iPSC se tiñeron con fosfatasa alcalina, un marcador de células madre embrionarias comúnmente usado (Takahashi y Yamanaka, 2006).

La **FIG. 19** muestra que el ARNm codificante de L-MYC puede sustituir a c-MYC para la reprogramación de fibroblastos BJ humanos a células iPSC. Los fibroblastos BJ se transfectaron con ARNm de Ψ tratado con RNasa III, o ARNm de Ψ y m5C codificante de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y L-MYC durante 17 días.

La **FIG. 20** muestra ejemplos de colonias de iPSC generadas a partir de fibroblastos BJ después de 17 transfecciones diarias con ARNm de Ψ tratado con RNasa III, o ARNm de Ψ y de m5C codificante de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y L-MYC durante 17 días. Los ejemplos de las colonias de iPSC observadas el día 17 se muestran a 10 aumentos (las 6 imágenes superiores con barras de escala) y a 4 aumentos (las 6 imágenes inferiores con barras de escala).

La **FIG. 21** muestra imágenes de iPSC generadas a partir de fibroblastos BJ en células alimentadoras. La Figura 21 B muestra una amplificación mayor de una colonia de iPSC más pequeña y la mayor parte de su borde. La colonia de iPSC se tiñe positivamente tanto para TRA-1-60 (antígeno relacionado con el tumor 1-60) como para OCT4. Muchas de las células circundantes también son positivas para OCT4. Las imágenes se tomaron 10 días después de la última transfección de los factores de reprogramación de ARNm, y muestran 10 aumentos.

La **FIG. 22** muestra una colonia de iPSC rodeada de fibroblastos que expresa Tra-1-60. La Figura 22A muestra 4

aumentos, la Figura 22B muestra 10 aumentos y la Figura 22C muestra 20 aumentos.

La **FIG. 23** muestra imágenes de iPSC inmunoteñidas generadas a partir de fibroblastos BJ. La Figura 23A muestra la tinción de OCT4 y la Figura 23B muestra la tinción de TRA-1-60. La Figura 23C muestra 20 aumentos de un borde de una colonia y muestra una expresión de LIN28 de alto nivel. La Figura 23D muestra la expresión de LIN28. Se observa que el ARNm de LIN28 se transfirió, pero habían transcurrido 10 días, por lo que esto parecería mostrar expresión endógena. La Figura 23E muestra la expresión de SSEA4, un importante marcador de iPSC. La Figura 23F muestra la expresión de NANOG y la Figura 23G muestra la expresión de SSEA4. La Figura 23H muestra un segundo ejemplo usando una pequeña colonia en 20 aumentos. La Figura 23I muestra la expresión de NANOG y la Figura 23J muestra la expresión de SSEA4.

La **FIG. 24** muestra los cambios morfológicos observados en fibroblastos BJ en transición a las iPSC. Aproximadamente el día 9, se observó un cambio en la morfología de los fibroblastos BJ a medida que los fibroblastos BJ de crecimiento lento se transformaban en células epiteliales de división rápida.

La **FIG. 25** muestra colonias de iPSC que aparecen en el día 16. La Figura 25A muestra las primeras colonias de iPSC que aparecen el día 16 en el pocillo sin proteína B18R. La Figura 25B muestra las primeras colonias que aparecen el día 16 en el pocillo con la proteína B18R.

La **FIG. 26** muestra la inmunotinción de iPSC un mes después de la primera aparición de colonias de iPSC. La Figura 26A muestra la tinción para NANOG, SSEA4 y TRA-1-81, y la Figura 26B muestra la tinción para TRA-1-60, OCT4, SSEA4 y DNMT3B.

La **FIG. 27** muestra que las iPSC inducidas por ARNm modificados con ψ , con cola de poli(A) de 150 bases, protegidos con caperuza cap1 5', tratados con RNasa III codificantes de una mezcla a 3:1:1:1:1 de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y cMYC son pluripotentes según la capacidad de diferenciarse en células de las 3 capas germinales. La Figura 27A muestra TUJ1 (células de ectodermo) con un 4 aumentos, la Figura 27B muestra TUJ1 con 20 aumentos, la Figura 27C muestra 20 aumentos de GFAP (ectodermo), la Figura 27D muestra 4 aumentos de NFL (ectodermo), la Figura 27E muestra 10 aumentos de NFL, la Figura 27E muestra 10 aumentos de la actina de músculo liso alfa SMA (mesodermo), la figura 27G muestra 20 aumentos de las células musculares de Desmin (mesodermo), la Figura 27H muestra 20 aumentos de SOX17 (endodermo), la Figura 27I muestra 10 aumentos de AFP (endodermo) y la Figura 27J muestra 10 aumentos de AFP.

La **FIG. 28** muestra colonias positivas en fosfatasa alcalina generadas a partir de fibroblastos BJ transfectados diariamente durante 18 días con 1,2 microgramos de una proporción molar de 3:1:1:1:1 de ARNm modificados con pseudouridina, purificados por HPLC o tratados con RNasa III codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A) usando el reactivo de transfección de ARNm TRANSIT™, con o sin tratamiento previo con proteína B18R. Se transfectaron fibroblastos BJ sobre células alimentadoras diariamente durante 18 días, bien en presencia o en ausencia de proteína B18R, con 1,2 microgramos/pocillo/día de una proporción molar de 3:1:1:1:1 de ARNm monocatenarios modificados con ψ codificantes de, respectivamente, OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58) usando el reactivo de transfección de ARNm TransIT™ (Mirus Bio). Para preparar los ARNm modificados con ψ sustancialmente libres de ARN bicatenario, los ARNm modificados con ψ bien se purificaron mediante HPLC o se trataron con RNasa III antes de usarlos para la reprogramación. El día 20, las placas que contenían colonias de iPSC se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se tiñeron para detectar colonias positivas para fosfatasa alcalina, lo que es indicativo de colonias de iPSC. **Placa A:** purificación mediante HPLC, sin proteína B18R; **Placa B:** purificación mediante HPLC, + proteína B18R; **Placa C:** tratamiento con RNasa III, sin proteína B18R; **Placa D:** tratamiento con RNasa III, + proteína B18R. No se encontraron colonias positivas para la fosfatasa alcalina en las placas de las células que se transfectaron con los ARNm modificados con ψ que no se habían purificado mediante HPLC ni tratado con RNasa III.

La **FIG. 29** muestra un ejemplo de un pocillo con "demasiadas colonias que contar". Las colonias emergentes son las células densamente empaquetadas y de rápida división con una morfología epitelial. Ya no tienen la morfología larga y delgada de los fibroblastos BJ, y no se pueden ver las células alimentadoras debajo de la capa de células que forma las colonias confluentes. Básicamente, este pocillo entero de células se está reprogramando hasta cierto punto, pero no todas las células completarán el proceso y formarán una colonia de iPSC. La Figura 29A muestra dos imágenes, mostrando la imagen superior 4 aumentos y mostrando la imagen inferior la misma imagen con colonias más evidentes. La Figura 29B muestra dos imágenes, mostrando la imagen superior una sola colonia sobre un fondo de fibroblastos, y mostrando la imagen inferior desde el borde de un determinado pocillo colonias blancas redondeadas con células de fondo oscuro.

La **FIG. 30** muestra un ejemplo de un pocillo con inducción eficaz de colonias de iPSC a partir de fibroblastos BJ transfectados con ARNm modificados con pseudouridina codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC (T58A), en el que las células se trataron previamente con proteína B18R antes de las transfecciones.

La **FIG. 31** muestra un ejemplo de un pocillo con inducción eficaz de colonias de iPSC a partir de fibroblastos BJ transfectados diariamente durante 18 días con hasta 1,4 microgramos de una proporción molar de 3:1:1:1:1 de ARNm no modificados codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC (T58A), con y sin pretratamiento de

las células con la proteína B18R antes de las transfecciones. (A) 1,4 microgramos de la mezcla de reprogramación de ARNm por pocillo al día produjeron la muerte de muchas células, incluyendo las células alimentadoras de alrededor de esta colonia de iPSC, pero algunas colonias de iPSC sobrevivieron y se propagaron. (B) Un microgramo de mezcla de reprogramación de ARNm no modificado por pocillo y por día produjo menos toxicidad y generación de más células IPS en el día 18. (C) La adición de proteína B18R al medio durante la reprogramación dio lugar a un pocillo confluyente de colonias de iPSC - más de las que podían contarse - y las colonias de iPSC de este pocillo conservaron la morfología y las velocidades de crecimiento esperadas para las iPSC mientras se propagaban de manera continua durante más de dos meses.

La **FIG. 32** muestra imágenes de contraste de fases e iPSC inmunoteñidas tanto vivas como fijas generadas a partir de fibroblastos BJ usando ARNm no modificados tratados con RNasa III codificantes de los factores de inducción de iPSC OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A). La Figura 32A muestra una fase a 10 aumentos y la expresión de OCT4 y TRA-1-60. La Figura 32B muestra la expresión de NANOG, TRA-1-81, una fase a 10 aumentos y la expresión de SSEA4.

La **FIG. 33** muestra imágenes de contraste de fase e iPSC inmunoteñidas fijas generadas a partir de fibroblastos BJ usando ARNm modificados con ψ y purificados mediante HPLC codificantes de los factores de inducción de iPSC OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A). La Figura 33A muestra fase a 4 aumentos, fase a 10 aumentos, OCT4 a 10 aumentos y TRA1-60 a 10 aumentos. La Figura 33B muestra fase a 4 aumentos, fase a 10 aumentos, SOX2 a 10 aumentos, TRA1-80 a 10 aumentos, fase a 10 aumentos y NANOG a 10 aumentos.

La **FIG. 34** muestra una comparación del ensayo de expresión génica qPCR de niveles de GAPDH obtenidos a partir del ARN celular total aislado a partir de colonias de iPSC generadas con ARN celular total aislado de fibroblastos BJ. GAPDH es un gen constitutivo, comparable en expresión tanto en células iPSC como en fibroblastos BJ. Los niveles de expresión del gen GAPDH se midieron según sus valores de umbral de ciclo (CT), el número de ciclos de la PCR en el que la fluorescencia del indicador es superior al umbral y produce el primer aumento claramente detectable de fluorescencia sobre la variabilidad de fondo o basal. Todas las trazas cruzan el umbral (línea base) con el mismo valor CT.

La **FIG. 35** muestra una comparación del ensayo de expresión génica qPCR de CRIPTO (TDGF1), un factor de crecimiento derivado del teratocarcinoma y factor de pluripotencia conocido, obtenido a partir de ARN celular aislado de colonias de iPSC generadas y ARN celular aislado de fibroblastos BJ. Los niveles de expresión del gen CRIPTO se midieron según sus valores CT respectivos. El delta CT o cambio en la expresión es de 9,2 ciclos, que es un aumento de 588 veces en la expresión de las colonias de iPSC en reprogramación frente a los fibroblastos BJ.

La **FIG. 36** muestra una comparación del ensayo de expresión génica qPCR de NANOG, un factor de pluripotencia implicado en la diferenciación celular, la proliferación, el desarrollo embrionario, el mantenimiento de células madre somáticas, obtenido a partir de ARN celular aislado de colonias de iPSC generadas y ARN celular aislado de fibroblastos BJ. Los niveles de expresión del gen NANOG se midieron según sus valores CT respectivos. Delta CT de 7,5 ciclos representa un aumento de 181 veces en la expresión de las colonias de iPSC reprogramadas frente a los fibroblastos BJ.

La **FIG. 37** muestra una comparación del ensayo de expresión génica qPCR de GBX2, un factor de transcripción de la unión al ADN implicado en una serie de procesos de desarrollo y factor de pluripotencia conocido, obtenido a partir de ARN celular aislado de colonias de iPSC generadas y ARN celular aislado de fibroblastos BJ. Los niveles de expresión del gen GBX2 se midieron según sus valores CT respectivos. Delta CT de 4,6 ciclos representa un aumento de 24 veces en la expresión de las colonias de iPSC reprogramadas frente a los fibroblastos BJ.

La **FIG. 38** muestra imágenes de iPSC KPSMO3S (1:1:1:3:1) tratadas con RNasa III y modificadas con pseudouridina con 5 factores.

La **FIG. 39** muestra imágenes de iPSC K₃LMO₃S (3:1:1:3:1) tratadas con RNasa III y modificadas con pseudouridina con 5 factores.

La **Fig. 40** muestra colonias positivas para la fosfatasa alcalina generadas a partir de fibroblastos BJ transfectados con ARNm tratados con RNasa III codificantes de KLMO₃S (1:1:1:3:1) (FIG. 40 A) y ARNm codificantes de K₃LMO₃S (3:1:1:3:1) (FIG. 40 B).

La **FIG. 41** muestra colonias positivas para la fosfatasa alcalina generadas a partir de fibroblastos BJ transfectados con ARNm no modificados tratados con RNasa III codificantes de KMOS, KLMOS y KLMNOS.

La **FIG. 42** muestra colonias positivas para fosfatasa alcalina generadas a partir de fibroblastos BJ transfectados con ARNm Cap0 modificados con pseudouridina y tratados con RNasa III codificantes de KLMOS y KLMOS + B18R.

La **FIG. 43** muestra colonias positivas para la fosfatasa alcalina generadas a partir de fibroblastos BJ

transfectados con ARNm Cap1 modificados con pseudouridina y tratados con RNasa III codificantes de KLMOS y KLMOS + B18R en la FIG. 43 A; ARNm protegidos con caperuza ARCA modificados con pseudouridina y tratados con RNasa III codificantes de KLMOS y KLMOS + B18R en la FIG. 43 B; ARNm protegidos con caperuza 5-metilcitidina ARCA modificados con pseudouridina y tratados con APex fosfatasa codificantes de KLMOS y KLMOS + B18R en la FIG. 43 C.

La **FIG. 44 A** muestra colonias positivas para la fosfatasa alcalina generadas a partir de fibroblastos BJ transfectados con ARNm KLM_{T58A}OS (con estequiometría 1:1:1:3:1 convencional) que tienen múltiples grados de varianza. La **FIG. 44 A** muestra los pocillos 1-6, que presentan lo siguiente: Pocillo 1 - ARNm protegidos con caperuza ARCA; Pocillo 2 - ARNm protegidos con caperuza ARCA y tratados con APex fosfatasa; Pocillo 3 - ARNm protegidos con caperuza ARCA y tratados con APex fosfatasa + proteína B18R; Pocillo 4 - ARNm protegidos con caperuza ARCA y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 2 mM); Pocillo 5 - ARNm protegidos con caperuza ARCA y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 2 mM) y tratados con APex fosfatasa; y Pocillo 6 - ARNm protegidos con caperuza ARCA y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 2 mM) y tratados con APex fosfatasa + proteína B18R. La **FIG. 44 B** muestra los pocillos 7-12, que presentan lo siguiente: Pocillo 7 - ARNm protegidos con caperuza ARCA y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 2 mM) + proteína B18R; Pocillo 8 - ARNm protegidos con caperuza ARCA y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 2 mM) + proteína B18R (x 2); Pocillo 9 - ARNm que tienen una estructura Cap0; Pocillo 10 - ARNm que tienen una estructura Cap0 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 1 mM); Pocillo 11 - ARNm que tienen una estructura Cap0 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 2 mM); y Pocillo 12 - ARNm que tienen una estructura Cap0 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 1 mM) + proteína B18R. La **FIG. 44 C** muestra los pocillos 13-18, que presentan lo siguiente: Pocillo 13 - ARNm que tienen una estructura Cap0 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 2 mM) + proteína B18R; Pocillo 14 - ARNm que tienen una estructura Cap0 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 1 mM) + proteína B18R (x 2); Pocillo 15 - ARNm que tienen una estructura Cap0 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 1 mM) + proteína B18R (x 2); Pocillo 16 - ARNm que tienen una estructura Cap1; Pocillo 17 - ARNm que tienen una estructura Cap1 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 1 mM); y Pocillo 18 - ARNm que tienen una estructura Cap1 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 2 mM). La **FIG. 44 D** muestra los pocillos 19-24, que presentan lo siguiente: Pocillo 19 - ARNm que tienen una estructura Cap1 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 1 mM) + proteína B18R; Pocillo 20 - ARNm que tienen una estructura Cap1 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 2 mM) + proteína B18R; Pocillo 21 - ARNm que tienen una estructura Cap1 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 1 mM) + proteína B18R (x 2); Pocillo 22 - ARNm que tienen una estructura Cap1 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 1 mM) + proteína B18R (x 2); Pocillo 23 - ARNm que tienen una estructura Cap1 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 1 mM); y Pocillo 24 - ARNm que tienen una estructura Cap1 y tratados con RNasa III (concentración del tampón de Mg⁺² 2 mM).

La **FIG. 45** muestra imágenes de células iPS reprogramadas libres de alimentadoras inmunoteñidas generadas a partir de fibroblastos BJ usando solo ARNm modificado con Ψ codificante de los cinco factores de reprogramación, OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, y cMYC, y luego diferenciadas en cardiomiocitos. La **FIG. 45 A** muestra células diferenciadas teñidas para beta-tubulina de clase III, troponina T cardíaca y sox17. La **FIG. 45 B** muestra que las células iPS se tiñeron para marcadores de pluripotencia antes de la diferenciación en cardiomiocitos.

La **FIG. 46** muestra imágenes de células iPS reprogramadas libres de alimentadoras inmunoteñidas generadas a partir de fibroblastos BJ usando ARNm no modificados o modificados con ψ , purificación mediante HPLC o tratamiento con RNasa III codificantes de factores de inducción de iPS. Las células diferenciadas expresaron marcadores que representan las 3 capas germinales de las células, incluyendo marcadores ectodérmicos, beta-tubulina de clase III neuronal (TUJ1) (Fig. 46A), proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y cadena ligera de neurofilamento (NF-L) (ambas Fig. 46B), los marcadores mesodérmicos, actina de músculo liso alfa (actina de músculo liso α , α -SMA o SMA) y desmina, y los marcadores endodérmicos, factor de transcripción SOX17 (Fig. 46C) y alfa-fetoproteína (AFP) (que se muestra en la Fig. 46C y D).

La **FIG. 47** muestra imágenes de células iPS reprogramadas sin alimentadoras inmunoteñidas (11 pases) generadas a partir de fibroblastos BJ que eran mezclas de ARNm tratadas con RNasa III o purificadas por HPLC que contenían el ARNm de cMyc T58A más corto. Las iPSC se tiñen positivamente para los marcadores que representan las 3 capas germinales de las células. Se descubrió que las células expresaban el marcador ectodérmico, beta-tubulina de clase III neuronal (TUJ1), los marcadores mesodérmicos, actina de músculo liso alfa (SMA) (todos mostrados en la Fig. 47A) y desmina (Fig. 47B), y los marcadores endodérmicos, factor de transcripción SOX17 (Fig. 47B) y alfa-fetoproteína (AFP) (Fig. 47C).

La **FIG. 48** muestra imágenes de células iPS reprogramadas sin alimentadoras inmunoteñidas (4 pases) generadas a partir de fibroblastos BJ que eran mezclas de ARNm tratadas con RNasa III o purificadas por HPLC que contenían el ARNm de cMyc T58A más corto. Las iPSC se tiñen positivamente para los marcadores que representan las 3 capas germinales de las células. Se descubrió que las células expresaban el marcador ectodérmico beta-tubulina de clase III neuronal (TUJ1) (Fig. 48A), los marcadores mesodérmicos actina de

músculo liso alfa (SMA) (Fig. 48B) y desmina (Fig. 48C), y los marcadores endodérmicos SOX17 (Fig. 48C).

La **FIG. 49** muestra que la adición de ciertas cantidades de ARN bicatenario inhibe la reprogramación de células madre mesenquimales de ratón a mioblastos, aunque, en ausencia de ARN bicatenario, se indujeron mioblastos a partir de las células madre mesenquimales después de solo dos transfecciones diarias con ARNm codificante de la proteína MYOD. Esto demuestra la importancia de la inducción de los sensores de ARN y las vías de respuesta inmune innata por parte del ARN bicatenario, y la importancia de purificar el ARNm mediante procedimientos cromatográficos, electroforéticos u otros procedimientos de separación de columnas o geles, o el tratamiento de la composición de ARN, o del ARN monocatenario o ARNm que la componen, usando el procedimiento de tratamiento con RNasa III desvelado en el presente documento. **A)** Células madre mesenquimales C3H10T1/2 sin tratar (contraste de fase). **B)** Células C3H10T1/2 sin tratar (Cadena pesada de miosina, MHC en rojo). **C)** Transfectadas simuladas (contraste de fase). **D)** Transfectadas simuladas (MHC). **E)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml (contraste de fase). **F)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml (MHC). **G)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + ARN bicatenario de luc2 a 0,1 µg/ml (contraste de fase). **H)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + ARN bicatenario de luc2 a 0,1 µg/ml (MHC). **I)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + ARN bicatenario de luc2 a 0,01 µg/ml (contraste de fase). **J)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + ARN bicatenario de luc2 a 0,01 µg/ml (MHC). **K)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + ARN bicatenario de luc2 a 0,001 µg/ml (contraste de fase). **L)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + ARN bicatenario de luc2 a 0,001 µg/ml (MHC). **M)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + ARN bicatenario de luc2 a 0,0001 µg/ml (contraste de fase). **N)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + ARN bicatenario de luc2 a 0,0001 µg/ml (MHC). **O)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + ARN bicatenario de luc2 a 0,00001 µg/ml (contraste de fase). **P)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + RN bicatenario de luc2 a 0,00001 µg/ml (MHC). **Q)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + ARN bicatenario de luc2 a 0,000001 µg/ml (contraste de fase). **R)** ARNm de MYOD a 0,5 µg/ml + ARN bicatenario de luc2 a 0,000001 µg/ml (MHC).

La **FIG. 50** muestra imágenes de contraste de fase a 10 aumentos de fibroblastos que fueron transfectados bien con ARNm de ψ codificantes de solo las proteínas A y N (arriba) o ARNm de ψ codificantes de proteínas AMNP (abajo). La Figura 50A muestra la fase a 10 aumentos de fibroblastos transfectados de forma simulada con IMR90 con morfología celular original. La Figura 50B muestra la fase a 10 aumentos de células transfectadas con ARNm modificados con ψ y tratados con RNasa III codificantes de AMNP con morfología neuronal.

La **FIG. 51** muestra una imagen de contraste de fase a 20 aumentos de la morfología presentada por los fibroblastos reprogramados el día 7 (parte superior; 51A). En este caso, la imagen superior muestra los fibroblastos que fueron transfectados con ARNm modificados con ψ codificantes de proteínas AMNP, y la imagen inferior (51B) muestra los fibroblastos que fueron transfectados con ARNm modificados con ψ codificantes solo de las proteínas A y N. Tras la fijación, las células de la imagen superior se tiñeron positivamente para la proteína 2 asociada con microtúbulos (MAP2), un marcador pan-neuronal.

Definiciones

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

Las expresiones "que comprende", "que contiene", "que tiene", "incluye" y "que incluye" se han de interpretar como "incluyendo, pero sin limitación", a menos que se indique lo contrario. Los términos "un", "una", "el" y "la", y los referentes similares en el contexto de descripción de la invención y, específicamente, en el contexto de las reivindicaciones anexas, se han de interpretar como que cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o expresiones ilustrativas ("por ejemplo", "p. ej.", "tal/es como") pretende meramente ilustrar aspectos o realizaciones de la invención, y no se ha de interpretar como limitante del ámbito de la misma, a menos que se reivindique lo contrario.

Cuando se usa el término "aproximadamente" en el presente documento para describir un número o una cantidad, el término se interpretará como el número o la cantidad que se especifica más o menos el 20 % de ese número o cantidad. Por ejemplo, las afirmaciones "de aproximadamente 1 mM a 4 mM" o "de aproximadamente 1 a 4 mM" se interpretarán como "de 0,8 mM a 4,8 mM".

Con respecto al uso de la palabra "derivado/a", tal como para un ARN (incluyendo el ARN monocatenario o el ARNm) o un polipéptido que "deriva" de una muestra, muestra biológica, célula, tumor o similares, se entiende que el ARN o el polipéptido estaban presentes en la muestra, muestra biológica, célula, tumor o similares, o se obtuvo usando el ARN de la muestra, muestra biológica, célula, tumor o similares mediante un procedimiento tal como una reacción de transcripción *in vitro* o una reacción de amplificación de ARN, en el que el ARN o polipéptido es codificado por o a partir de una copia de todas o de una parte de las moléculas de ARN o polipéptido de la muestra original, muestra biológica, célula, tumor o similares. A modo de ejemplo, dicho 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 usado para la transcripción *in vitro* o para una reacción de amplificación de ARN sea de la muestra, muestra biológica, célula, tumor o similares. En la mayoría de las realizaciones de la presente invención, un ARN monocatenario o ARNm que se deriva de una muestra biológica, célula, tumor o similares se amplifica a partir de ARNm de la muestra biológica,

célula, tumor o similar, usando una reacción de amplificación de ARN que comprende transcripción *in vitro*, como se describe en otra parte del presente documento.

Con respecto a las realizaciones de la presente invención que se refieren a los procedimientos, las composiciones, los sistemas y los kits para introducir una composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* codificante de una o más proteínas en una célula humana o animal (por ejemplo, de mamífero) (por ejemplo, una célula que está *ex vivo* en cultivo o *in vivo* en un tejido, órgano u organismo) para inducir un efecto biológico o bioquímico, las expresiones "efecto biológico o bioquímico" o "efecto biológico" o "efecto bioquímico" significan y se refieren en el presente documento a cualquier efecto en la célula en la que se introduce la composición de ARN o cualquier efecto en un tejido, órgano u organismo que contenga la célula en la que se introduce la composición de ARN, efecto que sería esperado o anticipado o entendido por un experto habitual en la materia basándose en la información y el conocimiento en la técnica sobre la proteína codificada por dicho ARN monocatenario o ARNm. Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que el ARN comprende ARN monocatenario o ARNm codificante de una proteína no mutada de tipo silvestre que tiene una función conocida (por ejemplo, como una enzima, factor de crecimiento, un receptor de superficie celular, por ejemplo, en una vía de señalización celular, una citocina, una quimiocina como una molécula efectora en un mecanismo de respuesta inmune activa o innata), el efecto biológico o bioquímico de dicha introducción de dicha composición de ARN en una célula que tiene un gen mutante defectuoso o no funcional, en el que la propia proteína de la célula es defectuosa o no funcional en dicha célula, sería que la composición de ARN introducida pudiera sustituir o reemplazar o complementar a la proteína defectuosa o no funcional de la célula, restableciendo así el efecto biológico o bioquímico normal de la proteína de tipo silvestre codificada por la composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm. A modo de ejemplo adicional, en algunas realizaciones en las que se introduce un ARNm codificante de eritropoyetina en una célula de mamífero *in vivo* en un mamífero, un efecto biológico o bioquímico es un aumento en la fracción de volumen de hematocrito o eritrocito (EVF), que refleja un aumento en el porcentaje en volumen (%) de glóbulos rojos en sangre de dicho mamífero.

El término "muestra" y la expresión "muestra biológica" se usan en su sentido más amplio, y abarcan muestras o especímenes obtenidos de cualquier fuente que contenga o pueda contener células eucariotas, incluyendo 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 animales y seres humanos. Sin embargo, estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestras u organismos que encuentran utilidad con la presente invención. Además, para realizar investigaciones o estudiar los resultados relacionados con el uso de un procedimiento o de una composición de la invención, en algunas realizaciones, una "muestra" o "muestra biológica" comprende células fijadas, células tratadas, lisados celulares y similares. En algunas realizaciones, tales como realizaciones del procedimiento en las que el ARNm se administra a una célula de un organismo que tiene una enfermedad conocida o a una célula que presenta un estado patológico o una patología conocida, la "muestra" o "muestra biológica" también comprende bacterias o virus.

Como se usa en el presente documento, el término "incubación" y las 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 para que se forme un producto de reacción deseado.

"*In vitro*" en el presente documento se refiere a un ambiente artificial y a procedimientos o reacciones que se producen dentro de un ambiente artificial. Los ambientes *in vitro* pueden componerse, entre otros, aunque sin limitación, de procedimientos o reacciones que se producen en un tubo de ensayo. La expresión "*in vivo*" se refiere al ambiente natural y a los procedimientos o las reacciones que se producen dentro de un ambiente natural (por ejemplo, en una célula viva, o un ser humano o animal). "*Ex vivo*", en el presente documento, se refiere a procedimientos o reacciones que tienen lugar dentro de una célula en cultivo.

Como se usa en el presente documento, un "nucleósido" se refiere a una molécula compuesta de 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). Un nucleósido también puede estar modificado. Por ejemplo, la pseudouridina (abreviada con la letra griega psi o Ψ) es un nucleósido modificado compuesto de ribosa que está unido a un átomo de carbono de uracilo, mientras que el nucleósido canónico uridina está unido a un átomo de nitrógeno designado como la posición 1 del uracilo. Un "nucleótido" o "mononucleótido" se refiere a un nucleósido que está fosforilado en uno o más de los grupos hidroxilo del azúcar pentosa. El número de grupos fosfato también puede estar indicado (por ejemplo, un "mononucleótido" se compone de 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 "terminal 5'" (extremo 5') y un "terminal 3'" (extremo 3'), porque, durante la síntesis (por ejemplo, por una ADN o ARN polimerasa [denominándose este último procedimiento "transcripción"]), los mononucleótidos se unen en una dirección a través de un enlace fosfodiéster para producir oligonucleótidos o polinucleótidos, de manera que un fosfato del átomo de carbono 5' de una fracción de azúcar del mononucleótido se une a un átomo de oxígeno en el átomo carbono 3' de la fracción 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 enlazado al átomo de oxígeno del átomo de carbono 3' de una fracción de azúcar de un mononucleótido, y se denomina "extremo 3'" si su átomo de oxígeno 3' no está unido a un fosfato 5' que se une a una fracción de azúcar de un mononucleótido posterior. 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, una fracción de azúcar o un enlace internucleosídico (o internucleotídico) de uno o más de los nucleótidos del ARNm que se introduce en la célula eucariota en los procedimientos de la invención puede comprender una base modificada, una fracción de azúcar o un enlace internucleosido. Por ejemplo, además de los otros nucleótidos modificados mencionados en otra parte del presente documento para realizar los procedimientos de la presente invención, uno o más de los nucleótidos del ARNm también pueden tener una base de ácido nucleico modificada que comprenda o consista 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; o una aza o desaza guanina; o una base de ácido nucleico que se derivatiza con una fracción de biotina, una fracción de digoxigenina, una fracción fluorescente o quimioluminiscente, una fracción de inactivación o algunas otras fracciones para lograr uno o más fines específicos; y/o uno o más de los nucleótidos del ARNm pueden tener una fracción 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 una fracción electrófila, fotorreactiva, alquilílica u otra fracción química reactiva.

En algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los kits de la invención, uno o más de los nucleótidos del ARNm comprende un enlace internucleosídico modificado, tal como un enlace fosforotioato, fosforoditioato, fosforoseleniato o fosforodiseleniato, que es resistente a algunas nucleasas, incluyendo en un análogo de caperuza dinucleotídico tio-ARCA (Grudzien-Nogalska y col. 2007), que se usa en una reacción IVT para la protección con caperuza durante la transcripción del ARN o en la cola de poli(A) (por ejemplo, mediante la incorporación de un nucleótido que tiene el enlace fosforotioato, fosforoditioato, fosforoseleniato o fosforodiseleniato modificado durante la IVT del ARN o, por ejemplo, mediante la incorporación de ATP que contiene el enlace fosforotioato, fosforoditioato, fosforoseleniato o fosforodiseleniato modificado en una cola de poli(A) en el ARN por poliadenilación usando una poli(A) polimerasa). La invención no se limita a las bases de ácidos nucleicos modificadas, las fracciones de azúcar o los enlaces internucleosídicos 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 molécula de polímero que comprende una secuencia unida covalentemente o una serie de "mononucleósidos", también denominados "nucleósidos", en la que el la posición 3' del azúcar pentosa de un nucleósido está unida por un enlace internucleosídico, tal como, pero sin limitación, un enlace fosfodiéster, a la posición 5' del azúcar pentosa del siguiente nucleósido (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 algunas realizaciones, el oligonucleótido consiste en o comprende ribonucleótidos ("ARN"). Un nucleósido unido a un grupo fosfato se conoce como "nucleótido". El nucleótido que está enlazado a la posición 5' del siguiente nucleótido en la serie se denomina "5' de" o "nucleótido 5'" y el nucleótido que está enlazado a la posición 3' del nucleótido 5' se denomina "3' de" o "nucleótido 3'". Los términos "3' de" y "5' de" se usan en el presente documento con respecto a la presente invención para referirse a la posición u orientación de una secuencia de ácido nucleico o elemento genético particular dentro de una cadena del ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido que se esté mencionando en particular (tal como un promotor de ARN polimerasa, codón de inicio, marco de lectura abierto o codón de parada en relación con otras secuencias o elementos genéticos dentro de una cadena de ADN; o un nucleótido de caperuza, región no traducida 5' o 3' (UTR 5' o UTR 3'), secuencia de Kozak, codón de inicio, secuencia de codificación, codón de parada o cola de poli-A en relación con otras secuencias dentro de una cadena de ARNm). Por lo tanto, aunque se cree que la síntesis de ARN en sentido de 5' a 3' durante la transcripción avanza en sentido "corriente abajo", la secuencia promotora codificante presentada por un promotor de ARN polimerasa se denomina en el presente documento 3' de la secuencia de molde transcrita en la cadena del molde. Los expertos en la materia comprenderán estos términos en el contexto de la química y estructura de los ácidos nucleicos, en particular, en referencia a las posiciones 3' y 5' de las fracciones de azúcar de los nucleótidos de ácido nucleico canónicos. A modo de ejemplo adicional, una primera secuencia que está "5' de" una segunda secuencia significa que la primera secuencia se presenta en o cerca del extremo 5' con respecto a la segunda secuencia. Si una primera secuencia de ácido nucleico está 3' de una segunda secuencia en una cadena, el complemento de la primera secuencia estará 5' del complemento de la segunda secuencia en la cadena complementaria.

Además, por varias razones, un ácido nucleico o polinucleótido de la invención puede comprender una o más bases de ácido nucleico modificadas, fracciones de azúcar o enlaces internucleosídicos. A modo de ejemplo, algunas de las razones por las que usar ácidos nucleicos o polinucleótidos que contienen bases modificadas, fracciones de azúcar o enlaces internucleosídicos incluyen, pero sin limitación: (1) la modificación de la T_q; (2) el cambio de la susceptibilidad del polinucleótido a una o más nucleasas; (3) el suministro de una fracción para la unión de un marcador; (4) el suministro de un marcador o un inactivador para una marcador; o (5) el suministro de una fracción,

tal como biotina, para unirse a otra molécula que esté en solución o unida a una superficie. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un oligonucleótido, tal como el oligorribonucleótido de marcaje terminal, puede sintetizarse de modo que la parte 3' aleatoria contenga uno o más análogos de ácido ribonucleico de configuración restringida, tal como, pero sin limitación, uno o más análogos de ácido ribonucleico en los que el anillo de ribosa esté "bloqueado" con un puente de metileno que conecte el átomo de 2'-O con el átomo de 4'-C (por ejemplo, como los que se pueden obtener en Exiqon, Inc. con la marca comercial "LNA™"); estos nucleótidos modificados dan lugar a un aumento en la T_f o temperatura de fusión de aproximadamente 2 grados a aproximadamente 8 grados centígrados por monómero de nucleótido. Si la T_f aumenta, podría ser posible reducir el número de nucleótidos aleatorios en la parte 3' aleatoria del oligorribonucleótido que marcaje terminal. Sin embargo, un nucleótido modificado, tal como un LNA debe validarse para que funcione en el procedimiento para el fin previsto, así como para satisfacer otros criterios del procedimiento; por ejemplo, en algunas realizaciones, un criterio para usar el nucleótido modificado en el procedimiento es que el oligonucleótido que lo contiene pueda ser digerido por una RNasa específica de ARN monocatenario.

Para lograr los objetivos de la invención, a modo de ejemplo, pero no de limitación, las bases de ácido nucleico de los mononucleótidos pueden comprender guanina, adenina, uracilo, timina o citidina, o como alternativa, una o más de las bases de ácido nucleico pueden comprender una base modificada, tal como, pero sin limitación, xantina, alilamino-uracilo, alilamino-timidina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 5-propinil-uracilo, 5-propinil-citosina, 4-tiouracilo, 6-tioguanina, un aza o desaza uracilo, timidinas, citosinas, adeninas o guaninas. Aún más, pueden comprender una base de ácido nucleico que se derivatiza con una fracción de biotina, una fracción de digoxigenina, una fracción fluorescente o quimioluminiscente, una fracción de inactivación o alguna otra fracción. La invención no se limita a las bases de ácido nucleico enumeradas; esta lista se proporciona para mostrar un ejemplo de la amplia selección de bases que pueden usarse para un fin particular en un procedimiento.

Con respecto a los ácidos nucleicos o polinucleótidos de la invención, uno o más de las fracciones de azúcar pueden comprender ribosa o 2'-desoxirribosa, o como alternativa, una o más de las fracciones de azúcar pueden ser alguna otra fracción de azúcar, tal como, pero sin limitación, 2'-fluoro-2'-desoxirribosa o 2'-O-metil-ribosa, que proporcionan 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 una fracción electrófila, fotorreactiva, alquilílica u otra fracción química reactiva.

Los enlaces internucleosídicos de los ácidos nucleicos o polinucleótidos de la invención pueden ser enlaces fosfodiéster, o como alternativa, uno o más de los enlaces internucleosídicos pueden comprender enlaces modificados, tales como, pero sin limitación, enlaces fosforotioato, fosforoditioato, fosforoseleniato o fosforodiseleniato, que son resistentes a algunas nucleasas.

Los oligonucleótidos y polinucleótidos, incluyendo moléculas quiméricas (es decir, compuestas) y oligonucleótidos con bases modificadas, azúcares o enlaces internucleosídicos están disponibles en el mercado (por ejemplo, TriLink Biotechnologies, San Diego, CA, EE.UU. o Integrated DNA Technologies, Coralville, IA).

Siempre que se hace referencia a una muestra o composición "tratada con RNasa III" (por ejemplo, una composición de ARN, ARN monocatenario, ARN monocatenario protegido con caperuza y/o poliadenilado, ARNm, ARN monocatenario o ARNm, ARN monocatenario transcrito *in vitro* o similares "tratados con RNasa III"), quiere decir que la muestra u otra composición que contenga o pueda contener ARN bicatenario se ha tratado con RNasa III usando un tratamiento con RNasa III o un "procedimiento de tratamiento con RNasa III".

Siempre que se hace referencia a un "tratamiento con RNasa III" o "procedimiento de tratamiento con RNasa III" o "tratar una muestra o composición con RNasa III" en el presente documento, quiere decir incubar una muestra o composición que comprende ARN monocatenario y que contiene o puede contener ARN bicatenario (por ejemplo, una composición de ARN, ARN monocatenario, ARN monocatenario protegido con caperuza y/o poliadenilado, ARNm, ARN monocatenario o ARNm, ARN monocatenario transcrito *in vitro*, ARN de IVT o similares) con la enzima RNasa III en una solución acuosa tamponada o mezcla de reacción en condiciones en las que la RNasa III esté activa [por ejemplo, en las que la solución acuosa tamponada tiene un pH de aproximadamente pH 7 a pH 9 y comprende una sal u otro compuesto a una concentración suficiente para mantener una fuerza iónica equivalente a al menos 50 mM de acetato de potasio o glutamato de potasio (por ejemplo, aproximadamente 50-300 mM de acetato de potasio o glutamato de potasio y un compuesto de magnesio que proporciona aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM de cationes de magnesio divalentes inicialmente no quelados] y luego, opcionalmente, en algunas realizaciones, limpiar el ARN monocatenario de la muestra o composición para eliminar la enzima RNasa III y/o nucleótidos y/o pequeños oligonucleótidos y/o sal, y/u otros componentes de la reacción de tratamiento con RNasa III. En algunas realizaciones del tratamiento con RNasa III o el procedimiento de tratamiento con RNasa III o de tratar una muestra o composición con RNasa III, se usa el procedimiento de limpieza rápida de ARN descrito en el presente documento para dicha limpieza del ARN monocatenario de la muestra o composición. Sin embargo, en otras realizaciones, se usa otro procedimiento de limpieza para dicha limpieza del ARN monocatenario.

Los términos "purificado" o "purificar" o "limpiado" o "limpiar", en el presente documento, se refieren a la eliminación de componentes (por ejemplo, contaminantes) de una muestra (por ejemplo, de ARN monocatenario, ARNm o un precursor de los mismos transcritos *in vitro* o sintetizados *in vitro*). Por ejemplo, ácidos nucleicos, tales como ARN

monocatenario, ARNm o un precursor de los mismos transcritos *in vitro* o sintetizados *in vitro*) se purifican o se limpian mediante la eliminación de proteínas contaminantes en la mezcla de reacción de transcripción *in vitro* o especies de ácido nucleico no deseadas (por ejemplo, el molde de ADN o contaminantes de ARN distintos del ARN monocatenario o ARNm deseado, tal como ARN bicatenario o productos de transcripción *in vitro* que son más cortos o más largos que el ARN monocatenario o ARNm de longitud completa deseados codificados por el molde. La eliminación de contaminantes da lugar a un aumento en el porcentaje de ácido nucleico deseado (por ejemplo, el ARN monocatenario o ARNm deseado) que comprende el ácido nucleico. Los términos "purificado/a" o "purificar", cuando se usa en el presente documento, se refieren al uso de procedimientos para eliminar contaminantes mediante el uso de un dispositivo de separación cromatográfica o electroforética que comprende una resina, matriz o gel, o similar (por ejemplo, por HPLC, FPLC o cromatografía en columna de flujo por gravedad, o electroforesis en agarosa o poliacrilamida). Por el contrario, "limpio/s" y "limpiar", cuando se usan en el presente documento, se refieren al uso de procedimientos para eliminar contaminantes por extracción (por ejemplo, extracción con disolvente orgánico, por ejemplo, extracción con fenol y/o cloroformo), precipitación (por ejemplo, precipitación de ARN con acetato de amonio) y lavado de precipitados (por ejemplo, lavado de precipitados de ARN con etanol al 70 %), sin el uso de un dispositivo de separación cromatográfica o electroforética que comprenda una resina, matriz o gel, o similares. Por lo tanto, cuando se limpia una muestra (por ejemplo, ARN monocatenario o ARNm transcrito *in vitro* o sintetizado *in vitro*), dicho procedimiento, en determinadas realizaciones, es mucho más fácil, más rápido, mucho menos costoso, requiere mucho menos conocimiento y preparación, y requiere menos materiales, materiales menos costosos y menos mano de obra para purificar la muestra. En algunas otras realizaciones, una muestra (por ejemplo, ARN monocatenario o ARNm transcrito *in vitro* o sintetizado *in vitro*, o precursor del mismo) se limpia o se purifica además usando un procedimiento de filtración rápida en gel con un dextrano reticulado (por ejemplo, Sephadex, por ejemplo, una columna de centrifugación Sephadex) para separar moléculas de bajo peso molecular, tales como sales, tampones, nucleótidos y oligonucleótidos pequeños, disolventes (por ejemplo, fenol, cloroformo) o detergentes del ARN monocatenario o ARNm.

La invención no se limita a una ARN polimerasa usada para la transcripción o la síntesis *in vitro* de un ARN monocatenario o ARNm usado en un procedimiento o que comprende una composición, un sistema o kit de la presente invención. Sin embargo, en algunas realizaciones preferidas, el ARN monocatenario o ARNm se sintetiza usando una ARN polimerasa de tipo T7. Una "ARN polimerasa de tipo T7" (o "RNAP T7"), en el presente documento, significa ARN polimerasa de T7 (por ejemplo, véase Studier, F. W. y col., pág. 60-89 en *Methods in Enzymology*, Vol. 185, ed. por Goeddel, DV, Academic Press, 1990) o una RNAP derivada de un bacteriófago "de tipo T7", que significa un bacteriófago que tiene una organización genética similar a la del bacteriófago T7. Se ha descubierto que la organización genética de todos los fagos de tipo T7 que se han examinado es esencialmente la misma que la de T7. Los ejemplos de bacteriófagos de tipo T7 de acuerdo con la invención incluyen los fagos de *Escherichia coli* tales como T3 y los fagos de *Salmonella typhimurium* tales como SP6, y los fagos de *Klebsiella* tales como K11 (McAlister WT y Raskin CA, 1993), así como las formas mutantes de dichas RNAP (por ejemplo, Sousa y col., Patente de los Estados Unidos n.º 5.849.546; Padilla, R y Sousa, R, *Nucleic Acids Res.*, 15: e138, 2002; Sousa, R y Mukherjee, S, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, 73: 1-41, 2003; Guillerez, J, y col., patente de EE.UU. n.º 7.335.471; o solicitud de patente de EE.UU. 20040091854). Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas de los procedimientos en los que se usa una ARN polimerasa para la transcripción o síntesis *in vitro* de cualquier ARN monocatenario usado en un procedimiento o en una composición del presente documento, la ARN polimerasa se selecciona del grupo que consiste en RNAP de T7, RNAP de T3, RNAP de tipo T7 de tipo silvestre SP6 RNAP, la mutante Y639F de RNAP de T7, la mutante Y640F de RNAP de T3, la mutante Y631F de RNAP de SP6, la mutante Y662F de la RNAP de K11 del fago de *Klebsiella*, la mutante doble Y639F/H784A de RNAP de T7, la mutante P266L de RNAP de T7, la mutante P267L de RNAP de T3, la mutante P239L de RNAP de SP6 y la mutante P289L de la RNAP de K11 del fago de *Klebsiella*. Sin embargo, en otras realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm se sintetiza usando otra ARN polimerasa que se une e inicia la transcripción en un promotor de ARN polimerasa que se une a una secuencia codificante en el molde de ADN que da lugar a la síntesis del ARN monocatenario o ARNm por dicha ARN polimerasa.

Un "molde" es una molécula de ácido nucleico que sirve para especificar la secuencia de nucleótidos presentada por un ácido nucleico que se sintetiza mediante una polimerasa de ácido nucleico dependiente de ADN o ARN. Si el ácido nucleico comprende dos cadenas (es decir, es "bicatenario"), y a veces incluso si el ácido nucleico comprende solo una cadena (es decir, es "monocatenario"), la cadena que sirve para especificar la secuencia de nucleótidos presentada por un ácido nucleico que se sintetiza es el "molde" o "la cadena molde". El ácido nucleico sintetizado por la ácido nucleico polimerasa es complementario al molde. Tanto el ARN como el ADN siempre se sintetizan en el sentido de 5' a 3', comenzando en el extremo 3' del molde, y las dos cadenas de un dúplex de ácido nucleico siempre están alineadas de modo que los extremos 5' de las dos cadenas están en extremos opuestos del dúplex (y, por necesidad, entonces son los extremos 3'). Se requiere un cebador para que los moldes de ARN y ADN inicien la síntesis mediante una ADN polimerasa, pero no se requiere un cebador para iniciar la síntesis mediante una ARN polimerasa dependiente de ADN, que, en general, se denomina simplemente "ARN polimerasa".

"Transcripción" o "transcripción *in vitro*" o "IVT" significa la formación o síntesis de una molécula de ARN por una ARN polimerasa usando una molécula de ADN como molde usando una reacción o procedimiento *in vitro*.

Un "promotor de ARN polimerasa" o un "promotor", como se usa en el presente documento, significa un segmento de ADN que presenta una secuencia de nucleótidos a la que una ARN polimerasa que reconoce dicha secuencia es

capaz de unirse e iniciar la síntesis de ARN. La ARN polimerasa que reconoce al promotor también se puede designar (por ejemplo, un "promotor T7" o un "promotor de ARN polimerasa de T7" o un "promotor de RNAP T7" es un promotor reconocido por la ARN polimerasa de T7). La mayoría, pero no todos, los promotores de ARN polimerasa son bicatenarios. Si un promotor de ARN polimerasa es bicatenario, el promotor de ARN polimerasa presenta (o tiene) una "secuencia promotora codificante" y una "secuencia promotora no codificante". Como se usa en el presente documento, la "secuencia promotora codificante" se define como la secuencia de un promotor de ARN polimerasa que se une a la cadena molde, en cuyo caso la secuencia promotora codificante está 3' de la secuencia de ADN en la cadena molde que se espera para especificar la secuencia de nucleótidos presentada por el ARN que es sintetizado por la ARN polimerasa que reconoce y se une al promotor de la ARN polimerasa. Como se usa en el presente documento, la "secuencia promotora no codificante" se define como la secuencia de un promotor de ARN polimerasa que es complementaria a la secuencia de promotor codificante. Si una ARN polimerasa (por ejemplo, la ARN polimerasa del fago N4) puede sintetizar ARN usando un promotor de ARN polimerasa monocatenario, entonces, el promotor de la ARN polimerasa presenta solo la secuencia del promotor codificante. Cabe señalar que las definiciones de una "secuencia de promotor codificante" y "secuencia de promotor no codificante" pueden ser opuestas a lo que se esperaría de algunas personas con conocimiento en la técnica, pero la terminología usada en el presente documento se desarrolló en el nuevo contexto de promotores de ARN polimerasa monocatenarios. Se entiende y recuerda más fácilmente al observar que una secuencia promotora codificante de la cadena molde (es decir, unida a los extremos 3' de las moléculas de ADNc de la primera cadena) da lugar a la síntesis del ARN codificante usando los procedimientos de la invención.

Una "caperuza" o un "nucleótido con caperuza" significa un nucleósido-5'-trifosfato que, en condiciones de reacción adecuadas, se usa como un sustrato mediante 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 productos de transcripción de ARN primarios (que tienen un 5'-trifosfato) o ARN que tiene un 5'-difosfato. El nucleótido que está así unido al ARN también se denomina en el presente documento "nucleótido con caperuza". Un "nucleótido con caperuza" es un nucleótido de guanina que se une a través de su extremo 5' al extremo 5' de un producto de transcripción de ARN primario. El ARN que tiene el nucleótido con caperuza unido a su extremo 5' se denomina "ARN protegido con caperuza" o "producto de transcripción de ARN protegido con caperuza" o "producto de transcripción protegido con caperuza". Un nucleósido con caperuza común es la 7-metilguanosina o N⁷-metilguanosina (a veces denominada "caperuza convencional"), que tiene una estructura designada "m⁷G", en cuyo caso el ARN protegido con caperuza o "ARN protegido con caperuza m⁷G" tiene una estructura designada m⁷G(5')ppp(5')N₁(pN)_x-OH(3'), o de manera más simple, m⁷GpppN₁(pN)_x o m⁷G[5']ppp[5']N, en las que m⁷G representa el nucleósido con caperuza de 7-metilguanosina, ppp representa el puente trifosfato entre los átomos de carbonos 5' del nucleósido con caperuza y el primer nucleótido del producto de transcripción primario de ARN, N₁(pN)_x-OH(3') representa producto de transcripción primario de ARN, del que 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 la guanina, y "[5']" indica la posición en la que la "p" se une a la ribosa del nucleótido con caperuza y al primer nucleósido del producto de transcripción de ARNm ("N"). Además de esta "caperuza convencional", hay una variedad de otros análogos de caperuza de origen natural y sintéticos que son conocidos en la técnica. El ARN que tiene cualquier nucleótido con caperuza se denomina "ARN protegido con caperuza".

Un ARN protegido con caperuza que comprende una composición o un sistema o un kit, o se usa en un procedimiento de la presente invención se sintetiza *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARN protegido con caperuza se sintetiza después de la transcripción a partir de ARN transcrito *in vitro*, mediante la protección con caperuza del ARN monocatenario que tiene un grupo trifosfato 5' o ARN monocatenario que tiene un grupo difosfato 5' usando un sistema enzimático de protección con caperuza (por ejemplo, usando un sistema enzimático de protección con caperuza que comprende una ARN guaniltransferasa; por ejemplo, un sistema enzimático de protección con caperuza de vaccinia o un sistema enzimático de protección con caperuza de *Saccharomyces cerevisiae*).

Como alternativa, en algunas otras realizaciones, el ARN protegido con caperuza sintetizado durante la transcripción mediante la transcripción *in vitro* (IVT) de un molde de ADN que contiene un promotor de ARN polimerasa, en las que, además de la GTP, la reacción de IVT también contiene un análogo de caperuza dinucleotídico (por ejemplo, un análogo de caperuza de m⁷GpppG o un análogo de caperuza de N⁷-metil,2'-O-metil-GpppG AR-CA o un análogo de caperuza N⁷-metil,3'-O-metil-GpppG ARCA) o un análogo de caperuza de dinucleótido fosforotioato o tio-ARCA (Grudzien-Nogalska E, y col., 2007), usando procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando un kit de protección con caperuza AMPLICAP™ T7 para la fabricación de un ARN protegido con caperuza de m⁷GpppG o, por ejemplo, usando un kit de transcripción de ARN con 5mC y Ψ con ARCA INCOGNITO™ T7 o un kit de transcripción kit de transcripción MESSAGEMAX™ T7 ARCA-CAPPED MESSAGE para la fabricación de ARN protegido con caperuza de ARCA, CELLSRIPT, INC, Madison, WI, EE.UU.). Sin embargo, algunas realizaciones de los procedimientos, de las composiciones o de los sistemas o kits (por ejemplo, en procedimientos en los que el ARNm usado para dicha introducción de ARNm codificante de al menos un factor de reprogramación en una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo, en los que el ARN monocatenario o ARNm se protegió con caperuza durante la transcripción usando un análogo de caperuza), el ARN monocatenario o ARNm se trató además con una fosfatasa (por ejemplo, como se describe en otra parte del presente documento) para eliminar las moléculas de ARN que presentan un grupo trifosfato 5'.

La protección con caperuza posterior a la transcripción de un producto de transcripción de ARNm primario 5'-trifosforilado *in vivo* (o usando un sistema enzimático de protección con caperuza *in vitro*) se produce a través de varias etapas enzimáticas (Higman y col., 1992, Martin y col., 1975, Myette y Niles, 1996).

En general, las siguientes reacciones enzimáticas participan en la protección con caperuza del ARNm eucariota:

- 5 (1) la ARN trifosfatasa escinde el trifosfato 5' de ARNm a un difosfato, $\text{pppN}_1(\text{p})\text{N}_x\text{-OH}(3') \rightarrow \text{ppN}_1(\text{p})\text{N}_x\text{-OH}(3') + \text{P}_i$; y luego
- (2) la ARN guaniltransferasa cataliza la unión de GTP al difosfato 5' de la mayoría de los nucleótidos 5' (N_1) del ARNm, $\text{ppN}_1(\text{p})\text{N}_x\text{-OH}(3') + \text{GTP} \rightarrow \text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{N}_1(\text{p})\text{N}_x\text{-OH}(3') + \text{PPI}$; y finalmente,
- 10 (3) la guanina-7-metiltransferasa, usando S-adenosil-metionina (AdoMet) como cofactor, cataliza la metilación del nitrógeno 7 de la guanina en el nucleótido con caperuza,
 $\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{N}_1(\text{p})\text{N}_x\text{-OH}(3') + \text{AdoMet} \rightarrow \text{m}^7\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{N}_1(\text{p})\text{N}_x\text{-OH}(3') + \text{AdoHyc}$.

El ARN que resulta de la acción de la ARN trifosfatasa y las actividades enzimáticas de ARN guaniltransferasa, así como el ARN que es además metilado por la actividad enzimática de la guanina-7-metiltransferasa, se denomina en el presente documento "ARN protegido con caperuza 5'" o "ARN protegido con caperuza", y un "sistema enzimático de protección con caperuza que comprende ARN-guaniltransferasa" o, de manera más simple, un "sistema enzimático de protección con caperuza" o una "enzima de protección con caperuza" significa en el presente documento cualquier combinación de uno o más polipéptidos que tienen las actividades enzimáticas que dan lugar a "ARN protegido con caperuza". Los sistemas enzimáticos de protección con caperuza, que incluyen formas clonadas de dichas enzimas, se han identificado y purificado a partir de muchas fuentes y son bien conocidos en la técnica (Banerjee 1980, Higman y col., 1992 y 1994; Myette y Niles 1996, Shuman 1995 y 2001; Shuman y col. 1980; Wang y col. 1997). Se puede usar cualquier sistema enzimático de protección con caperuza que pueda convertir el ARN no protegido con caperuza que tiene un polifosfato 5' en ARN protegido con caperuza para proporcionar un ARN con caperuza para cualquiera de las realizaciones de la presente invención. En algunas realizaciones, el sistema enzimático de protección con caperuza es un sistema enzimático de protección con caperuza de poxvirus. En algunas realizaciones preferidas, el sistema enzimático de protección con caperuza es un sistema enzimático de protección con caperuza de virus vaccinia. En algunas realizaciones, el sistema enzimático de protección con caperuza es un sistema enzimático de protección con caperuza de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, en vista del hecho de que los genes codificantes de ARN trifosfatasa, ARN guaniltransferasa y guanina-7-metiltransferasa de una fuente pueden complementar las eliminaciones 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.

Las composiciones de ARN que comprenden ARN monocatenario o ARNm usados en los procedimientos de la presente invención pueden mostrar un nucleótido con caperuza modificado; en algunas realizaciones, las moléculas de ARN monocatenario se protegen con caperuza usando un sistema enzimático de protección con caperuza según lo descrito por Jendrisak; J y col., en la Solicitud de Patente de EE.UU. con número de serie 11/787352 (publicación n.º 20070281336). Un "nucleótido con caperuza modificado" de la presente invención significa un nucleótido con caperuza en el que el azúcar, la base de ácido nucleico o el enlace internucleosídico están modificados químicamente en comparación con el correspondiente nucleótido con caperuza de 7-metilguanosina canónico. Los ejemplos de un nucleótido con caperuza modificado incluyen un nucleótido con caperuza que comprende: (i) un 2'- o 3'-desoxiguanosina-5'-trifosfato modificado (o guanina 2'- o 3'-ácido desoxirribonucleico-5'-trifosfato) en el que la posición 2'- o 3'-desoxi de la fracción de azúcar desoxirribosa se sustituye con un grupo que comprende un grupo amino, un grupo azido, un grupo flúor, un grupo metoxi, un grupo tiol (o mercapto) o un grupo metil-tio (o grupo metilmercapto); o (ii) un guanosina-5'-trifosfato modificado, en el que el oxígeno O6 de la base de guanina está sustituido con un grupo metilo; o (iii) 3'-desoxiguanosina. Por razones de claridad, se entenderá en el presente documento que un "desoxiguanosina-5'-trifosfato sustituido con alcoxi" también se puede denominar "guanosina-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) también se pueden denominar en el presente documento 2'-O-metilguanosina-5'-trifosfato (2'-OMe-GTP) y 3'-O-metilguanosina-5'-trifosfato (3'-OMe-GTP), respectivamente. Después de la unión del nucleótido con caperuza modificado al extremo 5' del ARN no protegido con caperuza que comprende productos de transcripción de ARN primario (o ARN que tiene un difosfato 5'), la parte de dicho nucleótido con caperuza modificado que se une al ARN no protegido con caperuza que comprende los productos de transcripción de ARN primario (o ARN que tiene difosfato 5') puede denominarse en el presente documento "nucleósido con caperuza modificado" (es decir, sin hacer referencia a los grupos fosfato a los que está unido), pero, a veces, se denomina "nucleótido con caperuza modificado".

Un "ARN protegido con caperuza de nucleótido modificado" es una molécula de ARN protegido con caperuza que se sintetiza usando un sistema enzimático de protección con caperuza y un nucleótido con caperuza modificado, en el que el nucleótido con caperuza en su extremo 5' comprende el nucleótido de caperuza modificado o un ARN protegido con caperuza que se sintetiza durante la transcripción en una reacción de transcripción *in vitro* que contiene un análogo de caperuza modificado dinucleotídico en el que el análogo de caperuza dinucleotídico contiene

la modificación química en el nucleótido de caperuza. En algunas realizaciones, el análogo de caperuza dinucleotídico modificado es un análogo de caperuza antiinverso o ARCA o un tio-ARCA (Grudzien y col. 2004, Grudzien- Nogalska y col., 2007, Jemielity y col. 2003, Peng y col. 2002, Stepinski y col. 2001).

- 5 Un "ARN primario" o "producto de transcripción de ARN primario" significa una molécula de ARN que es sintetizada 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'.

Las células humanas y animales poseen una amplia selección de mecanismos de defensa que comprenden sensores de ARN y vías de señalización para protegerlos contra la introducción exógena de ARN. Es importante entender estos mecanismos de defensa celular y tenerlos en cuenta al diseñar moléculas de ARN para su introducción en una célula humana o animal con el fin de reprogramar la célula a otro estado de diferenciación o fenotipo (por ejemplo, para investigación clínica o para medicina regenerativa o inmunoterapia) para que esas moléculas de ARN eviten o minimicen la inducción y/o activación de numerosos sensores de ARN y vías de señalización. Entre estos, se encuentran los "sensores de ARN de ARN bicatenario" y las "vías de señalización de ARN bicatenario", que significa e incluye cualquiera de los mecanismos mediante los que una célula humana o animal reconoce y responde al ARN bicatenario que se introduce en la célula, tal como ARN bicatenario que se introduce en la célula como resultado de la infección por virus. En particular, la inducción del sistema de interferón (IFN) por ARN bicatenario es el principal activador de la respuesta de una célula de mamífero a la detección del ARN bicatenario por sensores celulares de ARN (por ejemplo, véase Gantier, MP y Williams, BRG, 2007, y Jiang, F y col. 2011). Después de su activación por ARN bicatenario, el IFN de tipo I induce y activa una proteína quinasa Ser/Thr ahora conocida comúnmente como PKR (anteriormente conocida también como quinasa Eif2ak2, Prkr, Tik, DAI, P1-eIF-2 y p68). La PKR inhibe la traducción del ARNm catalizando la fosforilación de la subunidad alfa del factor 2 de inicio de la traducción eucariota (eIF-2 α). La síntesis de proteínas celulares se inhibe cuando tan solo el 20 % de las moléculas de eIF-2 α se fosforilan. La inhibición significativa de la síntesis de proteína reduce la expresión del ARN monocatenario que se introduce, mediante lo que se contrarresta el resultado deseado para el que se introdujo el ARN monocatenario, y si la síntesis de proteína se prolonga, la célula se debilita y, finalmente, la célula avanza hacia la muerte. El IFN también induce y/o activa otros sensores de ARN. Por ejemplo, el IFN induce un sistema 2'-5'-oligoadenilato sintasa (2'-5'OAS)/RNasa L. Las enzimas 2'-5'OAS se componen de dos dominios que se ensamblan en la célula para formar un sitio de activación de ARN bicatenario. Tras la unión al ARN bicatenario, la 2'-5'OAS se activa a una forma que convierte el ATP en PPi y oligoadenilatos unidos en 2'-5'. A su vez, los oligoadenilatos unidos en 2'-5' se unen a monómeros de RNasa L enzimáticamente inactivos, que se dimerizan para formar dímeros de RNasa L enzimáticamente activos. Los dímeros de RNasa L activos luego degradan el ARN en la célula, disminuyendo aún más la síntesis de proteínas. Aún más, con respecto al reconocimiento inmune innato del ARN que se introduce en una célula (por ejemplo, por infección con un virus ARN), los receptores citoplásmicos o citosólicos RIG-I (codificado por el gen I inducible por ácido retinoico) y MDA5 (codificado por el gen 5 asociado con la diferenciación del melanoma) tienen funciones importantes. RIG-I parece reconocer y unir al menos tres elementos de la estructura del ARN: (i) reconoce y se une preferentemente al ARN bicatenario corto de extremos romos con o sin un grupo trifosfato 5'; (ii) reconoce específicamente y se une a los grupos trifosfato 5' en ARN monocatenario o ARN bicatenario, pero no reconoce ni se une a esos ARN si están protegidos con caperuza 5'; y (iii) reconoce y une ARN con secuencias de poliuridina (Kato H y col., 2008; Hornung V y col. 2006; Jiang y col. 2011; Pichlmair A y col., 2006; Saito T y col., 2008; Schlee M y col., 2009; Uzri D y Gehrke L, 2009). Por otra parte, MDA-5 reconoce específicamente y se une a ARN bicatenario largo, en lugar de ARN bicatenario corto como RIG-I). Además, Züst y col. (2011) mostraron que MDA-5 también media en la detección de ARN monocatenario que carece de caperuza 5' con una estructura cap1; por lo tanto, un virus corona mutante que carecía de actividad 2'-O-metiltransferasa y producía ARN monocatenario tenía una estructura capO que produjo la inducción dependiente de MDA-5 de interferones de tipo I en ratones, mientras que el virus corona de tipo silvestre que tenía actividad 2'-O-metiltransferasa y producía ARN monocatenario que tenía una estructura cap1 no produjo la inducción de interferones de tipo I, y la inducción del interferón de tipo I por virus deficientes en 2'-O-metiltransferasa dependió de MDA5 citoplásmico. Tras la detección de ARN que presenta uno o más de los elementos que reconocen, los sensores de ARN citoplásmico RIG I o MDA-5 inician las cascadas de señalización que inducen la expresión de las citocinas, incluyendo los interferones tipo I (IFN- α e IFN- β), que son secretados por las células activadas para transmitir señales de peligro a las células vecinas. Estas señales de peligro se transmiten por la unión de los interferones secretados a receptores de interferón de tipo I en las superficies de las células vecinas, y el receptor de interferón de tipo I activado (IFNAR) desencadena una vía de señalización que consiste en factores de transcripción Jak y STAT, activando así la expresión de numerosos genes estimulados por interferón. Además, se sabe que el ARN bicatenario también se une a otros sensores de ARN celulares que dan lugar a la inducción y/o activación de muchos genes. Por ejemplo, el ARN bicatenario induce directa o indirectamente factores de transcripción de la familia IRF, en particular, IRF 1, IRF 3, IRF 5 e IRF 7, que, a su vez, inducen la producción de más IFN de tipo I, y el IFN de tipo I induce aproximadamente mil genes estimulados por IFN. La inducción de estos y otros sensores de ARN y vías de respuesta inmune innata (por ejemplo, receptores de tipo TLR3, TLR7 y TLR8; gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I); gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5); y posiblemente la helicasa (LGP2), dan lugar a la inhibición de la síntesis de proteínas en la célula afectada y, finalmente, la apoptosis inducida por ARN bicatenario a través de la señalización del receptor de la muerte, incluyendo la activación de caspasa-8. Se ha informado que la quinasa N-terminal PKR, RNasa L, IRF3 y c-Jun son componentes de las vías proapoptóticas activadas por ARN bicatenario. Por lo tanto, es importante que las moléculas de ARN introducidas en las células

humanas y animales vivas eviten inducir y activar los numerosos sensores y mecanismos de ARN que las protegen contra los patógenos que comprenden ARN. Posiblemente, los preparados de ARN que contienen incluso pequeñas cantidades de ARN bicatenario pueden desencadenar una respuesta inmune innata *in vivo*, tal como una respuesta inducida por interferón (IFN) y/o activada por IFN, que conduce a la supresión de la traducción y a la muerte celular *in vivo* (Yang S y col., 2001; Wianny F y Zernicka-Goetz M, 2000).

En algunos EJEMPLOS del presente documento que describen realizaciones de los procedimientos que comprenden la reprogramación de células que presentan un primer estado diferenciado o fenotipo a células que presentan un segundo estado o fenotipo diferenciado, se realizó la qRT-PCR en ARN celular total purificado de células transfectadas con mezclas de reprogramación de ARNm para cuantificar los niveles de ARNm en esas células que serían indicativos de la inducción de sensores de ARN o de genes de respuesta del sistema inmune innato. Por ejemplo, en determinados experimentos, la qRT-PCR se realizó usando pares de cebadores para amplificar los niveles de expresión de los ARNm codificantes de IFNB, RIG1, OAS3 e IFIT1 en células que se reprogramaban usando mezclas de ARNm codificantes de los factores de reprogramación de iPSC, en los que dichos ARNm se trataron con el procedimiento de tratamiento con RNasa III descrito en el presente documento o se purificaron por HPLC. Por ejemplo, en estos ensayos de qRT-PCR, los niveles de expresión de los ARNm codificantes de IFNB, RIG1, OAS3 y IFIT1, normalizados para los niveles de expresión de ciertos genes constitutivos, fueron bajos, y los niveles de ARNm para estos genes en las células transfectadas con mezcla de reprogramación de ARNm tratado con RNasa III fueron similares a los niveles de ARNm para estos genes en las células transfectadas con la misma mezcla de reprogramación de ARNm que se purificó mediante HPLC. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la activación o inducción de la expresión de uno o más sensores de ARN o genes de respuesta inmune innata se detecta, se analiza, se mide y/o se cuantifica mediante la detección, el ensayo, la medición y/o la cuantificación de los niveles o niveles relativos de ARNm expresados en las células mediante PCR o qRT-PCR (por ejemplo, tras la introducción de mezclas de reprogramación de ARNm en dichas células).

En algunas realizaciones, una composición, un sistema, un kit o un procedimiento de la presente invención comprende o usa una composición que comprende ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* usando una reacción de amplificación de ARN. 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, en algunas realizaciones, el procedimiento de amplificación de ARN comprende: (a) sintetizar ADNc de primera cadena complementario a una o más moléculas de ARN deseadas por la extensión de ADN polimerasa dependiente de ARN o transcripción inversa 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 usando un procedimiento 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 mediante lo que se obtiene el ARN correspondiente a una o más moléculas de ARN deseadas. A menos que se indique lo contrario en relación con una realización específica de la invención, una amplificación de ARN de acuerdo con la presente invención 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 producto de transcripción de ARN primario, en lugar del complemento de esa secuencia). Las reacciones de amplificación de ARN codificante conocidas en la técnica, que están abarcadas dentro de la presente definición incluyen, aunque sin limitación, los procedimientos que sintetizan ARN codificante descritos en Ozawa y col. (2006) y en las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 20090053775; 20050153333; 20030186237; 20040197802; y 20040171041. El procedimiento de amplificación de ARN descrito en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20090053775 (actualmente, patentes de EE.UU. n.º 8.039.214 y 8.329.887) por Dahl y Sooknanan es un procedimiento preferido para obtener ARN amplificado derivado de una o más células, cuyo ARN amplificado se usa luego para producir ARNm para su uso en los procedimientos de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, "RNasa III", cuando se usa en el presente documento con respecto a un procedimiento, una composición, un kit o un sistema de la invención significa una endoRNasa de la familia de las RNasas III. En realizaciones preferidas de los procedimientos, de las composiciones o de los kits que comprenden RNasa III, o del uso o procedimientos de uso de los mismos, la RNasa III se une y digiere ARN bicatenario que contiene un mínimo de dos vueltas de la doble hélice de forma A, (aproximadamente 20 pb), pero no el ARN monocatenario, a oligonucleótidos de ARN bicatenario pequeños que tienen un tamaño de aproximadamente 12 a 15 pb de longitud. En algunas realizaciones preferidas, la RNasa III es una RNasa III de clase I. En algunas realizaciones preferidas, la RNasa III se deriva de una fuente microbiana (por ejemplo, una fuente procariota). En una realización preferida, la RNasa III es una enzima derivada de *E. coli*, o un fragmento funcional o variante enzimática de la misma. En algunas otras realizaciones, la RNasa III genera oligorribonucleótidos de ARN bicatenario de menos de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En realizaciones preferidas, la RNasa III presenta al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con RNasa III de *E. coli*. Sin embargo, la RNasa III, que a veces se abrevia como "RIII" en el presente documento, puede ser cualquier endoribonucleasa específica de doble cadena (endoRNasa) que digiera ARN bicatenario, pero no ARN monocatenario, en un grado similar a RNasa III de *Escherichia coli*, ya sea en condiciones de reacción aproximadamente similares a las descritas en el presente documento, o en otras condiciones de reacción que sean óptimas para otra RNasa III altamente

purificada particular que carezca de actividad endorribonucleasa y exorribonucleasa en el ARN monocatenario. Se pueden identificar las condiciones de reacción óptimas para otras enzimas de la familia de las RNasas III mediante el uso del nuevo sustrato de ARN que comprende partes monocatenarias y bicatenarias desarrolladas en el presente documento (FIG. 1); este sustrato permite un análisis y una optimización rápidos, exactos y precisos de la actividad de RNasa específica del ARN bicatenario, y la especificidad de la digestión del ARN bicatenario frente al ARN monocatenario. Como se menciona en el presente documento, este sustrato fue usado por los solicitantes para desarrollar el procedimiento de tratamiento con RNasa III de la presente invención, que digiere mucho más completamente los contaminantes de ARN bicatenario de muestras de ARN que comprenden principalmente ARN monocatenario, mientras que preservan mejor la integridad del ARN monocatenario que las condiciones del procedimiento de ensayo de RNasa III de Robertson y colaboradores en su trabajo de 1968 (Robertson, HD y col., 1968), y se usaron de forma continua y universal desde ese momento (por ejemplo, 1975; Robertson H. D., 1982; Mellits K. H. y col., 1990; Nicholson A. W., 1996; Pe'ery T. y Mathews M. B. 1997).

Una "ADN polimerasa dependiente de ARN" o "transcriptasa inversa" es una enzima que es capaz de extender el extremo 3' de un ácido nucleico que se hibrida con un molde de ARN para sintetizar ADN que es complementario al molde ("ADN complementario" o "ADNc"). El extremo 3' del ácido nucleico que se extiende puede ser el extremo 3' del mismo molde de ARN, en cuyo caso, la síntesis de ADNc se cebe intramolecularmente, o el extremo 3' del ácido nucleico que se extiende puede ser el extremo 3' de otro ácido nucleico que sea diferente del molde de ARN y que se hibrida con el molde de ARN, en cuyo caso, la síntesis de ADNc se cebe intermolecularmente. Todas las transcriptasas inversas conocidas también tienen la capacidad de hacer una copia de ADN complementaria de un molde de ADN; por lo tanto, son ADN polimerasas dependientes tanto del ARN como del ADN.

Como se usa en el presente documento, una "DNasa específica monocatenaria" significa una DNasa que digiere específicamente el ADN monocatenario, pero que no digiere el ARN monocatenario, o el ARN o ADN que se hibrida o forma complejos con ARN o ADN complementarios, bien formando parte dicho ARN o ADN complementario de otra molécula de ácido nucleico (por ejemplo, mediante emparejamiento de bases intermolecular) o formando parte de la misma molécula de ácido nucleico (por ejemplo, mediante emparejamiento de bases intramolecular). La DNasa específica de ADN monocatenario puede ser una endonucleasa o una exonucleasa, siempre que esté activa en la digestión específica del ADN monocatenario a monómeros o oligodesoxirribonucleótidos cortos. En realizaciones preferidas, los productos de digestión usando la DNasa específica de ADN monocatenario no sirven como cebadores en presencia de una molécula de ácido nucleico monocatenario que sea capaz de servir como molde en las condiciones de reacción usadas en el procedimiento. La exonucleasa I, exonucleasa VII y la exonucleasa Rec J son ejemplos de DNasas específicas de ADN monocatenario.

Como se usa en el presente documento, una "RNasa específica monocatenaria" significa una RNasa que digiere específicamente el ARN monocatenario, pero que no digiere el ADN monocatenario, o el ARN o ADN que se hibrida o forma complejos con ARN o ADN complementarios, bien formando parte dicho ARN o ADN complementario de otra molécula de ácido nucleico (por ejemplo, mediante emparejamiento de bases intermolecular) o formando parte de la misma molécula de ácido nucleico (por ejemplo, mediante emparejamiento de bases intramolecular). La RNasa específica de ARN monocatenario puede ser una endonucleasa o una exonucleasa, siempre que sea activa en la digestión específica del ARN monocatenario a monómeros u oligorribonucleótidos cortos que no sirvan como cebadores en presencia de una molécula de ácido nucleico monocatenario que pueda servir como molde en las condiciones de reacción usadas en el procedimiento. La RNasa I de *E. coli* es una RNasa específica del ARN monocatenario ilustrativa.

Una "poli-A polimerasa" o "poli(A) polimerasa" ("PAP") significa una ARN polimerasa independiente del molde que se encuentra en la mayoría de los eucariotas, procariotas y virus eucariotas, que usa selectivamente ATP para incorporar restos de AMP a extremos 3'-hidroxilados de ARN. Dado que las enzimas PAP que se han estudiado en plantas, animales, bacterias y virus, todas catalizan la misma reacción global (Edmonds, 1990), son altamente conservadas estructuralmente (Gershon, 2000) y carecen de especificidad intrínseca por secuencias particulares o tamaños de moléculas de ARN determinados si la PAP se separa de proteínas que reconocen las señales de poliadenilación AAUAAA (Wilusz y Shenk, 1988), se pueden usar enzimas PAP de tipo silvestre y recombinantes purificadas de cualquiera de una variedad de fuentes para la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones de las composiciones, de los kits o de los procedimientos de la invención, se fabrica un ARN monocatenario o ARNm "poliadenilado" o "con cola de poli(A)" usando enzima PAP de *Saccharomyces* (por ejemplo, de *S. cerevisiae*) o enzima PAP de *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*) de tipo silvestre o recombinante. En algunas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm poliadenilado o con cola de poli(A) comprende o consiste en uno o más ARN monocatenarios o ARNm que contienen nucleósidos que comprenden una o más bases de ácido nucleico modificadas que dan lugar a una reducción de la inducción o activación de un sensor de ARN o mecanismo de respuesta inmune innata en comparación con los nucleósidos que comprenden bases de ácido nucleico GAUC canónicas (por ejemplo, cada una de las que codifican un factor de reprogramación, por ejemplo, un factor de inducción de células iPS). En otras realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm poliadenilado o con cola de poli(A) comprende nucleósidos que comprenden solo bases de ácido nucleico canónicas, y no comprende nucleósidos que comprenden una o más bases de ácido nucleico modificadas que den lugar a una reducción de la inducción o activación de un sensor de ARN o mecanismo de respuesta inmune innata en comparación con las bases GAUC.

En algunas realizaciones preferidas de las composiciones, de los kits o de los procedimientos de la invención, el

ARN monocatenario o ARNm comprende o consiste en ARN monocatenario o ARNm (o ARN monocatenario o moléculas de ARNm) sintetizado *in vitro* (o transcrito *in vitro*), cada uno de los cuales "codifica" (o "presenta una región de codificación" o (secuencia de codificación" ("cds") o "presenta un marco de lectura abierto" ("ORF") de una proteína o de un polipéptido en particular (por ejemplo, un determinado factor de reprogramación proteico o polipeptídico), lo que significa que cada ARN monocatenario o ARNm presenta una agrupación lineal de tripletes de codones definidos por la secuencia de nucleótidos que se extiende desde el codón de inicio de la traducción hasta el codón de terminación de la traducción para una proteína o un polipéptido en particular. Además de presentar el ORF de una determinada proteína, cada molécula de ARN monocatenario también puede presentar otras secuencias a 5' o 3' del ORF que se denominan "regiones no traducidas 5' o 3'", o "UTR 5' o 3'", que pueden cumplir diferentes funciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, la UTR 5' comprende una secuencia consenso de Kozak o una secuencia de Kozak. Una secuencia de Kozak es una secuencia que se produce en el ARNm eucariota y que tiene el consenso (gcc)gccRccAUGG, en el que R es un purina (adenina o guanina) tres bases corriente arriba del codón de inicio (AUG), que está seguido de otra 'G' (Kozak M., 1987). La secuencia consenso de Kozak desempeña un papel importante en el inicio del procedimiento de traducción.

En algunas realizaciones preferidas de las composiciones, de los kits o de los procedimientos de la invención, el uno o más ARN monocatenarios o ARNm sintetizados *in vitro* y/o los ARN monocatenarios o ARNm purificados presentan al menos una secuencia UTR 5' heteróloga, secuencia de Kozak, secuencia IRES, o la secuencia UTR 3' que da lugar a una mayor traducción a la proteína codificada cuando dichos respectivos ARN monocatenarios se introducen en células eucariotas en comparación con los mismos ARN monocatenarios que no muestran dicha secuencia UTR 5' respectiva, secuencia de Kozak, secuencia IRES o secuencia UTR 3'. En algunas realizaciones preferidas particulares, la UTR 5' o UTR 3' es una secuencia presentada por un ARNm de alfa- (α -)globina o beta- (β -)globina de *Xenopus* o humano, o en las que la UTR 5' es una secuencia presentada por el ARN del virus del ataque químico del tabaco (TEV).

En algunas realizaciones preferidas de una composición, de un kit y procedimiento de la invención, la composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm se trata o se purifica (por ejemplo, tratando con una RNasa específica del ARN bicatenario (por ejemplo, una endorribonucleasa específica del ARN bicatenario)(endoRNasa), por ejemplo, RNasa III recombinante o de tipo silvestre, o un fragmento activo o una variante de la misma), tratando con un anticuerpo específico del RN bicatenario y/o purificando mediante la extracción con fenol-cloroformo, la precipitación con acetato de amonio o cromatografía, incluyendo la HPLC) (por ejemplo, antes del uso de dicha composición que comprende ARN monocatenario o ARNm en el procedimiento de la invención para la reprogramación). En algunas realizaciones de las composiciones, de los kits y de los procedimientos de la invención, el ARN monocatenario o ARNm tratado o purificado presenta una caperuza 5' que comprende 7-metilguanina o un análogo de caperuza antiinverso (ARCA, que incluye un ARCA con un grupo tio en el puente de trifosfato). En algunas realizaciones, los ARN monocatenarios tratados, o el ARN monocatenario o ARNm purificado comprende además una caperuza 5' que tiene una estructura cap1, en la que el hidroxilo 2' de la ribosa del penúltimo nucleótido 5' está metilado. En algunas realizaciones, en las que el ARN monocatenario o ARNm tratado o purificado presenta una caperuza 5', el uno o más ARN monocatenarios o ARNm sintetizados *in vitro* usados en dicho tratamiento y/o dicha purificación presentan la caperuza 5' (es decir, antes de dicho tratamiento o purificación). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el uno o más ARN monocatenarios o ARNm sintetizados *in vitro* usados para dicho tratamiento y/ dicha purificación comprenden ARN monocatenarios o ARNm protegidos con caperuza. En algunas de estas realizaciones, la una o más moléculas de ARN monocatenario sintetizadas *in vitro* que presentan la caperuza 5' se sintetizaron antes de dicho tratamiento y/o purificación: (i) durante la transcripción mediante la incorporación de un análogo de caperuza (por ejemplo, un análogo de caperuza antiinverso o ARCA, o por ejemplo, un tio-ARCA) durante la transcripción *in vitro* (por ejemplo, usando el kit de transcripción MESSAGEMAX™ T7 ARCA-CAPPED MESSAGE o el kit de transcripción de ARN con 5^mC- y Ψ IN-COGNITO™ T7 ARCA, CELLSRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.); o (ii) tras la transcripción, incubando moléculas de ARN monocatenario transcritas *in vitro* con un sistema enzimático de protección con caperuza que comprende ARN guaniltransferasa en condiciones en las que las moléculas de ARN monocatenario transcritas *in vitro* son protegidas con caperuza 5', incluyendo cuando el sistema enzimático de protección con caperuza genera la metilación del hidroxilo 2' de la ribosa en el penúltimo nucleótido 5' (por ejemplo, usando el sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™, o usando un sistema de transcripción *in vitro* separado, tal como el kit de IVT de ARN convencional T7-SCRIBF™, el kit de transcripción de ARN con Ψ INCOG-NITO™ T7 o el kit de transcripción de ARN con Ψ y 5mC INCOGNITO™ T7 para obtener ARN monocatenario, y el sistema de protección con caperuza de m⁷G SCRIPTCAP™ para obtener ARN cap0 (todos de CELLSRIPT, Inc.); en algunas realizaciones preferidas, el sistema enzimático de protección con caperuza produce además la metilación del hidroxilo 2' de la ribosa en el penúltimo nucleótido 5' para generar el ARN cap1, y otra etapa de síntesis de dicho ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* comprende: incubar el ARN monocatenario o ARNm transcrito *in vitro* con ARN 2'-O-metiltransferasa (por ejemplo, usando el kit de 2'-O-metiltransferasa SCRIPTCAP™, CELLSRIPT, INC.).

En algunas realizaciones preferidas de una composición, de un kit y procedimiento de la invención, en las que el ARN monocatenario o ARNm tratado y/o purificado presenta una caperuza 5', el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* están protegidos con caperuza; en algunas realizaciones, antes del uso de los ARN monocatenarios o ARNm en un procedimiento de reprogramación, otra etapa de síntesis de dichos ARN monocatenarios o ARNm sintetizados *in vitro* comprende: tras la transcripción, proteger con caperuza los ARN

monocatenarios tratados y/o purificados para generar ARN monocatenarios tratados protegidos con caperuza 5' y/o ARN monocatenarios purificados protegidos con caperuza 5'. En algunas realizaciones preferidas, dicha protección con caperuza comprende la protección con caperuza con un sistema enzimático de protección con caperuza que comprende ARN guaniltransferasa y 2'-O-metiltransferasa. En algunas realizaciones, dicha protección con caperuza después de la transcripción de los ARN monocatenarios tratados y/o purificados se realiza como se ha descrito anteriormente y/o como se describe en la literatura del producto proporcionada con el sistema de protección con caperuza de m⁷G SCRIPTCAP™, el kit de 2'-O-metiltransferasa SCRIPTCAP™ o el sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™ con respecto a los componentes del sistema enzimático de protección con caperuza (todos de CELLSRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.).

En algunas realizaciones preferidas de una composición, de un kit o de un procedimiento de la invención, el uno o más ARN monocatenarios o ARNm sintetizados *in vitro* usados para dicho tratamiento están significativamente libres de ARN no protegidos con caperuza que presentan un grupo trifosfato 5' (que se considera que es un tipo de "moléculas de ARN contaminantes" en el presente documento). En algunas realizaciones preferidas, la composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm tratado y/o purificado está significativamente libre de ARN no protegidos con caperuza que presentan un grupo trifosfato 5'. En determinadas realizaciones, el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* usados para dicho tratamiento, los ARN monocatenarios tratados y/o los ARN monocatenarios purificados consisten en una población de moléculas de ARN monocatenario que tienen: (i) más del 90 % de moléculas de ARN monocatenario protegido con caperuza; (ii) más del 95 % de moléculas de ARN monocatenario protegido con caperuza; (iii) más del 98 % de moléculas de ARN monocatenario protegido con caperuza; o (v) más del 99,9 % de moléculas de ARN monocatenario protegido con caperuza. En algunas realizaciones en las que la población de moléculas de ARN monocatenario también comprende moléculas contaminantes de ARN no protegido con caperuza que presentan un trifosfato 5', antes de usar dicha composición de ARN que comprende dichas moléculas de ARN monocatenario para la reprogramación, el procedimiento comprende además: incubar el uno o más ARN monocatenarios sintetizados *in vitro* usados para dicho tratamiento, o los ARN monocatenarios tratados o los ARN monocatenarios purificados generados a partir del procedimiento con al menos una enzima para eliminar los grupos trifosfato de los ARN monocatenarios no protegidos con caperuza contaminantes. En algunas realizaciones, la al menos una enzima es una fosfatasa alcalina (por ejemplo, NTPphosphatase™, epicentre technologies, Madison, WI, EE.UU.) o con ARN 5'-polifosfatasa (epicentre technologies); en algunas realizaciones en las que la al menos una enzima es ARN 5'-polifosfatasa, dichas moléculas de ARN monocatenario para la reprogramación se incuban además con la nucleasa dependiente del fosfato 5' TERMINATOR™ (epicentre technologies) o exorribonucleasa de Xrn1 (por ejemplo, de *Saccharomyces cerevisiae*) para digerir dicho ARN no protegido con caperuza del que se ha eliminado el grupo trifosfato 5'. Estos procedimientos de incubación con fosfatasa alcalina o con ARN 5'-polifosfatasa y, opcionalmente, también con nucleasa dependiente de fosfato 5' TER-MINATOR™ o exorribonucleasa de Xrn1, son particularmente útiles para eliminar los ARN monocatenarios no protegidos con caperuza de los ARN monocatenarios protegidos con caperuza que se fabricaron mediante la protección con caperuza durante la transcripción mediante la incorporación de un análogo de caperuza durante una reacción de transcripción *in vitro*.

"Células madre", en el presente documento, significa células que tienen tres propiedades generales que las hacen diferentes de otros tipos de células del organismo: (1) son capaces de autorrenovarse a largo plazo, lo que significa que, a diferencia de las células especializadas o diferenciadas, que normalmente no se replican por sí mismas, pueden proliferar mediante la división de células individuales en dos células hijas que son idénticas a la célula madre durante largos períodos; (2) no están especializadas, lo que significa que no tienen ninguna estructura específica para realizar funciones especializadas; y (3) pueden dar lugar a tipos de células especializadas mediante un proceso denominado "diferenciación". Se puede encontrar información sobre células madre en un sitio web del National Institutes of Health dedicado a ese fin ([http:// seguido de "stemcells.nih.gov/info"](http://seguido.de/stemcells.nih.gov/info)).

"Células madre pluripotentes", en el presente documento, significa células que pueden dar lugar a cualquier tipo de célula del organismo excepto a aquellas necesarias para apoyar y desarrollar un feto en el útero.

Se usan diferentes procedimientos para analizar o evaluar una célula con respecto a su estado pluripotente. Por ejemplo, a veces se usa el ensayo de diferenciación espontánea del cuerpo embrioide (por ejemplo, véanse los EJEMPLOS) para evaluar la capacidad de las células o de una estirpe celular para diferenciarse en células que representan las tres capas germinales. Otro procedimiento que se usa es la realización de ensayos de inmunotinción fluorescente usando anticuerpos fluorescentes que se unen a proteínas que se sabe que se expresan en células pluripotentes (por ejemplo, véanse lo EJEMPLOS). Otro tipo de ensayo más que se puede realizar para evaluar la pluripotencia es la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa o qRT-PCR, a veces, simplemente denominada "qPCR". En estos ensayos, la qPCR se realiza para cuantificar el nivel relativo de expresión de ciertos ARNm codificantes de proteínas que se sabe que se expresan o que se expresan en ciertos niveles relativos en células pluripotentes en comparación con los niveles de expresión de ciertos genes constitutivos que se expresan de manera aproximadamente constitutiva. Los ejemplos de ARNm de pluripotencia que pueden analizarse mediante qRT-PCR incluyen ARNm codificantes de CRIPTO, GDF3, NANOG, OCT4 y REX1 (véanse, por ejemplo, los EJEMPLOS). Por ejemplo, en algunos ensayos de qRT-PCR realizados usando ARN celular total aislado de 6 estirpes diferentes de iPSC generadas en los experimentos de reprogramación descritos en el presente documento, se midieron niveles significativamente más altos de ARNm codificantes de CRIPTO, GDF3, NANOG, OCT4 y REX1 en las estirpes de iPSC generadas a partir de la reprogramación de ARNm con ARNm tratado con

RNasa III o purificado mediante HPLC en comparación con los medidos en los fibroblastos BJ de prepucio primarios humanos originales y las células alimentadoras (NUFF) usadas en esos experimentos.

"Células madre pluripotentes inducidas" ("iPSC"), en el presente documento, significa células adultas que han sido genéticamente inducidas o reprogramadas a un estado de células madre embrionaria al verse obligadas a expresar genes y factores importantes para mantener ciertas propiedades definitorias de las células madre embrionarias, tales como la expresión de marcadores de células madre embrionarias y la capacidad de diferenciación en células de las tres capas germinales.

Una "estirpe de iPSC", en el presente documento, significa células madre derivadas de una sola colonia de iPSC que mantienen estas ciertas propiedades definitorias de las células madre embrionarias tras la propagación repetida en cultivo.

Un "factor de reprogramación" significa una proteína, un polipéptido u otra biomolécula que, cuando se usa sola o en combinación con otros factores o condiciones, causa un cambio en el estado de diferenciación de una célula en la que se introduce o se expresa el factor de reprogramación. En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos de la presente invención, el factor de reprogramación es una proteína o un polipéptido que es codificado por un ARNm que se introduce en una célula, generando así una célula que presenta un estado cambiado de diferenciación en comparación con la célula en la que se introdujo el ARNm. En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos de la presente invención, el factor de reprogramación es un factor de transcripción. Una realización de un factor de reprogramación usado en un procedimiento de la presente invención es un "factor de inducción de iPS", que significa una proteína, un péptido u otra biomolécula que, cuando se usa sola o en combinación con otros factores o condiciones, produce un cambio en el estado de diferenciación de una célula en la que se introduce y/o se expresa el factor de inducción de células iPS a una célula madre pluripotente inducida (o iPSC).

Un "factor de reprogramación de ARNm" significa un ARNm codificante de un factor de reprogramación que consiste en una proteína o un polipéptido. Un "factor de inducción de iPSC de ARNm" es una realización de un factor de reprogramación de ARNm, y significa un ARNm codificante de un factor de inducción de iPSC.

Las expresiones "mezcla de reprogramación de ARNm" o "mezcla de factor de reprogramación de ARNm" o "mezcla de reprogramación de ARN monocatenario" o "mezcla de factor de reprogramación de ARN monocatenario" se usan indistintamente en el presente documento, y significan una mezcla de ARNm codificantes de diferentes factores de reprogramación, cada uno de los cuales consiste en una proteína o un polipéptido.

De forma similar, Las expresiones "mezcla de reprogramación de iPSC de ARNm" o "mezcla de factores de inducción de iPSC de ARNm" o "mezcla de reprogramación de iPSC de ARN monocatenario" o "mezcla de factores de inducción de iPSC de ARN monocatenario" se usan indistintamente en el presente documento, y significan una mezcla de ARNm codificantes de diferentes factores de inducción de iPSC, cada uno de los cuales consiste en una proteína o en un polipéptido. Un "factor de inducción de células iPS" o "factor de inducción de iPSC" es una proteína, un polipéptido u otra biomolécula que, cuando se usa sola o en combinación con otros factores de reprogramación, produce la generación de una célula desdiferenciada o células iPS de células somáticas. Los 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 polipeptídicas de longitud completa o fragmentos biológicamente activos de las mismas. Del mismo modo, un ARNm codificante de un factor de inducción de células iPS puede codificar un polipéptido de longitud completa o fragmentos biológicamente activos del mismo. Las secuencias de molde de ADN para los ARNm codificantes de los factores de inducción de iPS ilustrativos se muestran en las SEQ ID NO: 2-10. En determinadas realizaciones, la presente invención emplea las secuencias de molde de ADN o secuencias similares que se muestran en estas SEQ ID NO, incluyendo las secuencias de molde de ADN codificantes de moléculas de ARN monocatenario o de ARNm que comprenden además, unidos a estas secuencias de ARN monocatenario o ARNm, oligorribonucleótidos que presentan cualquiera de las secuencias UTR 5' y 3', secuencias de Kozak, secuencias EXP, nucleótidos con caperuza y/o secuencias de poli(A) usadas en los experimentos descritos en el presente documento (por ejemplo, como se muestra en SEQ ID NO. 1), u otras UTR u otras secuencias que son conocidas en la técnica en general o que se descubrirán en el futuro, que pueden usarse en lugar de las que se usan en el presente documento, uniéndolas a estas secuencias de ARNm codificantes de 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 realizar los procedimientos descritos en el presente documento.

"Diferenciación" o "diferenciación celular" significa el proceso biológico que ocurre de forma natural mediante 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 de un organismo eucariota) se convierte en una célula que presenta un estado de diferenciación o tipo celular más especializado. Los científicos, incluyendo los biólogos, biólogos celulares, inmunólogos y embriólogos, usan 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 cataliza con respecto a su "tipo celular", "estado diferenciado" o "estado de diferenciación" en función de uno o más fenotipos presentados por esa célula, fenotipos que incluyen 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, en algunas realizaciones, se pueden identificar y clasificar diferentes tipos de células usando 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. Como se usa en el presente documento, se entenderá que la diferencia entre una célula que presenta un primer estado de diferenciación, estado diferenciado, tipo de célula o fenotipo, y una célula que presenta un segundo estado de diferenciación, estado diferenciado, tipo de célula o fenotipo puede variar desde una diferencia en la expresión relativa de una sola proteína a diferencias en la expresión de múltiples proteínas; por lo tanto, en algunas realizaciones, la célula que presenta un segundo estado de diferenciación, estado diferenciado, tipo de célula o fenotipo difiere de la célula que presenta un primer estado de diferenciación, estado diferenciado, tipo de célula o fenotipo, porque la célula que presenta un segundo estado de diferenciación, estado diferenciado, tipo de célula o fenotipo expresa una proteína o múltiples proteínas que está o están codificadas por una molécula de ARNm que se introducen en la célula que presenta el primer estado de diferenciación, estado diferenciado, tipo de célula o fenotipo, mientras que, en otras realizaciones, la célula que presenta un segundo estado de diferenciación, estado diferenciado, tipo de célula o fenotipo difiere de la célula que presenta un primer estado de diferenciación, estado diferenciado, tipo de célula o fenotipo, porque la célula que presenta un segundo estado de diferenciación, estado diferenciado, tipo de célula o fenotipo expresa una o más proteínas que están inducidas por moléculas de ARNm que se introducen en la célula que presenta el primer estado de diferenciación, estado diferenciado, tipo de célula o fenotipo, incluso aunque una o más de esas proteínas pueden no estar codificadas por dichas moléculas de ARNm que se introducen en la célula que presenta un primer estado de diferenciación, estado diferenciado, tipo de célula o fenotipo.

El término "reprogramación", como se usa en el presente documento, significa un procedimiento inducido o no natural de cambio de estado de diferenciación o fenotipo de una célula en respuesta a la administración de uno o más factores de reprogramación en el célula, directamente (por ejemplo, mediante la administración de factores de reprogramación proteicos o polipeptídicos en la célula) o indirectamente (por ejemplo, mediante la administración del preparado 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 mantiene las células en condiciones (por ejemplo, medio, temperatura, niveles de oxígeno y de CO₂, matriz, factores de crecimiento, citocinas, inhibidores de citocinas y otras condiciones ambientales) que son propicias para la diferenciación. El término "reprogramación", como se usa en el presente documento, no pretende significar ni referirse a una dirección o vía de diferenciación específica (por ejemplo, de un tipo celular menos especializado a un tipo celular más especializado), y no excluye procedimientos que proceden en una dirección o vía de diferenciación de lo que normalmente se observa en la naturaleza. Por lo tanto, en diferentes realizaciones de la presente invención, "reprogramación" significa e incluye todos y cada uno de los siguientes:

(1) "Desdiferenciación", que significa un proceso mediante el que una célula que presenta un estado de diferenciación o tipo de célula más especializado (por ejemplo, un fibroblasto de mamífero, un queratinocito, una célula muscular o una célula neuronal) se convierte en una célula que presenta un estado de diferenciación o tipo celular menos especializado (por ejemplo, una célula iPS);

(2) "Transdiferenciación", que significa un proceso mediante el que una célula que presenta un estado de diferenciación o tipo de célula más especializado (por ejemplo, un fibroblasto de mamífero, un queratinocito o una célula neuronal) se convierte en una célula que presenta otro estado de diferenciación o 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 mediante el que una célula que presenta cualquier estado de diferenciación o tipo celular particular se convierte en una célula que presenta otro estado de diferenciación o tipo celular como cabría esperar en la naturaleza si la célula estuviera presente en su lugar o entorno natural (por ejemplo, en un embrión o un organismo), ya sea que dicho proceso se produzca *in vivo* en un organismo o en cultivo (por ejemplo, en respuesta a uno o más factores de reprogramación).

Una "RNasa específica de ARN bicatenario", en el presente documento, significa una exorribonucleasa o endorribonucleasa que digiere ARN bicatenario, pero no ARN monocatenario, a monorribonucleótidos o oligorribonucleótidos pequeños (por ejemplo, a oligorribonucleótidos que tienen un tamaño inferior a aproximadamente 30 nucleótidos), pero que no digiere ARN monocatenario.

Una "exorribonucleasa 3' a 5' específica del ARN bicatenario" significa e incluye cualquier exorribonucleasa que digiere ARN bicatenario, pero no ARN monocatenario, en una dirección de 3' a 5', comenzando desde los extremos 3' que están hibridados a un ARN complementario.

La expresión "composición de ARN purificado o tratado" (que, cuando se usa en un procedimiento de la presente invención, a veces se denomina solo "ARN monocatenario", "ARNm" o una "composición de ARN"), pretende significar una composición que comprende o consiste en uno o más ARN monocatenarios o ARNm tratados o purificados que están sustancialmente libres, casi libres, esencialmente libres, prácticamente libres, extremadamente libres o absolutamente libres de moléculas de ARN bicatenario como se define en el presente documento.

Por ejemplo, una composición de ARN, o ARN monocatenario o ARNm, que está sustancialmente libre de moléculas de ARN bicatenario contendría menos de cinco nanogramos de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud por microgramo de ARN.

- 5 Por ejemplo, una composición de ARN, o ARN monocatenario o ARNm, que está casi libre de moléculas de ARN bicatenario contendría menos de un nanogramo de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud por microgramo de ARN.

Por ejemplo, una composición de ARN, o ARN monocatenario o ARNm, que está esencialmente libre de moléculas de ARN bicatenario contendría menos de 0,5 nanogramos de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud por microgramo de ARN.

- 10 Por ejemplo, una composición de ARN, o ARN monocatenario o ARNm, que está prácticamente libre de moléculas de ARN bicatenario contendría menos de 100 picogramos de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud por microgramo de ARN.

- 15 Por ejemplo, una composición de ARN, o ARN monocatenario o ARNm, que está extremadamente libre de moléculas de ARN bicatenario contendría menos de 10 picogramos de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud por microgramo de ARN.

Por ejemplo, una composición de ARN, o ARN monocatenario o ARNm, que está absolutamente libre de moléculas de ARN bicatenario contendría menos de 2 picogramos de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud por microgramo de ARN.

- 20 De forma similar, también se entenderá en el presente documento que una "composición de ARN" o una "composición de ARN monocatenario" o "moléculas de ARN monocatenario" o "ARNm" o una "mezcla de reprogramación" o una "mezcla de reprogramación de ARN monocatenario" o una "mezcla de reprogramación de ARNm" o una "mezcla de reprogramación de iPSC de ARN monocatenario" o una "mezcla de reprogramación de iPSC de ARNm" o una "mezcla de inducción de iPSC de ARN monocatenario" o una "mezcla de factores de reprogramación de ARNm" o "una mezcla de factores de reprogramación" o "una mezcla de factores de inducción de iPSC" (o similar) que está o están "prácticamente libres", "extremadamente libres" o "absolutamente libres" de ARN bicatenario en el presente documento significa que menos de 100 picogramos, menos de 10 picogramos o menos de 2 picogramos, respectivamente de ARN bicatenario de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases está presente por microgramo de ARN en dicha composición de ARN, composición de ARN monocatenario, moléculas de ARN monocatenario, ARN monocatenario, ARNm, mezcla de reprogramación de iPSC de ARN monocatenario, mezcla de reprogramación de iPSC de ARNm, mezcla de factores de reprogramación, mezcla de factores de inducción de iPSC, o similares. En algunas realizaciones, la cantidad de ARN bicatenario se determina usando un ensayo de transferencia de puntos, en el que la cantidad de ARN bicatenario se cuantifica mediante un inmunoensayo usando el anticuerpo específico del ARN bicatenario J2 (English & Scientific Consulting, Szirák, Hungría) (por ejemplo, en comparación con cantidades conocidas de patrones de ARN bicatenario manchados en membranas de nylon en ensayos paralelos usando procedimientos idénticos o equivalentes a los descritos en el presente documento). En otras realizaciones, la cantidad de ARN bicatenario se determina mediante otro procedimiento, tal como mediante HPLC comparativa usando patrones conocidos.

Descripción de la invención

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

- En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones y a procedimientos para reprogramar células somáticas a células madre pluripotentes. Por ejemplo, la presente invención proporciona composiciones de ARN que comprenden ARN monocatenario (por ejemplo, moléculas de ARNm) y su uso en la reprogramación de células somáticas humanas o animales (por ejemplo, de mamífero) a células madre pluripotentes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la invención proporciona moléculas de ARN monocatenario modificadas con pseudouridina (modificadas con Ψ) y/o modificadas con 5-metilcitidina (m^5C), que están al menos prácticamente libres de moléculas de ARN bicatenario, más preferentemente, al menos extremadamente libres de moléculas de ARN bicatenario, y lo más preferentemente, absolutamente libres de moléculas de ARN bicatenario, y que codifican factores de reprogramación.

- Los experimentos realizados durante el desarrollo de las 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, que incluyen células madre pluripotentes. Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para generar células desdiferenciadas o iPS. De forma sorprendente, la administración de ARNm monocatenario que está al menos prácticamente libre, y preferentemente, al menos extremadamente libre o al menos absolutamente libre de ARN bicatenario puede proporcionar una generación altamente eficaz de células desdiferenciadas o iPS. De forma inesperada y sorprendente, no solo ARNm modificado,

tal como ARNm modificado con pseudouridina (Ψ) y/o 5-metilcitidina (m^5C) codificantes de factores de inducción de células iPS, sino también ARNm no modificado codificante de dichos factores de inducción de células iPS, dan lugar a la generación altamente eficaz de células desdiferenciadas o células iPS.

5 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos de desdiferenciación de una célula somática que comprenden: introducir ARNm codificante de uno o más factores de inducción de iPSC en una célula somática para generar una célula desdiferenciada.

10 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos de desdiferenciación de una célula somática que comprenden: introducir una composición de ARN monocatenario que comprende moléculas de ARNm codificantes de uno o más factores de inducción de iPSC en una célula somática; y mantener la célula en condiciones en las que la célula sea viable y el ARNm que se introduce en la célula se exprese en cantidad suficiente y durante el tiempo suficiente para generar una célula desdiferenciada. En algunas realizaciones preferidas, la célula desdiferenciada es una célula madre pluripotente inducida (iPSC). En algunas realizaciones de los procedimientos de la presente invención para reprogramar una célula de un primer estado de diferenciación o fenotipo a un segundo estado de diferenciación o fenotipo que comprende una célula iPS, o de composiciones, sistemas o kits que realizan dicho procedimiento, o de composiciones que resultan del uso de dichos procedimientos, la célula iPS expresa el marcador interno específico de la masa celular NANOG (que es un marcador usado para ensayar si una célula desdiferenciada es una célula iPS, por ejemplo, Véase Ganzalez y col., 2009, y Huangfu y col., 2008). En algunas otras realizaciones de los procedimientos de la presente invención para reprogramar una célula de un primer estado de diferenciación o fenotipo a un segundo estado de diferenciación o fenotipo que comprende una célula iPS, o de composiciones, sistemas o kits que realizan dicho procedimiento, o de composiciones que resultan del uso de dichos procedimientos, la célula iPS expresa TRA-1-60 (que se considera un marcador más estricto de células iPS totalmente reprogramadas usado para ensayar si una célula desdiferenciada es una célula iPS, por ejemplo, véase Chan y col., 2009). En realizaciones preferidas de este procedimiento o de las composiciones, sistemas o kits que realizan dicho procedimiento, o de composiciones que resultan del uso de dichos procedimientos, la composición de ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm usada para dicha introducción está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario.

30 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para cambiar el estado de diferenciación (o estado diferenciado) de una célula eucariota (por ejemplo, una célula humana o animal) que comprende: introducir una composición de ARN monocatenario que comprende moléculas de ARNm codificantes de uno o más factores de reprogramación en una célula; y mantener la célula en condiciones en las que la célula sea viable y el ARNm que se introduce en la célula se exprese o se traduzca en proteínas en cantidades suficientes y durante el tiempo suficiente para generar una célula, en los que la célula presenta un estado cambiado de diferenciación en comparación con la célula en la que se introdujo el ARNm. En realizaciones preferidas de este procedimiento, la composición de ARN monocatenario está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario.

40 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para cambiar el estado de diferenciación de una célula eucariota (por ejemplo, una célula humana o animal) que comprende: introducir una composición de ARN monocatenario que comprende de ARNm codificante de uno o más factores de reprogramación en una célula; y mantener la célula en condiciones en las que la célula sea viable y el ARNm que se introduce en la célula se exprese o se traduzca en proteínas en cantidades suficientes y durante el tiempo suficiente para generar una célula presente un estado de diferenciación cambiado en comparación con la célula en la que se introdujo el ARNm. En realizaciones preferidas de este procedimiento, la composición de ARN monocatenario está sustancialmente libre, casi libre, esencialmente libres, prácticamente libres, extremadamente libre o absolutamente libre de ARN bicatenario. En algunas realizaciones, el estado de diferenciación cambiado es un estado de diferenciación de desdiferenciación en comparación con la célula en la que se introdujo el ARNm. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula que presenta el estado de diferenciación cambiado es una célula madre pluripotente que está desdiferenciada 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 algunas realizaciones, 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 de diferenciación cambiado es una célula somática que presenta un linaje, un fenotipo o una función que es diferente al de la célula en la que se introdujo el ARNm; por lo tanto, en estas realizaciones, el procedimiento da lugar a la transdiferenciación (Graf y Enver, 2009).

55 Los procedimientos de la invención no se limitan a una célula en la que se introduce el ARNm en particular. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos de reprogramación de una célula eucariota, la célula en la que se introduce el ARNm se deriva de cualquier eucariota multicelular. En algunas realizaciones preferidas, la célula en la que se introduce el ARNm se selecciona entre una célula humana y una célula animal. En otras realizaciones, la célula en la que se introduce el ARNm se selecciona entre una célula vegetal o fúngica. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos de reprogramación de una célula eucariota, la célula en la que se introduce el ARNm es una célula normal que procede de un organismo que está exento de una enfermedad conocida. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos de reprogramación de una célula eucariota, es una célula de un organismo que tiene una enfermedad conocida. En algunas realizaciones de cualquiera de los

procedimientos de reprogramación de una célula eucariota, la célula en la que se introduce el ARNm es una célula que está exenta de una patología conocida. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos de reprogramación de una célula eucariota, la célula en la que se introduce el ARNm es una célula que presenta un estado patológico o una patología conocida (por ejemplo, una célula cancerosa o una célula beta pancreática que presenta propiedades metabólicas características de una célula diabética).

La invención no se limita al uso de un tipo específico de célula (por ejemplo, a un tipo de célula somática específica) en las realizaciones de los procedimientos que comprenden la introducción de ARNm codificante de uno o más factores de inducción de células iPSC con el fin de generar una célula desdiferenciada (por ejemplo, una célula desdiferenciada o una célula iPS). Se contempla cualquier célula que se someta a desdiferenciación usando factores de inducción de células iPS. Dichas células incluyen, aunque sin limitación, fibroblastos, queratinocitos, adipocitos, linfocitos, linfocitos T, linfocitos B, células de sangre de cordón mononuclear, células de mucosa bucal, células hepáticas, HeLa, MCF-7 u otras células cancerosas. En algunas realizaciones, las células residen *in vitro* (por ejemplo, en cultivo) o *in vivo*. En algunas realizaciones, cuando se generan en cultivo, se usa un medio acondicionado libre de células (por ejemplo, un medio acondicionado por fibroblastos embrionarios de ratón o acondicionado por MEF). Por ejemplo, en algunas realizaciones de los procedimientos de reprogramación de una célula humana o de mamífero que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo a un segundo estado diferenciado o fenotipo mediante la introducción repetida o continua de ARN monocatenario o ARNm codificante de uno o más factores de reprogramación, las células de dicha reprogramación se incuban sobre células alimentadoras durante y/o después de dicha introducción; en otras realizaciones, las células se incuban en un medio acondicionado con MEF (por ejemplo, preparado según lo descrito por Xu y col., 2001) en ausencia de células alimentadoras durante y/o después de dicha introducción, en lugar de sembrarlas en placa sobre una capa alimentadora. En algunas realizaciones, este procedimiento es más rápido y más eficaz que otros procedimientos de reprogramación con los protocolos publicados que comprenden transfectar células con plásmidos de ADN o vectores lentivíricos codificantes de los mismos o factores de reprogramación similares en un medio no acondicionado con MEF (por ejemplo, Aoi y col., 2008). En algunas otras realizaciones, se usa el medio de reprogramación de ARNm de Stemgent PLURITON™ para cultivar las células somáticas que se transfectan con la composición de ARN purificado que comprende moléculas de ARN monocatenario codificantes de uno o más factores de inducción de células iPS hasta que se inducen células desdiferenciadas o iPS, después de lo que las células desdiferenciadas o iPS, o las colonias de iPSC se cultivan en otro medio, tal como el medio NUTRISTEM™. En algunas otras realizaciones (por ejemplo, como se describe en el EJEMPLO 11), se usa otro medio (por ejemplo, el medio de reprogramación sin alimentadoras desarrollado por los presentes inventores para reprogramar fibroblastos humanos a iPSC) para la reprogramación y, en algunas otras realizaciones (por ejemplo, como se describe en el EJEMPLO 11), se usa otro medio para el mantenimiento de las iPSC o colonias de iPSC generadas a partir de la reprogramación (por ejemplo, para evitar la rediferenciación de las células o colonias iPS o desdiferenciadas en células somáticas. Como se demuestra más adelante, dicho medio de reprogramación sin alimentadoras proporcionó una mejor generación y sin alimentadoras de células y colonias desdiferenciadas o iPS a partir de células somáticas humanas (por ejemplo, fibroblastos). La invención no se limita, sin embargo, a las condiciones de cultivo usadas. Cualquier condición de cultivo o medio ahora conocidos o identificados posteriormente como útiles para los procedimientos de la invención (por ejemplo, para generar células desdiferenciadas o células iPS a partir de células somáticas y mantener dichas células) se contempla para su uso con la invención. Por ejemplo, aunque no se prefiere, en algunas realizaciones del procedimiento, se usa una capa de células alimentadoras en lugar de medio acondicionado para cultivar las células que se tratan usando el procedimiento.

En algunas realizaciones de estos procedimientos, la etapa de introducción de ARNm comprende administrar el ARNm en la célula (por ejemplo, una célula somática humana o de otro animal) con un reactivo de transfección (por ejemplo, reactivo de transfección de ARNm TRANSIT™, MirusBio, Madison, WI). Sin embargo, la invención no está limitada por la naturaleza del procedimiento de transfección usado. De hecho, se contempla cualquier procedimiento de transfección conocido o identificado en el futuro que sea capaz de administrar moléculas de ARNm en células *in vitro* o *in vivo*, incluyendo los procedimientos que administran el ARNm a las células en cultivo o en un medio que soporte la vida, ya sea que dichas células comprendan células aisladas o células que comprendan un tejido u órgano eucariota, o procedimientos que comprendan administrar el ARNm *in vivo* en las células de un organismo, tal como un ser humano, animal, planta u hongo. En algunas realizaciones, el reactivo de transfección comprende un lípido (por ejemplo, liposomas, micelas, etc.). En algunas realizaciones, el reactivo de transfección comprende una nanopartícula o un nanotubo. En algunas realizaciones, el reactivo de transfección comprende un compuesto catiónico (por ejemplo, polietilenimina o PEI). En algunas realizaciones, el procedimiento de transfección usa una corriente eléctrica para administrar el ARNm en la célula (por ejemplo, mediante electroporación).

Los datos presentados en el presente documento muestran que, con respecto al ARNm introducido en la célula, ciertas cantidades de los ARNm usados en los EJEMPLOS descritos en el presente documento dieron lugar a una mayor eficacia y a la inducción más rápida de células madre pluripotentes a partir de las células somáticas particulares usados de otras cantidades de ARNm. Sin embargo, los procedimientos de la presente invención no se limitan al uso de una cantidad específica del ARNm de introducción en la célula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usó un total de tres dosis, comprendiendo cada dosis 18 microgramos de cada uno de seis ARNm diferentes, cada uno codificando un factor de reprogramación humano diferente, para introducir el ARNm en aproximadamente 3×10^5 fibroblastos humanos en una placa de 10 cm (por ejemplo, administrado usando un

reactivo de transfección que contenía lípidos), aunque, en otras realizaciones, se usaron cantidades mayores o menores de los ARNm para introducirlas en las células.

La invención no se limita a una forma química en particular del ARNm usado, siempre que la forma particular de ARNm funcione para su aplicación prevista, aunque ciertas formas de ARNm pueden producir resultados más eficaces, que son realizaciones preferidas en el presente documento. En algunas realizaciones preferidas, el ARNm está poliadenilado. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, 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 algunas realizaciones, se usa una cola de poli A más larga o más corta. En algunas realizaciones, el ARNm usado en los procedimientos está protegido con caperuza. Para aumentar al máximo la eficacia de la expresión y para reducir al mínimo la respuesta inmune innata en las células, se prefiere que la mayoría, y más preferentemente, todas o sustancialmente todas las moléculas de ARNm contengan una caperuza. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, las moléculas de ARNm usadas en los procedimientos se sintetizan *in vitro* incubando ARN primario no protegido con caperuza en presencia de un sistema enzimático de protección con caperuza, lo que puede dar lugar al aproximadamente 100 % de las moléculas de ARN protegidas con caperuza. En realizaciones preferidas, se protegen con caperuza más del 90 %, más del 95 % o más del 98 % de las moléculas de ARNm. En realizaciones incluso más preferidas, se protege con caperuza más del 99 %, más del 99,5 % o más del 99,9 % de la población de moléculas de ARNm. En realizaciones preferidas, las moléculas de ARNm usadas en los procedimientos de la presente invención tienen una caperuza con una estructura cap1, en la que el penúltimo nucleótido con respecto al nucleótido con caperuza tiene un grupo metilo en la posición 2' de la ribosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se sintetiza ARNm que tiene estructura cap1 incubando en ARN transcrito *in vitro* con enzima de protección con caperuza SCRIPTCAP™ y las enzimas 2'-O-metiltransferasa SCRIPTCAP™ (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI) o los componentes enzimáticos de protección con caperuza equivalentes del sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™, como se describe en la literatura del producto provista con esos productos (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI). En algunas realizaciones, el ARNm usado en los procedimientos de la presente invención tiene un nucleótido con caperuza modificado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ARNm que comprende un nucleótido con caperuza modificado se sintetiza como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. con n.º de serie 11/787352 (Publicación n.º 20070281336). Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, el ARN primario usado en la reacción de enzima de protección con caperuza se sintetiza mediante transcripción *in vitro* (IVT) de una molécula de ADN codificante del ARN que se va a sintetizar. El ADN codificante del ARN que se va a sintetizar se une a un promotor de ARN polimerasa, al que se une una ARN polimerasa e inicia la transcripción a partir de entonces. La IVT se puede realizar usando cualquier ARN polimerasa siempre que la síntesis del molde codificante del ARN se inicie específica y suficientemente a partir de un promotor de ARN polimerasa afín respectivo. En algunas realizaciones preferidas, la ARN polimerasa se selecciona entre la ARN polimerasa de T7, la ARN polimerasa de SP6 y la ARN polimerasa de T3.

Por lo tanto, se prefiere ARNm que tenga una estructura cap1, preparado mediante la protección con caperuza posterior a la transcripción de ARN transcrito *in vitro* para los procedimientos que comprenden introducir ARNm purificado que comprende o consiste en al menos un ribonucleósido modificado, cuyo ARNm codifica al menos un factor de reprogramación, en una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo para generar una célula reprogramada que presente un segundo estado diferenciado o fenotipo. Sin embargo, en algunas otras realizaciones, el ARN protegido con caperuza se sintetiza durante la transcripción usando un análogo de protección con caperuza dinucleotídico en la reacción de IVT (por ejemplo, usando un kit AMPLICAP™ T7 o un kit de transcripción MESSAGEMAX™ T7 ARCA-CAPPED MESSAGE; CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.). Si la protección con caperuza se realiza durante la transcripción, Preferentemente, el análogo de caperuza dinucleotídico es un análogo de caperuza antiinverso (ARCA). Sin embargo, se prefiere el uso de una reacción de IVT separada, seguida de un sistema enzimático de protección con caperuza, que dé lugar a aproximadamente un 100 % del ARN protegido con caperuza, frente a la protección con caperuza durante la transcripción, que normalmente da lugar al aproximadamente 80 % del ARN protegido con caperuza. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, un alto porcentaje de las moléculas de ARNm usadas en un procedimiento de la presente invención están protegidas con caperuza (por ejemplo, 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 están protegidas con caperuza). En algunas realizaciones preferidas, el ARNm usado en los procedimientos de la presente invención tiene una caperuza con una estructura cap1, que significa que el penúltimo nucleótido con respecto al nucleótido con caperuza tiene un grupo metilo en la posición 2' de la ribosa. El ARN protegido con caperuza sintetizado durante la transcripción mediante el uso de un análogo de caperuza dinucleotídico en la reacción de IVT puede convertirse en ARNm que tiene una estructura cap1 mediante la incubación de dicho ARN protegido con caperuza con una enzima ARN 2'-O-metiltransferasa (por ejemplo, enzima 2'-O-metil-transferasa SCRIPTCAP™, CELLSCRIPT, INC.) de acuerdo con la información y los protocolos proporcionados en la literatura del producto.

Los presentes investigadores habían descubierto previamente que el ARNm de cap1 se suele expresar en proteína a niveles más altos que el ARNm de cap0 correspondiente cuando se introduce en células vivas en cultivo. Por lo tanto, se prefiere el uso de ARNm que tenga una estructura cap1 para todos los procedimientos del presente documento. Sin embargo, aunque se prefiere ARNm que tenga una estructura cap1, en algunas realizaciones, el ARNm usado en los procedimientos tiene una caperuza con una estructura cap0, que significa que el penúltimo nucleótido con respecto al nucleótido con caperuza no tiene un grupo metilo en la posición 2' de la ribosa. Con

algunos productos de transcripción, pero no todos, la transfección de células eucariotas con ARNm que tiene una caperuza con una estructura cap1 da lugar a un nivel superior o mayor duración de la expresión proteica 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 algunas realizaciones, el ARNm usado en los procedimientos de la presente invención tiene un nucleótido con caperuza modificado.

En algunos experimentos realizados antes de los experimentos presentados en los EJEMPLOS del presente documento, los solicitantes descubrieron que, al transfectar fibroblastos humanos 1079 o IMR90 con ARNm de OCT4 que contenía bien uridina o pseudouridina en lugar de uridina, el ARNm que contenía pseudouridina se expresó a un nivel superior o durante más tiempo que el ARNm que contenía uridina. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, una o más o todas las uridinas contenidas en el/los ARNm usado/s en los procedimientos de la presente invención se reemplaza/n por pseudouridina (por ejemplo, sustituyendo la pseudouridina-5'-trifosfato en la reacción de IVT para sintetizar el ARN en lugar de uridina-5'-trifosfato). Sin embargo, en algunas realizaciones, el ARNm usado en los procedimientos de la invención contiene uridina y no contiene pseudouridina. Además, para lograr objetivos específicos, una base de ácido nucleico, una fracción de azúcar o un enlace internucleósido de uno o más de los nucleótidos del ARN monocatenario o ARNm que se introduce en la célula eucariota en los procedimientos de la invención puede comprender una base de ácido nucleico, una fracción de azúcar o un enlace internucleósido modificados.

La invención tampoco está limitada con respecto a la fuente del ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro* que se administra en la célula eucariota en los procedimientos de la invención. En algunas realizaciones, tales como las descritas en los EJEMPLOS, el ARN monocatenario o ARNm se sintetiza *in vitro* mediante la transcripción de un molde de ADN que comprende un gen clonado en un vector de plásmido linealizado, o un producto de amplificación por PCR o RT-PCR, protección con caperuza, usando un sistema enzimático de protección con caperuza, y poliadenilación, usando una poli-A polimerasa. En algunas otras realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm que se administra en la célula eucariota se deriva de una célula o una muestra biológica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ARNm derivado de una célula o muestra biológica se obtiene amplificando el ARNm de la célula o muestra biológica usando una reacción de amplificación de ARN. En algunas realizaciones preferidas, el ARNm derivado de la célula o muestra biológica se amplifica para generar ARN codificante de acuerdo con los procedimientos descritos en la patente de EE.UU. n.º 8.039.214.

Con respecto a los procedimientos que comprenden introducir ARNm codificante de uno o más factores de inducción de células iPS para generar una célula desdiferenciada (por ejemplo, una célula iPS), la invención no está limitada por la naturaleza de los factores de inducción de células iPS usados. Cualquier ARNm que codifique uno o más factores de inducción proteicos ahora conocidos, o que se descubran más tarde, que encuentren uso en la desdiferenciación, se contemplan para su uso en la presente invención. En algunas realizaciones, se emplean uno o más ARNm codificantes de KLF4, LIN28, c-MYC de tipo silvestre, c-MYC(T58A) (Wang X y col., 2011; Wasylishen A. R., y col. 2011), L-MYC, NANOG, OCT4 o SOX2. Se han identificado proteínas OCT-3/4 y ciertos miembros proteicos de la familia de genes SOX (SOX1, SOX2, SOX3 y SOX15) como reguladores de la transcripción implicados en el procedimiento de inducción. Otros genes adicionales codifican ciertos miembros proteicos de la familia KLF (KLF1, KLF2, KLF4 y KLF5), la familia MYC (c-MYC(WT), c-MYC(T58A), L-MYC y N-MYC), NANOG y LIN28, que se han identificado para aumentar la eficacia de la inducción. Uno o más de estos factores pueden usarse en ciertas realizaciones.

Aunque las composiciones y los procedimientos de la invención se pueden usar para generar células iPS, la invención no se limita a la generación de dichas células. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ARNm codificante de uno o más factores de reprogramación se introduce en una célula para generar una célula con un estado de diferenciación cambiado en comparación con la célula en la que se introdujo el ARNm. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ARNm codificante de uno o más factores de inducción de células iPS se usa para generar una célula desdiferenciada que no sea una célula iPS. Dichas células encuentran uso en investigación, detección de fármacos y otras aplicaciones.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona además procedimientos que emplean las células desdiferenciadas generadas mediante los procedimientos anteriores. Por ejemplo, dichas células encuentran uso en investigación, detección de fármacos y aplicaciones terapéuticas en seres humanos u otros animales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células generadas encuentran uso en la identificación y caracterización de factores de inducción de células iPS, así como otros factores asociados con la diferenciación o desdiferenciación. En algunas realizaciones, las células desdiferenciadas generadas se trasplantan en un organismo o en un tejido que reside *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, se expone un organismo, tejido o sistema de cultivo que alberga las células generadas a un compuesto de ensayo, y se observa o se mide el efecto del compuesto de ensayo sobre las células o sobre el organismo, tejido o sistema de cultivo.

En algunas otras realizaciones, una célula desdiferenciada generada usando los procedimientos anteriores (por ejemplo, una célula iPS) se trata además para generar una célula diferenciada que tenga el mismo estado de diferenciación o tipo de célula que la célula somática a partir de la que se generó la célula desdiferenciada. En algunas otras realizaciones, la célula desdiferenciada generada usando los procedimientos anteriores (por ejemplo, una célula iPS) se trata además para generar una célula diferenciada que tenga un diferente estado de

diferenciación o tipo de célula en comparación con la célula somática a partir de la que se generó la célula desdiferenciada. En algunas realizaciones, la célula diferenciada se genera a partir de la célula desdiferenciada generada (por ejemplo, la célula iPS generada) introduciendo ARNm codificante de uno o más factores de reprogramación en la célula iPS generada y manteniendo la célula en la que se introduce el ARNm en condiciones en las que la célula sea viable y se diferencie en una célula que tenga un estado de diferenciación o tipo de célula cambiado en comparación con la célula desdiferenciada generada (por ejemplo, la célula iPS generada) en la que se introduce el ARNm codificante de uno o más factores de reprogramación. En algunas de estas realizaciones, la célula diferenciada generada que tiene el estado de diferenciación cambiado se usa para investigación, detección de fármacos y aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, en seres humanos u otros animales). Por ejemplo, las células diferenciadas generadas encuentran uso en la identificación y caracterización de los factores de reprogramación asociados con la diferenciación. En algunas realizaciones, las células diferenciadas generadas se trasplantan en un organismo o en un tejido que reside *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, se expone un organismo, tejido o sistema de cultivo que alberga las células diferenciadas generadas a un compuesto de ensayo, y se observa o se mide el efecto del compuesto de ensayo sobre las células o sobre el organismo, tejido o sistema de cultivo.

En algunas realizaciones preferidas del procedimiento que comprende introducir ARNm codificante de uno o más factores de inducción de iPSC en una célula somática; y mantener la célula en condiciones en las que la célula sea viable y el ARNm que se introduce en la célula se exprese en cantidad suficiente y durante el tiempo suficiente para generar una célula desdiferenciada (por ejemplo, en las que la célula desdiferenciada es una célula madre pluripotente inducida), el tiempo suficiente para generar una célula desdiferenciada es inferior a una semana. Sin embargo, en algunas realizaciones del procedimiento, el tiempo suficiente para generar una célula desdiferenciada (por ejemplo, una célula iPS) es de al menos ocho días. En algunas realizaciones del procedimiento, el tiempo suficiente para generar una célula desdiferenciada (por ejemplo, una célula iPS) es superior a ocho días (por ejemplo, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días o más). Entre otros factores, los factores de inducción de células iPS particulares usados, y sus dosis y dosis relativas, así como las células alimentadoras (si se usan), los medios y otras condiciones de crecimiento afectan a la cantidad de tiempo que es el tiempo suficiente para generar una célula desdiferenciada (por ejemplo, una célula iPS). Por ejemplo, los presentes solicitantes descubrieron que, en las mismas condiciones de cultivo, el uso de moléculas de ARN monocatenario codificantes de L-MYC requirió un tiempo mayor (por ejemplo, al menos aproximadamente 17 días) para generar células iPS que cuando se usaron moléculas de ARN monocatenario codificantes de c-MYC (por ejemplo, en un experimento, lo que requiere solo aproximadamente 10-12 días para generar células iPS). En algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas 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 algunas realizaciones preferidas, este procedimiento tuvo una eficacia de más del doble que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector vírico (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunas realizaciones preferidas, este procedimiento fue más de 5 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector vírico (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunas realizaciones preferidas, este procedimiento fue más de 10 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector vírico (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunas realizaciones preferidas, este procedimiento fue más de 20 veces más

eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector vírico (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunas realizaciones preferidas, este procedimiento fue más de 25 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector vírico (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunas realizaciones preferidas, este procedimiento fue más de 30 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector vírico (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunas realizaciones preferidas, este procedimiento fue más de 35 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector vírico (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunas realizaciones preferidas, este procedimiento fue más de 40 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector vírico (por ejemplo, un vector de lentivirus).

La presente invención proporciona además composiciones (sistemas, kits, mezclas de reacción, células, ARNm) usados o útiles en los procedimientos y/o generados mediante los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona ARNm codificante de un factor de inducción de células iPS, teniendo el ARNm pseudouridina en lugar de uridina.

La presente invención proporciona además composiciones que comprenden un reactivo de transfección y un ARNm codificante de un factor de inducción de células iPS (por ejemplo, una mezcla de reactivo de transfección y ARNm).

En algunas realizaciones, las composiciones comprenden ARNm codificante de 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 además cualquier otro reactivo o componente suficiente, necesario o útil para poner en practicar cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. Dichos reactivos o componentes incluyen, aunque sin limitación, reactivos de transfección, medio de cultivo (por ejemplo, medio acondicionador de MEF), células (por ejemplo, células somáticas, células iPS), recipientes, cajas, tampones, inhibidores (por ejemplo, inhibidores de RNasa), etiquetas (por ejemplo, fluorescentes, luminiscentes, radiactivas, etc.), moléculas de control positivas y/o negativas, reactivos para generar ARNm protegido con caperuza, hielo seco u otros refrigerantes, instrucciones para su uso, equipo de cultivo celular, equipo de detección/análisis, y similar.

En determinadas realizaciones, los ARN monocatenarios o ARNm que comprenden una composición, un kit o un procedimiento de la invención se purifican o se tratan para generar composiciones de ARN tratado o purificado, o preparados de ARN monocatenario o de ARNm que tienen la mayoría de las moléculas de ARN contaminantes eliminadas (por ejemplo, moléculas que causan una respuesta inmunogénica en las células). En determinadas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm usado en la composición o en el preparado de ARN purificado o tratado se purifica para eliminar los contaminantes, incluyendo los contaminantes de ARN (por ejemplo, contaminantes de ARN bicatenario) de modo que esté sustancialmente libre, prácticamente libre, extremadamente libre o absolutamente libre de dichos contaminantes. La presente invención no está limitada con respecto a los procedimientos de purificación o de tratamiento usados para purificar el ARN monocatenario o ARNm para los procedimientos del presente documento que usan una composición de ARN purificado o tratado (por ejemplo, que comprende un ARN monocatenario o ARNm) para inducir un efecto biológico o bioquímico (por ejemplo, para reprogramar una célula humana o de mamífero de un estado diferenciado o fenotipo a un segundo estado diferenciado o fenotipo), y la invención incluye el uso de cualquier procedimiento que se conozca en la técnica o se desarrolle en el futuro para purificar el ARN monocatenario o ARNm y eliminar los contaminantes, incluyendo los contaminantes de ARN, que interfieren con el uso previsto del ARN monocatenario o ARNm. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, la purificación del ARN monocatenario o ARNm elimina los contaminantes que son tóxicos para las células (por ejemplo, induciendo una respuesta inmune innata en las células o, en el caso de los contaminantes de ARN que comprenden ARN bicatenario, induciendo interferencia de ARN (ARNi), por ejemplo, a través de ARNip o moléculas largas de ARNi) y contaminantes que directa o indirectamente reducen la traducción del ARNm en las células). En algunas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm se purifica mediante HPLC usando un procedimiento descrito en el presente documento, que incluye los de los EJEMPLOS. En determinadas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm se purifica usando un sustrato de resina polimérica que comprende un copolímero de estirendivinilbenceno derivado de C18 y un agente de emparejamiento de iones de acetato de trietilamina (TEAA) en el tampón de columna junto con el uso de un gradiente de acetonitrilo para eluir el ARN monocatenario o ARNm y separarlo de los ARN contaminantes de una manera dependiente del tamaño; en algunas realizaciones, la purificación del ARN monocatenario o ARNm se realiza usando HPLC, pero, en algunas otras realizaciones, se usa una columna de flujo por gravedad para la purificación. En algunas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm se purifica usando un procedimiento descrito en el libro titulado "RNA Purification and Analysis" de Douglas T. Gjerde, Lee Hoang y David Hornby, Publicado por Wiley-VCH, 2009. En algunas realizaciones, la purificación de ARN monocatenario o ARNm se lleva a cabo en un modo no desnaturante (por ejemplo, a una temperatura inferior a aproximadamente 50 °C, por ejemplo, a temperatura ambiente). En algunas realizaciones, la purificación de ARN monocatenario o ARNm se lleva a cabo en un modo parcialmente desnaturante (por ejemplo, a una temperatura inferior a aproximadamente 50 °C y 72 °C). En algunas realizaciones, la purificación de ARN monocatenario o ARNm se lleva a cabo en un modo desnaturante (por ejemplo, a una temperatura superior a aproximadamente 72 °C). Como es evidente, los expertos en la materia sabrán que la temperatura de desnaturación depende de la temperatura de fusión (Tf) del ARN monocatenario o

ARNm que se está purificando, así como de las temperaturas de fusión del ARN, ADN o híbridos de ARN/ADN que contaminan el ARN monocatenario o ARNm. En algunas otras realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm se purifica según lo descrito por Mellits K. H. y col., 1990). Tras observar esa incubación de ARN transcrito *in vitro* (IVT-ARN) con RNasa III usando las condiciones descritas por Robertson y col. (Robertson, H. D. y col., 1968) antagonizaron la activación de DAI en un sistema de traducción *in vitro* libre de células, estos autores usaron una purificación en tres etapas para eliminar los contaminantes, que puede usarse en realizaciones de la presente invención. La etapa 1 fue electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % en urea 7 M (condiciones de desnaturalización). La banda principal de ARN se escindió del corte de gel y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % en condiciones no desnaturalizantes (sin urea), y la banda principal se recuperó del corte de gel. Se realizó una purificación adicional en una columna de celulosa CF-11 usando una fase móvil de etanol-tampón salino que separa el ARN bicatenario del ARN monocatenario (Franklin R. M. 1966. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 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. Se usó un procedimiento de purificación de IVT-ARN de 3 etapas similar que comprendía electroforesis en gel desnaturalizante, electroforesis en gel no desnaturalizante y cromatografía CF-11 por Peery y Mathews (Peery T. y Mathews, M. B. 1997). Estos autores dijeron que la RNasa III podría ser un pretratamiento opcional o en lugar del gel no desnaturalizante, siempre que el ARN no fuera sensible a la enzima, lo que observaron al cortar algunos ARN monocatenarios. En algunas otras realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm se purifica usando una columna de hidroxiapatita (HAP) en condiciones no desnaturalizantes o a temperaturas más altas (por ejemplo, según lo descrito por Pays E. 1977). *Biochem. J.* 165: 237-245; Lewandowski L. J. y col. 1971. *J. Virol.* 8: 809-812; Clawson G. A. y Smuckler E. A. 1982. *Cancer Research* 42: 3228-3231; y/o Andrews-Pfannkoch C. y col. 2010. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 5039-5045). En algunas otras realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm se purifica mediante cromatografía líquida de intercambio aniónico débil en condiciones no desnaturalizantes (por ejemplo, según lo descrito por Easton L. E. y col., 2010. *RNA* 16: 647-653, para limpiar reacciones de transcripción *in vitro*). En algunas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm se purifica usando uno o más de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento o cualquier otro procedimiento conocido en la técnica o desarrollado en el futuro. En otra realización más, el ARN monocatenario o ARNm usado en las composiciones, kits o procedimientos de la presente invención se purifica usando un procedimiento que comprende tratar el ARN monocatenario o ARNm con una enzima que actúe específicamente (por ejemplo, que digiera) uno o más ARN contaminantes o ácidos nucleicos contaminantes (por ejemplo, incluyendo el ADN), pero que no actúe (por ejemplo, que no digiera) el ARN monocatenario o ARNm deseado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm usado en las composiciones y en los procedimientos de la presente invención se purifica usando un procedimiento que comprende tratar el ARNm con una enzima ribonucleasa III (RNasa III) (por ejemplo, RNasa III de *E. coli*) y el ARN monocatenario o ARNm se purifica a continuación de los productos de digestión con RNasa III. Una enzima ribonucleasa III (RNasa III), en el presente documento, significa una enzima que digiere ARN bicatenario de más de aproximadamente doce pares de bases a fragmentos cortos de ARN bicatenario. En algunas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm usado en las composiciones, kits o procedimientos de la presente invención se purifica usando un procedimiento que comprende tratar el ARN monocatenario o ARNm con una o más otras enzimas que digieran específicamente uno o más ARN contaminantes o ácidos nucleicos contaminantes (por ejemplo, incluyendo el ADN).

En algunas realizaciones, los resultados descritos en el presente documento demuestran un procedimiento de la presente invención para reprogramar una célula que presenta un primer estado de diferenciación o fenotipo a una célula que presenta un segundo estado de diferenciación o fenotipo (por ejemplo, la reprogramación de una célula madre mesenquimal de ratón a un mioblasto, por ejemplo, la reprogramación de un fibroblasto humano a una célula neuronal; por ejemplo, la reprogramación de una célula somática; por ejemplo, un fibroblasto, queratinocito o célula sanguínea a una célula desdiferenciada o iPS), que comprende: introducir de forma repetida (por ejemplo, en o durante cada uno de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 18 o > 18 días) o continua en una célula que presenta un primer estado de diferenciación o fenotipo una mezcla de reprogramación de ARNm que comprende ARNm modificado con pseudouridina (GAΨC) codificante de uno o más factores de reprogramación proteicos (por ejemplo, uno o más factores de transcripción), en las que el ARNm de GAΨC: (i) presenta una caperuza en su extremo 5' y una cola de poliA en su extremo 3'; (ii) se purifica (por ejemplo, mediante HPLC o cromatografía o electroforesis a baja presión o por gravedad) o se trata con una endorribonucleasa específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III) en condiciones en las que: por ejemplo, para el ARNm codificante de proteína MYOD, menos del 1 % del ARN total que comprende dicha mezcla de reprogramación de ARNm usada para dicha introducción comprende ARN bicatenario; por ejemplo, para ARNm codificante de factores de reprogramación proteicos para inducir células neuronales o células iPS, menos del 0,01 % del ARN total que comprende dicha mezcla de reprogramación de ARNm usada para dicha introducción comprende ARN bicatenario; y mantener la célula en condiciones para generar una célula reprogramada que presente un segundo estado de diferenciación o fenotipo. En algunas realizaciones preferidas, la caperuza presenta una estructura cap1, en la que el penúltimo nucleótido 5' comprende un grupo 2'-O-metilo.

En otras determinadas realizaciones, estos resultados demuestran un procedimiento de la presente invención para reprogramar una célula que presenta un primer estado de diferenciación (por ejemplo, una célula somática; por ejemplo, un fibroblasto, queratinocito, una célula sanguínea) o fenotipo a una célula que presenta un segundo estado de diferenciación (por ejemplo, una célula desdiferenciada o iPS), que comprende: introducir de forma repetida (por ejemplo, en o durante cada uno de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 18, 19, 20 o >20 días) o

continua en la célula que presenta un primer estado de diferenciación o fenotipo una mezcla de reprogramación de ARNm que comprende ARNm de GAUC sin modificar codificante de uno o más factores de reprogramación proteicos (por ejemplo, uno o más factores de transcripción), en las que el ARNm de GAUC sin modificar: (i) presenta una caperuza en su extremo 5' y una cola de poliA en su extremo 3'; (ii) se purifica (por ejemplo, mediante HPLC o cromatografía o electroforesis a baja presión o por gravedad) o se trata con una endorribonucleasa específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III) en condiciones en las que (por ejemplo para ARNm codificante de proteína MYOD, menos del 0,1 % del ARN total que comprende dicha mezcla de reprogramación de ARNm usada para dicha introducción comprende ARN bicatenario; por ejemplo, para ARNm codificante de factores de reprogramación proteicos para inducir células iPS, menos del 0,004 % del ARN total que comprende dicha mezcla de reprogramación de ARNm usada para dicha introducción comprende ARN bicatenario); y cultivar la célula en condiciones para generar una célula reprogramada que presente un segundo estado de diferenciación o fenotipo. En algunas realizaciones preferidas, la caperuza presenta una estructura cap1, en la que el penúltimo nucleótido 5' comprende un grupo 2'-O-metilo. En algunas realizaciones preferidas del procedimiento de reprogramación de una célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo a una célula que presenta un segundo estado diferenciado o fenotipo, la célula que presenta un primer estado diferenciado o fenotipo es una célula somática (por ejemplo, un fibroblasto o queratinocito humano), la mezcla de reprogramación de ARNm usada para dicha introducción (por ejemplo, transfección) en la célula que presenta el primer estado de diferenciación comprende bien ARNm de GAΨC modificados con pseudouridina, ARNm de GAΨm⁵C modificados con pseudouridina y 5-metilcitidina, o ARNm de GAUC no modificados que presentan una estructura cap1, en cada caso con colas de poliA con al menos nucleósidos de 50 aminoácidos (por ejemplo, nucleósidos de aproximadamente 150 aminoácidos); en el que dicha mezcla de reprogramación de ARNm codifica una mezcla seleccionada entre: K₍₁₋₃₎MO₃S; K₍₁₋₃₎MO₃SL; y K₍₁₋₃₎MO₃SLN; en las que M = c-MYC(T58A) o c-MYC; en las que dichos ARNm de dicha mezcla de reprogramación de ARNm están tratados con RNasa III y están absolutamente libres de ARN bicatenario; y la célula que presenta un segundo estado diferenciado o fenotipo es una célula iPS.

Ejemplos

Materiales y procedimientos generales, particularmente los relacionados con el desarrollo del procedimiento de tratamiento con RNasa III

La siguiente descripción ilustra ejemplos de los materiales y procedimientos usados en general en el presente documento. Siempre que ha sido posible, los solicitantes han intentado señalar cuándo se usaron otros materiales o procedimientos, o las desviaciones o modificaciones de los materiales y procedimientos generales, en los EJEMPLOS o experimentos particulares descritos a continuación.

Producción de un sustrato de ARN que comprende partes tanto de ARN bicatenario como de ARN monocatenario para su uso en el ensayo simultáneo de actividades de RNasa III tanto en ARN bicatenario como en ARN monocatenario

Se usó una construcción de ADN de plásmido que contenía el promotor de la ARN polimerasa T7 y T3 para la generación de un sustrato de ARN que comprendiera una parte central de ARN bicatenario con una parte de ARN monocatenario 5'-terminal en una cadena y una parte de ARN monocatenario 3'-terminal en la otra cadena para su uso en el ensayo de las actividades de RNasa III tanto en ARN bicatenario como en ARN monocatenario simultáneamente. Se cortó una inserción de 1.671 pares de bases, como se muestra en la FIG. 1, de la estructura principal del plásmido con ClaI, y luego se generó ARN monocatenario (ARNmc) mediante la transcripción *in vitro* de cada cadena de ADN (FIG. 1) en dos reacciones separadas usando un kit de ARN-IVT convencional T7-Scribe™ (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, USA) o un kit de transcripción de alto rendimiento AmpliScribe™ T3 (epicentre, Madison, WI), respectivamente. Tras el tratamiento con DNasa I para eliminar el molde de ADN, se hicieron precipitar los productos de la transcripción de ARN monocatenario con un volumen de acetato de amonio 5 M, y se volvieron a suspender en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) con EDTA 1 mM. Las dos cadenas de ARN monocatenario se hibridaron mediante la incubación de cantidades equivalentes de los ARN monocatenarios transcritos con T7 y T3 a 94 °C durante 2 minutos, 72 °C durante 10 minutos y luego enfriando lentamente hasta la temperatura ambiente. El ARN hibridado resultante tenía 1.671 bases de longitud con una región monocatenaria de 255 bases en un extremo y una región monocatenaria de 136 bases en el otro extremo.

Producción de un ARN monocatenario de control

Se linealizó con EcoRI una construcción de plásmido que contiene un promotor de ARN polimerasa T7 con una inserción de 955 bases. Se usó el kit de ARN-IVT convencional T7-Scribe™ para transcribir el ARN a partir del molde. El tratamiento con DNasa I y la precipitación con acetato de amonio se realizaron como se ha descrito anteriormente, y el producto de la transcripción de ARN monocatenario se volvió a suspender en agua.

Ensayo simultáneo de la actividad de RNasa III en sustratos de ARN bicatenario y ARN monocatenario en diferentes condiciones de reacción

Se ajustó un microgramo del sustrato de ARN que comprendía partes tanto de ARN bicatenario como de ARN monocatenario, (Denominado en el presente documento "sustrato de ARN" o "sustrato de ARN bicatenario") a una

concentración final de 20 ng/microlitro, y se trató con RNasa III 20 nM usando el kit de eliminación de ARN bicatenario MINIMMUNE™ incubado (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE. UU.) a 37 °C durante 10 minutos en una mezcla de reacción de 50 microlitros que variaba en composición. En una realización, la mezcla de reacción contenía concentraciones finales de Tris-acetato 33 mM (pH 8) como tampón, acetato de potasio 200 mM como sal monovalente y acetato de magnesio entre 1 mM y 10 mM como fuente de cationes de magnesio divalentes. Las reacciones también contenían 0,8 unidades por microlitro de inhibidor de la RNasa SCRIPTGUARD™ (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.). Se detuvieron las reacciones mediante la adición de EDTA a la misma concentración final que la concentración de cationes de magnesio divalentes usada en el ensayo (por ejemplo, 1 mM a 10 mM final).

La digestión del sustrato de ARN se analizó por electroforesis en gel desnaturizante. En resumen, se analizaron muestras de 10 microlitros de cada reacción de RNasa III de 50 microlitros mediante electroforesis en gel desnaturizante en agarosa al 1 %, gel de urea 1 M en tampón de TBE x 1. Las muestras se desnaturizaron durante 2 minutos a 94 °C en tampón de carga que contenía formamida, y se colocaron junto a marcadores de ARN Millennium™ (Ambion/Life Technologies). Los geles se tiñeron con colorante de gel de ácido nucleico SYBR® Gold (Invitrogen/Life Technologies).

Ensayos de transferencia de puntos para el ensayo o la cuantificación del ARN bicatenario usando anticuerpos específicos del ARN bicatenario

Se aplicaron diluciones apropiadas de muestras de ARN (5 microlitros/muestra) para el fin de ensayo destinado a membranas de nylon cargadas positivamente Nytran SPC (Thermo Scientific, Waltham, MA). Se dejó secar el ADN sobre la membrana de nylon durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces, se bloquearon las membranas en tampón de bloqueo (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween al 0,05 %, leche en polvo al 20,5 % p/v) a temperatura ambiente durante 1 hora en una plataforma giratoria. Los anticuerpos primarios (anticuerpos J2 o K1, English & Scientific Consulting, Szirák, Hungría) se añadieron entonces a 1 microgramo/ml en tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora en una plataforma giratoria. Las membranas se lavaron entonces 6 veces durante 5 minutos con 20 ml de tampón de lavado (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 %). Después, se incubaron las membranas a temperatura ambiente durante 1 hora en una plataforma giratoria en un tampón de bloqueo al que se añadió una dilución 1:1000 del anticuerpo secundario (HRP anti-IgG de ratón, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA). Las membranas se lavaron de nuevo 6 veces durante 5 minutos con 20 ml de tampón de lavado (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 %). Después, se añadieron volúmenes iguales de sustratos quimioluminiscentes SUPERSIGNAL WEST PICO™ (Thermo Scientific, Waltham, MA), y se dejó que el color se desarrollara durante 5 minutos en una plataforma giratoria. Se tomaron imágenes de los puntos al exponer la película en la habitación oscura y luego revelar la película en Kodak Developer (Sigma, St. Louis, MO) durante 1 minuto y Kodak Fixer (Sigma, St. Louis, MO) durante 1 minuto.

Materiales y procedimientos generales, en particular, los que pertenecen a la reprogramación de células que presentan un primer estado diferenciado o fenotipo a un segundo estado diferenciado o fenotipo (por ejemplo, la reprogramación de células somáticas humanas a células iPS)

Procedimientos de uso de células alimentadoras y siembra en placas de fibroblastos BJ para reprogramar iPSC con ARNm codificantes de factores de reprogramación de iPSC

Se sembraron células Nuff (fibroblastos de prepucio humano P9 irradiados (donante 11) (GlobalStem, Rockville, MD) a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos recubiertos de gelatina. Se cultivaron las Nuff durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio de cultivo para Nuff (DMEM Invitrogen n.º de catálogo 11965-118, Hyclone FBS Fisher al 10 % n.º de catálogo SH30070.03HI, GLUTAMAX™ Invitrogen n.º de catálogo 35050-061, Pen/Estrep Invitrogen n.º de catálogo 15140-122). Se sembraron fibroblastos BJ (ATCC) a 1×10^4 células por pocillo en células Nuff que habían sido tratadas el día anterior. Entonces, se incubaron las células en medio de fibroblastos BJ (Advanced MEM, Hyclone FBS Fisher al 10 % n.º de catálogo SH30070.03HI, GLUTAMAX Invitrogen n.º de catálogo 35050-061, Pen/Estrep Invitrogen n.º de catálogo 15140-122) durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Protocolo de transferencia de ARNm TransIT™

Se retiró el medio de fibroblastos BJ de los fibroblastos BJ sembrados sobre células alimentadoras Nuff, y se reemplazó por medio de reprogramación de ARNm PLURITON™ (Stemgent, Cambridge, MA) (medio base con suplemento y penicilina/estreptomicina) (2 ml) con o sin 4 microlitros de proteína recombinante B18R (EBiosciences, San Diego, CA) hasta una concentración final de 200 ng/ml. Los medios se cambiaron inmediatamente antes de cada transfección con el reactivo de transfección de ARNm Mirus (Mirus Bio, Madison, WI). Para transfectar los fibroblastos BJ, se añadieron de 0,6 a 1,4 microgramos de la mezcla de ARNm a 3:1:1:1:1 que comprendía OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y bien c-MYC (T58A) o cMYC a 120 microlitros de medio OptiMEM, y luego se mezclaron refuerzo de TransIT™ (2 microlitros por microgramo de ARNm) y el reactivo de transfección de ARNm TransIT™ (microlitros por microgramo de ARNm) (Mirus Bio) con el ARNm. Se incubó la mezcla de ARNm-TransIT durante 2 minutos, y luego se añadió a cada pocillo de fibroblastos BJ sobre Nuff alimentadoras en medio PLURITON. Al día siguiente, se cambiaron los medios PLURITON antes de transfectar la misma dosis de ARNm usando refuerzo de TransIT y el reactivo de transfección de ARNm TransIT. Se reemplazó el medio PLURITON acondicionado con Nuff

por medio PLURITON el sexto día de las transfecciones. A menos que se indique lo contrario, se realizó un total de 18 transfecciones para cada experimento de reprogramación.

Protocolo de diferenciación espontánea de cuerpos embrioides

- Se procesaron algunas colonias de iPSC que se recogieron y se pasaron múltiples veces (al menos 5 veces) para la diferenciación espontánea de cuerpos embrioides como se ha descrito previamente (Huangfu y col., 2008). En resumen, se disociaron las colonias de iPSC con Colagenasa IV y se incubaron durante 8 días en placas de 6 pocillos de baja unión en medio de iPSC (medio DMEM/F12 suplementado con sustituyente de suero KNOCKOUT™ al 20 %, L-glutamina 0,1 mM, aminoácidos no esenciales y penicilina/estreptomicina (todos de Invitrogen). La mitad del medio se cambió todos los días durante el período de 8 días. Después de ocho días en cultivo en suspensión, se transfirieron los cuerpos embrioides a placas de 6 pocillos recubiertas de gelatina en el mismo medio (medio DMEM/F12 suplementado con sustitutivo de suero KNOCKOUT™ al 20 %, L-glutamina 0,1 mM, aminoácidos no esenciales y penicilina/estreptomicina) y se incubaron durante 8 días más. Se lavaron los cultivos en PBS y luego se fijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se tiñeron las células usando anticuerpos que reconocen Desmin (Thermo Scientific, Fremont, CA), actina de músculo liso α (SMA) (Sigma, St. Louis MO), fetoproteína alfa (AFP) (Sigma, St. Louis MO), SOX17 (R & D Systems, Minneapolis, MN) y beta-tubulina de clase III (Covance, Emeryville, CA). Se reconocieron estos anticuerpos primarios con el anticuerpo secundario fluorescente anti-555 de ratón (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA). Se tomaron imágenes en un microscopio Nikon epifluorescente TS100.

Tinción con fosfatasa alcalina como marcador de células iPSC

- Se lavan las células una vez en PBS x 1, seguido de la fijación en paraformaldehído al 4 % en PBS durante 5 minutos. Luego se lavaron las células dos veces en PBS seguido de dos lavados en TBST (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, TWEEN™ 20 al 0,5 %). Luego se lavaron las células en tampón AP (Tris 0,1 M, pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 5 mM). Luego se añadieron 132 microlitros de 50 mg/ml de nitroazul de tetrazolio (NBT) en dimetilformamida al 70 % (DMF) y 64 microlitros de 50 mg/ml de bromocloro-indolil-fosfato (BCIP) en dimetilformamida al 100 % (DMF) a cada 20 ml de tampón AP, que luego se añadió a las células durante 5-10 minutos hasta que se desarrolló la mancha. Una vez que se desarrolló el color púrpura, se lavaron las células al menos tres veces con TBST y, opcionalmente, dos veces con PBS x 1, y se realizó el recuento de las colonias teñidas, o se almacenaron en PBS para la obtención de imágenes y realizar el recuento de las colonias.

Inmunización de células vivas de colonias de iPSC con Tra-1-60

- Se considera que TRA-1-60 es un marcador relativamente riguroso de células iPSC completamente reprogramadas (Chan y col., 2009). Se realizó la obtención de imágenes de células vivas Tra-1-60 con el anticuerpo anti-Tra-1-60 humana de ratón StainAlive Dylight™ 488 (Stemgent) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En resumen, se diluyó un anticuerpo TRA-1-60 estéril (anticuerpo anti-Tra-1-60 humana StainAlive™ DyLight™ 488; Stemgent) 1:100 en medio de reprogramación. El día 18 del protocolo de reprogramación, se retiró el medio y se incubaron las células en medio que contenía TRA-1-60 durante 30 minutos a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se lavaron las células dos veces con medio para eliminar el anticuerpo no unido y se mantuvieron las células en medio nuevo de reprogramación durante la generación de imágenes inmunofluorescentes. Este anticuerpo permite la tinción de las células vivas, en lugar de fijar las células y sacrificarlas para la generación de imágenes.

Procedimientos para la inmunotinción de células fijas de iPSC

- Se lavaron colonias de iPSC dos veces en solución tamponada con fosfato (PBS) x 1 y se fijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS a temperatura ambiente durante media hora. Tras 3 lavados en PBS x 1, las células se lavaron 3 veces en tampón de lavado, (PBS con Triton-X100 al 0,1 %) y se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo, Triton-X100 al 0,1 %, BSA al 1 %, FBS al 2 % en PBS. Se diluyeron los anticuerpos primarios a 1:500 en solución de bloqueo y se aplicaron a las células durante la noche a 4 °C. Las células se lavaron 6 veces en tampón de lavado. Se diluyeron los anticuerpos secundarios a 1:1.000 en tampón de bloqueo, se aplicaron durante 2 horas a temperatura ambiente a oscuras. Tras 6 lavados con tampón de lavado, las células se lavaron dos veces en PBS x 1 antes de la generación de imágenes. Los anticuerpos primarios usados fueron: anticuerpo de conejo OCT4 (Santa Cruz Biotechnology); anticuerpo de ratón TRA-1-60 (Cell Signaling Technology); anticuerpo de ratón LIN28 (Cell Signaling Technology); anticuerpo de conejo NANOG (Cell Signaling Technology); anticuerpo de ratón SSEA4 (Cell Signaling Technology); anticuerpo de ratón TRA-1-81 (Cell Signaling Technology); y anticuerpo de conejo DNMT 3B (Cell Signaling Technology). Los anticuerpos secundarios usados fueron: anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Life Technologies) y anti-ratón Alexa Fluor® 555 (Molecular Probes, Life Technologies).

- Construcción de moldes de ADN para la transcripción *in vitro* de ARN monocatenarios o ARNm codificantes de factores de reprogramación de iPSC (por ejemplo, factores de reprogramación o inducción de iPSC)**

Se amplificaron por PCR los marcos de lectura abiertos (ORF) de la mayoría de los genes humanos (por ejemplo, *KLF4*, *Lin28*, *NANOG*, *Oct4*, *Sox2*) a partir de clones de ADNc (por ejemplo, Open Biosystems, Huntsville, AL) o en

algunos casos, el ORF de ciertos genes se obtuvo mediante RT-PCR del ARN total celular (por ejemplo, el ORF de *c-MYC* se obtuvo mediante la RT-PCR del ARN total de células HeLa), se clonaron en un vector plasmídico basado en pUC corriente abajo de un promotor de ARN polimerasa T7 (Mackie 1988, Studier y Moffatt 1986), y se secuenciaron para confirmar la precisión del ORF clonado. En algunas realizaciones preferidas, los ORF anteriores se ligaron en sitios EcoRV (para *c-MYC*) o EcoRV/SpeI (para KLF4, LIN28, NANOG, OCT4 y SOX2) entre las regiones no traducidas de beta-globina de *Xenopus laevis* 5' y 3' descritas (Krieg y Melton, 1984).

En algunas realizaciones específicas, el vector basado en pUC19 se modificó mediante la inserción de un promotor T7 seguido de la UTR 5' de β -globina de *Xenopus laevis*, un sitio de clonación múltiple que consiste en los sitios de restricción BglII, EcoRV y SpeI para la inserción de un gen de interés, y finalmente, la UTR 3' de β -globina de *Xenopus laevis*. Los plásmidos se linealizaron con Sail antes de la transcripción *in vitro*; por ejemplo, el promotor de ARN polimerasa T7 (subrayado/negrita), las UTR 5' y 3' de β -globina de *Xenopus laevis* (subrayadas/cursiva) y el sitio de restricción de Sall (GTCGAC/subrayado) se representan en la SEQ ID NO: 1. Los plásmidos de ADN basados en pUC19 que comprenden la SEQ ID NO: 1 con inserciones de ADN codificantes de un factor de inducción de iPSC [por ejemplo, OCT4 (SEQ ID NO: 2), SOX2 (SEQ ID NO: 3), KLF4 (SEQ ID NO: 4), LIN28 (SEQ ID NO: 5), NANOG (SEQ ID NO: 6) y MYC; por ejemplo, bien cMYC larga de tipo silvestre (SEQ ID NO: 7), cMYC(T58A) corta (SEQ ID NO: 8), cMYC corta de tipo silvestre (SEQ ID NO: 9) o L-MYC (SEQ ID NO: 10) ARNm] se linealizaron cada uno mediante la incubación durante una noche con Sail, y luego se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo o fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Se hizo precipitar el ADN lineal con precipitación en acetato de sodio/etanol, seguida de un lavado con etanol al 70 %. El ADN lineal se reconstituyó en agua y se procesó en un gel de agarosa para comprobar que el plásmido estaba completamente linealizado. Los ADN plasmídicos tratados con Sail se reconstituyeron en agua y se procesaron en un gel de agarosa para verificar que todos los plásmidos se habían linealizado para su uso en la transcripción *in vitro*. Entonces, se usó el plásmido linealizado como molde para la transcripción *in vitro* como se describe en el presente documento.

Síntesis *in vitro* de ARNm codificantes de factores de inducción de iPSC para la reprogramación

Se usó el sistema de producción de ARNm T7 mSCRIPT™ (CELLSCRIPT, INC, Madison, WI, EE.UU.) para producir ARNm no modificado con una estructura Cap1 5' y una cola de poli(A) 3' (por ejemplo, con aproximadamente 150 restos de aminoácidos). El sistema de producción de ARNm T7 mSCRIPT™ también se usó para producir ARNm modificado con pseudouridina y/o 5-metilcitidina con una estructura de caperuza 1 5' y una cola de poli(A) 3' (por ejemplo, con aproximadamente 150 restos de aminoácidos), excepto que se usó pseudouridina-5'-trifosfato (TRILINK, San Diego, CA o CELLSCRIPT, San Diego, CA o CELLSCRIPT, INC.) o 5-metilcitidina-5'-trifosfato (TRILINK, San Diego, CA) en lugar de uridina-5'-trifosfato o citidina -5'-trifosfato, respectivamente, en las reacciones de transcripción *in vitro*. Por ejemplo, los moldes linealizados se usaron para la transcripción *in vitro* como se describe en la literatura proporcionada con el sistema de producción de ARNm convencional mSCRIPT™ T7 (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.), de la siguiente manera: se usó 1 microgramos de molde de ADN lineal en reacciones x 1 junto con 2 microlitros de tampón de transcripción T7-SCRIBF™ x 10, 1,8 microlitros de ATP 100 mM, 1,8 microlitros de CTP o m⁵CTP 100 mM (Trilink Biotechnologies, San Diego, CA), 1,8 microlitros de GTP 100 mM, 1,8 microlitros de UTP o Ψ TP 100 mM (CELLSCRIPT), 2 microlitros de DTT 100 mM, 0,5 microlitros de inhibidor de RNasa SCRIPTGUARD™ y 2 microlitros de solución enzimática T7-SCRIBF™.

Tras la transcripción *in vitro* (IVT), se digirieron los moldes de ADN con DNasa I, y luego se limpiaron ARNm transcritos *in vitro* por extracción con fenol-cloroformo y precipitación en acetato de amonio como se describe en el apartado del procedimiento de limpieza rápida de ARN. En resumen, se incubaron las reacciones de transcripción *in vitro* a 37 °C durante 1 hora, seguido de la adición de 1 microlitro de DNasa I libre de RNasa y de la incubación durante 15 minutos más a 37 °C. El ARN se precipita añadiendo un volumen igual de acetato de amonio 5 M seguido de la incubación en hielo durante 10 minutos. Luego, se sedimenta el ARN centrifugando a 13.000 rpm durante 10 minutos. El sedimento se lava con etanol al 70 % y se vuelve a suspender en agua.

Los ARNm transcritos *in vitro* se trataron a continuación con RNasa III como se describe en el apartado del procedimiento de tratamiento con RNasa III, tras lo que se limpiaron los ARNm de nuevo como se describe en el apartado del procedimiento de limpieza rápida de ARN.

Después, se protegió con caperuza cada uno de los ARNm con ARNm de cap1 (o, en otras realizaciones, con ARNm de cap0) usando la enzima de protección con caperuza SCRIPTCAP™ y las enzimas 2'-O-metiltransferasa SCRIPTCAP™ (o para el ARNm de cap0, solo la enzima de protección con caperuza SCRIPTCAP™) como se describe en el sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™: En resumen, se añadieron 60 microgramos de ARN transcrito *in vitro* a 10 microlitros de tampón de protección con caperuza SCRIPTCAP™, 5 microlitros de GTP 20 mM, 2,5 microlitros de S-adenosil-metionina (SAM), 2,5 microlitros de inhibidor de RNasa SCRIPTGUARD™, 4 microlitros de 2'-O-Metiltransferasa SCRIPTCAP™, 4 microlitros de enzima de protección con caperuza SCRIPTCAP™, y agua hasta 100 microlitros. Todas las reacciones de protección con caperuza se incubaron a 37 °C durante 1 hora seguido de directamente la reacción formación de colas de poli(A).

La síntesis de ARNm con cola de poli(A) se realizó usando el sistema de producción de ARN T7 mSCRIPT™(CELLSCRIPT, Inc.) de la siguiente manera: se añadieron 12 microlitros de tampón de formación de colas A-Plus x10, 6 microlitros de ATP 20 mM, 5 microlitros de poli(A) polimerasa A-PLUS™ y 0,5 microlitros de

inhibidor de RNasa SCRIPTGUARD™ a los 100 microlitros de ARN transcrito *in vitro* protegido con caperuza 5', y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos (para generar una cola de poli(A) de aproximadamente 150 bases) o durante 1 hora (para generar una cola de poli(A) de > 200 bases). Los ARNm protegidos con caperuza y poliadenilados se limpiaron como se describe en el apartado del procedimiento de limpieza rápida de ARN o como se describe en el sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™. Por lo tanto, las reacciones se terminaron mediante dos extracciones en fenol/cloroformo/isoamilo, seguidas de la precipitación con un volumen igual de acetato de amonio 5 M. Las mezclas de ARNm/acetato de amonio 5 M se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos, se lavaron en etanol al 70 % y se volvieron a suspender en agua estéril.

En algunos experimentos, los ARNm transcritos *in vitro* codificantes de factores de reprogramación de iPSC se evaluaron para determinar la expresión tras la transfección de células humanas. Por ejemplo, en algunos experimentos, cada uno de los ARNm monocatenarios transcritos *in vitro* con cola de poli(A) y cap1 (con nucleótidos de 150 aminoácidos) fabricados con sustitución de la uridina-5'-trifosfato con pseudouridina-5'-trifosfato (Kariko y col., 2008) y codificantes de KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 o SOX2 dieron lugar a la expresión y la ubicación subcelular adecuada de cada producto proteico respectivo en fibroblastos humanos 1079 de prepucio de feto recién nacido. Por ejemplo, en algunos experimentos, se transfectaron los fibroblastos 1079 con hasta 4 microgramos de uno de estos ARNm por pocillo de una placa de 6 pocillos y luego se analizaron mediante análisis de inmunofluorescencia 24 horas después de la transfección. En resumen, las células 1079 se lavaron con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada lavado con PBS seguido de tres lavados en PBS + Triton X-100 al 0,1 %, se bloquearon en tampón de bloqueo (PBS + Triton al 0,1 %, FBS al 2 % y BSA al 1 %) durante 1 hora a temperatura ambiente, y luego se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (por ejemplo, OCT4 anti-humano de ratón con n.º de catálogo sc-5279, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; NANOG anti-humano de conejo con n.º de catálogo 3580; KLF4 anti-humano de conejo con n.º de catálogo 4038; LIN28 anti-humano de ratón con n.º de catálogo 5930; c-MYC anti-humano de conejo con n.º de catálogo 5605; o SOX2 anti-humano de conejo con n.º de catálogo 3579; todos de Cell Signaling Technology, Beverly, MA) a una dilución de 1:500 en tampón de bloqueo. Tras lavar 5 veces en PBS + Triton X-100 al 0,1 %, las células se incubaron durante 2 horas con anticuerpo ALEXA Fluor 488 anti-conejo (n.º de catálogo 4412, Cell Signaling Technology), anticuerpo secundario anti-FITC de ratón (n.º de catálogo F5262, Sigma) o un Alexa Fluor 555 anti-ratón (n.º de catálogo 4409, Cell Signaling Technology) a diluciones de 1:1000 en tampón de bloqueo. Se tomaron imágenes en un microscopio invertido Nikon TS100F (Nikon, Tokio, Japón) con una cámara digital monocromática de 2 megapíxeles (Nikon) usando el software de elementos NIS (Nikon). Los niveles endógenos de proteínas KLF4, LIN28, NANOG, OCT4 y SOX2 no fueron detectables por inmunofluorescencia en células 1079 no transfectadas, aunque, en algunos casos, los niveles endógenos de c-MYC fueron relativamente altos en células 1079 no transfectadas. Las transfecciones con ARNm codificantes de los factores de transcripción, KLF4, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2 dieron lugar a la ubicación principalmente nuclear de cada proteína 24 horas después de las transfecciones de ARNm, mientras que la proteína de unión al ARNm citoplasmático, LIN28, se localizó en el citoplasma.

Ejemplo del uso de los ARNm con cola de poli A) y protegidos con caperuza transcritos *in vitro* codificantes de los factores de reprogramación de iPSC para la reprogramación de células somáticas humanas o de ratón a células iPS

A menos que se indique lo contrario para un experimento particular, los factores de reprogramación de ARNm usados en los procedimientos de inducción de iPSC se diluyeron a 100 ng/ml, y se preparó una mezcla que contenía los factores en una proporción molar de 3:1:1:1 de OCT4/SOX2/KLF4/LIN28/MYC (por ejemplo, cMYC, cMYC(T58A) o L-MYC), y se dividió en alícuotas que contenían aproximadamente de 1 a 1,4 microgramos de ARN total. Por ejemplo, en una realización que comprendía el uso de 1,1 microgramos totales al día por pocillo de ARNm para la reprogramación, se preparó en una proporción molar de 3:1:1:1 de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC o c-MYC (T58A) mezclando los siguientes volúmenes de una solución de 100 ng/ml de cada factor de reprogramación de ARNm: OCT4, 385,1 microlitros; SOX2, 119,2 microlitros; KLF4, 155,9 microlitros; LIN28, 82,5 microlitros; c-MYC o c-MYC(T58A), 147,7 microlitros; más 109,6 microlitros de agua, formando un volumen total de 1 ml. [Como alternativa, en algunas realizaciones, se reemplazó una parte del agua por una solución acuosa de ARNm codificante de proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) a 100 ng/ml como marcador de transfección].

Procedimiento de limpieza rápida de ARN

El siguiente protocolo proporciona un procedimiento de limpieza rápida de ARN para la extracción de enzimas, nucleótidos, oligonucleótidos pequeños y otros componentes del ARN de la reacción de transcripción *in vitro* (IVT) o de tratamiento con RNasa III. No pretende ser un procedimiento para la purificación extensa de ARN monocatenario o ARNm. Este procedimiento de limpieza comprende la extracción en fenol-cloroformo, seguida de la precipitación con acetato de amonio para retirar la proteína y hacer precipitar selectivamente el ARN, dejando el ADN residual no digerido y los trifosfatos 5' de los nucleósidos no incorporados en el sobrenadante. Sin limitar el procedimiento con respecto a las cantidades específicas de ARN purificadas o los volúmenes de reactivos específicos, que pueden aumentarse a escala o ajustarse, a continuación, se presenta una realización del procedimiento usado con respecto a la presente invención.

1. Se ajusta un volumen de reacción IVT de 20 microlitros a 200 microlitros en total usando agua exenta de

RNasa (se añaden 179 microlitros a la reacción).

2. Se añade un volumen (200 microlitros) de fenol/cloroformo saturado con TE. Se agita con formación de vórtice durante 10 segundos.

3. Se centrifuga en una microcentrifugadora a >10.000 xg durante 5 minutos para separar las fases.

5 4. Se retira la fase acuosa (superior) con una pipeta y se transfiere a un tubo limpio.

5. Se añade un volumen (200 microlitros) de acetato de amonio 5 M, se mezcla bien y luego se incuba durante 15 minutos en hielo.

6. Se sedimenta el ARN por centrifugación a >10.000 xg durante 15 minutos a 4 °C.

7. Se retira el sobrenadante con una pipeta y se enjuaga suavemente el sedimento con etanol al 70 %.

10 8. Se retira el etanol al 70 % con una pipeta sin perturbar el sedimento de ARN.

9. Se deja secar el sedimento, luego se vuelve a suspender en 50-75 microlitros de agua exenta de RNasa y se cuantifica el ARN mediante espectrofotometría o fluorimetría.

Ejemplo de un procedimiento de tratamiento con RNasa III de la presente invención

15 Se incuban cien microgramos de ARN monocatenario transcrito *in vitro*, ARN monocatenario o ARNm protegido con caperuza y/o poliadenilado, que se ha limpiado preferentemente usando el procedimiento de limpieza rápida de ARN descrito en el presente documento, en una mezcla de reacción de 200 microlitros que contiene Tris-acetato 33 mM (pH 8) como tampón, acetato de potasio 200 mM como sal monovalente, y entre aproximadamente 1 mM y 4 mM (más preferentemente, aproximadamente 2-3 mM, y lo más preferentemente 2 mM) de acetato de magnesio como la sal de magnesio, y RNasa III 20 nM (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI 53713) durante 30 minutos a 37 °C. A menos
20 que se indique lo contrario, los ARN monocatenarios se trataron con RNasa III usando el tratamiento con RNasa III descrito en el presente documento con acetato de magnesio 1 o 2 mM y acetato de potasio 150 mM. Sin embargo, en algunos experimentos descritos en el presente documento, se usó hasta aproximadamente 10 mM de acetato de magnesio para el tratamiento con RNasa III con el fin de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cationes de magnesio divalentes sobre la actividad de la RNasa III para la eliminación del ARN bicatenario. En algunas
25 realizaciones, las reacciones de tratamiento con RNasa III también contienen un inhibidor de RNasa (por ejemplo, 0,8 unidades/microlitro de inhibidor de RNasa SCRIPTGUARD™; CELLSCRIPT, INC.). Las reacciones de tratamiento con RNasa III se detienen mediante la adición de EDTA a una concentración suficiente para formar complejos con los cationes de magnesio (por ejemplo, EDTA 1 mM final si se usa acetato de magnesio 1 mM). En realizaciones preferidas, el ARN monocatenario o ARNm se limpia además usando el procedimiento de limpieza
30 rápida de ARN, que comprende la extracción usando fenol/cloroformo saturado con TE, la precipitación con 1 volumen de acetato de amonio 5 M y el lavado del sedimento de ARN con etanol al 70 % (como se describe en el presente documento para el procedimiento de limpieza rápida de ARN). En algunas realizaciones, el ARN monocatenario o ARNm tratado con RNasa III se vuelve a suspender luego en agua.

Ejemplo 1: La concentración de cationes de magnesio durante el tratamiento con RNasa III tiene efectos importantes sobre la integridad del ARN monocatenario y la plenitud de la digestión con RNasa III del ARN bicatenario

35 Se trató un microgramo de ARN bicatenario con RNasa III 20 nanomolar en tampones de reacción que contenían acetato de magnesio de 0 a 10 mM en el tampón. Las condiciones de tratamiento ideales digerirían la región de ARN bicatenario de 1.671 nucleótidos de longitud del producto de la transcripción y dejarían intactos dos fragmentos de
40 ARN monocatenarios de 255 y 136 nucleótidos de longitud (FIG. 1).

Como se muestra en la FIG. 2, la banda de ARN bicatenario fue digerida por la RNasa III. Lo que es más importante, las bandas de ARN monocatenario eran del tamaño correcto y estaban intactas, según las manchas mínimas debajo de las bandas, a concentraciones de acetato de magnesio de entre 1 y 4 mM. El hecho de que la cantidad de
45 manchas debajo de las bandas de ARN monocatenario aumente de manera constante, comenzando a aproximadamente 5 mM y empeorando gradualmente a medida que las concentraciones de acetato de magnesio aumentaban hasta 10 mM, indicó que una concentración óptima de acetato de magnesio para la digestión con RNasa III estaba en el intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM, y más preferentemente, de aproximadamente 1 mM a 3 mM. Esto fue una gran sorpresa, porque los expertos que habían trabajado en la técnica de la RNasa III, al menos hasta donde saben los presentes inventores, no había enseñado que la concentración de
50 acetato de magnesio era importante para la reacción de la RNasa III, habiendo establecido que podía usarse en un amplio intervalo de concentraciones de hasta 100 mM. Por lo tanto, la observación de los presentes inventores de que se produjeron manchas significativas y crecientes de las bandas de ARN monocatenario, en particular, a concentraciones de acetato de magnesio de 5 mM y superiores, fue sorprendente e inesperada. Este resultado
55 mostró por primera vez que se necesitaba una concentración de cationes de magnesio divalentes mucho más baja que la establecida anteriormente para mantener la integridad del ARN monocatenario, y que la concentración de 10

mM que se había usado en la técnica era demasiado alta y conducía a una degradación del ARN monocatenario. Aún más, como se muestra en otra parte del presente documento, la digestión del ARN bicatenario fue incompleta cuando se realizó el tratamiento con RNasa III usando la concentración de cationes de magnesio 10 mM, lo que fue muy sorprendente, porque este nivel de cationes de magnesio para la digestión con RNasa III se ha estado enseñando en la técnica durante aproximadamente 35 años sin que se cuestionara ni se cambiara.

Aún más, como se muestra en el EJEMPLO 9, la eficacia biológica de los ARNm monocatenarios modificados (por ejemplo, ARNm modificados con pseudouridina) para la expresión de las proteínas codificadas que comprenden factores de reprogramación de iPSC fue mayor si los ARNm modificados codificantes de los factores de reprogramación de iPSC se trataron con el tratamiento de RNasa III usando Mg^{2+} 2 mM en lugar de Mg^{2+} 10 mM. Aún más sorprendentemente, la efectividad de los ARN monocatenarios o ARNm no modificados (GAUC) tratados con RNasa III codificantes de los factores de inducción de células iPS que se trataron con la RNasa III usando Mg^{2+} 2 mM en lugar de Mg^{2+} 10 mM fueron muy diferentes, sin que se produjera la inducción de células iPS usando Mg^{2+} 10 mM, pero produciéndose la inducción de muchas células iPS mediante el ARNm tratado con RNasa III usando Mg^{2+} 2 mM (por ejemplo, EJEMPLO 10).

Ejemplo 2: Los efectos de la concentración de cationes de magnesio divalentes sobre la plenitud de la digestión con RNasa III del ARN bicatenario son detectables usando el anticuerpo monoclonal específico del ARN bicatenario J2

Se digirieron diferentes cantidades conocidas de un sustrato de ARN bicatenario usando el tratamiento con RNasa III en presencia de diferentes concentraciones de cationes de magnesio divalentes, y luego se analizaron las cantidades detectables de ARN bicatenario restante mediante ensayos de transferencia de puntos, usando el anticuerpo monoclonal específico del ARN bicatenario J2.

Como se ha informado previamente (Leonard y col., 2008), se necesitan tramos de ARN bicatenario de 40 pb o mayores para dimerizar TLR3 con el fin de generar una respuesta inmune innata. El anticuerpo J2 puede reconocer el ARN bicatenario de 40 pb o más. Por consiguiente, se escogió el anticuerpo monoclonal J2, porque puede reconocer solamente tamaños biológicamente relevantes de ARN bicatenario que inducirán la producción de interferón a través de la activación de TLR3.

Los resultados del ensayo de transferencia de puntos, como se muestra en la FIG. 3, muestran que la digestión de los contaminantes de ARN bicatenario por la RNasa III varió con la concentración de cationes de magnesio divalentes presente en la reacción. En este caso, la mayor parte del contaminante de ARN bicatenario se digirió a una concentración final de acetato de magnesio inferior a aproximadamente 5 mM, y la digestión pareció ser completa entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de cationes de magnesio divalentes.

Ejemplo 3: Efecto de la concentración de cationes de Mg^{2+} sobre la plenitud de la digestión del ARN bicatenario mediante composiciones de RNasa III detectado usando anticuerpo monoclonal específico del ARN bicatenario K1

Las muestras que contenían diferentes cantidades conocidas de ARN bicatenario se trataron con RNasa III en presencia de diferentes cantidades de cationes de magnesio divalentes, y después se analizaron mediante el ensayo de transferencia de puntos para la cantidad de ARN bicatenario restante usando el anticuerpo monoclonal K1 tras el tratamiento con RNasa III.

Como se muestra en el EJEMPLO 2, se necesitan tramos de ARN bicatenario de 40 pb o más para dimerizar TLR3 con el fin de generar una respuesta inmune innata. Similar al anticuerpo monoclonal J2, el anticuerpo monoclonal puede reconocer el ARN bicatenario de 40 pb o más. Por consiguiente, se escogió este anticuerpo, porque puede reconocer solo fragmentos de ARN bicatenario biológicamente relevantes que inducirán la producción de interferón a través de la activación de TLR3.

Los resultados, como se muestra en la FIG. 4, muestran que la capacidad de digerir los contaminantes de ARN bicatenario varió en función de la concentración de cationes de magnesio divalentes usados para el tratamiento con RNasa III. Usando el anticuerpo K1, la digestión del contaminante de ARN bicatenario pareció casi completarse a una concentración final de acetato de magnesio de entre aproximadamente 1 mM y 5 mM, y la digestión del ARN bicatenario pareció completarse a entre aproximadamente 2 mM y 4 mM de acetato de magnesio.

Ejemplo 4: Efectos del tratamiento con RNasa III sobre la integridad de los productos de transcripción de ARN monocatenario pequeño (255 nucleótidos o 156 nucleótidos) y grande (955 nucleótidos) y el grado de digestión del ARN bicatenario con diferentes concentraciones de Mg^{+2}

Se mezcló un microgramo del sustrato de ARN que comprendía tanto ARN bicatenario de 1.671 pares de bases como ARN monocatenario de 255 y 136 nucleótidos, y un producto de transcripción de control de ARN monocatenario de 955 nucleótidos, y se trató con RNasa III 20 nanomolar en tampones de reacción que contenían acetato de magnesio 0 a 10 mM. En condiciones ideales, la reacción digeriría la parte de ARN bicatenario de 1.671 pares de bases del sustrato de ARN y dejaría los extremos de ARN monocatenario de 255 nucleótidos y 136 nucleótidos de este sustrato de ARN y el producto de transcripción de control de ARN monocatenario de 955

nucleótidos sin digerir e intactos.

Como se puede ver a partir de los resultados en la FIG. 5, la capacidad de digerir los contaminantes de ARN bicatenario mientras se mantiene la integridad del ARN monocatenario tanto pequeño como grande varió en función de la concentración del catión de magnesio divalente presente en la reacción. En este caso, se produjo una digestión de contaminante de ARN bicatenario óptima cuando la concentración final de acetato de magnesio estaba entre aproximadamente 1 y 4 mM de magnesio divalente, y preferentemente, entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 3 mM de magnesio divalente. A estas concentraciones de catión de magnesio divalente, la parte de ARN bicatenario del sustrato de ARN se digirió aproximadamente por completo y se observó un manchado mínimo de las bandas de ARN monocatenario en el gel, evidencia de que ambos productos de transcripción de ARN monocatenario permanecieron conservados e intactos.

Ejemplo 5: Ejemplo de los análisis realizados para evaluar los efectos de la $[Mg^{+2}]$ en presencia de diferentes sales monovalentes, en este caso, glutamato de potasio 200 mM, sobre la actividad de RNasa III en el ARN bicatenario y ARN monocatenario, incluyendo los efectos sobre la plenitud de la digestión del ARN bicatenario y la integridad del ARN monocatenario

Se trató un microgramo de ambos productos de transcripción de ARN bicatenario y ARN monocatenario con RNasa III 20 nanomolar en la mezcla de reacción que contenía Tris-acetato 33 mM, pH 8, glutamato de potasio 200 mM (en lugar de acetato de potasio) y diferentes concentraciones de catión divalente que varían de 0 a 10 mM de acetato de magnesio.

Como se puede ver a partir de los resultados en la FIG. 6, el tratamiento con RNasa III es capaz de digerir eficazmente los contaminantes de ARN bicatenario mientras se mantiene la integridad del ARN monocatenario usando diferentes sales monovalentes, en este caso, glutamato de potasio en lugar de acetato de potasio. En el presente EJEMPLO 5, las reacciones óptimas incluyeron entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 mM de concentración final de acetato de magnesio, y más preferentemente, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 mM de concentración final de acetato de magnesio.

Ejemplo 6: Efecto de la RNasa III sobre la integridad del ARN monocatenario y el grado de digestión del ARN bicatenario usando Mg^{+2} 1 mM y diferentes concentraciones de glutamato de potasio

En las reacciones que contenían ambos productos de transcripción de ARN bicatenario y ARN monocatenario, se aumentó la concentración de glutamato de potasio en la reacción de 0 a 300 mM de concentración final. Cada reacción contenía RNasa III 20 nM, Tris-acetato 33 mM, acetato de magnesio 1 mM y cantidades variables de glutamato de potasio. Como se puede ver en la FIG. 7, la RNasa III presenta patrones de unión superiores y digestión del contaminante a concentraciones específicas de sal de glutamato de potasio. A esta concentración de acetato de magnesio, el ARN bicatenario pareció ser digerido aproximadamente por completo, y el ARN monocatenario no se digirió significativamente en todas las concentraciones de glutamato de potasio ensayadas.

Ejemplo 7: Efecto de los tratamientos con RNasa III de sustratos de ARN bicatenario o ARN monocatenario en reacciones separadas que comprenden 1 mM de concentración final de Mg^{+2} y concentraciones variables de acetato de potasio como sal monovalente

Se trataron sustratos de ARN bicatenario o un sustrato de ARN monocatenario en reacciones separadas con RNasa III en mezclas de reacción que contenían RNasa III 20 nM, Tris-acetato 33 mM, acetato de magnesio 1 mM y concentraciones finales variables de acetato de potasio de entre 0 y 300 mM.

Como se puede ver en la FIG. 8, a una concentración final de cationes de Mg^{2+} 1 mM, la RNasa III digirió eficazmente el sustrato de ARN bicatenario, pero no digirió el ARN monocatenario, a toda la concentración de acetato de potasio de entre 50 y 300 mM de concentración final. Al comparar resultados tales como los mostrados en esta FIG. 8 y la FIG. 7 anterior, los solicitantes concluyeron que, en general, se necesita un compuesto tal como una sal monovalente para mantener la fuerza iónica, pero, siempre que la concentración final sea suficiente (por ejemplo, de al menos aproximadamente 50 mM de concentración final), ni la identidad ni la concentración de sal monovalente afecta significativamente a la actividad de RNasa III en el ARN bicatenario o su especificidad por el ARN bicatenario. Esto fue sorprendente e inesperado a la vista de las publicaciones previas en la técnica que habían aconsejado que la concentración de sal monovalente era una variable importante de optimizar con el fin de afectar a la actividad y la especificidad de la RNasa III por el ARN bicatenario. Sin quedar ligados a teoría alguna, los presentes solicitantes creen que la función de la sal monovalente con respecto a la digestión con RNasa III es la de mantener una fuerza iónica suficiente para estabilizar el emparejamiento de bases de las regiones de ARN bicatenario del ARN, de forma que los ARN bicatenarios no se desnaturalicen durante el tratamiento con la RNasa III. Como se menciona en otra parte del presente documento, contrariamente a lo que se ha enseñado previamente en la técnica, los solicitantes descubrieron que la concentración final de cationes de magnesio divalentes es muy importante para la actividad y especificidad óptimas de la RNasa III por el ARN bicatenario, y que la concentración final de cationes de magnesio para la actividad óptima y especificidad del RNasa III hacia el ARN bicatenario es preferentemente de aproximadamente 1-4 mM, lo más preferentemente, de aproximadamente 2-3 mM, que es mucho más baja de lo que se había enseñado previamente en la técnica.

Ejemplo 8: Efecto del tratamiento con RNasa III sobre la integridad del ARN monocatenario y el grado de digestión del ARN bicatenario con cantidades crecientes de ARN bicatenario añadidas a la mezcla de reacción

La cantidad de ARN bicatenario que puede ser digerida en una incubación de 10 minutos a 37 °C con RNasa III 20 nM se aumentó secuencialmente de un microgramo (a una concentración de 20 ng/microlitro final) a 20 microgramos (400 ng/microlitro finales). La mezcla de reacción contenía Tris-acetato 33 mM, pH 8, KOAc 200 mM y acetato de magnesio 1 mM. A partir de los resultados de la FIG. 9, solo se pudieron digerir de 1 microgramo a 2 microgramos de ARN bicatenario en estas condiciones de reacción. Se usa un microgramo de ARN monocatenario en el procedimiento de tratamiento con RNasa III descrito en el presente documento para garantizar la digestión completa del ARN bicatenario evitando cualquier posibilidad de insuficiente RNasa III debido a una muestra particular que contenga niveles más altos de ARN bicatenario. Sin embargo, los expertos en la materia comprenderán que se puede usar menos RNasa III, y comprenderán que se podría hacer una valoración similar a la que se describe en el presente documento para determinar la cantidad de RNasa III necesaria para determinados tipos de muestras.

Ejemplo 9: Efecto de los tratamientos con RNasa III en presencia de diferentes niveles de cationes de magnesio divalentes sobre los niveles de traducción *in vivo* del ARNm codificante de luciferasa transfectado en fibroblastos BJ

Se trató ARNm de luciferasa de luciérnaga durante 20 minutos con RNasa III en una mezcla de reacción que contenía tampón a base de Tris-acetato 33 mM, pH 8, KOAc 200 mM y acetato de magnesio bien 2 mM o 10 mM. El ARNm tratado con RNasa III se limpió mediante extracción con fenol-cloroformo, precipitación usando acetato de amonio y lavado con etanol al 70 % (como en el procedimiento de limpieza rápida de ARN descrito en el presente documento), y se transfectó en fibroblastos humanos BJ en pocillos por triplicado. Dieciocho horas después de la transfección, las células se lisaron y se analizaron para determinar la cantidad de actividad de luciferasa producida. La cantidad de actividad de luciferasa (medida en unidades de luz relativa, ULR) se promedió para los ensayos duplicados de las muestras por triplicado (n = 6), y se normalizó por la cantidad de proteína del lisado celular.

Como se muestra en la FIG. 10, el ARNm de luciferasa que se trató con RNasa III usando cationes de magnesio divalentes 2 mM presentó una actividad de luciferasa medida mucho mayor (~9 veces) en comparación con el ARNm de luciferasa tratado con RNasa III usando cationes de magnesio divalentes 10 mM. Esto muestra además que la concentración de magnesio usada en la técnica durante aproximadamente 35 años no da lugar a una actividad biológica óptima del ARNm tratado con RNasa III. Aunque sorprendente e inesperado, este resultado coincide con otros hallazgos de los presentes inventores de que el uso de la RNasa III para tratar ARN monocatenario o ARNm no digirió contaminantes de ARN bicatenario de manera eficaz usando cationes de magnesio 10 mM, como se enseña en la técnica, como el uso de cationes de magnesio 1-4 mM. Aún más, los presentes inventores descubrieron que los cationes de magnesio 1-3 mM, y preferentemente aproximadamente 2 mM, son más eficaces para digerir los contaminantes de ARN bicatenario, mientras que no digieren significativamente el ARN monocatenario. En el EJEMPLO 10, se muestra la importancia fundamental de usar las bajas concentraciones descubiertas de cationes de magnesio para los tratamientos con RNasa III del ARN monocatenario o ARNm que se introduce de manera repetida o continua en células humanas o animales para inducir un efecto biológico o bioquímico. En el EJEMPLO 10, el efecto biológico es la reprogramación de células somáticas humanas a células madre pluripotentes inducidas.

Ejemplo 10: Efectos de los tratamientos con RNasa III usando diferentes niveles de Mg^{2+} en la capacidad del ARNm de cola de poli (A), cap1 sin modificar (-150 adenosinas) codificantes de factores de reprogramación de iPSC para reprogramar células somáticas a células madre pluripotentes inducidas ("iPSC") en ausencia de un inhibidor de las vías de respuesta inmune innata

En este EXAMPLE 10, se muestra que los ARNm codificantes de factores de reprogramación de iPSC, en los que dichos ARNm contienen únicamente nucleótidos no modificados (GAUC) y no contienen un nucleótido modificado que reduzca una respuesta inmune innata (a excepción del nucleótido con caperuza 5'-terminal que comprende 7-metilguanina y el penúltimo nucleótido 5' 2'-O-metilado al que se une el nucleósido con caperuza, que juntos comprenden la estructura de caperuza cap1) pueden usarse para reprogramar células somáticas de mamíferos sin necesidad de un inhibidor de la respuesta inmune innata tal como la proteína B18R, siempre que los ARNm se traten usando los procedimientos de tratamiento con RNasa III descritos en el presente documento. Por lo tanto, en este experimento, se usó una mezcla de factores de reprogramación de ARNm que comprendía ARNm no modificados codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y cMYC(T58A) en una proporción molar de 3:1:1:1:1:1, en los que los ARNm fueron tratados con RNasa III en presencia de acetato de potasio 200 mM como sal monovalente y acetato de magnesio 1, 2, 3, 4, 5 o 10 mM para evaluar la importancia de la concentración de cationes de magnesio divalentes en la etapa de tratamiento con RNasa III para la inducción de iPSC. En otro aspecto de este experimento, los ARNm se trataron con RNasa III en presencia de glutamato de potasio 200 mM para evaluar los efectos de esta sal monovalente en lugar de acetato de potasio, y 2 o bien 10 mM de acetato de magnesio para evaluar la importancia de la concentración de cationes de magnesio divalentes en la etapa de tratamiento con RNasa III para la inducción de iPSC.

Los procedimientos para usar las células alimentadoras y sembrar fibroblastos BJ en placas para la reprogramación

y para usar el reactivo de transfección TransIT™ (Mirus Bio) para la reprogramación fueron como se ha descrito anteriormente. En resumen, se sembraron $1,25 \times 10^5$ de fibroblastos sobre 5×10^5 de células alimentadoras NuFF. Las células se transfectaron diariamente durante 13 días con 1,2 microgramos de una mezcla de reprogramación de ARNm de 100 ng por microlitro que comprendía una proporción molar de 3:1:1:1:1 que contenía OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y cMYC(T58A). La transfección se realizó con 2,4 microlitros de cada refuerzo de Bio TransIT™ y reactivo de transfección TransIT™ de Mirus como se ha descrito previamente. El medio PLURITON™, con penicilina/estreptomicina x 1, suplemento de PLURITON™ x 1 y 0,5 U/ml de inhibidor de la RNasa SCRIPTGUARD™ se cambió diariamente antes de transfectar las células. El día 13, las células se fijaron, se inmunotifieron para el marcador fosfatasa alcalina de iPSC, y se contó el número de colonias de iPSC teñidas con fosfatasa alcalina para cada tratamiento.

Como se muestra en la siguiente Tabla 1, los números de células iPS positivas en fosfatasa alcalina inducidas en las células transfectadas una vez al día con ARNm que habían sido tratados con RNasa III en presencia de acetato de magnesio 1 o 2 mM fueron mucho más altos que en las células transfectadas una vez al día con los ARNm tratados con mayores concentraciones de acetato de magnesio. En particular, no se indujeron células positivas en fosfatasa alcalina en fibroblastos BJ que se transfectaron una vez al día con la mezcla de reprogramación de ARNm que comprendía ARNm que se habían tratado con RNasa III en presencia de acetato de magnesio 10 mM en presencia bien de acetato de potasio o de glutamato de potasio como sal monovalente.

TABLA 1

Capacidad de los ARNm tratados con RNasa III en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{2+} para generar iPSC positivas en fosfatasa alcalina tras transfecciones repetidas de fibroblastos BJ.		
Sal de potasio monovalente usada para el tratamiento con RNasa III	Concentración de $Mg(OAc)_2$ usada para el tratamiento con RNasa III	Número de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina el Día 13
Acetato	1 mM	110
Acetato	2 mM	70
Acetato	3 mM	3
Acetato	4 mM	3
Acetato	5 mM	2
Acetato	10 mM	0
Glutamato	2 mM	27
Glutamato	10 mM	0

Estos resultados demuestran que los procedimientos de tratamiento con RNasa III descritos en el presente documento, que comprenden el tratamiento de ARN transcrito *in vitro* con RNasa III en presencia de Mg^{2+} aproximadamente 1-4 mM, eliminaron el ARN bicatenario en una medida suficiente para permitir la reprogramación de los fibroblastos a iPSC tras transfecciones repetidas de células somáticas de fibroblastos BJ humanos con esta mezcla de reprogramación de ARNm que comprende 6 ARNm diferentes codificantes de diferentes factores de reprogramación proteicos. En la presencia de Mg^{2+} 1 o 2 mM, el tratamiento con RNasa III eliminó muy eficazmente el ARN bicatenario de una mezcla de reprogramación de ARNm de modo que la reprogramación de las células somáticas de fibroblastos BJ se reprogramó eficazmente a células desdiferenciadas o células madre pluripotentes inducidas positivas en fosfatasa alcalina. Por el contrario, una mezcla de reprogramación de ARNm que comprendía los mismos ARNm tratados usando Mg^{2+} 10 mM, la concentración recomendada por primera vez por Robertson y col. (Robertson H. D. y col., 1968) y que se cree que posteriormente fue usada como las condiciones convencionales de otros investigadores a partir de ese momento, no dio lugar a la reprogramación de las células somáticas de fibroblastos BJ a células desdiferenciadas o células madre pluripotentes inducidas positivas en fosfatasa alcalina en, por los demás, las mismas condiciones. Las diferencias de inmunotinción también se vieron respaldadas por las diferencias morfológicas observadas entre las células tratadas con Mg^{2+} 1-2 mM en comparación con 10 mM. Por ejemplo, los fibroblastos BJ transfectados diariamente con ARNm tratados con RNasa III en Mg^{2+} 2 mM presentaron colonias de iPSC, mientras que los fibroblastos BJ transfectados diariamente con ARNm tratados con RNasa III en Mg^{2+} 10 mM no presentaron una nueva morfología.

Los presentes investigadores creen que la reprogramación con éxito de células somáticas humanas o animales a células iPSC usando únicamente ARN monocatenario no modificado no se ha informado ni demostrado previamente. Sin quedar ligados a teoría alguna, se cree que otros no han tenido éxito en la reprogramación de células humanas o animales con ARN monocatenarios no modificados, porque no han reconocido la importancia de purificar o tratar el ARN monocatenario sintetizado *in vitro* con el fin de producir ARN monocatenarios, e incluso si alguien ha reconocido la importancia y los beneficios de fabricar ARN monocatenarios que estén al menos prácticamente libre de ARN bicatenario, no han entendido ni desarrollado un procedimiento para purificar o tratar suficientemente dichos ARN monocatenarios con el fin de hacerlos al menos prácticamente libres de ARN bicatenario, y más preferentemente, extremadamente libres o incluso absolutamente libres de ARN bicatenario. Por ejemplo, los

presentes investigadores han descubierto procedimientos sencillos, rápidos y eficaces para tratar los ARN monocatenarios con una RNasa específica del ARN bicatenario que dé lugar a ARN monocatenarios que estén al menos prácticamente libres de ARN bicatenario. Un ejemplo de dicha RNasa específica del ARN bicatenario que puede usarse para este fin es la RNasa III endorribonucleasa. Los presentes investigadores han descubierto también que, de forma sorprendente e inesperada, un procedimiento de uso de la RNasa III que se informó en la literatura para retirar el ARN bicatenario del ARN monocatenario con el fin de eliminar la actividad inhibidora del ARN bicatenario en la traducción *in vitro* no retiraba suficiente ARN bicatenario del ARN monocatenario para que los ARN monocatenarios tratados con ese procedimiento pudieran usarse para la traducción en células vivas o para la reprogramación de células vivas humanas o animales de un estado de diferenciación a otro estado de diferenciación (por ejemplo, para la reprogramación de células somáticas humanas o animales a células iPS). De hecho, los intentos de los presentes investigadores por usar ARN monocatenarios que se habían tratado con RNasa usando el procedimiento de la literatura para transfecciones repetidas para generar iPSC finalmente dieron lugar a la muerte de esas células. Aún más, no solo el procedimiento de uso de RNasa III para eliminar el ARN bicatenario para aplicaciones *in vitro* no funcionó para las aplicaciones *in vivo* (y dio lugar a la apoptosis de las células transfectadas con ARN monocatenarios tratados de esta manera), sino que el procedimiento también degradó los ARN monocatenarios que los investigadores deseaban traducir en las células vivas. En otras palabras, no solo es que el procedimiento de RNasa III de la literatura no lograra eliminar suficientemente el ARN bicatenario no deseado, sino que también destruyó una parte de los ARN monocatenarios deseados codificantes de las proteínas de interés. A continuación, los presentes investigadores trataron de modificar todas las condiciones de los autores del procedimiento de la RNasa III para crear ARN monocatenario para aplicaciones *in vitro*, pero desafortunadamente no sirvieron. Por lo tanto, aunque los autores del procedimiento existente sugerían que podría ser beneficioso aumentar la concentración de la sal monovalente en la reacción de RNasa III a una concentración que fuera más alta o más baja que la que sugerían, los presentes inventores lo intentaron sin éxito. También probaron varias sales monovalentes diferentes y variaron sus concentraciones, pero esto tampoco dio lugar a una eliminación suficiente del ARN bicatenario para los ARN monocatenarios que se usaban para reprogramar células vivas, no redujo suficientemente la toxicidad de los ARN monocatenarios, y aún así, dañó o destruyó al menos una parte de los ARN monocatenarios deseados. El cambio de otras variables sugeridas por los autores del procedimiento publicado tampoco logró el objetivo deseado. Sin quedar ligados a teoría alguna, los presentes investigadores creen que la dificultad se debió a los niveles extremadamente bajos de ARN bicatenario que pueden ser detectados por la respuesta inmune innata y otros sensores de ARN que están presentes en las células humanas y animales para proteger a esas células de la infección por virus de ARN bicatenario y otros patógenos. Por lo tanto, debido a la extrema sensibilidad de las células humanas o animales al ARN bicatenario que se introduce en esas células, un procedimiento que es adecuado para reducir el ARN bicatenario de los ARN monocatenarios para el uso del ARN monocatenario para aplicaciones *in vitro* no es suficiente para hacer que los ARN monocatenarios se introduzcan en células vivas humanas o animales. Aún más, la respuesta inmune innata y otros sensores de ARN (por ejemplo, receptores de tipo Toll, por ejemplo, TLR3, interferones, y otros sensores similares) se inducen a niveles superiores si los ARN bicatenarios se introducen en dichas células. En otras palabras, si los ARN monocatenarios que se introducen en células vivas humanas o animales contienen incluso una cantidad mínima de ARN bicatenario contaminante, ese ARN bicatenario induce a la respuesta inmune innata y otros sensores de ARN a responder, lo que puede causar toxicidad e inhibición de la síntesis de proteínas en dichas células. La respuesta inicial puede sensibilizar a las células para que sean aún más sensibles a las subsecuentes introducciones repetidas de los ARN monocatenarios en las células, provocando una mayor toxicidad e inhibición de la síntesis de proteínas (por ejemplo, Kalal M. y col. 2002; Stewart II, W. E. y col., 1972). Si se prolongan, estos efectos conducen a un aumento de la toxicidad y a la muerte celular. Por lo tanto, con respecto a ciertos procedimientos de la técnica anterior para reprogramar células somáticas humanas a células iPS, la respuesta inmune innata y otras respuestas de sensores de ARN se inducen cada vez que los ARN monocatenarios codificantes de los factores de reprogramación se introducen en las células. Por ejemplo, algunas de las moléculas que son inducidas y activadas por el ARN bicatenario son los interferones, que pueden inhibir la síntesis de proteínas, inducir citotoxicidad y, si se prolongan, producir la muerte celular.

Ejemplo 11. Reprogramación sin células alimentadoras de células somáticas humanas a células iPS en Matriz GFR MATRIGEL™ usando ARNm que contienen pseudouridina codificantes de factores de inducción de iPSC en ausencia de un inhibidor o agente que reduzca la expresión de una vía de respuesta inmune innata

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 11

En las realizaciones del EXAMPLE 11, cada ARN monocatenario que contiene pseudouridina sintetizado *in vitro* (es decir, sintetizado usando ψ TP en lugar de UTP en la reacción de IVT) que codifica un factor de inducción de iPSC [por ejemplo, OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cualquiera de los cMYC o cMYC(T58A)] u otros ARN monocatenarios que contienen pseudouridina transfectados junto con los factores de inducción de iPSC se trataron con RNasa III con Mg(OAc)₂ 1 mM antes de proteger con caperuza el y añadir cola al ARN monocatenario. En este EXAMPLE 11, las reacciones de tratamiento con RNasa III también contenían 0,8 U/microlitro de inhibidor de RNasa SCRIPTGUARD™ (CELLSCRIPT, INC.).

Reprogramación sin células alimentadoras de fibroblastos humanos a células iPSC usando factores de inducción de iPSC de ARNm monocatenario

Antes de su uso para la reprogramación, se sembraron fibroblastos BJ (ATCC) a 5×10^4 células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos recubiertas con 83 ng por pocillo de matriz de GFR MATRIGEL™ (BD Biosciences, San Jose, CA) en MEM avanzado (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con FBS al 10 % (Fisher) y GLUTAMAX™-I 2 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA), un medio esencial mínimo (MEM) útil para el crecimiento de fibroblastos.

Al día siguiente, se cambió el medio a un "Medio de reprogramación sin células alimentadoras" desarrollado por los presentes solicitantes. Este medio de reprogramación sin células alimentadoras se componía de medio de Eagle modificado por Dulbecco con mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12; (DMEM/F12; Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con reemplazo sérico KNOCK-OUT™ al 20 % (Invitrogen), GLUTAMAX™-I 2 mM (Invitrogen), solución de aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Invitrogen), 2 micromolar del inhibidor del factor de crecimiento transformante β (TGF β) STEMOLECULE™ SB431542 (Stemgent®, Cambridge, MA, EE.UU.), 0,5 micromolar del inhibidor de la vía de señalización de MEK STEMOLECULE™ PD0325901 (Stemgent) y/o 10 ng/ml de citocina de ratón recombinante, factor inhibidor de la leucemia (LIF o mLIF; Invitrogen, Carlsbad, CA) y 100 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante (FGF; Invitrogen) con antibióticos de penicilina-estreptomicina. En algunos experimentos, se usa una concentración menor o mayor de uno o más de estos inhibidores (por ejemplo, 1-20 micromolar del inhibidor de TGF β , 0,5-10 micromolar del inhibidor de la señalización de MEK y/o 5-50 ng/ml la citocina recombinante de ratón, factor inhibidor de la leucemia). Dado que algunas de las moléculas que se inhiben pueden ser introducidas por los reactivos o los medios usados (por ejemplo, TGF β en la MATRIGEL™ u otra matriz extracelular, las concentraciones de los inhibidores usados pueden variar en función de los reactivos y de los medios usados. En algunos experimentos, se omitió el inhibidor de TGF β , el inhibidor de la señalización de MEK y/o LIF del medio de reprogramación sin células alimentadoras. El medio de reprogramación sin células alimentadoras se cambió diariamente una hora antes de cada transfección con factores de reprogramación de ARNm. Las células se transfectaron diariamente durante 18 días consecutivos usando el kit de transfección de ARNm TRANSIT™ (Mirus Bio LLC, Madison, WI, EE. UU.) como se describe en la literatura del producto: En resumen, se diluyó una solución que comprendía una mezcla de todos los factores de reprogramación del ARNm con 250 microlitros de medio de suero reducido OPTI-MEM® I (Invitrogen, Carlsbad, CA), y luego se añadieron 2,4 microlitros de TRANSIT™ BOOST y se mezcló, seguidos de 2,4 microlitros del reactivo de transfección TRANSIT™. En algunas realizaciones, no se usó inhibidor de la expresión de una vía de respuesta inmune innata. En algunas otras realizaciones, se añadieron 132 ng de ARNm que contenía pseudouridina codificante de la proteína B18R a los factores de reprogramación que comprenden ARNm codificante de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC para la reprogramación de los fibroblastos BJ. Esta mezcla de transfección se aplicó gota a gota a las células. Las células se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % hasta la transfección del día siguiente. Después de 18 transfecciones, se cambió el medio a un "Medio de mantenimiento de iPSC" diferente que se componía de DMEM/F12 complementado con reemplazo de suero KNOCKOUT™ al 20 %, L-glutamina 1 mM, solución de aminoácidos no esenciales 0,1 mM y 100 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humanos recombinante (FGF) (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA) con antibióticos de penicilina-estreptomicina durante unos días más hasta que las colonias de iPSC fueron lo suficientemente grandes como para recogerlas manualmente.

En otro experimento para evaluar el efecto del uso de diferentes concentraciones del inhibidor de TGF β , STEMOLECULE™ SB431542, se llevó a cabo una reprogramación de los fibroblastos BJ como se ha descrito anteriormente, excepto que la concentración del inhibidor de TGF β STEMOLECULE™ SB431542 usada en el medio de reprogramación fue una concentración de 0, 1,2 o 4 micromolar, y, en este experimento, los fibroblastos BJ se transfectaron durante solo 17 días consecutivos en lugar de durante 18 días.

En otro experimento para evaluar el efecto del uso de diferentes concentraciones del inhibidor de MEK STEMOLECULE PD0325901™, la reprogramación de los fibroblastos BJ se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente con una concentración 2 micromolar del inhibidor de TGF β , y el inhibidor de MEK PD0325901 STEMOLECULE™ se usó en el medio de reprogramación a una concentración de 0, 0,5, 1, 2, 10 o 15 micromolar, y, en este experimento, los fibroblastos BJ se transfectaron durante solo 17 días consecutivos en lugar de durante 18 días.

Mantenimiento de colonias de iPSC generadas a partir de reprogramación de células somáticas humanas sin células alimentadoras usando factores de inducción de iPSC de ARNm monocatenario

Las colonias de iPSC resultantes de la reprogramación sin células alimentadoras se recogieron y se transfirieron manualmente a placas de 12 pocillos recubiertas con 42 ng por pocillo de matriz de GFR MATRIGEL™ (BD Biosciences) que contenía un medio compuesto de una mitad de medio mTESR®-1 (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) y una mitad del medio de mantenimiento de iPSC descrito anteriormente con inhibidor de la ROCK STEMOLECULE™ Y27632 10 micromolar (Stemgent), un inhibidor de moléculas pequeñas permeable a las células de quinasas asociadas a Rho. Las placas se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante la noche, tras lo que las colonias de iPSC se volvieron a recoger manualmente y se mantuvieron en medio mTESR (StemCell Technologies). A fin de que expandir los cultivos, se pasaron las colonias de iPSC en solución de dispasa (1 mg/ml) en medio DMEM/F12 (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) en placas recubiertas con matriz de GFR MATRIGEL™ de 6 pocillos (BD Biosciences); se incubaron las iPSC en la solución de dispasa durante 7 minutos a 37 °C y CO₂ al 5 %, se lavaron tres veces con 3 ml de medio DMEM/F12, se eliminaron en medio mTESR®-1 (StemCell Technologies) y se sembraron en pocillos de una placa recubierta con matriz de GFR MATRIGEL™ nueva (BD

Biosciences) a proporciones de división apropiadas.

Inmunocitoquímica de las colonias de iPSC

Se lavaron las células dos veces en solución tamponada con fosfato (PBS) x1 y se fijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS a temperatura ambiente durante media hora. Tras 3 lavados en PBS x1, las células se lavaron 3 veces en tampón de lavado (Triton-X100 al 0,1 % en PBS) y se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (Triton-X100 al 0,1 %, BSA al 1 %, FBS al 2 % en PBS). Se diluyeron los anticuerpos primarios a 1:1.000 en solución de bloqueo y se aplicaron a las células durante la noche a 4 °C. Las células se lavaron 6 veces en tampón de lavado, y se aplicaron los anticuerpos secundarios, diluidos a 1:1.000 en tampón de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente a oscuras. Tras 6 lavados con tampón de lavado, las células se lavaron dos veces en PBS x1 antes de la generación de imágenes.

Protocolo de diferenciación de las iPSC reprogramadas sin células alimentadoras a cardiomiocitos

Se disociaron colonias de células madre pluripotentes inducidas con TrypLE Select (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 5 minutos a 37 °C en CO₂ al 5 %. Se neutralizó TrypLE a una proporción de 1:1 con mTESR suplementado con inhibidor de ROCK Y27632 10 micromolar (Stemgent) y 25 microgramos/ml de gentamicina (Invitrogen, Carlsbad, CA), se centrifugó y se volvió a suspender en el mismo medio. Se sembraron las iPSC disociadas a 5 x 10⁶ células en matraces T25 de fijación ultrabaja (Corning Life Sciences, Lowell, MA) y se incubaron durante una noche a 37 °C en CO₂ al 5 %. Al día siguiente, los medios se intercambiaron a mTESR al 50 % y medio de transición de agregados al 50 %, DMEM GLUTAMAX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), FBS al 10 % (Fisher), 50 ng/ml de FGFb (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 25 microgramos/ml de gentamicina (Invitrogen, Carlsbad, CA), y los agregados se dividieron en 2 matraces T25 de fijación ultrabaja. Durante los 12 días siguientes, se alimentaron los agregados con medio de inducción cardíaca, DMEM GLUTAMAX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), FBS al 10 % (Fisher), 50 ng/ml de FGFb (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cuando los agregados comenzaron a latir, los medios se cambiaron a medios de mantenimiento cardíaco, DMEM bajo en glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), FBS al 10%, 25 microgramos/ml de gentamicina.

Resultados del EJEMPLO 11

Los fibroblastos BJ sembrados en matriz de GFR MATRIGEL™ se transfectaron diariamente durante 18 días consecutivos con factores de reprogramación de ARNm que contenían pseudouridina codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC o cMYC(T58A) en medio de reprogramación sin células alimentadoras. Los factores de reprogramación de ARN monocatenario se componían de ARNm que contenían pseudouridina preparados como se ha descrito anteriormente y en la literatura proporcionada con el sistema de producción de ARNm convencional mSCRIPT™ T7 (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.), excepto que la uridina-5'-trifosfato (UTP) se sustituyó por pseudouridina-5'-trifosfato (ΨTP) y, antes de la protección con caperuza o de la poliadenilación, los ARN transcritos *in vitro* se trataron usando el tratamiento con RNasa III como se describe en el presente documento con una concentración de 1 mM de acetato de Mg. No se usaron células alimentadoras. A menos que se indique específicamente lo contrario, no se usó proteína B18R ni otro inhibidor o agente que reduzca la expresión de una vía de respuesta inmune innata. Las células sobrevivieron y crecieron hasta la confluencia, y hacia el final del régimen de transfección, eran realmente demasiado confluentes. En los experimentos en los que se usaron ARNm que contenían pseudouridina codificantes del mutante cMYC(T58A) de la proteína cMYC, las colonias de iPSC comenzaron a aparecer alrededor del día 14, tras 15 transfecciones (Figura 11), contando como primer día de transfección el día 0. En los experimentos en los que se usaron ARNm codificantes de la versión larga de tipo silvestre de la proteína cMYC, las colonias de iPSC comenzaron a aparecer alrededor del día 16. En este experimento, las colonias de iPSC se obtuvieron solo cuando la proteína LIF o un inhibidor de TGFβ o MEK de molécula pequeña (por ejemplo, inhibidor de TGFβ SB431542 o inhibidor de MEK PD0325901) estaban presentes en el medio (FIG. 12). No se formaron colonias de iPSC en ausencia de estos inhibidores.

En otros experimentos de reprogramación de ARNm en los que se usó medio de reprogramación de ARNm PLURITON™ (Stemgent) en matriz de GFR MATRIGEL™ sin células alimentadoras, se observó la muerte celular masiva en la primera semana de transfecciones con los mismos factores de reprogramación de ARNm que contenían pseudouridina codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y la versión larga de tipo silvestre de cMYC; todos los fibroblastos BJ murieron en el medio PLURITON™, y no se observaron colonias de iPSC. Usando el ARNm que contiene pseudouridina codificante de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y mutante cMYC(T58A) en ausencia de las moléculas pequeñas, SB431542 (inhibidor de TGFβ), PD0325901 (inhibidor de MEK) y LIF (factor inhibidor de la leucemia), murió la mayoría de las células en el medio PLURITON™, pero un pequeño número de células supervivientes pudieron formar colonias de iPSC después de 18 transfecciones. Sin embargo, se generaron muchas menos colonias de iPSC a partir de fibroblastos BJ sin células alimentadoras en medio PLURITON™ de las que se generaron en los fibroblastos BJ sin células alimentadoras transfectados con los mismos factores de reprogramación de ARNm que contienen pseudouridina codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC (T58A) en el medio de reprogramación sin células alimentadoras suplementado con inhibidor de TGFβ SB431542, inhibidor de MEK PD0325901 y LIF, como se describe en el presente ejemplo (por ejemplo, véase la FIG.12).

Las colonias de iPSC que se formaron en matriz de GFR MATRIGEL™ en el medio de reprogramación sin células

alimentadoras y se desarrollaron como se describe en el presente ejemplo se tiñeron positivamente para una fosfatasa alcalina, característica de las colonias de iPSC (FIG. 12). Tras un par de días en el medio de mantenimiento de iPSC, las colonias de iPSC se recogieron manualmente, se sembraron en placas recubiertas con matriz de GFR MATRIGEL™ y se expandieron. Los cultivos de cada colonia crecieron y se pudieron expandir como se esperaba para las iPSC, necesitando pasarse cada 3 o 4 días mediante la división en solución de dispasa, y habiéndose mantenido en cultivo durante al menos 10 pasadas hasta la fecha. Las células de las colonias también se tiñeron positivamente para los marcadores de pluripotencia de iPSC: NANOG, TRA-1-60, SSEA4, OCT4 y SOX2 (por ejemplo, FIG. 13). Los resultados de inmunotinción mostrados en la FIG. 13 son de una estirpe de células iPSC establecida a partir de una colonia de iPSC seleccionada de un experimento de reprogramación para reprogramar fibroblastos BJ a células iPS, en la que se añadieron 132 ng de ARNm que contenía pseudouridina codificante de la proteína B18R a los factores de reprogramación que comprendían ARNm que contenían pseudouridina codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC. Otras estirpes de células iPSC inducidas en ausencia de ARNm codificante de la proteína B18R o usando otras condiciones descritas en el presente ejemplo también se tiñen positivamente para los marcadores de pluripotencia de iPSC.

Se determinó previamente que los fibroblastos BJ humanos a 1×10^4 tenían una densidad celular óptima por pocillo en una placa de 6 pocillos para el éxito de la inducción de iPSC sobre células alimentadoras. Los experimentos iniciales de reprogramación indicaron que una densidad celular de 1×10^4 de fibroblastos BJ por pocillo no fue suficiente para generar tantas colonias de iPSC a partir de la reprogramación sin células alimentadoras de los fibroblastos BJ en la matriz de GFR MATRIGEL™ como las generadas a partir de la reprogramación usando células alimentadoras. Sin embargo, la reprogramación sin células alimentadoras de mayores números de fibroblastos BJ a colonias de iPSC se logró cuando la densidad celular por pocillo de los fibroblastos BJ se aumentó hasta 5×10^4 células por pocillo en la matriz de GFR MATRIGEL™.

La siguiente Tabla 2 muestra el número de colonias de iPSC contadas el Día 18 cuando los fibroblastos BJ se transfectaron diariamente durante 18 días con la mezcla de ARNm que contenían pseudouridina codificantes de los cinco factores de inducción de iPSC: OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A), como se ha descrito anteriormente, y, además, con o sin ARNm que contenía pseudouridina codificante de la proteína B18R, y se sembraron a una densidad celular de 5×10^4 células por pocillo en la matriz de GFR MATRIGEL™ en el medio de reprogramación sin células alimentadoras de iPSC desarrollaron los presentes inventores como se ha descrito anteriormente, o a una densidad celular de 1×10^4 células sobre células alimentadoras de fibroblastos neonatales humanos en el medio de reprogramación sin células alimentadoras. El nuevo medio de reprogramación sin células alimentadoras de iPS usado para la reprogramación de las células sin células alimentadoras en la matriz de GFR MATRIGEL™ también contenía el inhibidor de TGFβ STEMOCULE™ SB431542, el inhibidor de MEK STEMOCULE™ PD0325901 y la proteína LIF como se ha descrito anteriormente.

Tabla 2. Reprogramación sin células alimentadoras de fibroblastos BJ a iPSC

Sustrato	ARNm que contiene pseudouridina codificante de proteína B18R usado	Número de colonias de iPSC observadas
Matriz MATRIGEL sin células alimentadoras	SÍ	72
Matriz MATRIGEL sin células alimentadoras	NO	102
Células alimentadoras de fibroblastos neonatales humanos	SÍ	81
Células alimentadoras de fibroblastos neonatales humanos	NO	76

La siguiente Tabla 3 muestra el número de colonias de iPSC contadas el Día 17 cuando los fibroblastos BJ se transfectaron diariamente durante 17 días con la mezcla de ARNm que contenían pseudouridina codificantes de los cinco factores de inducción de iPSC: OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A) en presencia de las concentraciones indicadas del inhibidor de TGFβ STEMOCULE™ SB431542 (Stemgent).

Tabla 3. Reprogramación sin células alimentadoras de fibroblastos BJ en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de TGFβ STEMOCULE™ SB431542 (Stemgent)

Concentración del inhibidor de TGFβ SB431542 (μM)	Colonias de iPSC observadas
0	0
1	9
2	71
4	160

La siguiente Tabla 4 muestra el número de colonias de iPSC contadas el Día 17 cuando los fibroblastos BJ se

transfectaron diariamente durante 17 días con la mezcla de ARNm que contenían pseudouridina codificantes de los cinco factores de inducción de iPSC: OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A) en presencia de 2 micromolar del inhibidor de TGFβ STEMOLECULE™ SB431542 (Stemgent) y las concentraciones indicadas del inhibidor de MEK STEMOLECULE™ PD0325901 (Stemgent).

5 **Tabla 4. Reprogramación sin células alimentadoras de fibroblastos BJ en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de MEK STEMOLECULE™ PD0325901 (Stemgent)**

Concentración de PD0325901 (μM)	Colonias de iPSC observadas
0	1
0,5	77
1	27
2	94
10	11
15	0

Diferenciación de las iPSC reprogramadas sin células alimentadoras a cardiomiocitos

10 Se diferenciaron células madre pluripotentes inducidas que se habían generado a partir de la reprogramación de fibroblastos BJ sin células alimentadoras usando factores de reprogramación OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC de ARNm que contenían pseudouridina codificantes de B18R en agregados pulsátiles de cardiomiocitos usando el protocolo de diferenciación de cardiomiocitos descrito en el apartado de Materiales y procedimientos del EJEMPLO 11. Los agregados de cardiomiocitos pulsátiles se observaron por primera vez tras 13 días. Se grabaron vídeos de los agregados de cardiomiocitos pulsátiles.

15 **Ejemplo 12. Estudios sobre variables que afectan a la eficacia de los ARNm codificantes de factores de inducción de iPSC para reprogramar fibroblastos BJ humanos a células iPS usando capas alimentadoras**

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 12

Procedimientos de uso de células alimentadoras y siembra en placas de fibroblastos BJ para reprogramar a iPSC con factores de inducción de iPSC de ARNm

20 Se realizaron células alimentadoras Nuff y la siembra de fibroblastos BJ como se describe en el apartado de Materiales y procedimientos generales. Los factores de reprogramación de ARNm codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y MYC (por ejemplo, bien c-MYC, c-MYC(T58A) o L-MYC) se prepararon en una proporción molar de 3:1:1:1:1 como ha descrito anteriormente. A menos que se indique lo contrario, los ARN monocatenarios se trataron con RNasa III usando el tratamiento con RNasa III descrito en el presente documento con acetato de magnesio 1 mM o 2 mM descrito en el presente documento.

25 **Protocolo de transfección de ARNm RNAiMAX™**

Se retiraron los medios de fibroblastos BJ de los fibroblastos BJ sembrados sobre células alimentadoras Nuff, y se añadieron a medios de reprogramación de ARNm PLURITON™ (Stemgent, Cambridge, MA) (medios base con suplemento y penicilina/estreptomicina) (2 ml), y se añadieron 4 microlitros de proteína recombinante B18R (EBiosciences, San Diego, CA) hasta una concentración final de 200 ng/ml. Las células se incubaron a 37 °C bajo CO₂ al 5 % durante 4 horas antes de transfectar el ARNm. Para transfectar los fibroblastos BJ con mezcla de ARNm 3:1:1:1:1 (OCT4, SOX2, KLF4, LIN28) y c-MYC(T58A) o cMYC, se añadieron 12 microlitros de la mezcla de ARN a 100 ng/μl (1,2 microgramos en total) a 48 microlitros de medio OptiMEM™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) en el tubo A. En algunos experimentos, también se añadió ARNm codificante de la proteína EGFP para formar una mezcla de ARNm 3:1:1:1:1:1 de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, c-MYC(T58A) y EGFP, y, en algunos experimentos, se varió la cantidad total de microgramos de la mezcla de ARNm usada para la transfección, como se indica para ese experimento. En el tubo B, se mezclaron 54 microlitros de medio OptiMEM con 6 microlitros de RNAiMAX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se usaron cinco microlitros de RNAiMAX™ por cada 1 microgramo de ARN total usado para una transfección. El tubo A se mezcló con el tubo B durante 15 minutos a temperatura ambiente, y luego la mezcla se añadió a los 2 ml de medio PLURITON ya en los fibroblastos BJ sembrado en Nuff. A menos que se indique lo contrario, el medio se cambió 4 horas después de cada transfección con RNAiMAX™ por nuevo medio PLURITON con o sin proteína B18R a 200 ng/ml, y se incubó durante la noche a 37 °C en CO₂ al 5 %. Al día siguiente, se preparó la mezcla de transfección de la misma manera que se ha descrito anteriormente, y se añadieron los complejos de ARNm/RNAiMAX™ al medio ya en cada pocillo sin cambiar el medio antes de añadir los complejos de ARNm/RNAiMAX™. Los medios se cambiaron de nuevo 4 horas después de las transfecciones, y se añadió proteína B18R a 200 ng/ml, y las células se incubaron durante la noche a 37 °C en CO₂ al 5 %. Se usó medio PLURITON acondicionado con Nuff para reemplazar el medio PLURITON el sexto día de las transfecciones. Estas transfecciones se repitieron todos los días al mismo tiempo para 16 transfecciones de ARNm adicionales para un total de 18 transfecciones de ARNm.

Sin embargo, en otros experimentos, como se indica en el apartado de RESULTADOS, el medio se cambió antes de cada transfección con las mezclas de ARNm codificantes de los factores de inducción de iPSC y, en algunos casos, con o sin ARNm codificantes de otras proteínas, o, en algunos experimentos, el medio no se modificó 4 horas después de las transfecciones con RNAiMAX™.

5 Protocolo de transferencia de ARNm TransIT™

Se retiraron los medios de fibroblastos BJ de los fibroblastos BJ sembrados sobre células alimentadoras Nuff, y se añadieron a medios de reprogramación de ARNm PLURITON™ (Stemgent, Cambridge, MA) (medios base con suplemento y penicilina/estreptomicina) (2 ml), y se añadieron 4 microlitros de proteína recombinante B18R (EBiosciences, San Diego, CA) hasta una concentración final de 200 ng/ml. Los medios se pueden cambiar inmediatamente antes de cada transfección con el reactivo de transfección de ARNm Mirus (Mirus Bio, Madison, WI). Para transfectar los fibroblastos BJ con mezcla de ARNm 3:1:1:1:1 (OCT4, SOX2, KLF4, LIN28) y c-MYC(T58A) o cMYC, se añadió la mezcla de ARNm (de 0,6 a 1,4 microgramos de ARNm total) a 120 microlitros de Opti-MEM [sin TransIT Boost™ (Mirus Bio), TransIT y el volumen de la mezcla de ARNm] luego se mezclaron el TransIT Boost (2 microlitros por microgramo de ARNm) y el reactivo de transfección de ARNm TransIT (2 microlitros por microgramo de ARNm) con el ARNm. Se incubó la mezcla de ARNm-TransIT durante 2 minutos, y luego se añadió a cada pocillo de fibroblastos BJ sobre Nuff alimentadoras en medio PLURITON. Al día siguiente, se cambiaron los medios PLURITON antes de transfectar la misma dosis de ARNm usando refuerzo de TransIT y el reactivo de transfección de ARNm TransIT. Se reemplazó el medio PLURITON acondicionado con Nuff por medio PLURITON el sexto día de las transfecciones. Se realizó un total de 18 transfecciones.

20 Protocolo de diferenciación espontánea de cuerpos embrioides

El protocolo de diferenciación espontánea de cuerpos embrioides se realizó como se ha descrito previamente (Huangfu y col., 2008), y como se resume en el apartado de Materiales y procedimientos generales.

Tinción de células vivas de colonias de iPSC con Tra-1-60

Se considera que TRA-1-60 es un marcador relativamente riguroso de células iPS completamente reprogramadas (Chan y col., 2009). Se realizó la obtención de imágenes de células vivas Tra-1-60 con el anticuerpo anti-Tra-1-60 humana de ratón StainAlive Dylight™ 488 (Stemgent) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Resultados del EJEMPLO 12

El tratamiento con RNasa III redujo el nivel de ARN bicatenario

Todos los ARN transcritos *in vitro* usados en estos experimentos se trataron con RNasa III para eliminar el ARN bicatenario antes a las reacciones de protección con caperuza y de adición de cola (FIG. 14). Los tratamientos con RNasa III de los ARNm de Ψ (o ARNm de Ψ y m⁵C), datos no mostrados) produjeron niveles no detectables de ARN bicatenario que fue reconocido por el anticuerpo monoclonal de ARN bicatenario J2 en experimentos de transferencia de puntos de ARN bicatenario, cuando se detectó menos de o igual a 1 microgramo de ARN sobre la membrana (por ejemplo, FIG. 14). Los presentes inventores creen que la eliminación de los contaminantes de ARN bicatenario de los presentes ARNm reduciría enormemente la toxicidad global y, por lo tanto, mejoraría la reprogramación al transfectar los ARNm durante hasta 18 días seguidos. Para reducir aún más cualquier posible reactividad de inmunidad innata hacia los presentes ARNm, también se incorporó pseudouridina (Ψ) en lugar de uridina convencional (y, en algunos de los presentes ARNm, también 5-metilcitosina (m⁵C) en lugar de citidina); los Doctores Kariko y Weissman y sus colaboradores (Kariko y col., 2005; Kariko y col., 2008; Kariko y Weissman, 2007) han demostrado que los ARNm que contienen estos nucleósidos no canónicos presentan respuestas inmunes celulares significativamente reducidas.

Inducción de iPSC a partir de fibroblastos BJ usando protocolos RNAiMAX™

Cuando se introdujo una proporción molar de 3:1:1:1:1 de ARNm con Ψ y m⁵C tratados con RNasa codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC o c-MYC T58A) en fibroblastos BJ (cultivados en células alimentadoras Nuff humanas irradiadas) usando el reactivo de transfección RNAiMAX™ cada día durante 18 días, la transformación de células mesenquimales a epiteliales se hizo evidente hacia el día 12 de las transfecciones, y se generaron colonias epiteliales fuertemente empaquetadas con altas proporciones de nucleares con respecto a citoplásmicas hacia el día 16 de las transfecciones. Los fibroblastos BJ que se transfectaron con dosis diarias totales de 1,2 microgramos de ARNm mostraron colonias positivas de Tra-1-60 el día 18, tanto para las células transfectadas con ARNm codificante de c-MYC como para las células transfectadas con ARNm codificante de la proteína mutante c-MYC(T58A) (FIG. 15).

La Tabla 5 muestra los números relativos de colonias de iPSC observadas que eran positivas en Tra-1-60 el día 18 de las transfecciones cuando se transfectaron fibroblastos BJ usando RNAiMAX™ con diferentes dosis de los ARNm tratados con RNasa III codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC, o c-MYC(T58A) que contenían nucleósidos modificados tanto con Ψ como con m⁵C.

Tabla 5. Inducción de iPSC a partir de fibroblastos BJ usando ARNm modificados con Ψ y m⁵C tratados con RNasa III codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC o c-MYC(T58A) complejados con RNAiMax™

Tratamiento	N.º de colonias de iPSC el Día 18 de la reprogramación (positivas en Tra-1-60)
Sin tratamiento	0
Transfección simulada	0
1,2 µg de 5 Factores (cMYC)	6
1,2 µg de 5 Factores (cMYC) (+ 200 ng/ml de B18R)	3
0,6 µg de 5 Factores (cMYC)	0
0,3 µg de 5 Factores (cMYC)	0
1,2 µg de 5 Factores (cMYC T58A)	38
1,2 µg de 5 Factores (cMYC T58A) (+ 200 ng/ml de B18R)	20
0,6 µg de 5 Factores (cMYC T58A)	3
0,3 µg de 5 Factores (cMYC T58A)	0

Las mezclas de ARNm con c-MYC(T58A) en lugar de c-MYC de tipo silvestre mostraron ~6 veces más colonias a la dosis de 1,2 microgramos de ARNm e incluso dieron lugar a colonias positivas en Tra-1-60 a la dosis de 0,6 microgramos. Las mezclas de transfección que contenían c-MYC de tipo silvestre no dieron lugar a ninguna colonia de iPSC a la dosis de 0,6 microgramos (Tabla 5). La adición de proteína recombinante B18R no ayudó a la eficiencia de la reprogramación en este experimento e incluso pareció ser perjudicial, ya que dio lugar a aproximadamente la mitad de las colonias de iPSC positivas en Tra-1-60 en comparación con los pocillos sin proteína B18R (Tabla 5).

Al repetir el protocolo de transfección con RNAiMAX™ con solo la proporción molar de 3:1:1:1:1 de ARNm modificados con Ψ y m⁵C tratados con RNasa III codificantes OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC, se volvió a ver una reducción del número de colonias que se asemejan morfológicamente a las colonias de iPSC generadas cuando se usó la proteína B18R (Tabla 6). Sin quedar ligados a teoría alguna, es posible que B18R no fuera beneficiosa en este experimento, porque los ARNm modificados con Ψ y m⁵C tratados con RNasa III no generaron una respuesta inmune innata sustancial.

Tabla 6. Inducción de iPSC a partir de fibroblastos BJ ± proteína B18R usando ARNm modificados con Ψ y m⁵C tratados con RNasa III codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC complejados con RNAiMax™

Cantidad de mezcla de ARNm usada para la transfección usando RNAiMAX™	Tratamiento adicional	N.º de colonias de iPSC (basado en la morfología celular)
Nada - Transfección simulada	Ninguno	0
1,2 µg de mezcla de ARNm	Ninguno	20
1,2 µg de mezcla de ARNm	+ proteína B18R	8
0,8 µg de mezcla de ARNm	Ninguno	5
0,8 µg de mezcla de ARNm	+ proteína B18R	3
0,6 µg de mezcla de ARNm	Ninguno	0

Colonias de iPSC a partir de fibroblastos BJ rediferenciados en las tres capas germinales

Se recogieron manualmente varias colonias del primer experimento de transfección con RNAiMAX™ (Tabla 5) y se sembraron en placas sobre nuevas capas alimentadoras Nuff en medios de iPSC con 100 ng/ml de hFGF2. Estas colonias se pasaron entre 5 y 10 veces antes de congelar algunas, y ensayar otras para determinar la expresión de marcadores de células madre como OCT4, NANOG, SOX2 (FIG. 16). Otros clones de iPSC se ensayaron para determinar su capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales como cabría esperar si estas colonias de iPSC fueran verdaderamente pluripotentes. Se pasaron 7 veces clones de iPSC diferentes creados a partir de fibroblastos BJ transfectados usando RNAiMAX™ con la proporción molar de 3:1:1:1:1 de ARNm modificados con Ψ y m⁵C tratados con RNasa III codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC a una dosis de 1,2 microgramos/ml al día durante 18 días, y se analizaron en ensayos de diferenciación espontánea de cuerpos embrioides (Huangfu y col., 2008). Tras 8 días de cultivo en suspensión seguidos de 8 días más de unión a placas recubiertas de gelatina, se diferenciaron los 3 clones en las tres capas germinales marcadas por marcadores de endodermo (AFP y SOX17), marcadores de mesodermo (SMA y Desmina) y marcador neuronal de ectodermo beta-tubulina de clase III) (FIG. 17A, B y C). Con el Clon 2 de iPSC, Se generaron miocitos cardíacos palpitantes en uno de los pocillos.

Inducción de iPSC a partir de fibroblastos BJ usando protocolos TransIT™

Experimentos de reprogramación de iPSC similares usando el reactivo de transfección de ARNm TransIT™ (Mirus Bio, Madison, WI, USA) dieron lugar a muchas más colonias de iPSC, y las colonias de iPSC aparecieron antes de lo que se obtuvieron usando el reactivo de transfección RNAiMAX™ (FIG. 18). Por ejemplo, se pudo ver la formación de colonias de iPSC en los pocillos transfectados diariamente con la dosis de 1,2 microgramos de la proporción molar 3:1:1:1 de ARNm modificados con Ψ y m⁵C tratados con RNasa III codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC tan pronto como el día de transfección 10.

Tabla 7. Inducción de iPSC a partir de fibroblastos BJ transfectados con ARNm modificados con Ψ o con Ψ y m⁵C tratados con RNasa III usando TransIT™

Número en la placa	Tratamiento	Número de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina el Día 15
1	Transfección simulada	0
2	1,2 μ g de ARNm con Ψ y m ⁵ C	321
3	1,0 μ g de ARNm con Ψ y m ⁵ C	125
4	0,8 μ g de ARNm con Ψ y m ⁵ C	13
5	0,6 μ g de ARNm con Ψ y m ⁵ C	0
6	0,4 μ g de ARNm con Ψ y m ⁵ C	0
7	Transfección simulada	0
8	1,2 μ g de ARNm con Ψ	49
9	1,0 μ g de ARNm con Ψ	168
10	0,8 μ g de ARNm con Ψ	8
11	0,6 μ g de ARNm con Ψ	4
12	0,4 μ g de ARNm con Ψ	0

La Tabla 7 muestra el número de colonias de iPSC generadas a partir de fibroblastos BJ humanos transfectados diariamente con cantidades de la proporción molar 3:1:1:1 de ARNm modificados con Ψ o con Ψ y m⁵C tratados con RNasa III codificantes de factores de inducción de iPSC (OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, cMYC), según lo indicado. Tras 15 días, las células se fijaron y se tiñeron para fosfatasa alcalina, un marcador de células madre.

Evaluación de la inducción de iPSC usando ARNm codificantes de diferentes combinaciones de factores de reprogramación

Basándose en el hallazgo de que el reactivo TransIT™ produjo un aumento impresionante del número de colonias de iPSC generadas a partir de fibroblastos BJ en comparación con el uso del reactivo RNAiMAX™, el reactivo TransIT™ se usó luego para evaluar diferentes combinaciones de factores de reprogramación.

Se descubrió que el uso de ARNm codificantes de los cuatro factores de inducción de iPSC (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC) que mostró la generación de iPSC según Takahashi y Yamanaka (2006) bastó para reprogramar fibroblastos BJ a colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina mediante la reprogramación del día 18. En estos experimentos, la inducción de colonias de iPSC usando ARNm modificados con Ψ y m⁵C codificantes de factores de inducción OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC no pareció ser más eficaz que la obtenida usando solo los ARNm modificados con Ψ codificantes de esas proteínas (FIG. 19).

Yu y col., (2007) demostraron que las células somáticas humanas podían reprogramarse sobreexpresando OCT4, SOX2, LIN28 y NANOG como factores de reprogramación usando sistemas lentivíricos. Posiblemente, cantidades más altas de los ARNm o más tratamientos con ARNm codificantes de estos factores podrían ser exitosos. Sin embargo, los presentes inventores no observaron ninguna colonia de iPSC positiva en fosfatasa alcalina mediante la reprogramación el día 18 usando las cantidades de ARNm tratado con RNasa III codificantes de solo los factores de inducción OCT4, SOX2, LIN28 y NANOG evaluados, bien estando esos ARNm solo modificados con Ψ o modificados con Ψ y m⁵C.

Nakagawa M. y col., (2010) mostraron que L-MYC, un miembro de la familia de los oncogenes MYC con menos actividad oncogénica que c-MYC, se podría usar en lugar de c-MYC para la inducción de iPSC. Los presentes inventores descubrieron que el ARNm modificado con Ψ o con Ψ y m⁵C tratado con RNasa III codificante de L-MYC también se pudo usar en lugar de c-MYC para la reprogramación a iPSC de fibroblastos BJ en diversas combinaciones de factores de inducción de iPSC de ARNm. Sin embargo, la eficiencia de la generación de colonias de iPSC usando los ARNm codificantes de L-MYC fue, en general, menor que cuando se usaron ARNm codificantes de c-MYC (Tabla 8 y FIG. 19 y FIG. 20).

Nakagawa M. y col., (2010) mostraron que las células humanas se pueden reprogramar a un estado pluripotente

mediante el uso de sistemas lentivíricos para sobreexpresar solo tres factores (OCT4, SOX2 y KLF4). Los presentes inventores no observaron la generación de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina mediante la reprogramación el día 18 usando las cantidades de ARNm tratado con RNasa III codificantes de solo los factores de inducción OCT4, SOX2 y KLF4 sin c-MYC o L-MYC, bien estando esos ARNm solo modificados con Ψ o modificados con Ψ y m⁵C (Tabla 8 y FIG. 19). Posiblemente, cantidades más altas de los ARNm o más tratamientos con ARNm codificantes de estos factores podrían ser exitosos.

Cuando se expresaron factores de reprogramación en células somáticas usando vectores episomales, otros descubrieron que la introducción de la expresión de 6 factores (OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, c-MYC y NANOG) produjo el nivel más alto de inducción de iPSC.

Los presentes inventores descubrieron que el ARNm modificado con Ψ o modificado con Ψ y m⁵C tratado con RNasa III codificante de los seis factores, Incluyendo NANOG, en general, dio lugar a un ligero aumento Del número de colonias positivas en fosfatasa alcalina (ALKP) en comparación con OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC sin NANOG (Tabla 8 y FIG. 19). En este experimento en particular, también observaron la formación de colonias de iPSC el día 10 cuando se incluyó el ARNm codificante de NANOG, en comparación con el día 11 o día 12 cuando no se incluyó el ARNm codificante de NANOG con los ARNm de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC.

Tabla 8. Inducción de iPSC de fibroblastos BJ por diferentes tipos y cantidades de ARNm de reprogramación

Numeración de la placa	Cantidad total, Identidad y modificación de los ARNm tratados con RNasa III usados para la transfección	Número de colonias positivas en fosfatasa alcalina el Día 17
Placa 5 (2 últimos pocillos)	Fibroblastos BJ sin tratar	0
Placa 1 (A1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, KLF4, LIN28, cMYC	108
Placa 1 (A1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, KLF4, LIN28, cMYC	278
Placa 1 (B1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ y m ⁵ C total codificante de OCT, SOX2, KLF4, LIN28, cMYC	85
Placa 1 (B1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ y m ⁵ C total codificante de OCT, SOX2, KLF4, LIN28, cMYC	268
Placa 1 (C1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC	36
Placa 1 (C1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC	34
Placa 2 (D1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ y m ⁵ C total codificante de OCT, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC	171
Placa 2 (D1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ y m ⁵ C total codificante de OCT, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC	107
Placa 2 (E1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, KLF4, cMYC	28
Placa 2 (E1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, KLF4, cMYC	87
Placa 2 (F1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ y m ⁵ C total codificante de OCT, SOX2, KLF4, cMYC	207
Placa 2 (F1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ y m ⁵ C total codificante de OCT, SOX2, KLF4, cMYC	255
Placa 3 (G1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, KLF4, L-MYC	0
Placa 3 (G1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, KLF4, L-MYC	3
Placa 3 (H1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ y m ⁵ C total codificante de OCT, SOX2, KLF4, L-MYC	44
Placa 3 (H1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ y m ⁵ C total codificante de OCT, SOX2, KLF4, L-MYC	17

(continuación)

Numeración de la placa	Cantidad total, Identidad y modificación de los ARNm tratados con RNasa III usados para la transfección	Número de colonias positivas en fosfatasa alcalina el Día 17
Placa 3 (11.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, Klf4	0
Placa 3 (11.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, Klf4	0
Placa 4 (J1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ y m5C total codificante de OCT, SOX2, Klf4	0
Placa 4 (J1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ y m5C total codificante de OCT, SOX2, Klf4	0
Placa 4 (K1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, Klf4, LIN28, cMYC, NANOG	97
Placa 4 (K1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, Klf4, LIN28, cMYC, NANOG	364
Placa 4 (L1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ y m5C total codificante de OCT, SOX2, Klf4, LIN28, cMYC, NANOG	150
Placa 4 (L1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ y m5C total codificante de OCT, SOX2, Klf4, LIN28, cMYC, NANOG	303
Placa 5 (M1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, LIN28, NANOG	0
Plate5 (M1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ total codificante de OCT, SOX2, LIN28, NANOG	0
Placa 5 (N1.2)	1,2 µg de ARNm con Ψ y m5C total codificante de OCT, SOX2, LIN28, NANOG	0
Placa 5 (N1.0)	1,0 µg de ARNm con Ψ y m5C total codificante de OCT, SOX2, LIN28, NANOG	0

Ejemplo 13. Reprogramación de fibroblastos BJ en células iPS usando ARNm modificados con ψ con cola de Poli-A y Cap1 tratados con RNasa III codificantes de los factores de reprogramación OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y cMYC

5 Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 13

Factores de reprogramación de ARNm

Se prepararon ARNm modificados con ψ con caperuza 5' Cap1 codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y cMYC con una cola de Poli(A) de aproximadamente 150 bases (con la longitud de la cola verificada mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante), y luego se mezclaron en una proporción molar de 3:1:1:1:1 como se ha descrito anteriormente. El tratamiento con RNasa III para eliminar el ARN bicatenario se realizó usando el ARN transcrito *in vitro* antes de la protección con caperuza y la formación de la cola en presencia de acetato de magnesio 1 mM.

Breve descripción del procedimiento de reprogramación

Se sembraron fibroblastos BJ (ATCC) en células alimentadoras irradiadas - células NUFF humanas (fibroblastos de prepucio de recién nacido; Globalstem) en medio PLURITON™ más suplemento (Stemgent) con antibióticos de penicilina/estreptomicina (pen/estrep), y se transfectaron diariamente durante 18 días con 800 ng de la mezcla de ARNm a 3:1:1:1:1 con reactivo de transfección e ARNm TransIT™ (2 microlitros por microgramo de ARN; Mirus Bio). El medio celular se cambió diariamente, 1 hora antes de la transfección, con inhibidor de RNasa SCRIPTGUARD™ (0,4 U/ml; CELLSCRIPT) añadido al medio antes de la transfección. Las células de cada pocillo de cultivo se dividieron de 1 a 3, y se transfirieron a 3 pocillos de réplica el día 8 después de la novena transfección.

Descripción detallada del procedimiento de reprogramación

Se sembraron células NuFF inactivadas mitóticamente de 9 pasadas a $2,5 \times 10^5$ (GlobalStem) en placas de 6 pocillos recubiertas con gelatina, en medios NuFF (DMEM) [Life Technologies], suero bovino fetal al 10 % (FBS, Thermo Fisher), GLUTAMAX x1 (Life Technologies) y penicilina/estreptomicina x1 (Life Technologies). Veinticuatro horas después, se retiraron los medios y se sembraron 10^4 fibroblastos BJ (ATCC) por pocillo en las células alimentadoras NuFF en medio de fibroblastos, (EMEM[ATCC] complementado con FBS al 10 % y pen/estrep x1).

El medio de reprogramación PLURITON™ (Stemgent), con suplemento de PLU-RITON™ x1 recién añadido y

pen/estrep x1, se cambió diariamente una hora antes de las transfecciones del ARNm. Se añadió inhibidor de la RNasa SCRIPTGUARD™ a los medios de reprogramación PLURITON™ (y los medios de reprogramación PLURITON™ acondicionados con NuFF descritos a continuación) hasta una concentración final de 0,4 U/ml. El medio se añadió luego a las células diariamente, 1 hora o menos antes de las transfecciones.

- 5 Las células se transfectaron durante 18 días consecutivos usando el kit de transfección de ARNm TransIT® (Mirus Bio). Se diluyeron 800 ng de mezcla de ARNm de reprogramación en 250 microlitros de Opti-MEM I (Life Technologies) y se añadieron 1,6 microlitros de TransIT BOOST™. se mezclaron los componentes de la reacción, luego se añadieron 1,6 microlitros del reactivo de transfección TransIT y se mezclaron los componentes de la reacción. Tras 2-5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se aplicó la mezcla de transfección gota a gota a las células. Las células se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante la noche. Tras 6 transfecciones diarias en medio PLURITON™, se cambió el medio a medios de reprogramación PLURITON™ acondicionados con NuFF. Este medio basado en PLURITON™ se había incubado previamente en células alimentadoras NuFF durante 24 horas, regido y almacenado congelado hasta su uso. Cuando fue necesario, el medio acondicionado se descongeló, se filtró y se añadieron PLURITON™ y antibióticos nuevos, diariamente. Tras la última de las 18 transfecciones diarias, las células se tiñeron en vivo con un anticuerpo contra TRA-1-60, para confirmar la producción de colonia de iPSC.

Procedimientos de inmunotinción *in vivo*

- Se diluyó, en condiciones estériles, un anticuerpo anti TRA-1-60 (anticuerpo anti TRA-1-60 humana StainAlive™ DyLight™ 488; Stemgent) a 1:100 en medio PLURITON™. El día 18 del protocolo de reprogramación, se retiró el medio y se incubaron las células en medio que contenía TRA-1-60 durante 30 minutos a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se lavaron las células dos veces con medio PLURITON™ para eliminar el anticuerpo no unido y se mantuvieron las células en medio nuevo de reprogramación durante la generación de imágenes inmunofluorescentes. Este anticuerpo permite la tinción de las células vivas, en lugar de fijar las células y sacrificarlas para la generación de imágenes. Basándose en la morfología y la tinción del anticuerpo TRA-1-60, se generaron cientos de colonias de iPSC por pocillo de fibroblastos BJ transfectados con ARNm modificado con pseudouridina que se había tratado con RNasa III, pero solo se observaron 2 colonias de iPSC con el ARNm que contenía pseudouridina y 5-metilcitidina con modificación doble que se había tratado con RNasa III. Tras confirmar las colonias de células iPSC según su morfología y tinción de TRA-1-60, el día 19 se recogieron y se sembraron sobre células alimentadoras NuFF nuevas en medio acondicionado NuFF.

Selección de colonias de iPSC reprogramadas

- 30 Las colonias de iPSC se recogieron manualmente de placas de reprogramación y se expandieron para una caracterización adicional. En la recogida manual, las colonias se diseccionaron con una pipeta, se retiraron físicamente de la placa de reprogramación, y los fragmentos se volvieron a sembrar en placas de células alimentadoras NuFF nuevas con inhibidor de ROCK Y27632 10 uM (Stemgent) en medio NuFF acondicionado. Las células se expandieron y se dividieron al alcanzarse una confluencia del 60-70 % con colagenasa IV como se ha descrito a continuación.

Mantenimiento de iPSC

- Se expandieron cultivos de células madre pluripotentes inducidas y mantuvieron sobre placas de 6 pocillos MATRIGEL™ dependientes de células alimentadoras o sin ellas. En el cultivo de iPSC dependiente de células alimentadoras, las células se mantuvieron bien sobre fibroblastos neonatales humanos irradiados (GlobalStem) o sobre fibroblastos de ratón embrionarios irradiados (R&D Systems) sembrados a 2,5 x 10⁵ células por pocillo. Las colonias de iPSC sobre las placas de células alimentadoras se mantuvieron en medio de mantenimiento de iPSC, DMEM/F12 complementado con reemplazo sérico knockout al 20 %, L-glutamina 1 mM, solución de aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 10 ng/ml de FGF recombinante humano básico (todos de Invitrogen) con antibióticos de penicilina-estreptomicina. El medio se cambió diariamente. Los cultivos se dividieron cuando la población celular creció hasta aproximadamente del 60 % al 70 % de confluencia usando colagenasa IV como se descrito más adelante.

- En el cultivo exento de células alimentadoras de iPSC, las colonias se mantuvieron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos recubiertas con 83 ng por pocillo de MATRIGEL™ (BD Biosciences). Las colonias de las placas de MATRIGEL™ se mantuvieron en medios de mTESR (STEMCELL Technologies) que se cambiaron diariamente. los cultivos se dividieron cuando la población celular creció hasta aproximadamente del 60 % al 70 % de confluencia usando dispasa como se describe a continuación.

División de iPSC

- Para los cultivos mantenidos sobre células alimentadoras, el día anterior a la división, se sembraron placas recubiertas de gelatina al 0,1 % con células alimentadoras, fibroblastos neonatales humanos irradiados (GlobalStem) o fibroblastos de ratón embrionarios irradiados (R&D Systems) a 2,5 x 10⁵ células por pocillo. Las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) x1, y se aplicó 1 ml de una solución de colagenasa de tipo IV a 1 mg/ml en DMEM/F12 (Invitrogen). Las colonias de iPSC se incubaron en colagenasa IV en 37 °C y CO₂ al 5 % durante de 8 a 10 minutos hasta que los bordes de las colonias comenzaron a elevarse. Se lavaron las colonias

suavemente 3 veces con de 2 a 3 ml de DMEM/F12, y se retiraron y rompieron en medio de mantenimiento de iPSC, DMEM/F12 complementado con reemplazo sérico knockout al 20 %, L-glutamina 1 mM, solución de aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 10 ng/ml de FGF recombinante humano básico (todos de Invitrogen) con antibióticos de penicilina-estreptomicina, en volúmenes para alcanzar las proporciones de división apropiadas. Los cultivos divididos se sembraron en placas nuevas previamente sembradas con células alimentadoras en medio de mantenimiento de iPSC.

Para el mantenimiento sin células alimentadoras de los cultivos de iPSC, se recubrieron placas de cultivo tisular de 6 pocillos con 83 ng por pocillo de MATRIGEL (BD Biosciences) a temperatura ambiente al menos una hora antes del uso. En las pasadas de los cultivos de iPSC, se retiró el medio y se reemplazó con 1 ml de una solución de dispasa a 1 mg/ml en DMEM/F12 (STEMCELL Technologies). Se incubaron los cultivos a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 8 a 10 minutos hasta que los bordes de las colonias comenzaron a elevarse. Se lavaron suavemente las colonias de iPSC 3 veces con de 2 a 3 ml de DMEM/F12, y se extrajeron y se rompieron en medios nuevos, mTESR™ (Tecnologías STEMCELL) antes de sembrarlas en una nueva placa de MATRIGEL.

El día 28, después de 10 días de cultivo, tras recoger las colonias el día 19 y una posterior pasada de colagenasa de las células, algunas de las células se fijaron e inmunotifieron.

Procedimientos de inmunotinción de iPSC

Se lavaron colonias de iPSC dos veces en solución tamponada con fosfato (PBS) x 1 y se fijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS a temperatura ambiente durante media hora. Tras 3 lavados en PBS x1, las células se lavaron 3 veces en tampón de lavado, (PBS con Triton-X100 al 0,1 %) y se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo, Triton-X100 al 0,1 %, BSA al 1 %, FBS al 2 % en PBS. Se diluyeron los anticuerpos primarios a 1:500 en solución de bloqueo y se aplicaron a las células durante la noche a 4 °C. Las células se lavaron 6 veces en tampón de lavado. Se diluyeron los anticuerpos secundarios a 1:1.000 en tampón de bloqueo, se aplicaron durante 2 horas a temperatura ambiente a oscuras. Tras 6 lavados con tampón de lavado, las células se lavaron dos veces en PBS x1 antes de la generación de imágenes. Las imágenes se muestran en la FIG. 13, FIG. 15, FIG. 16, FIG. 17, FIG 22, FIG. 31 y FIG. 26.

Anticuerpos primarios usados:

Anticuerpo de conejo Oct4 (Santa Cruz Biotechnology)
Anticuerpo de ratón Tra-1-60 (Cell Signaling Technology)
Anticuerpo de ratón Lin28 (Cell Signaling Technology)
Anticuerpo de conejo NANOG (Cell Signaling Technology)
Anticuerpo de ratón SSEA4 (Cell Signaling Technology)

Anticuerpos secundarios usados:

Anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Life Technologies)
Anticuerpo anti-ratón Alexa Fluor® 555 (Molecular Probes, Life Technologies)

Diferenciación en cardiomiocitos

Algunas colonias de iPSC se diferenciaron en cardiomiocitos como se ha descrito en el EJEMPLO 11.

Resultados del EJEMPLO 13

El día 18, había >> 100 colonias de iPSC presentes en cada uno de 3 pocillos de réplica de fibroblastos BJ que se habían transfectado con 18 dosis diarias de 800 ng de la mezcla molar de 3:1:1:1:1 de RNasa III, ARNm modificado con pseudouridina codificante de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y cMYC. Las colonias de iPSC eran demasiado numerosas para contarlas, y algunas de las colonias de iPSC ya empezaban a diferenciarse en otros tipos de células hacia el día 18. (100 colonias de iPSC representarían una eficiencia de ~ 1 % de la inducción de iPSC).

Las colonias de iPSC presentaron morfología de colonia iPSC (FIG. 21).

Las colonias vivas de iPSC se tiñeron positivamente para el marcador de células madre Tra-1-60 (FIG. 22).

Uno de los 3 pocillos también se trató con proteína B18R de la transfección n.º 10 a n.º 18, pero no se observó ningún beneficio en que este pocillo tuviera un número de colonias de iPSC similar al del pocillo que no recibió la proteína B18R.

Se recogieron más de 50 colonias de iPSC el día 19. Algunas colonias de iPSC se trataron con colagenasa y se transfirieron; las colonias restantes se transfirieron a nuevas células alimentadoras el día 21.

De las colonias de iPSC que se cultivaron, > 90 % sobrevivieron y se cultivaron durante más de 10 pasadas.

Algunas de las colonias de iPSC se fijaron e inmunotifieron positivamente para marcadores de células madre el día 28, 10 días de cultivo de iPSC después de la última transfección (FIG. 23).

Algunas de las colonias de iPSC se propagaron y se diferenciaron en cardiomiocitos pulsátiles.

Ejemplo 14. Experimentos adicionales sobre la reprogramación de fibroblastos BJ a iPSC y caracterización adicional de las colonias de iPSC

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 14

Breve descripción del procedimiento de reprogramación

Los factores de reprogramación de iPSC que se prepararon se componían de ARNm modificados con ψ protegidos con caperuza en 5' cap1 codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y cMYC con una cola de Poli(A) de aproximadamente 150 bases (con la longitud de la cola verificada mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante), y luego se mezclaron en una proporción molar de 3:1:1:1:1:1 como se ha descrito anteriormente. El tratamiento con RNasa III para eliminar el ARN bicatenario se realizó usando el ARN transcrito *in vitro* antes de la protección con caperuza y la formación de la cola en presencia de acetato de magnesio 1 mM. Los fibroblastos BJ (ATCC) se reprogramaron usando los factores de reprogramación de iPSC en un procedimiento de reprogramación similar al descrito en el EJEMPLO 13, excepto que los fibroblastos BJ se transfectaron diariamente durante 18 días con un microgramo (en lugar de 800 ng) del reactivo de transfección de ARNm trans-IT[™] con mezcla de ARNm a 3:1:1:1:1 (2 microlitros por microgramo de ARNm; Mirus Bio). Algunos fibroblastos BJ de este EJEMPLO 14 se trataron previamente con proteína recombinante B18R (eBioscience) antes de tratarlos con los factores de reprogramación de ARNm, en cuyos casos, la solución de proteína B18R se añadió al medio de reprogramación varias horas antes de añadir los factores de reprogramación de ARNm. Algunas de las colonias de iPSC también se transfirieron a una matriz extracelular artificial (MATRIGEL[™]) para la propagación con el fin de propagar las iPSC en ausencia de células alimentadoras. Las iPSC propagadas en matriz MATRIGEL se usaron para el aislamiento y la purificación de ARNm de las iPSC para el análisis de la expresión génica por qRT-PCR sin aislar también el ARNm contaminante de células alimentadoras. Para el cultivo sin células alimentadoras, se mantuvieron las colonias de iPSC en placas de 6 pocillos recubiertas con matriz MATRIGEL[™] calificada como hES (BD Biosciences). La matriz MATRIGEL se descongeló en hielo, se diluyó en medios DMEM/F12 y las placas se recubrieron durante una hora a temperatura ambiente antes de su uso. Las colonias de iPSC en placas recubiertas con MATRIGEL se mantuvieron en medio mTESR (STEMCELL Technologies) que se cambió diariamente. Los cultivos se dividieron cuando la población celular creció hasta aproximadamente del 60 % al 70 % de confluencia como se describe a continuación. En las pasadas de los cultivos de iPSC, el medio se retiró y se reemplazó por 1 ml de una solución de dispasa a 1 mg/ml en medio DMEM/F12. (STEMCELL Technologies). Los cultivos se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 8 a 10 minutos hasta que los bordes de las colonias comenzaron a levantarse. Las colonias se lavaron suavemente 3 veces con de 2 a 3 ml de DMEM/F12, y se retiraron y se rompieron en medio mTESR nuevo (STEMCELL Technologies) antes de sembrarlas en una nueva placa recubierta con MATRIGEL. El mTeSR se suplementó con inhibidor de ROCK Y27632 10 uM (Stemgent). Las placas se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante la noche. Los cultivos se mantuvieron en mTESR para la expansión y la purificación del ARN para experimentos de qRT-PCR como se describe a continuación.

Descripción detallada del procedimiento de reprogramación del EJEMPLO 14.

Se reprogramaron fibroblastos BJ a iPSC usando los materiales, procedimientos y protocolos presentados a continuación.

Materiales para la reprogramación de fibroblastos BJ a iPSC

- Medios de reprogramación PLURITON[™] (Stemgent, n.º de cat. 00-0070)
- DMEM, rico en glucosa (GIBCO, n.º de cat. 11965-092, Life Technologies)
- EMEM (ATCC, n.º de cat. 302003)
- Suero bovino fetal definido (Hyclone n.º de cat. SH30070.03, Thermo)
- GLUTAMAX[™]-1 (GIBCO, n.º de cat. 35050-061, Life Technologies)
- 10000 UI de Penicilina/ Estreptomicina 10.000 microgramos (x200) (MP Biomedicals, n.º de cat. 1670249, Thermo)
- Medio sérico reducido OPTI-MEM[®] I x1 (Invitrogen, n.º de cat. 11058-021)
- Fibroblastos de prepucio humano neonatal (NuFF), P9, IRR (GlobalStem n.º de cat. GSC-3001G) - pasada 9, irradiado
- Fibroblastos BJ humanos de recién nacido (ATCC, n.º de cat. CRL-2522)
- Proteína recombinante B18R sin vehículo (eBioscience n.º de cat. 34-8185-85)
- Factor de crecimiento básico de fibroblastos humanos recombinante (FGFb) (AA 10-155) (GIBCO, n.º de cat. PHG0023, Life Technologies)
- Kit de transfección de ARNm TransIT[®] (Mirus Bio, n.º de cat. 2256)
- Agua UltraPure con gelatina al 0,1 % (Millipore, n.º de cat. ES-006-B)
- Tripsina al 0,025 %, EDTA al 0,02 % para células primarias (GIBCO, n.º de cat. R-001-100, Life Technologies)

- Solución neutralizante de tripsina (GIBCO, n.º de cat. R-002-100, Life Technologies)

Composición de los medios

- Medio de cultivo de NuFF - DMEM rico en glucosa, FBS definido al 10 %, GlutaMAX-1 x1, Pen/Estrep x1
- Medio de fibroblastos BJ- EMEM, FBS definido al 10 %, Pen/Estrep x1
- 5 • Medio de reprogramación PLURITON™ - Medio Pluriton, Suplemento de Pluriton x1, Pen/Estrep x1
- Medio de reprogramación PLURITON™, acondicionado con NuFF - 25 ml de medio de reprogramación Pluriton (anterior) recogido tras 24 horas sobre células NuFF a 4×10^6 , recogido diariamente, combinado, filtrado en condiciones estériles y almacenado en alícuotas congeladas.

Composición de la solución

- 10 • FGFb - se diluye hasta 4 microgramos/ml y 50 microgramos/ml de reservas de trabajo en PBS con BSA al 0,1 %
- Colagenasa: se compone 1 mg/ml en medio DMEM/F12.

Preparación

- Se descongela el suplemento Pluriton a 4 °C, y se extrae en alícuotas y se congele a -70 °C.
- Se descongelan los medios Pluriton a 4 °C durante 2 días.
- 15 • Se descongelan a 4 °C y se forman alícuotas de proteína B18R, se almacenan a -70 °C.
- Se cubren los matraces con gelatina 4+ horas antes de que sean necesarios para las células NuFF.
- Se siembran 4×10^6 células NuFF por matraz T75 en 25 ml de medios - para medios acondicionados (tarda 7 días).
- Se recubren las placas de 6 pocillos con gelatina durante 4+ horas antes de que se necesiten para las células NuFF.
- 20 • Se siembran NuFF en placas de 6 pocillos para la reprogramación (día -2).
- Se siembran fibroblastos BJ a 10^4 células por pocillo de placa de 6 pocillos.
- Se transcribe, se protege con caperuza, se añade la cola y se cuantifica el ARN.
- Se mezcla ARNm de KLMOS a una proporción molar de 1:1:1:3:1 en agua estéril.
- 25 • Se renuevan los medios Pluriton diariamente añadiendo suplemento y Pen/Estrep x1.

Generación de medio Pluriton acondicionado con NuFF (empieza el día -2)

1. Se añaden 8 ml de solución de gelatina al 0,1 % a un matraz de cultivo de tejidos T75.
2. Se incuba el matraz al menos 4 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %.
3. Se siembran fibroblastos de prepucio humano de recién nacido inactivados en placa (NuFF) a una densidad de 4×10^6 células en 25 ml de medio de cultivo NuFF en un matraz T75.
- 30 4. Se incuban las células NuFF durante la noche a 37 °C y CO₂ al 5 %.
5. Al día siguiente, se aspira el medio de cultivo NuFF del matraz y se desecha.
6. Se añaden 10 ml de PBS para lavar. Se aspira el PBS y se desecha.
- 35 7. Se añaden 25 ml de medio Pluriton suplementado con 25 microlitros de solución básica de FGF a 4 microgramos/ml y 125 microlitros de penicilina/estreptomicina x200 a las NuFF en el matraz T75.
8. Se incuban las células y el medio durante una noche a 37 °C en CO₂ al 5 %.
9. Después de 24 horas, se recoge el medio acondicionado con NuFF y se almacena a -20 °C.
10. Se añaden 25 ml de medio Pluriton nuevo suplementado con 25 microlitros de solución de FGFb y 125 microlitros de penicilina/estreptomicina a las NuFF en el matraz T75.
- 40 11. Se incuban durante la noche a 37 °C y CO₂ al 5 %.
12. Se repiten las etapas 7 a 9 diariamente durante cinco días más. Se combinan en un bote estéril de tapa naranja y se mantienen a -20 °C hasta la recogida final. **Nota:** Seis días de recogida de medio darán un total de ~150 ml de medio Pluriton acondicionado con NuFF.
- 45 13. Se descongelan todas las alícuotas congeladas de medio Pluriton acondicionado con NuFF a 4 °C.
14. Se combinan las alícuotas y se esterilizan por filtración usando un filtro de baja unión proteica con un tamaño de poro de 0,22 µm.
15. Se recogen alícuotas de 20-40 ml del medio Pluriton acondicionado con NuFF filtrado en tubos cónicos de 50 ml.
- 50 16. Se almacenan las alícuotas a -20 °C hasta que se necesiten en los días 6 a 20 de la reprogramación.

Antes de usar el medio Pluriton acondicionado con NuFF:

1. Se descongela una alícuota de medio Pluriton acondicionado con NuFF y una alícuota suplemento Pluriton x2500 a 4 °C.
2. Justo antes de su uso, se añaden 4 microlitros del Suplemento Pluriton x2500 a 10 ml de medio Pluriton acondicionado con NuFF equilibrado.
- 55

Orden de la reprogramación

	Día menos 2	Placas recubiertas de gelatina: se incuban durante 4 horas a 37 °C. Se siembran células NuFF. (También se siembran células NuFF para preparar un medio acondicionado).
5	Día menos 1	se siembran células BJ sobre células NuFF. (Se cambia el medio en los matraces de NuFF para el medio acondicionado).
	Día 0-5	Se cambia el medio a nuevo medio de reprogramación Pluriton. Se transfectan las células y se recoge el medio acondicionado de los matraces para su uso del día 6 al día 17.
10	Día 6-17	Se cambian los medios a medio de reprogramación Pluriton acondicionado con NuFF nuevo. Se transfectan las células.
	Día 18	Se examinan las células y se identifican las colonias. Se recubren nuevas placas con gelatina y se siembran células alimentadoras NuFF.
	Día 19+	Se recogen las colonias y se transfieren sobre células alimentadoras NuFF nuevas.
15	~ Día 18-22	Se cambian los medios a medios de iPSC. Las células se pueden fijar, teñir, Cubrir con colagenasa en nuevas placas o MEF o células alimentadoras NuFF, Se siembran en MATRIGEL™ y los medios se pueden cambiar a una serie de medios de células ES o iPS.

Protocolo etapa a etapa usado para la reprogramación de fibroblastos humanos a iPSC:

20 Siembra de células alimentadoras NuFF humanas (Día -2)

1. Se añade 1 ml de gelatina al 0,1 % en 6 pocillos de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos.
2. Se incuba la placa al menos 4 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %.
3. Se descongela un vial (4-5 x 10⁶ células) de fibroblastos de prepucio neonatales humanos inactivados mitóticamente (NuFF) y se siembran a una densidad de 2,5 a 5 x 10⁵ células por pocillo en medio de cultivo NuFF en los 6 pocillos de la placa de 6 pocillos recubierta con gelatina.
4. Se incuban las células durante la noche a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Siembra de fibroblastos BJ en la capa de células alimentadoras (día -1)

1. Se aspira el medio de cultivo de NuFF de las células y se desecha.
2. Se siembran fibroblastos BJ a 1 x 10⁴ células por pocillo en medio BJ encima de las células NuFF.
3. Se incuban las células durante la noche a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Reprogramación de células (día 0)

Se añade proteína B18R a los pocillos de las células para tratarlas previamente con este inhibidor proteico.

1. Se aspira el medio BJ de las células diana y se añaden 2 ml por pocillo de Pluriton Complete **con o sin proteína B18R** a una concentración final de 200 ng/ml.
2. Se incuba la placa durante un mínimo de 4 horas a 37 °C y CO₂ al 5 % si se usa proteína B18R. NOTA: Si no usa proteína B18R, la placa se incuba a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 1 hora antes de la primera transfección.

Preparación de complejo de transfección de ARNm que comprende la mezcla de reprogramación de ARNm

1. Se descongela la mezcla de reprogramación de ARNm en hielo.
2. Se añaden 250 microlitros de OPTI-MEM a un tubo de microcentrifugación estéril de 1,5 ml.
3. Se añaden 8-12 microlitros de premezcla de reprogramación de ARNm a 100 ng/microlitro al OPTI-MEM y se pipetea para mezclar.
4. Se añaden 2 microlitros de reactivo TransIT Boost por 1 microgramo de ARNm usado. Se pipetea hacia arriba y hacia abajo para mezclar.
5. Se añaden 2 microlitros de reactivo de transfección de ARNm TransIT por 1 microgramo de ARNm usado. Se pipetea para mezclar.
6. Se incuba a temperatura ambiente 2-5 minutos y se añade gota a gota a las células.
7. Se balancea suavemente la placa de 6 pocillos de un lado a otro y de delante a atrás para distribuir el complejo de transfección de ARNm a través del pocillo.
8. Se incuba la placa durante ~23 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Notas: El complejo de transfección que comprende la mezcla de reprogramación de ARNm debe mezclarse bien después de cada adición a las células para garantizar la mejor eficacia de la transfección. Solo se deben preparar

unas cuantas reacciones a la vez, de modo que el reactivo de transfección de ARNm se pueda añadir rápidamente después del reactivo TransIT® Boost.

Reprogramación de las células (para el día 1 hasta el día 5)

- 5 1. Se equilibra el medio Pluriton y se completa con P/S y suplemento (y proteína B18R cuando esté incluida en el tratamiento).
2. Se aspira el medio de cultivo y se desecha.
3. Se añaden 2 ml de medio de reprogramación de ARNm Pluriton a cada pocillo (incluso con proteína B18R cuando se usa en el tratamiento).
4. Se incuba a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 1 hora.
- 10 5. Se prepara el complejo de transfección de ARNm como se ha descrito para el día 0.
6. Se transfectan las células como se ha descrito para el día 0.
7. Se incuba la placa O/N a 37 °C y CO₂ al 5 %.
8. Se repiten las etapas 1 a 8 cuatro veces más (día 2 hasta el día 5).

Reprogramación de células en cada uno de los días 6 a 17, cambiando cada vez el medio a medio acondicionado con NuFF y continuas transfecciones).

- 15 1. Se descongelan los medios y el suplemento Pluriton acondicionados con NuFF y la proteína B18R.
2. Se equilibran los medios Pluriton de NuFF y se completan con P/S y suplemento (y proteína B18R cuando se usa).
3. Se aspira el medio de cultivo que contiene el complejo de transfección de ARNm.
- 20 4. Se añaden 2 ml de medio de reprogramación de ARNm acondicionado (con o sin proteína B18R) a cada pocillo.
5. Se incuba a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 1 hora.
6. Se prepara el complejo de transfección de ARNm como se ha descrito para el día 0.
7. Se transfectan las células como se ha descrito para el día 0.
- 25 8. Se incuba la placa O/N a 37 °C y CO₂ al 5 %.
9. Se repiten las etapas 1 a 8 doce veces más (del día 6 al día 17).

Identificación de colonias de células iPS primarias (día 18 hasta el día 20)

1. Una vez completadas las transfecciones, se incuban durante 1 a 3 días para permitir que las colonias se expandan.
- 30 2. Se reemplaza el medio diariamente con 2 ml por pocillo de medio Pluriton acondicionado con NuFF con suplemento Pluriton x2500, pero sin la proteína B18R.
3. Antes del aislamiento manual, las colonias de células iPS primarias pueden identificarse usando anticuerpos estériles que se tiñen en vivo, tal como anticuerpo anti-humano de ratón StainAlive™ DyLight™ 488 sin dañar las células.
- 35 4. A continuación, las células se pueden fijar y teñir para la actividad de la fosfatasa alcalina, fijarse y teñirse con anticuerpos, o mantenerse vivas y recogerse o transferirse a nuevas placas recubiertas de la capa alimentadora de fibroblastos.

APÉNDICE B

Pasada de las células en medio de reprogramación de ARNm

- 40 **Nota:** Las células de los pocillos más confluentes pueden pasarse aproximadamente el día 6 o el día 7 para permitir una mayor proliferación y formación de colonias.

Las células deberían pasarse después de una transfección de 4 horas, reemplazando así el cambio diario del medio. Las pasadas, si es necesario, deben realizarse después del día 6 o el día 7. Se debe disponer una nueva placa que contenga células alimentadoras NuFF de $2,5 \times 10^5$ células por pocillo el día previo a la pasada, como se hizo el día 45 menos 2.

1. Se calienta tripsina/EDTA y neutralizante de tripsina en un baño de agua a 37 °C.
2. Se añade 1 ml de PBS por pocillo de células para las pasadas. Se aspira el lavado de PBS.
3. Se añaden 0,5 ml de tripsina/EDTA al pocillo. Se agita suavemente la placa para distribuir uniformemente la enzima a través del pocillo.
- 50 4. Se incuban las células durante 5 minutos a 37 °C en CO₂ al 5 %.
5. Se retira la placa de la incubadora y se golpea suavemente el lado del pocillo para ayudar a la disociación y liberación de la células de la superficie de cultivo.
6. Se añaden 0,5 ml de neutralizante de tripsina al pocillo.
7. Se pipetea suavemente las células en el pocillo tres veces con la punta de una pipeta de 1 ml.
- 55 8. Se extraen las células y se transfieren a un tubo cónico de 15 ml.
9. Se añade 1 ml de medio Pluriton al pocillo para recoger las células restantes.
10. Se transfiere 1 ml más de células a la suspensión celular en el tubo cónico de 15 ml.

11. Se centrifuga durante 5 minutos a 200 x g.
12. Se aspira el sobrenadante y se vuelve a suspender el sedimento en 1 ml de medio Pluriton caliente.
13. Se aspira el medio de cultivo de NuFF de los pocillos de una placa con células alimentadoras NuFF preparada.
14. Se añade 1 ml de PBS por pocillo para enjuagar. Se aspira el PBS.
15. Se añaden 2 ml de medio de reprogramación de ARNm Pluriton **con proteína B18R e Y27632** a cada pocillo.
- Nota:** la proteína B18R se debe añadir a una concentración final de 200 ng/ml y el inhibidor de ROCK Y27632 se debe añadir a una concentración final de 10 mM.
16. Se dispensan las células resuspendidas en los pocillos preparados de la placa de células alimentadoras NuFF.
- Nota:** Se recomienda una proporción de la división de 1:6, pero puede variar según la confluencia del pocillo y la velocidad de proliferación de las células. Se pueden volver a sembrar de uno a 6 pocillos de células, sin embargo, es importante escoger una serie de pocillos sembrados para proseguir una reprogramación comparable con la cantidad de ARNm disponible para el resto del experimento de reprogramación.
17. Se incuban las células durante la noche a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Materiales para el crecimiento, aislamiento, mantenimiento o confirmación de células iPS

- Anticuerpo anti-Tra-1-60 humana de ratón StainAlive DyLight 488 (Stemgent, n.º de cat. 09-0068)
- Inhibidor de Rock I Y27632 (Stemgent, n.º de cat. 04-0012)
- PBS x10 sin calcio ni magnesio (Lonza Biowhittaker, n.º de cat. 17-517Q, Thermo)
- Colagenasa de tipo IV, 250 U/mg (GIBCO, n.º de cat. 17104-019)
- iMEF - fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (R&D Systems n.º de cat. PSC001)
- Matriz cualificada para hESC BD MATRIGEL™ (BD n.º de cat. 354277, Thermo)
- Kit de medio 1 mTeSR® - Medio Basal más suplemento x5 (STEMCELL Technologies, n.º de cat. 05850)
- Dispasa a 5 mg/ml (STEMCELL Technologies, n.º de cat. 07913)
- Synth-a-Freeze, Medios de congelación celular, (GIBCO, n.º de cat. A12542-01, Life Technologies)
- Medios DMEM/F12 (1:1) (GIBCO, n.º de cat. 11330, Life Technologies)
- Reemplazo sérico KNOCKOUT™ SR para células ES (GIBCO, n.º de cat. 10828, Life Technologies)
- Solución de aminoácidos no esenciales MEM NEAA (x100) (GIBCO, n.º de cat. 11140, Life Technologies)
- Beta-mercaptoetanol (Sigma, n.º de cat. 63689)
- Kit de tinción de fosfatasa alcalina II (Stemgent, n.º de cat. 00-0055)
- Albúmina de suero bovino (para FGFb)
- Paraformaldehído al 95 % (Sigma, n.º de cat. 158127)
- Anticuerpos, tapones de lavado, etc.
- Medio para células iPS - DMEM/F12, Knockout SR al 20 %, 10 ng/ml de FGFb, aminoácidos no esenciales x1 Pen/Estrep x1, beta-Mercaptoetanol 0,1 mM (bME), GLUTAMAX™ x1
- Medio mTeSR 1 - mTeSR 1 más Suplemento x1.

Materiales y procedimientos para caracterizar las colonias de iPSC generadas usando los procedimientos

Los **materiales y procedimientos de inmunotinción** fueron idénticos a los usados en el EJEMPLO 13, excepto que también se usaron dos anticuerpos adicionales, el anticuerpo de ratón TRA-1-81 (Cell Signaling Technology) y el anticuerpo de conejo DNMT 3B (Cell Signaling Technology).

Ensayos de Q-PCR de niveles de expresión génica en las iPSC generadas usando los procedimientos en comparación con los niveles de expresión en células somáticas de fibroblastos BJ a partir de las que se generaron las iPSC

Para determinar si los genes que se sabe que están regulados positivamente en las células madre embrionarias o células iPS generadas usando otros procedimientos también se regulaban positivamente en las iPSC generadas usando los factores de reprogramación de iPSC de ARNm de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, se realizó la qR-PCR en ARN celular total aislado de colonias de iPSC generadas y de fibroblastos BJ.

Por lo tanto, se aisló el ARN celular total de los fibroblastos BJ y de las colonias de células iPS cultivadas en una matriz extracelular artificial (matriz MATRIGEL™ de BD Bioscience) para minimizar la contaminación de los fibroblastos. Las iPSC usadas se obtuvieron de colonias "clonales" de iPSC que se habían recogido y sometido a 5 pasadas durante un período de un mes después del último día de transfección con los factores de reprogramación de ARNm. Se lisó un pocillo entero de estas colonias "clonales" y se combinó para la preparación del ARN. El ADNc se sintetizó mediante transcripción inversa de 1 microgramo del ARN celular total de fibroblastos BJ y de las colonias clónicas de células iPSC, respectivamente, usando cebadores oligo d(T)₂₀VN. Después, se realizó la PCR en tiempo real (qPCR) en los ADNc usando la supermezcla para PCR SsoFAST™ EvaGreen (BioRad) y cebadores de PCR (diseñados basándose en la información de Assen, 2008) para analizar los niveles relativos de expresión de los ARNm codificantes de las siguientes proteínas:

GAPDH - un gen constitutivo, comparable en expresión en ambos tipos de células.

NANOG - Caja homeótica de Nanog - implicada en la diferenciación celular, la proliferación, el desarrollo embrionario, el mantenimiento de células madre somáticas y más.

OCT4 - Caja homeótica 1 de clase 5 de POU (POU5F1) - desempeña un papel en el desarrollo embrionario especialmente durante la embriogénesis temprana, y es necesaria para la pluripotencia de las células ES.

5 **CRIPTO** - (TDGF1) factor de crecimiento derivado del teratocarcinoma 1 - una proteína de señalización extracelular, unida a la membrana que desempeña un papel esencial en el desarrollo embrionario y en el crecimiento tumoral.

GBX2 - Caja homeótica 2 cerebral de gastrulación- un factor de transcripción de unión al ADN que participa en una serie de procesos del desarrollo.

10 **GDF3** - Factor de diferenciación del crecimiento 3 - un miembro de la familia de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y la superfamilia de TGF-beta. Los miembros regulan el crecimiento y la diferenciación celular en tejidos embrionarios y adultos.

REX1 - (REXO1) homólogo de ARN exonucleasa 1 - implicada en la proliferación y diferenciación.

cMYC - una fosfoproteína nuclear multifuncional que actúa como un factor de transcripción que desempeña un papel en la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la transformación celular.

15 Las muestras de ADNc se amplificaron por PCR por triplicado, y los resultados de la qPCR obtenidos usando los valores se promediaron y los datos se expresaron como valores de umbral de ciclo o CT. El valor de CT es el número de ciclos de la PCR en el que la fluorescencia del indicador es superior al umbral y produce el primer aumento claramente detectable de fluorescencia sobre la variabilidad de fondo o basal. Este es el procedimiento más preciso para comparar los niveles de expresión por PCR antes de que se produzca una meseta en la formación del producto.

20 **Diferenciación espontánea de cuerpos embrioides de iPSC**

Se usó la misma estirpe de las colonias de iPSC que se analizó mediante qPCR en el protocolo de diferenciación espontánea de cuerpos embrioides descrito en el EJEMPLO 12 con el fin de analizar la capacidad de las células para diferenciarse en células que representen las tres capas germinales. En resumen, se seleccionó una colonia y se expandió durante 17 pasadas, luego se congeló durante una semana, luego se cultivó y se realizaron 4 pasadas más. Se permitió la formación de colonias grandes, se desprendieron de la superficie de la matriz MATRIGEL™ con dispasa y se mantuvieron en cultivo en suspensión durante 8 días en medios de iPS sin FGFb para permitir la formación de los cuerpos embrioides. Como se ha descrito anteriormente, se dispusieron luego los cuerpos embrioides en placas recubiertas de gelatina, y se dejaron que se adhirieran y diferenciaban espontáneamente en medio de iPS sin FGFb durante 7 días más. Las células se fijaron y se incubaron con anticuerpos para diversos marcadores como se ha descrito previamente. Se realizó la inmunofluorescencia y se obtuvieron imágenes de las células.

Resultados del EJEMPLO 14

35 Hacia el día 10, hubo un cambio drástico en la morfología de los pocillos de la morfología alargada y fina de los fibroblastos a una morfología de células epiteliales más pequeñas y redondas (FIG. 24). Basándose en los resultados finales de este y otros experimentos de reprogramación con los factores de reprogramación de ARNm usados, este cambio morfológico parece ser un signo reproducible de que la reprogramación de los fibroblastos BJ a las colonias de iPSC tendrá éxito.

40 Las colonias de iPSC se detectaron por primera vez el día 16 basándose en el examen a simple vista (por ejemplo, FIG. 25)

Los recuentos de las colonia de iPSC en los pocillos el día 18 fueron menos impresionantes que en el EJEMPLO 13. Sin quedar ligados a teoría alguna, los presentes inventores creen que dañaron las células al intentar dividir las colonias de iPSC usando tripsina el día 10.

45 En este experimento, en presencia de proteína B18R, hubo aproximadamente 10 veces más colonias de iPSC generadas el día 18 a partir de los factores de reprogramación de ARNm tratados con RNasa III que contenían solamente pseudouridina de las que se generaron con los mismos factores de reprogramación de ARNm que contenían modificaciones tanto de pseudouridina como de 5-metilcitidina.

50 Se recogieron colonias de iPSC de un pocillo que contenía células que se habían reprogramado en ausencia de proteína B18R usando 18 dosis diarias de 800 ng de factores de reprogramación de ARNm tratados con RNasa III que contenían solo modificación con pseudouridina, y se pasaron y mantuvieron cultivo a largo plazo.

También se recogieron colonias de iPSC del pocillo generado por el mismo régimen de tratamiento, pero con la proteína B18R. Estas células iPS se mantuvieron en cultivo durante 2 meses. No se observaron diferencias en la morfología ni las características de propagación entre las iPSC generadas con o sin la proteína B18R.

Algunas colonias de iPSC se dividieron con colagenasa y se transfirieron a células alimentadoras el día 21.

Algunas colonias de iPSC se fijaron e inmunotñieron el día 46 (después de aproximadamente un mes de cultivo de las iPSC tras la última transfección (FIG. 26).

- 5 Algunas colonias de iPSC se pasaron sobre la matriz MATRIGEL en ausencia de células alimentadoras; después de cinco pasadas y aproximadamente un mes en cultivo, se aisló el ARN de algunas de estas colonias de iPSC y para el análisis de expresión génica por qPCR, como se ha descrito. De la FIG. 34 a la FIG. 37, se proporcionan ejemplos de resultados de qPCR.

Resultados de la expresión génica de colonias de iPSC frente a fibroblastos BJ por qPCR

- 10 Se usaron cebadores de GAPDH para demostrar que la cantidad de ADNc de entrada y, por lo tanto, las cantidades de ARN iniciales de entrada eran equivalentes. Como se muestra en la FIG. 34, tanto los fibroblastos BJ como las colonias de iPSC expresaron una cantidad elevada, casi equivalente de GAPDH, por lo que los CT mostrados en la FIG. 34 no fueron normalizados.

A diferencia de los niveles similares de GAPDH, la expresión de cada factor de pluripotencia (FIG. 35 a FIG. 37) fue mayor en las células iPS que en los fibroblastos BJ.

- 15 CRIPTO es un ejemplo drástico del cambio en los niveles de expresión. El umbral de ciclo medio para el ARN codificante de CRIPTO en los fibroblastos BJ fue de aproximadamente 30 ciclos, mientras que el valor medio de CT para el ARN codificante de CRIPTO en colonias de iPSC derivadas de los fibroblastos BJ fue de aproximadamente 21 (FIG. 35); esta diferencia de 9 ciclos representa un aumento de 588 veces en la expresión de CRIPTO. Un CT de 20 ciclos también indica la gran abundancia de este mensaje en el ARN de las células iPS.

- 20 **Resumen de las diferencias de expresión para todos los pares de cebadores de qRT-PCR ensayados**

Proteína codificada por ARN:	GAPDH CT	NANOG CT	OCT4 CT	CRIPTO CT	GBX2 CT	GDF3 CT	REX1 CT	cMyc CT
linfocitos BJ	18,5	30,4	29,6	30,1	32	ND	ND	26,2
Células iPS	18,7	22,9	20,7	20,9	27,4	25,8	23,1	25,5
Delta CT	0,2	7,5	8,9	9,2	4,6	ND	ND	0,7
Diferencias	1,15	181	478	588	24,25	ND	ND	1,62

- 25 Como cabría esperar para las iPSC verdaderas, todos los marcadores anteriores excepto el gen constitutivo GAPDH se expresaron a niveles mucho más altos en las colonias de iPSC que en los fibroblastos BJ. Los valores similares de CT para GAPDH en ambos tipos de células muestran que se compararon cantidades iguales de ARN. Las diferencias fueron demasiado elevadas para determinarse para los genes de fibroblastos BJ con niveles de expresión no detectables (ND).

Pluripotencia demostrada por la capacidad de las iPSC para diferenciarse espontáneamente en cuerpos embrioides que contienen células de las tres capas germinales

- 30 Como se muestra en la FIG. 27, las iPSC inducidas por ARNm modificados con ψ , con cola de poli(A) de 150 bases, protegidos con caperuza 5' cap1, [con $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM] tratados con RNasa III codificantes de una mezcla a 3:1:1:1:1:1 de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y cMYC, y sometidos al protocolo de diferenciación espontánea de cuerpos embrioides se tiñeron positivamente para los marcadores que representan las 3 capas germinales de las células, lo que demuestra la pluripotencia de las células. Por lo tanto, Se descubrió que las células expresaban marcadores ectodérmicos, beta-tubulina de clase III neuronal (TUJ1), proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y cadena ligera de neurofilamento (NF-L), los marcadores mesodérmicos, actina de músculo liso alfa (SMA) y desmina, y los marcadores endodérmicos, factor de transcripción SOX17 y alfa-fetoproteína (AFP).

Ejemplo 15. Evaluaciones de HPLC frente a procedimiento de tratamiento de RNasa III para preparar factores de reprogramación que comprenden ARN monocatenarios modificados con pseudouridina codificantes de factores de inducción de células iPS para reprogramar fibroblastos BJ a células iPS

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 15

- 40 En un experimento, se prepararon factores de reprogramación de iPSC compuestos de ARNm modificados con ψ ARNm protegidos con caperuza 5' cap1 codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58), cada uno con una cola de poli(A) de aproximadamente 150 bases (estando la longitud de la cola verificada por electroforesis en gel desnaturizante de agarosa) como se ha descrito anteriormente, pero sin realizar el tratamiento con RNasa III. Los ARNm con una cola de poli(A) y cap1 se dividieron luego en 3 partes. Se purificó un tercio de cada ARNm mediante RNARx LLC (Wayne, PA) usando HPLC como se ha descrito (Kariko y col., 2011). Un tercio de cada ARNm se dejó sin purificar y un tercio de cada ARNm se trató con RNasa III usando un procedimiento de tratamiento de RNasa III

con $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1 mM y la limpieza usando el procedimiento de limpieza rápida de ARN descrito en el presente documento; (nota, esta vez, el tratamiento con RNasa III se realizó tras la protección con caperuza y la adición de la cola en lugar de después de las transcripciones *in vitro*). Después, los 5 factores de reprogramación de ARNm de cada parte (es decir, todos los que habían sido purificados por HPLC, todos los que no habían sido purificados o todos los que habían sido tratados con RNasa III) se mezclaron a una proporción molar de 3:1:1:1:1 de ARNm modificados con ψ codificantes de, respectivamente, OCT4, SOX2, KLF4, Lin28 y cMYC (T58) para preparar una mezcla de reprogramación de ARNm purificado por HPLC, y una mezcla de reprogramación de ARNm no tratado, así como una mezcla de reprogramación tratada con RNasa III. Después, se usaron 1,2 microgramos de cada mezcla de reprogramación de ARNm para la reprogramación de diez mil células por pocillo de fibroblastos BJ (sembrados en NuFF) a iPSC, esencialmente como se describe en el EJEMPLO 14, con variables experimentales adicionales que se muestran en la tabla de los resultados de reprogramación de iPSC.

Diferenciación espontánea de iPSC en 3 capas germinales

Se seleccionaron colonias de iPSC seleccionadas y se usaron en el protocolo de diferenciación espontánea del cuerpo embrioide como se ha descrito en el EJEMPLO 14 para evaluar su pluripotencia.

Resultados del EJEMPLO 15

Se detectaron colonias de iPSC hacia el día 13 en los pocillos de los fibroblastos BJ transfectados con la mezcla de reprogramación de ARNm tratado con RNasa III o con la mezcla de reprogramación de ARNm purificado por HPLC. Todas las células de los pocillos transfectados con la mezcla de reprogramación de ARNm sin purificar murieron durante el proceso de reprogramación, incluso con la adición de la proteína B18R. La adición de la proteína B18R mejoró la eficacia de la reprogramación de los fibroblastos BJ a iPSC en los pocillos tratados con la mezcla de reprogramación de ARNm tratado con RNasa III o en los pocillos tratados con la mezcla de reprogramación de ARNm purificado por HPLC.

Propagación de colonias de iPSC

Se escogieron colonias de iPSC de los pocillos replicados reprogramados con la mezcla de reprogramación de ARNm purificado por HPLC y la mezcla de reprogramación de ARNm tratado con RNasa III y se procesaron enzimáticamente con colagenasa sobre células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón irradiados en medio de mantenimiento de células iPS que contenía 10 ng/ml de FGFb. Las colonias de iPSC se propagaron y mantuvieron una morfología y una velocidad de crecimiento como era de esperar para las iPSC durante más de 9 pasadas en cultivo, tras lo que se congelaron y se almacenaron en un congelador.

Tinción con fosfatasa alcalina de colonias de iPSC

El día 20, las placas que contenían colonias de iPSC se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se tiñeron para detectar colonias positivas para fosfatasa alcalina, como se ha descrito previamente. Las imágenes de placas de los fibroblastos BJ con colonias de células que se tiñen positivamente para fosfatasa alcalina, un marcador para colonias de iPSC, se muestran en la FIG. 28. Los números de colonias de iPSC teñidas con fosfatasa alcalina obtenidas usando factores de reprogramación de ARNm monocatenarios modificados con ψ de los que se retiró el ARN bicatenario mediante purificación por HPLC o usando el tratamiento con RNasa III descrito en el presente documento, de modo que dichos factores de reprogramación de ARNm estuvieran prácticamente libres, extremadamente libres o absolutamente libres de ARN bicatenario, en comparación con el uso de factores de reprogramación de ARNm monocatenarios modificados con ψ sin purificar, se resumen en la siguiente tabla.

Inmunotinción

Tras 1 semana de almacenamiento en el congelador, las células iPSC derivadas ARNm modificado con pseudouridina purificado por HPLC congeladas se descongelaron, se transfirieron a placas recubiertas con matriz artificial MATRIGEL™ y se propagaron en medio mTeSR™. Las colonias de iPSC se pasaron 4 veces más antes de fijarse una placa, y las células se inmunotifieron con anticuerpos contra los marcadores de pluripotencia OCT4, TRA1-60, SOX2, TRA1-80 y NANOG característicos de las células iPS usando procedimientos de inmunotinción tal como se ha descrito previamente. Como se muestra en la FIG. 33, las iPSC inducidas a partir de fibroblastos BJ usando los factores de reprogramación de ARNm modificado con pseudouridina purificado por HPLC se inmunotifieron positivamente para estos marcadores de pluripotencia.

Resumen de reprogramación de iPSC con factores de reprogramación de ARNm modificado con ψ

Tipo de tratamiento	Proteína B18R usada	Grado de toxicidad observado	Número de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina	Marcador de placa de la imagen inferior
Purificación mediante HPLC	NO	Células alimentadoras muertas, pero colonias de iPSC presentes	15	A

(continuación)

Tipo de tratamiento	Proteína B18R usada	Grado de toxicidad observado	Número de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina	Marcador de placa de la imagen inferior
Purificación mediante HPLC	SÍ	Células alimentadoras OK y colonias de iPSC presentes	~100	B
Tratamiento con RNasa III	NO		~50	C
Tratamiento con RNasa III	SÍ		~100	D
Sin purificar	NO	Células muertas	0	-
Sin purificar	SÍ	Células muertas	0	-

Pluripotencia de iPSC

Se diferenciaron cuerpos embrioides de forma espontánea de colonias de iPSC escogidas que habían sido inducidas a partir de fibroblastos BJ mediante ARNm modificados con ψ purificados por HPLC codificantes de los factores de reprogramación indicados y luego cultivadas durante 4 a 11 pasadas en medio en pocillos recubiertos con una matriz MATRIGEL™ como se ha descrito en el EJEMPLO 14. Se observaron células diferenciadas que se tiñeron positivamente para los marcadores que representan las 3 capas germinales. Por ejemplo, se observaron células que expresaban marcadores ectodérmicos, beta-tubulina de clase III neuronal (TUJ1), los marcadores mesodérmicos, actina de músculo liso alfa (SMA) y desmina, y los marcadores endodérmicos, factor de transcripción SOX17 y alfa-fetoproteína (AFP).

Ejemplo 16. Evaluación de variables adicionales relacionadas con el uso de factores de reprogramación de ARNm modificado tratado con RNasa III codificante de factores de inducción de células IPS para la reprogramación de fibroblastos BJ a células IPS

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 16

Los objetivos de los experimentos descritos en el Ejemplo 16 eran determinar: (1) si el ARNm tratado con RNasa III puede producir un número significativo de colonias sin el uso de un inhibidor de la expresión de una vía de respuesta inmune innata, tal como la proteína B18R; (2) qué ARNm codificante de una proteína cMYC - ARNm codificante de cMYC de tipo silvestre o ARNm codificante de la proteína mutante cMYC (T58A) - es más eficaz para reprogramar fibroblastos BJ en colonias de iPSC; y (3) si 10.000 fibroblastos BJ por pocillo es el número óptimo de células para la reprogramación eficaz a las colonias de iPSC.

Los materiales y procedimientos usados fueron similares a los descritos para los EJEMPLOS 4-8 anteriores. La mezcla de factores de reprogramación del ARNm se componía de ARNm modificados con ψ (GA ψ C) codificantes de la mezcla molar 3:1:1:1:1 de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC o cMYC(T58A), que se trataron con RNasa III en una mezcla de reacción que contenía acetato de magnesio 1 mM para hacer que la mezcla de factores de reprogramación de ARNm tuviera un nivel suficientemente bajo de ARN bicatenario para no interferir en la transfección y la supervivencia celular. Esta mezcla de factores de reprogramación de ARNm tratado con RNasa III se transfectó todos los días durante 18 días a una dosis de 1,2 microgramos por pocillo al día (a menos que se indique otra dosis diferente de ARNm en la tabla de resultados respectiva) usando el reactivo de transfección de ARNm TransIT™ (Mirus Bio) en 10⁴ (a menos que se indique un número diferente de células en la tabla de resultados respectiva) fibroblastos BJ/pocillo durante 8 días seguidos en una fila en placas de 6 pocillos encima de las células alimentadoras NuFF. Las variables experimentales se enumeran en las tablas de resultados para cada experimento. Los recuentos de las colonias de iPSC se realizaron inmunotiñendo células vivas con anticuerpo anti-TRA-1-60 humana StainAlive™ DyLight™ 488 (Stemgent), como se ha descrito en el presente documento, y contando manualmente las colonias de iPSC teñidas en un campo visual usando una rejilla. Hubo variación en el tamaño de las colonias y la intensidad de la tinción, y algunas veces hubo "demasiadas colonias para contarlas" (por ejemplo, véase la FIG. 28), haciendo que fuera difícil o imposible contarlas correctamente. Por ejemplo, hubo más de 300 colonias en cada pocillo designadas como "demasiadas colonias para contar" o "DCPC". Por lo tanto, los recuentos de colonias de iPSC son aproximados.

Resultados del EJEMPLO 16

Reprogramación eficaz de fibroblastos BJ a colonias de iPSC mediante factores de reprogramación de ARNm modificado con pseudouridina tratado con RNasa III en presencia o ausencia de proteína B18R

Las colonias de iPSC se detectaron primero el Día 13 en dos pocillos diferentes de fibroblastos BJ que se transfectaron con factores de reprogramación de ARNm modificado con pseudouridina tratado con RNasa III (MgOAc)₂ 1 mM) en ausencia de la proteína B18 en el medio. Sin embargo, las colonias de iPSC también se

indujeron comenzando uno o dos días después en los pocillos de fibroblastos BJ que se transfectaron con factores de reprogramación de ARNm modificado con pseudouridina tratado con RNasa III en presencia de 200 ng/ml de proteína humana B18R recombinante en el medio. Las colonias de iPSC inducidas en presencia de la proteína B18R se muestran en la imagen de la FIG. 30. De hecho, en este experimento, fue imposible determinar un efecto de la proteína B18R, porque todo el pocillo estaba lleno de colonias (con cientos de colonias por pocillo de una placa de 6 pocillos) en ambos casos, y el número de colonias era de demasiadas colonias para contar (DCPC). (Si solo hubiera 100 colonias de iPSC por pocillo, la eficacia de la inducción de las iPSC hubiera sido del 1 %)

Tipo de ARN usado	Tipo de proteína MYC codificada por ARNm en la mezcla de reprogramación de ARNm	Proteína usada B18R	Recuento de colonias de iPSC el Día 18
GA ψ C	cMYC(T58A)	NO	DCPC
GA ψ C	cMYC(T58A)	SÍ	DCPC

A continuación, se muestran experimentos similares en los que se usó ARNm modificado con ψ codificante de factores de reprogramación para la transfección $\pm$ proteína B18R en el medio, y en los que las colonias de iPSC generadas se podían contar. Por ejemplo, en un experimento de evaluación del uso de ARNm codificante de proteína cMYC de tipo silvestre frente a ARNm codificante de proteína cMYC(T58A) mutante para la reprogramación, se observaron más colonias de iPSC el Día 18, cuando se añadió proteína B18R al medio una hora antes de cada transfección, como se ha mostrado anteriormente. Este experimento también indicó que el ARNm codificante de cMYC(T58A) aumentó la inducción de colonias de iPSC en comparación con el uso de ARNm codificante de cMYC de tipo silvestre.

Tipo de ARN usado	Tipo de proteína MYC codificada por ARNm en la mezcla de reprogramación de ARNm	Proteína usada B18R	Recuento de colonias de iPSC el Día 18
GA ψ C	cMYC de tipo silvestre	NO	105
GA ψ C	cMYC de tipo silvestre	SÍ	157
GA ψ C	cMYC(T58A)	NO	182
GA ψ C	cMYC(T58A)	SÍ	DCPC

Se realizó otro experimento para determinar si el número de fibroblastos BJ que fueron transfectados con los factores de reprogramación de ARNm modificado con pseudouridina tratado con RNasa III era óptimo para la reprogramación usando ya sea ARNm codificante de proteína cMYC de tipo silvestre o ARNm codificante de proteína cMYC(T58A) mutante en la mezcla de reprogramación de ARNm. Si se sembraran muy pocos fibroblastos BJ, habría menos colonias de iPSC inducidas, mientras que si se sembraran demasiados fibroblastos BJ (y las células no se dividieran a mitad de la reprogramación), las colonias de iPSC se volverían confluentes y no podrían recogerse fácilmente, lo que produciría menos colonias de iPSC utilizables. Basándose en el resultado de este experimento, la siembra de 5.000 a 10.000 fibroblastos BJ de 4 pasadas por pocillo fue ideal, como se muestra en los resultados de la siguiente tabla. Sin embargo, en experimentos posteriores, se descubrió que los fibroblastos BJ de número de pasada posterior crecieron más lentamente, por lo que parecía ser mejor usar más células con fibroblastos BJ de pasada posterior. Por lo tanto, el número ideal de células variará según la velocidad de crecimiento de los fibroblastos BJ, creciendo las células más jóvenes, en general, más rápidamente, y creciendo las células más viejas más lentamente. Basándose en los resultados de este experimento, el ARNm codificante de cMYC(T58A) dio el doble de colonias de iPSC en condiciones por lo demás similares en comparación con el ARNm codificante de la proteína cMYC de tipo silvestre. Por lo tanto, el ARNm codificante de la proteína mutante cMYC(T58A) pareció ser beneficioso para la eficacia de la inducción de iPSC, como se muestra en los resultados de la siguiente tabla.

La transfección de demasiados fibroblastos BJ por pocillo da lugar a un menor número de colonias de iPSC, y el ARNm codificante de cMYC(T58A) da lugar a más colonias de iPSC que el ARNm codificante de cMYC de tipo silvestre

Tipo de ARN usado	Tipo de proteína MYC codificada por ARNm en la mezcla de reprogramación de ARNm	Número de fibroblastos BJ sembrados por pocillo	Recuento de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina el Día 18
GA ψ C	cMYC de tipo silvestre	5×10^3	80
GA ψ C	cMYC de tipo silvestre	10^4	105
GA ψ C	cMYC de tipo silvestre	$2,5 \times 10^4$	14

(continuación)

Tipo de ARN usado	Tipo de proteína MYC codificada por ARNm en la mezcla de reprogramación de ARNm	Número de fibroblastos BJ sembrados por pocillo	Recuento de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina el Día 18
GA ψ C	cMYC(T58A)	5x10 ³	203
GA ψ C	cMYC(T58A)	10 ⁴	182
GA ψ C	cMYC(T58A)	2,5x10 ⁴	41

Ejemplo 17. Reprogramación de fibroblastos BJ en células iPS usando ARNm no modificados (GAUC) con cola de poli (A) y Cap1 tratados con RNasa III codificantes de los factores de reprogramación OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y cMYC

5 Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 17

Como se demuestra en los ejemplos anteriores, los presentes inventores han sido capaces de reprogramar de forma repetible y eficaz fibroblastos BJ a colonias de iPSC usando una mezcla de factores de reprogramación de ARN monocatenario que comprende una proporción molar de 3:1:1:1:1 de ARNm modificados con pseudouridina y/o 5-metilcitidina codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC, cMYC(T58A) o L-MYC, en la que los ARNm modificados se purificaron por HPLC o se trataron con RNasa III en una mezcla de reacción que contenía bajos niveles de cationes de magnesio divalentes antes de su uso en la reprogramación. En vista de los resultados sorprendentemente e inesperadamente exitosos en la reprogramación de células somáticas humanas o animales a colonias de iPSC usando los factores de reprogramación de ARNm modificados que fueron tratados con RNasa III en presencia de niveles bajos de magnesio divalente, se decidió evaluar si sería posible reprogramar dichas células somáticas a colonias de iPSC usando factores de reprogramación de ARN monocatenario que comprendieran ARNm no modificados codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A). Los presentes investigadores creen que la reprogramación exitosa de células somáticas humanas o animales a colonias de iPSC que podrían propagarse en cultivo durante largos períodos de tiempo, suficiente para formar estirpes de colonias de iPSC, usando solo ARN monocatenario no modificado no se ha informado ni demostrado previamente. Por lo tanto, en vista del éxito de los presentes investigadores en el desarrollo de un procedimiento para el tratamiento de ARN monocatenario modificado sintetizado *in vitro* con una RNasa específica del ARN bicatenario (por ejemplo, RNasa III) para generar ARN monocatenarios codificantes de factores de reprogramación con ARN bicatenario reducido, en el que dichos ARN monocatenarios estaban intactos y funcionales en la reprogramación de células somáticas humanas o animales a iPSC, como se informa en el presente documento, se decidió evaluar si el mismo procedimiento de tratamiento con RNasa III descrito en el presente documento podría usarse para crear ARN monocatenarios no modificados codificantes de los mismos factores de reprogramación que tuvieran niveles muy bajos de ARN bicatenario y, de ser así, si dichos ARN monocatenarios tratados podrían usarse para reprogramar células somáticas humanas o animales a células iPS. Sorprendente e inesperadamente, este experimento tuvo éxito, como se informa a continuación.

Por lo tanto, una mezcla de factores de reprogramación de ARN monocatenario que comprende una proporción molar de 3:1:1:1:1 de ARNm protegido con caperuza 5' cap1 y con cola de poli(A) (de hasta ~150 bases de longitud) no modificado codificante de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A) se sintetizó mediante transcripción *in vitro* como se ha descrito en el presente documento anteriormente, excepto que el ARN se sintetizó usando solo GTP, ATP, CTP y UTP sin el uso de pseudouridina-5'-trifosfato, 5-metilcitidin-5'-trifosfato ni otro nucleósido-5'-trifosfato modificado y tratado con RNasa III en una reacción que comprende acetato de magnesio 1 mM, también como se ha descrito en el presente documento anteriormente. Se realizaron ensayos de transferencia de puntos con el anticuerpo J2 específico del ARN bicatenario para verificar la digestión del ARN bicatenario en los ARN monocatenarios tratados con RNasa III. Después, se transfectaron 10.000 células por pocillo de fibroblastos BJ en células alimentadoras NuFF en pocillos de una placa de 6 pocillos diariamente con una dosis de 1,0, 1,2 o 1,4 microgramos de la mezcla de reprogramación de ARN monocatenario todos los días durante al menos 18 días usando el reactivo de transfección de ARNm TransIT™ (Mirus Bio), todo como se describe en los Materiales y procedimientos generales. Las variables experimentales se enumeran en la tabla de resultados que se presenta a continuación para cada experimento. El día 18 del protocolo de reprogramación, se realizaron los recuentos de colonias de iPSC mediante inmunotinción de células vivas con anticuerpo anti-TRA-1-60 humana StainAlive™ DyLight™ 488 (Stemgent), como se ha descrito en el EJEMPLO 16 y en otra parte del presente documento, y contando manualmente las colonias de iPSC teñidas en un campo visual usando una rejilla. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Resultados del EJEMPLO 17

Cientos de colonias de iPSC se generaron a partir de ARNm no modificado que se trató con RNasa III usando procedimientos descritos en el presente documento

Tipo de ARN usado	Tipo de proteína MYC codificada por ARNm en la mezcla de reprogramación de ARNm	Proteína B18R usada	Microgramos totales de ARNm de la mezcla de reprogramación transfección	Recuento de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina el Día 18
GAUC	cMYC(T58A)	NO	1,0 microgramos por pocillo	262
GAUC	cMYC(T58A)	NO	1,2 microgramos por pocillo	244
GAUC	cMYC(T58A)	NO	1,4 microgramos por pocillo	88
GAUC	cMYC(T58A)	SÍ	1,2 microgramos por pocillo	DCPC

Como se muestra en la tabla anterior, las tres dosis diarias diferentes de una mezcla de reprogramación de ARN monocatenario que comprenden ARNm no modificados codificantes de OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A) que se usaron para transfectar fibroblastos BJ durante 18 días dieron lugar a la generación de colonias de iPSC. Sin embargo, esta mezcla de reprogramación de ARN monocatenario que comprende ARNm no modificados era claramente más tóxica para las células que la mezcla de reprogramación de ARN monocatenario que comprendía ARNm modificados con pseudouridina. Por lo tanto, un microgramo de la mezcla de reprogramación por pocillo, en lugar de 1,2 microgramos por pocillo, dio lugar a una toxicidad menos precoz y, por lo tanto, a más células que sobrevivieron a la transición epitelial y formaron colonias de iPSC. Cuando se usaron diariamente 1,4 microgramos de mezcla de reprogramación, la mayoría de las células alimentadoras murieron, dando lugar a colonias unidas a muy pocas células como se ve en las imágenes de la FIG. 31.

Las colonias inducidas usando ARNm no modificados tratados con RNasa III codificantes de los factores de inducción de iPSC OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A) fueron confirmadas como colonias de iPSC según la morfología, la capacidad de propagarse durante más de 16 pasadas en cultivo, la inmunotinción *in vivo* positiva para TRA-1-60 usando un anticuerpo anti-TRA-1-60 humana StainAlive™ DyLight™ 488 (Stemgent) y la tinción inmunofluorescente positiva de células fijadas en paraformaldehído usando anticuerpos para los marcadores de iPSC OCP4, TRA1-60, NANOG, TRA 1-81 y SSEA4, realizado como se describe en el EJEMPLO 13 (FIG. 32).

Los presentes investigadores creen que la reprogramación con éxito de células somáticas humanas o animales a células iPSC usando únicamente ARN monocatenario no modificado no se ha informado ni demostrado previamente. Sin quedar ligados a teoría alguna, creen que otros investigadores no han tenido éxito en la reprogramación de células humanas o animales con ARN monocatenarios no modificados, porque no han reconocido la importancia de los bajos niveles de contaminantes de ARN bicatenario generados durante la transcripción *in vitro* de ARN monocatenario. Por lo tanto, no reconocieron la importancia de purificar o tratar dicho ARN monocatenario sintetizado *in vitro* para eliminar todos o casi todos los contaminantes de ARN bicatenario. Aún más, no han entendido ni desarrollado un procedimiento para purificar o tratar suficientemente dichos ARN monocatenarios con el fin de eliminar de manera eficaz todos o parte de los contaminantes de ARN bicatenario. Los presentes investigadores han descubierto procedimientos sencillos, rápidos y eficaces para tratar los ARN monocatenarios con una RNasa específica del ARN bicatenario que dé lugar a ARN monocatenarios que estén libres o casi libres de contaminantes de ARN bicatenario. Un ejemplo de dicha RNasa específica del ARN bicatenario que puede usarse para este fin es la endorribonucleasa RNasa III. Sin embargo, Los presentes investigadores han descubierto también que, de forma sorprendente e inesperada, que el tratamiento de ARN monocatenario con RNasa III usando las condiciones óptimas conocidas en la técnica desde 1968 (Robertson, H. D. y col., 1968) no eliminaba suficientemente el ARN bicatenario para que los ARN monocatenarios tratados pudieran usarse para la traducción en células vivas o para la reprogramación de células humanas o animales vivas desde un estado de diferenciación a otro estado de diferenciación (por ejemplo, para reprogramar células somáticas humanas o animales a células iPSC). De hecho, cuando los presentes investigadores trataron ARN monocatenarios codificantes de factores de reprogramación de iPSC con RNasa III usando el procedimiento de la literatura, todas las células que fueron transfectadas de forma repetida con los ARN monocatenarios tratados para intentar generar iPSC finalmente murieron. El análisis detallado de la actividad y especificidad de la RNasa III en diferentes condiciones, como se describe en los EJEMPLOS 1-9, reveló que las condiciones de reacción de la literatura no eliminaban suficientemente pequeñas cantidades de contaminantes de ARN bicatenario del ARN monocatenario transcrito *in vitro* para su uso en la introducción en células vivas, y que esas condiciones también dieron lugar a una degradación significativa de los ARN monocatenarios tratados que los investigadores actuales deseaban traducir a las células vivas. En otras palabras, no solo es que el procedimiento de RNasa III de la literatura no lograra eliminar suficientemente el ARN bicatenario no deseado, sino que también destruyó una parte de los ARN monocatenarios deseados codificantes de las proteínas de interés. A continuación, los presentes investigadores trataron de modificar las condiciones que fueron sugeridas por varios autores que habían desarrollado o usado el procedimiento de RNasa III de la literatura, incluyendo, por ejemplo, el cambio del tipo o la concentración de sal monovalente, del pH y de la cantidad de enzima usada, pero fue en vano. Por lo tanto, aunque la literatura relativa a la RNasa III sugería que el cambio de la concentración de la sal monovalente en la reacción de RNasa III podría ser beneficioso, los presentes inventores probaron los intervalos de concentraciones de diferentes sales monovalentes sin éxito. Los cambios en las variables sugeridas en la literatura no dieron lugar a una eliminación suficiente del ARN bicatenario para los ARN monocatenarios que se usaban para reprogramar células vivas, no redujo suficientemente la toxicidad de los ARN monocatenarios, y aún así, dañaron o destruyeron al menos una parte de los ARN monocatenarios

deseados.

Sin quedar ligados a teoría alguna, los presentes investigadores creen que la alta toxicidad celular se debe a los niveles extremadamente bajos de ARN bicatenario que se detectan por la respuesta inmune innata y otros sensores de ARN que están presentes en las células humanas y animales para proteger a esas células de la infección por virus de ARN bicatenario y otros patógenos. Por lo tanto, debido a la extrema sensibilidad de las células humanas o animales al ARN bicatenario que se introduce en esas células, un procedimiento que es adecuado para reducir el ARN bicatenario de los ARN monocatenarios para aplicaciones *in vitro* no es necesariamente suficiente para hacer que los ARN monocatenarios se introduzcan en células vivas humanas o animales. La respuesta inmune innata y otros sensores de ARN (por ejemplo, receptores de tipo Toll, por ejemplo, TLR3, interferones, y otros sensores similares) se inducen a niveles superiores si una cantidad incluso pequeña de ARN bicatenarios se introduce en dichas células. Aún más, las inducciones de ciertos sensores de ARN pueden sensibilizar a las células a futuras introducciones del mismo ARN monocatenario. Además, los efectos tóxicos de la respuesta inmune innata pueden ser acumulativos. Por ejemplo, las introducciones repetidas de ARN bicatenario inducen interferones, que dan lugar a la fosforilación de PKR, lo que produce la inhibición de la síntesis de proteínas en las células, que, a su vez, puede conducir a una toxicidad prolongada para las células y, finalmente, a la muerte celular programada (apoptosis). Por lo tanto, con respecto a los procedimientos para reprogramar células somáticas humanas a células iPS, en los que se introducen ARN monocatenarios codificantes de factores de reprogramación todos los días durante 18 o más días para generar las células iPS, la respuesta inmune innata y otras respuestas de sensores de ARN se inducen cada vez que los ARN monocatenarios codificantes de los factores de reprogramación se introducen en las células.

Ejemplo 18. Reprogramación sin células alimentadoras de fibroblastos 1079 a células iPSC usando ARNm monocatenario codificante de factores de inducción de iPSC

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 18

En este EJEMPLO 18, se sembraron fibroblastos 1079 (ATCC, Manassas, VA) a densidades celulares de 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , o 5×10^4 células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos recubiertas con 83 ng por pocillo de matriz de GFR MATRIGEL™ (BD Biosciences, San Jose, CA) en un medio de fibroblastos compuesto de MEM avanzado (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con SFB al 10 % (Fisher) y GLUTAMAX-I 2 mM (Invitrogen Carlsbad, CA) antes de su uso para la reprogramación.

Al día siguiente, el medio se cambió a medio de reprogramación, compuesto de DMEM/F12 (Invitrogen Carlsbad, CA) suplementado con reemplazo de suero KNOCKOUT™ al 20 % (Invitrogen Carlsbad, CA), GLUTAMAX-I 2 mM (Invitrogen), solución de aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Invitrogen, Carlsbad CA), FGF recombinante humano básico a 100 ng/ml (Invitrogen Carlsbad, CA), Inhibidor de TGFβ 2 micromolar STEMOLECULE SB431542 (Stemgent, Cambridge, MA) y LIF recombinante de ratón a 10 ng/ml (Invitrogen Carlsbad, CA) con antibióticos de penicilina-estreptomicina. La reprogramación se realizó con ARNm tratados con RNasa III que contenían pseudouridina codificantes de los factores de inducción de iPSC OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A) en el medio de reprogramación sin células alimentadoras descrito previamente para los fibroblastos BJ en el EJEMPLO 11.

Resultados del EJEMPLO 18

Como se ha descubierto previamente usando los fibroblastos BJ del Ejemplo 11, los fibroblastos 1079 también se reprogramaron con éxito a células iPS usando una mezcla 3:1:1:1 de ARNm tratados con RNasa III que contenían pseudouridina codificantes de los factores de reprogramación OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A) en el medio de reprogramación sin células alimentadoras descrito anteriormente.

Se observó la reprogramación de los fibroblastos 1079 en pocillos sembrados con 1×10^4 y 2×10^4 células por pocillo. Se indujeron más colonias de iPSC a la densidad celular más baja ensayada (1×10^4 células por pocillo), observándose 24 colonias de iPSC, frente a solo 8 colonias de iPSC en las placas con 2×10^4 células. A densidades celulares más altas, no se observó reprogramación con los fibroblastos 1079 de crecimiento rápido, debido a que las células proliferaron demasiado en los pocillos antes de que ocurriera la reprogramación.

Ejemplo 19. Variación de la estequiometría de los ARNm codificantes de factores de reprogramación de iPSC

En este experimento, se comparó la reprogramación de fibroblastos humanos a iPSC usando una mezcla de ARNm codificante de KLF4, LIN28, cMYC(T58A), OCT4 y SOX2 a una proporción molar de 3:1:1:3:1 con la mezcla de ARNm anteriormente descrita que tenía una proporción molar de 1:1:1:3:1.

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 19

Se sembraron 10^4 fibroblastos BJ (pasada 6) en 4×10^5 células alimentadoras NuFF en los medios de reprogramación Pluriton como se ha descrito previamente. Los medios que contenían el inhibidor de RNasa se cambiaron antes de las transfecciones diarias. Las mezclas de ARNm que comprendían ARNm tratado con RNasa III (en Mg^{2+} 2 mM), con cola de poli (A) (~150 aa), modificado con pseudouridina codificante de KLF4, LIN28, cMYC(T58A), OCT4 y SOX2 se sintetizaron como se ha descrito previamente. En el Experimento 19-1, las mezclas

de ARNm se diluyeron en 60 microlitros de Tampón Stemfect, se combinaron con el reactivo de transfección Stemfect diluido en 60 microlitros de tampón Stemfect, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadió gota a gota a las células durante cada una de las dieciocho transfecciones diarias. En el Experimento 19-2, se transfectaron 1,0 microgramos, 1,2 microgramos o 1,4 microgramos de cada mezcla de ARNm con 4, 4,8 o 5,6 microlitros de reactivo de transfección Stemfect, respectivamente, y se realizaron solo 15 transfecciones. Las mezclas de reprogramación de ARNm se produjeron con ARNm codificante de KLF4 a proporciones molares x1, x2 y x3 en comparación con los ARNm de LIN28, cMYC(T58A) y SOX2 (es decir, con estequiometrias 1:1:1:3:1; 2:1:1:3:1; y 3:1:1:3:1).

Tras completarse todas las transfecciones, los pocillos con colonias de iPSC se fijaron y se tiñeron con fosfatasa alcalina después de que las colonias representativas se recogieran para su expansión. Se realizan los recuentos de las colonias positivas en fosfatasa alcalina obtenidas y se generan imágenes.

Experimento 19-1: N.º de colonias positivas en fosfatasa alcalina obtenidas.

Mezcla de reprogramación de ARNm	Tipo de ARNm	AMT del ARN (µg)	Reactivo de transferencia y vol (µl)	Recuento de colonias positivas en fosfatasa alcalina	N.º de pocillo
4F KMO ₃ S	Ψ RIII Cap 1	1,0	SF 4	3	1
4F KMO ₃ S	Ψ RIII Cap 1	1,2	SF 4,8	29	2
4F KMO ₃ S	Ψ RIII Cap 1	1,4	SF 5,6	44	3
5F KLMO ₃ S	Ψ RIII Cap 1	1,0	SF 4	13	7
5F KLMO ₃ S	Ψ RIII Cap 1	1,2	SF 4,8	57	8
6F KLMNO ₃ S (+Nanog)	Ψ RIII Cap 1	1,0	SF 4	39	9
6F KLMNO ₃ S (+Nanog)	Ψ RIII Cap 1	1,2	SF 4,8	109	10
5F K ₃ LMO ₃ S	Ψ RIII Cap 1	1,0	SF 4	40	11
5F K ₃ LMO ₃ S	Ψ RIII Cap 1	1,2	SF 4,8	148	12
Optim. de la transfección			Stemfect		
5F KLMO ₃ S	Ψ RIII Cap 1	1,0	SF 3	6	13
5F KLMO ₃ S	Ψ RIII Cap 1	1,0	SF 4	16	14
5F KLMO ₃ S	Ψ RIII Cap 1	1,0	SF 5	31	15
5F KLMO ₃ S	Ψ RIII Cap 1	1,0	SF 6	7	16

Resumen de resultados para el Experimento 19-1 del EJEMPLO 19

Como se ha visto previamente, la inclusión de ARNm codificante de NANOG en la mezcla de ARNm dio lugar a más colonias de iPSC que la mezcla de 5 factores que no incluía NANOG. La mezcla de 6 factores (KLMNO₃S) produjo la mayoría de las colonias y las primeras colonias.

Un resultado interesante de este experimento fue el efecto de aumentar la cantidad de ARNm codificante de KLF4 en la mezcla de ARNm de reprogramación. La mezcla de 5 factores con una proporción 3:1:1:3:1 de KLMO y S dio lugar a las primeras colonias, las colonias más grandes y la mayoría de las colonias. La mezcla de 6 factores fue la mejor.

El efecto más beneficioso de usar más ARNm codificante de KLF4 fue la morfología uniforme de las colonias de iPSC generadas. Representando otras mezclas de ARNm con ARNm de KLF4 una proporción molar de 1 vez, se han observado colonias de iPSC de diferentes tamaños y fase celular; las primeras colonias de iPSC solieron empezar a diferenciarse antes de que se realizara la última transfección. Algunas de las colonias de iPSC también han presentado lo que los presentes investigadores creen que son células reprogramadas de forma incompleta de alrededor. Algunas imágenes representativas de colonias típicas de iPSC obtenidas se muestran en la FIG. 38 y FIG. 39.

Como se puede ver en la FIG. 38, algunas de las iPSC con KLMO₃S modificadas con pseudouridina de 5 factores, tratadas con RNasa III (1:1:1:3:1) son de forma regular, pero muchas de las células no lo son. Hay células epiteliales más grandes alrededor de estas dos colonias. Las células dispersadas alrededor de la periferia son las células

alimentadoras.

Como se puede ver en la FIG. 39, todas las iPSC con K₃LMO₃S modificadas con pseudouridina de 5 factores, tratadas con RNasa III (3:1:1:3:1) tenían bordes más regulares. Estas células también tendieron a destruir a las células alimentadoras que rodeaban las colonias de iPSC. Estas las colonias eran más grandes y más fáciles de recoger para la propagación, porque eran más uniformes.

Tener control sobre la estequiometría de los factores es uno de los beneficios de usar ARNm para la reprogramación, tal como para encontrar las proporciones ideales de ARNm codificantes de diferentes factores de reprogramación para lograr un determinado efecto.

En la actualidad, el único inconveniente para elevar el nivel de KLF4 es la destrucción de la capa de células alimentadoras, pero debido a que las colonias prosperaron y fueron fáciles de trabajar, esto, en realidad, puede ser un beneficio. Como se muestra en la FIG. 40, cuando se tiñe con fosfatasa alcalina, los beneficios para las colonias resultantes del ARNm de KLF4 elevado en la mezcla de ARNm pueden verse claramente (véase la FIG. 40 B).

Experimento 19-2: Efecto de la cantidad de ARNm codificante de KLF4 en mezclas de ARNm de 5 factores que comprenden ARNm de CAP1 GAψC tratados con RNasa III en la inducción de iPSC a partir de fibroblastos BJ

Cantidad total de ARNm	Mezcla de ARNm	Cantidad de ARNm de Klf4 en la mezcla	Células epiteliales observadas	Observaciones	N.º de colonias positivas en fos. alc.	N.º de pocillo
1,0 µg	KLMO ₃ S	x1			149	28
1,0 µg	K ₂ LMO ₃ S	x2	Muy pronto		181	19
1,0 µg	K ₃ LMO ₃ S	x3	Muy pronto		73	22
1,2 µg	KLMO ₃ S	x1		DPCE	400+	29
1,2 µg	K ₂ LMO ₃ S	x2	Las más precoces	DPCE	400+	20
1,2 µg	K ₃ LMO ₃ S	x3	Las más precoces		194	23
1,4 µg	KLMO ₃ S	x1		DPCE	400+	30
1,4 µg	K ₂ LMO ₃ S	x2	Las más precoces	DPCE	400+	21
1,4 µg	K ₃ LMO ₃ S	x3	Las más precoces		~300	24

*DPCE = Demasiadas colonias positivas en fosfatasa alcalina para poder contarlas con exactitud; N/A = No aplicable.

Resumen de resultados para el Experimento 19-2 del EJEMPLO 19

Definitivamente, hubo un beneficio reproducible al aumentar la cantidad de ARNm codificante de KLF4 en las mezclas de reprogramación de ARNm. La mezcla de ARNm de K₃LMO₃S causó la muerte de las células alimentadoras como se vio en los experimentos previos. Sin embargo, las mezclas de K₂LMO₃S y K₃LMO₃S dieron lugar a una formación de células epiteliales más temprana y a colonias de iPSC que eran reproduciblemente más grandes y más fáciles de recoger. En este experimento, la mezcla de ARNm de K₂LMO₃S dio lugar a la inducción temprana de colonias de iPSC con menos muerte celular (incluyendo la muerte de las células alimentadoras) y un mayor número de colonias de iPSC que la mezcla de ARNm de K₃LMO₃S, de modo que se podrían realizar menos transfecciones para obtener buenos números de colonias de iPSC de manera eficaz.

Ejemplo 20. Efecto de diferentes caperuzas y otras variaciones en los materiales y procedimientos de reprogramación de iPSC para el EJEMPLO 20

Se sintetizaron conjuntos de diferentes ARNm de reprogramación que variaban en la caperuza, la composición de los nucleótidos y el tratamiento con RNasa III (RIII). Se usó fosfatasa APEX™ (Epicentre, Madison, WI, EE. UU.) para tratar algunos ARNm protegidos por ARCA durante la transcripción (véase la siguiente tabla). Se mezclaron ARNm de reprogramación codificantes de KLF4 (K), LIN28 (L), cMYC (T58A) (M), OCT4 (O) y SOX2 (S) para mantener un exceso molar del triple de OCT4 frente a los otros factores, independientemente del número de factores codificados en las mezclas de ARNm.

Se sembraron 10⁴ fibroblastos BJ (pasada 6) en 4 x 10⁵ células alimentadoras NuFF en los medios de reprogramación Pluriton como se ha descrito previamente. Cuando se usó la proteína B18R, el medio se cambió

cuatro horas antes de la primera transfección, y se añadió la proteína B18R (200 ng/ml de medio) al pocillo. Para las transfecciones posteriores, se añadieron la proteína B18R y el inhibidor de RNasa (0,5 U/ml de medio) a las células en medio nuevo, que se cambió antes de las transfecciones diarias. Se realizaron dieciocho transfecciones usando 1,2 microgramos de ARNm diluido en 60 microlitros de tampón Stemfect combinado con 4,8 microlitros del reactivo de transfección Stemfect diluido en 60 microlitros de tampón Stemfect. Se incubó cada mezcla de ARNm a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadieron gota a gota a las células

Se fijaron las colonias y se tiñeron con fosfatasa alcalina después de que las colonias representativas se recogieran para su expansión. Los recuentos de colonias se realizaron en células fijas, positivas en fosfatasas alcalinas, como se muestra en la siguiente tabla.

Resultados del EJEMPLO 20

N.º de colonias positivas en fosfatasa alcalina obtenidas:

Mezcla de reprogramación de ARNm	Tipo de caperuza	AMT del ARN (µg)	Proteína B18R usada	Recuento de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina	N.º de pocillo
RIII 4F KMOS sin modificar	Cap 1	1,2	NO	18	4
RIII 5F KLMOS sin modificar	Cap 1	1,2	NO	111	5
RIII 6F KLMNOS sin modificar	Cap 1	1,2	NO	140	6
Mezcla de reprogramación de ARNm modificado con ψ	Tipo de caperuza	AMT del ARN (µg)	Proteína B18R usada	Recuento de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina	N.º de pocillo
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 0	1,2	NO	223	9
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 0	1,2	SÍ	162	10
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 1	1,2	NO	214	13
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 1	1,2	SÍ	115	14
ψ RIII 5F KLMOS	ARCA	1,2	NO	317	17
ψ RIII 5F KLMOS	ARCA	1,2	SÍ	292	18
ψ y m ⁵ C 5F KLMOS (no RIII)	AR- CA+Fos	1,2	NO	5	21
ψ y m ⁵ C 5F KLMOS (no RIII)	AR- CA+Fos	1,2	SÍ	102	22
(RIII = tratado con RNasa III. O está en exceso molar del triple frente a los ARNm de reprogramación).					

N.º de colonias positivas en fosfatasa alcalina obtenidas: El recuento de colonias de iPSC por cada pocillo se da a continuación:

Mezcla de ARNm	Tipo de caperuza	AMT del ARN (µg)	Proteína B18R usada	N.º de colonias positivas en fos. alc.	N.º de pocillo
RIII 4F KMOS sin modificar	Cap 1	1,0	NO	3	1
RIII 5F KLMOS sin modificar	Cap 1	1,0	NO	18	2
RIII 6F KLMNOS sin modificar	Cap 1	1,0	NO	34	3
RIII 4F KMOS sin modificar	Cap 1	1,2	NO	18	4
RIII 5F KLMOS sin modificar	Cap 1	1,2	NO	111	5
RIII 6F KLMNOS sin modificar	Cap 1	1,2	NO	140	6

(continuación)

Mezcla de ARNm	Tipo de caperuza	AMT del ARN (µg)	Proteína B18R usada	N.º de colonias positivas en fos. alc.	N.º de pocillo
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 0	1,0	NO	66	7
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 0	1,0	SÍ	38	8
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 0	1,2	NO	223	9
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 0	1,2	SÍ	162	10
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 1	1,0	NO	73	11
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 1	1,0	SÍ	70	12
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 1	1,2	NO	214	13
ψ RIII 5F KLMOS	Cap 1	1,2	SÍ	115	14
			NO		
ψ RIII 5F KLMOS	ARCA	1,0	NO	120	15
ψ RIII 5F KLMOS	ARCA	1,0	SÍ	45	16
ψ RIII 5F KLMOS	ARCA	1,2	NO	317	17
ψ RIII 5F KLMOS	ARCA	1,2	SÍ	292	18
ψ m ⁵ C 5F KLMOS (no RIII)	ARCA+Fos	1,0	NO	0	19
ψ m ⁵ C 5F KLMOS (no RIII)	ARCA+Fos	1,0	SÍ	34	20
ψ m ⁵ C 5F KLMOS (no RIII)	ARCA+Fos	1,2	NO	5	21
ψ m ⁵ C 5F KLMOS (no RIII)	ARCA+Fos	1,2	SÍ	102	22
(RIII = tratado con RNasa III. O siempre está en exceso molar del triple frente a los ARNm de reprogramación).					

Resumen de resultados seleccionados para el Ejemplo 20

Se generaron colonias de células madre pluripotentes inducidas usando ARNm no modificados codificantes solo de 4 factores (KMOS). Se escogieron algunas colonias para expandirse y mantenerse. Las células toleraron el reactivo de transfección de ARN Stemfectcon con ARNm no modificado sin un cambio de medio después de la transfección. La proteína B18R disminuyó sistemáticamente los recuentos de colonias de las mezclas de ARNm tratados con RNasa III y modificados con ψ. El único beneficio de usar la proteína B18R fue con ARNm modificado doblemente (ψ y m⁵C), que no se trató con RNasa III. Como se puede ver en la FIG. 43 C, se obtuvieron menos colonias con la mezcla de ARNm doblemente modificado (ψ y m⁵C) protegido con caperuza ARCA durante la transcripción, a pesar de que fue fosfatado y de la adición de la proteína B18R al medio.

El número de colonias de las mezclas de ARNm modificadas con ψ y tratadas con RIII de CapO y Cap1 fue muy similar (véanse la FIG. 42 y la Fig. 43 A).

Como se muestra en la FIG. 43 B, la mezcla de ARNm modificada con ψ y tratada con RIII con caperuza de ARCA produjo colonias de iPSC de ARNm protegidas con caperuza después de la transcripción en este experimento. Las longitudes de cola de estos ARNm fueron ligeramente más cortas que las colas de ARNm de CapO y Cap1. Las comparaciones de las longitudes de gel de desnaturalización no son tan precisas en el ARNm modificado con pseudouridina, pero las colas parecen ser de ~120 bases en los ARNm de CapO y Cap1, y de al menos 100 bases en los ARNm con caperuza de ARCA. Algunas colonias se recogieron y retiraron para su propagación antes de la tinción.

Ejemplo 21. Estudios adicionales del efecto de diferentes caperuzas y otras variaciones en los materiales y procedimientos de reprogramación de iPSC para el EJEMPLO 21

Se sintetizaron ARNm codificantes de 5 factores de reprogramación (KLM_{T58A}OS) usando NTP GAUC sin modificar convencionales. Los ARN bien se sintetizaron protegidos con caperuza durante la transcripción con el análogo de caperuza ARCA, o protegidos con caperuza después de la transcripción para tener CapO o Cap1. A todos los ARNm se les añadió cola de poli(A) usando poli(A) polimerasa a una longitud de ~ 150 aa. Algunos de los ARNm protegidos con caperuza ARCA también se trataron con Apex fosfatasa.

Se prepararon mezclas de reprogramación de 5 factores (KLM_{T58A}OS con estequiometría 1:1:1:3:1 convencional) y se transfectaron 1,2 microgramos de cada mezcla de ARNm con 4,8 microlitros de reactivo de transfección STEMFECTION™ de Stemgent diariamente en 10⁴ fibroblastos BJ de 5 pasadas sembrados en 4 x 10⁵ células NuFF. Algunos pocillos tenían 200 ng o 400 ng de proteína B18R añadida por ml de medio. Después de 18 transfecciones, las células se cultivaron durante 2 días más, se recogieron unas cuantas colonias de iPSC y el resto se tiñó para detectar la actividad de fosfatasa alcalina para contar las colonias de iPSC.

Experimento 1: N° de colonias positivas en fosfatasa alcalina de cada tipo de mezcla de ARNm

Tipo de caperuza	RNasa III	Conc. de Mg del tampón de RIII	Tratado con Fosfatasa APEX™	Proteína B18R usada	Observaciones	N.º de colonias positivas en fos. alc.	N.º de pocillo
ARCA (durante trans.)	NO	N/A	NO	NO	Células muertas	0	1
ARCA	NO	N/A	SÍ	NO	Células muertas	0	2
ARCA	NO	N/A	SÍ	SÍ 200 ng		106	3
ARCA	SÍ	2 mM	NO	NO		0	4
ARCA	SÍ	2 mM	SÍ	NO		0	5
ARCA	SÍ	2 mM	SÍ	SÍ 200 ng		278	6
ARCA	SÍ	2 mM	NO	SÍ 200 ng		90	7
ARCA	SÍ	2 mM	NO	SÍ 400 ng		93	8
Cap0	NO	N/A	N/A	NO	Células muertas	0	9
Cap0	SÍ	1 mM	N/A	NO		0	10
Cap0	SÍ	2 mM	N/A	NO		0	11
Cap0	SÍ	1 mM	N/A	SÍ 200 ng		400+	12
Cap0	SÍ	2 mM	N/A	SÍ 200 ng		283	13
Cap0	SÍ	1 mM	N/A	SÍ 400 ng		252	14
Cap0	SÍ	2 mM	N/A	SÍ 400 ng		344	15
Cap1	NO	N/A	N/A	NO	Células muertas	0	16
Cap1	SÍ	1 mM	N/A	NO		394	17
Cap1	SÍ	2 mM	N/A	NO		386	18
Cap1	SÍ	1 mM	N/A	SÍ 200 ng		400+	19
Cap1	SÍ	2 mM	N/A	SÍ 200 ng		400+	20
Cap1	SÍ	1 mM	N/A	SÍ 400 ng		400+	21
Cap1	SÍ	2 mM	N/A	SÍ 400 ng		400+	22

Resultados del EJEMPLO 21

Resultados de ARCA

El ARNm protegido con caperuza ARCA durante la transcripción y sin modificar produjo colonias de iPSC cuando el ARNm se trató con fosfatasa y las células se trataron con B18R (pocillo n.º 3). La baja toxicidad del reactivo de transfección Stemfect también puede desempeñar un papel para que esto sea posible. El tratamiento con RNasa III

del ARNm de ARCA no fue suficiente para producir colonias (pocillos 4 y 5) a menos que las células también se trataran con B18R (pocillos 6, 7 y 8). El tratamiento con RNasa III aumentó significativamente el número de colonias de iPSC obtenidas con el tratamiento con ARCA + fosfatasa + B18R en el medio (pocillo n.º 6 frente a 3). El tratamiento con APeX fosfatasa pareció mejorar significativamente el recuento de colonias de iPSC (pocillo 6, frente a los pocillos 7 y 8). El aumento de la concentración de B18R de 200 ng/ml de medio a 400 ng/ml de medio no aumentó el recuento de colonias de iPSC (pocillo 8 frente a pocillo 7).

Resultados de CapO

En este experimento, El tratamiento con RNasa III del ARNm de CapO no fue suficiente para producir colonias de iPSC (pocillos 10 y 11) a menos que las células también se trataran con B18R (pocillos 12 a 15). B18R x2 no pareció aumentar el número de colonias de iPSC, pero los resultados fueron mixtos. En un caso, Mg(OAc)₂ 1 mM fue mejor que 2 mM en el tampón de RNasa III; en un caso no fue así (pocillos 12 a 15).

Resultados de Cap1

El uso de los ARNm no modificado de Cap1 que fueron tratados con RNasa III fue suficiente para producir colonias de iPSC, mientras que los ARNm no modificados con caperuza CapO o ARCA tratados con RNasa III no indujeron colonias de iPSC. Parece que la proteína B18R aumenta el número de colonias de iPSC del ARNm no modificado Cap1 tratado con RNasa III. No se pudo determinar ninguna diferencia cuando se usó Mg²⁺ 1 o 2 mM en el tampón de RNasa III; los recuentos de colonias de iPSC fueron similares o hubo demasiadas colonias para poder contarlas.

Comparaciones

Las mezclas de ARNm no modificado de CapO y Cap1 produjeron más colonias de iPSC que las mezclas de ARNm de caperuza ARCA. Las mezclas de reprogramación de ARNm no modificadas tratadas con RNasa III, de Cap1, indujeron colonias de iPSC sin proteína B18R, pero las mezclas de ARNm de CapO y ARCA no lo hicieron. Cuando se usaron el tratamiento con RNasa III y la proteína B18R junto con los ARNm no modificados CapO o Cap1, se indujeron numerosas colonias de iPSC. Se recogieron y se propagaron colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina de seis pocillos diferentes (números de pocillos 3, 6, 13, 17, 18 y 20) se tiñeron todas positivas para los marcadores de pluripotencia inmunofluorescentes TRA1-60, SOX2, OCT4, SSEA4 y NANOG.

Experimento de seguimiento

Se usaron las mismas mezclas de reprogramación de ARNm no modificados tratados con RNasa III (con Mg²⁺ 1 o 2 mM) que contenían ARNm codificantes de 5 factores de reprogramación (KLM_{T58A}OS) (en las que los ARNm se protegieron con caperuza durante la transcripción con el análogo de caperuza ARCA o se protegieron con caperuza enzimáticamente después de la transcripción para generar ARNm CapO o Cap1, y a los que se añadieron enzimáticamente colas de poli-A (nucleótidos de ~150 A) usando poli (A) polimerasa) para la reprogramación de fibroblastos BJ como se ha descrito anteriormente en este EJEMPLO 21, excepto que se transfectaron 0,5 microgramos de cada mezcla de ARNm, complejada con 2,5 microlitros del reactivo de transfección RNAiMAX™ de Invitrogen en lugar del reactivo STEMFECTION de Stemgent, diariamente durante 18 días en 5 x 10³ fibroblastos BJ (pasada 5) sembrados en 2,5 x 10⁵ células NuFF en placas de 12 pocillos (en lugar de placas de 6 pocillos. Algunos pocillos también tenían 200 o 400 ng de proteína B18R añadidos por ml de medio. Como control positivo para la reprogramación, también se transfectó de forma similar una mezcla de ARNm modificado con pseudouridina tratado con RNasa III (con Mg²⁺ 2 mM) codificante de los 5 factores de reprogramación de KLM_{T58A}OS en fibroblastos BJ en un pocillo. Las células murieron en todos menos en dos de los pocillos al final de las transfecciones, aparentemente porque el reactivo de transfección ARNiMAX era demasiado tóxico para las células en las condiciones usadas. Solo se generaron unas cuantas colonias positivas en fosfatasa alcalina usando la mezcla de control positivo de ARNm modificado con pseudouridina tratado con RNasa III. No se pudieron sacar otras conclusiones de este experimento.

Ejemplo 22. La reprogramación de queratinocitos neonatales humanos (HEKn) en iPSC usando ARNm tratados con RNasa III, Cap1, cola de poli (A), codificantes de factores de reprogramación proteicos, es reproducible y muy eficaz

Materiales y procedimientos para el Ejemplo 22

Protocolo de reprogramación de queratinocitos

En general, muchas etapas del protocolo de reprogramación de queratinocitos desarrollado y usado en el presente documento son similares a las etapas del protocolo de reprogramación de fibroblastos a iPSC del apartado titulado "Descripción detallada del procedimiento de reprogramación para el EJEMPLO 14", con algunas etapas adicionales como las descritas a continuación en el presente documento.

Los queratinocitos neonatales primarios se propagaron en un medio bajo en calcio libre de suero, que potencia un estado altamente proliferativo e indiferenciado. En presencia de niveles fisiológicos de calcio, las células se diferencian terminalmente en epidermis completamente estratificada. Para reprogramar estas células de manera más eficaz, las 3 primeras transfecciones se realizan con las células que crecen en medio de queratinocitos de bajo

contenido en calcio (Medio EpiLife con suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos de Life Technologies) sin células alimentadoras. Se siembran 2×10^5 células HEKn en placas y se transfectan diariamente 3 veces. Cuatro horas después de la tercera transfección, las células se tratan con una solución de tripsina/EDTA al 0,025 % y se transfieren a capas de células alimentadoras NuFF en el medio de reprogramación Pluriton como se ha descrito anteriormente para la reprogramación de fibroblastos. A partir de este momento, las células se transfectan en medio de reprogramación PLURITON™ y medio acondicionado como se ha descrito anteriormente.

De manera más específica, se sembraron 2×10^5 células HEKn (pasada 4) (en plástico) por pocillo de una placa de 6 pocillos. Las células se mantuvieron en medio EpiLife con calcio 60 micromolar y se suplementaron con suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos (HKGS) ambos de Cascade Biologics (comercializados por Life Technologies). Las células se transfectaron diariamente con 4 microlitros de reactivo de transfección de ARN Stemfect por microgramo de mezcla de ARNm. El reactivo Stemfect se diluye en 60 microlitros de su propio tampón. Los 1,2 microgramos de ARNm se diluyeron en 60 microlitros de Tampón Stemfect. Se combinan las mezclas, se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añaden gota a gota a las células. El medio se cambió diariamente antes de la transfección y se añadieron 0,5 unidades de inhibidor de RNasa SCRIPTGUARD™ (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE. UU.) por ml de medio. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se añade un inhibidor de RNasa (por ejemplo, inhibidor de RNasa SCRIPTGUARD™ con ARN que comprende ARN monocatenario o ARNm codificante de una o más proteínas para inducir un efecto biológico o bioquímico (por ejemplo, para reprogramar una célula somática, por ejemplo, un queratinocito, a una iPSC).

Las 3 primeras transfecciones se realizaron con las células mantenidas en medio bajo en calcio EpiLife. Cuatro horas después de la tercera transfección, las células se tripsinizaron con solución de tripsina al 0,025 %/EDTA y las células de cada pocillo se sembraron en células alimentadoras NuFF en medio de reprogramación Pluriton con niveles convencionales de suplemento y penicilina estreptomicina como se ha descrito previamente. Las siguientes 6 transfecciones se realizaron en medio de reprogramación Pluriton y las 9 transfecciones finales se realizaron con células mantenidas en medio Pluriton acondicionado con NuFF.

Los ARNm se sintetizaron, ya sea usando ATP convencional sin modificar, CTP, GTP y UTP o usando ATP, CTP, GTP y ψ TP. Todos se protegieron con caperuza para crear una estructura Cap1 y se les añadió cola usando poli (A) polimerasa como se ha descrito previamente. En un experimento, se reprogramaron queratinocitos neonatales humanos HEKn usando el procedimiento de reprogramación de la presente invención mediante la transfección de 2×10^5 células HEKn con 1 - 1,5 microgramos de una mezcla de ARNm, tratado con RNasa III, modificado con pseudouridina, de KLM_{T58A}OS (1:1:1:3:1) diariamente durante 14 días. Se obtuvieron colonias positivas en fosfatasa alcalina indicadoras de iPSC y, tras la selección y las pasadas, las colonias ensayadas también dieron positivo en los marcadores de pluripotencia inmunofluorescente TRA1-60, SOX2, OCT4, SSEA4 y NANOG. Además, cuando se dejó que algunas de estas colonias de iPSC se diferenciaron en el protocolo de diferenciación espontánea de cuerpos embrioides, las células diferenciadas seleccionadas expresaron marcadores de las 3 capas germinales, incluyendo el endodermo (AFP y SOX17), mesodermo (SMA y Desmina) y ectodermo (beta-tubulina de clase III) cuando las células se fijaron y procesaron para la inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocían esos marcadores. Esto condujo a los presentes inventores a realizar experimentos adicionales en la reprogramación de células HEKn usando diferentes mezclas de reprogramación de ARNm.

Se preparó una mezcla de reprogramación de ARNm (KLM_{T58A}NOS) de 6 factores con ARNm no modificados tratados con RNasa III para la reprogramación. La reprogramación con ARNm codificante de NANOG en la mezcla de ARNm produce sistemáticamente más colonias de iPSC y más precoces que las mezclas de 5 factores. Se preparó una segunda mezcla de reprogramación de ARNm de 6 factores codificante de los mismos factores con ARNm tratado con RNasa III, modificado con ψ . Estas mezclas de ARNm se compararon en la reprogramación con una mezcla de reprogramación de ARNm de 5 factores preparada con una proporción molar 3 veces mayor de ARNm de KLF4 (3:1:1:3:1), que dio lugar a más colonias de iPSC, colonias más uniformes y colonias más precoces que una mezcla de ARNm 1:1:1:3:1.

Se transfectaron 1,2 microgramos o 1,5 microgramos de cada mezcla de ARNm con 4,8 microlitros o 6 microlitros de reactivo de transfección Stemfect de Stemgent diariamente en 2×10^5 células HEKn (pasada 5) sembradas en placas sobre plástico durante los primeros 2, 3 o 4 días, y luego con tripsina, y sembradas en 4×10^5 células NuFF 4 horas después de la transfección. El día 4, las células HEKn que todavía crecían en plástico ya eran confluentes. Esto las hace diferenciarse de manera terminal, por lo que los pocillos de transferencia del día 4 se eliminaron del experimento.

Tras solo 14 transfecciones diarias, muchas colonias de iPSC se hicieron evidentes, por lo que no se llevaron a cabo más transfecciones y las células se cultivaron durante 2 días más, se recogieron las colonias, se fijaron, se tiñeron para fosfatasa alcalina y se contaron.

La siguiente tabla es un resumen de los recuentos de colonias que resultan de cada tipo de mezcla de ARNm.

Sustituciones	Tratamiento con RNasa III	Tipo de mezcla	Cantidad de ARN transfectada diariamente (µg)	Número de días antes de la siembra sobre NuFF	Número de colonias de iPSC positivas en Fosfatasa alc. tras 14 transfecciones	N.º de pocillo
Sin modificar	Sí	6F KLM-NO3S	1,2	2	1	1
Sin modificar	Sí	6F KLM-NO3S	1,5	2	1	2
PseudoU (Ψ)	Sí	6F KLM-NO3S	1,2	2	1	3
PseudoU (Ψ)	Sí	6F KLM-NO3S	1,5	2	5	4
PseudoU (Ψ)	Sí	5F K3LMO3S	1,2	2	12	5
PseudoU (Ψ)	Sí	5F K3LMO3S	1,5	2	106	6
Sin modificar	Sí	6F KLM-NO3S	1,2	3	4	7
Sin modificar	Sí	6F KLM-NO3S	1,5	3	5	8
PseudoU (Ψ)	Sí	6F KLM-NO3S	1,2	3	26	9
PseudoU (Ψ)	Sí	6F KLM-NO3S	1,5	3	111	10
PseudoU (Ψ)	Sí	5F K3LMO3S	1,2	3	195	11
PseudoU (Ψ)	Sí	5F K3LMO3S	1,5	3	400+	12

Resultados del EJEMPLO 22

Las colonias positivas en fosfatasa alcalina representativas, que se observaron en todos los pocillos, se recogieron y se propagaron para una caracterización adicional de iPSC. La reprogramación de los queratinocitos neonatales humanos primarios fue reproducible y eficaz. En este ejemplo, tres fue el mejor número de transfecciones que se realizaron antes de que las células se sembraran en células alimentadoras (para este número de células queratinocíticas de partida). Se observó que se deben sembrar menos de 10^5 células HEKn en placas por cada 6 pocillos para evitar el crecimiento excesivo y la diferenciación terminal de las células diana. Si se siembran demasiadas células, las células no se resembrarían bien en las células alimentadoras. Se necesita usar más ARN y reactivo Stemfect para una alta eficiencia de reprogramación. Un total de 1,5 microgramos que comprendía todos los ARNm por pocillo fue más eficaz que 1,2 microgramos por pocillo. El uso de más ARNm codificante de KLF4 en la mezcla produjo más colonias de iPSC en menos días. Se observó la inducción de colonias de iPSC con ARNm no modificados tratados con RNasa III, pero la reprogramación fue ineficaz. Todas las colonias positivas en fosfatasa alcalina seleccionadas y propagadas de los pocillos números 2, 9 y 11 se tiñeron positivamente para los marcadores de pluripotencia inmunofluorescentes TRA1-60, SOX2, OCT4, SSEA4 y NANOG.

Ejemplo 23. REPROGRAMACIÓN LIBRE DE CÉLULAS ALIMENTADORAS USANDO ARNm NO MODIFICADOS O MODIFICADOS CON PSEUDOURIDINA CODIFICANTES DE FACTORES DE REPROGRAMACIÓN

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 23:

La reprogramación sin células alimentadoras se realizó como se ha descrito previamente usando fibroblastos BJ en la pasada 4, excepto que se realizaron 16 transfecciones consecutivas en lugar de 18 transfecciones. Las células se transfectaron con ARNm de cap1 codificante de los 5 factores de reprogramación, OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC(T58A). El ARNm usado contenía uno de los siguientes: NTP sin modificar con tratamiento de RNasa III después de la IVT, NTP sin modificar sin tratamiento con RNasa III después de la IVT o una sustitución con pseudouridina únicamente con tratamiento de RNasa III después de la IVT. El tratamiento con RNasa III de los ARNm se realizó como se ha descrito previamente. Los recuentos de colonias se realizaron el día 18 según la morfología.

Resultados del EJEMPLO 23

No se observaron colonias de iPSC cuando se usaron ARNm no modificados para la reprogramación sin el tratamiento con RNasa III de los ARNm después de la IVT. Se observaron colonias de células madre pluripotentes

inducidas en pocillos tratados con ARNm no modificados que fueron tratados con RNasa III después de la IVT. Sin embargo, se observaron más colonias cuando se sustituyó la uridina por pseudouridina en los ARNm.

Tratamiento	Número de colonias de iPSC observadas según la morfología
Sin modificar+ RNasa III	27
Sin modificar- RNasa III	0
Modificado con Ψ TP+ RNasa III	51

Ejemplo 24. Diferenciación de las colonias de iPSC reprogramadas inducidas por fibroblastos BJ usando ARNm modificados con ψ y tratados con RNasa III codificantes de factores de inducción de iPSC en medio exento de células alimentadoras

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 24

Se sometieron células de iPS reprogramadas sin células alimentadoras usando ARNm sustituido con Ψ codificante de los cinco factores de reprogramación, OCT4, SOX2, KLF4, LIN28 y cMYC al protocolo de diferenciación de cardiomiocitos como se ha descrito anteriormente. Se grabaron vídeos de los agregados pulsátiles. Los agregados pulsátiles y no pulsátiles, Se disociaron usando tripsina x10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). En resumen, se volvieron a suspender los agregados en tripsina x10, se incubaron a 37 °C durante 5 minutos y se fragmentaron usando una pipeta. La tripsina se neutralizó con medio de mantenimiento de cardiomiocitos, y las células se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos. Las células se volvieron a suspender en medio de mantenimiento de cardiomiocitos y se sembraron sobre placas de cultivo tisular de 6 pocillos previamente recubiertas con gelatina al 0,1 %. Los medios se cambiaron los siguientes 2 días. Las células se fijaron y se tiñeron para beta-tubulina de clase III, troponina T cardíaca y sox17.

Resultados del EJEMPLO 24

Se pusieron en diferenciación iPSC reprogramadas sin células alimentadoras a cardiomiocitos. Se observaron agregados pulsátiles el día 12 de la diferenciación, y se grabaron vídeos de los agregados pulsátiles. Una vez completado el protocolo de diferenciación, los agregados, tanto pulsátiles como no pulsátiles, se disociaron y se sembraron sobre gelatina para ver si las células que se originaban de las otras 2 capas germinales también se formaban a partir de estas iPSC. Las células se tiñeron positivamente para un marcador neuronal, la beta-tubulina de clase III, lo que indica el potencial de las iPSC para diferenciarse en células de origen ectodérmico. Como se muestra en la FIG. 45, también se observaron células con tinción positiva para SOX17, un factor de transcripción descubierto en células del linaje endodermo. También se observaron células con tinción positiva para la troponina T cardíaca, que es un marcador de cardiomiocitos, que tienen un origen mesodérmico. Por lo tanto, las iPSC reprogramadas sin células alimentadoras pudieron diferenciarse en células de las 3 capas germinales.

Ejemplo 25. Diferenciación directa de iPSC inducidas a partir de fibroblastos BJ usando ARNm no modificados o modificados con ψ , tratados con RNasa III o purificados por HPLC codificantes de factores de inducción de iPSC

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 25

Se mantuvieron iPSC derivadas de fibroblastos BJ en cultivo originalmente sobre células alimentadoras NUFF en medio iPS con 10 ng/ml de FGFb, luego en matriz artificial MATRIGEL en medio mTeSR como se ha descrito previamente. Se diferenciaron tres estirpes de iPSC diferentes, una de ARNm tratado con RNasa III y dos de ARNm purificado por HPLC.

ARNm tratado con RNasa III y modificado con pseudouridina

La estirpe 1 (TN4w4) se derivó de células BJ reprogramadas con ARNm modificado con pseudouridina, tratado con RNasa III (con MgOAc 1 mM) de mezcla estequiométrica molar 1:1:1:3:1 de KLM(largo)OS. La reprogramación implicó 18 transfecciones diarias de ARNm en fibroblastos BJ sembrados en células NuFF en medio Pluriton, como se ha descrito previamente. (Cabe señalar que se trata de la misma estirpe de iPSC que fue examinada por qPCR a fibroblastos BJ para comparar patrones de expresión). Se seleccionó una colonia y se expandió durante 17 pasadas, luego se congeló durante una semana, luego se cultivó y se realizaron 4 pasadas más. Se permitió la formación de colonias grandes, se desprendieron de la superficie de la matriz matrigel con dispasa y se mantuvieron en cultivo en suspensión durante 8 días en medios de iPS sin FGFb para permitir la formación de los cuerpos embrioides. Como se ha descrito anteriormente, se dispusieron luego los cuerpos embrioides en placas recubiertas de gelatina, y se dejaron que se adhirieran y diferenciaron espontáneamente en medio de iPS sin FGFb durante 7 días más. Las células se fijaron y se incubaron con anticuerpos para diversos marcadores como se ha descrito previamente. Se realizó la inmunofluorescencia y se obtuvieron imágenes de las células.

Resultados del EJEMPLO 25

Las iPSC se tiñen positivamente para los marcadores que representan las 3 capas germinales de las células. Se descubrió que las células expresaban marcadores ectodérmicos, beta-tubulina de clase III de neuronal (TUJ1), proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y cadena ligera de neurofilamento (NF-L), los marcadores mesodérmicos, actina de músculo liso alfa (SMA) y desmina, y los marcadores endodérmicos, factor de transcripción SOX17 y alfa-fetoproteína (AFP). Por lo tanto, Las mezclas de ARNm modificadas con pseudouridina, tratadas con RNasa III, cap1, con cola de poli(A) se pueden usar para generar iPSC que se diferencien en células de las 3 capas germinales.

Diferenciación de iPSC de la estirpe 2: ARNm modificado con pseudouridina y purificado por HPLC

La estirpe 2 (TN8w3) se derivó como se ha descrito anteriormente a partir de mezclas de ARNm purificados por HPLC, modificados con pseudoU, que contenían el ARNm de cMyc T58A más corto. La estirpe se ha sometido a 11 pasadas antes de que se formen cuerpos embrioides.

Como se muestra en la FIG. 47, las iPSC se tiñen positivamente para los marcadores que representan las 3 capas germinales de las células. Se descubrió que las células expresaban el marcador ectodérmico, beta-tubulina de clase III neuronal (TUJ1), los marcadores mesodérmicos, actina de músculo liso alfa (SMA) y desmina, y los marcadores endodérmicos, factor de transcripción SOX17 y alfa-fetoproteína (AFP).

Diferenciación de iPSC de la estirpe 3: ARNm modificado con pseudouridina y purificado por HPLC

La estirpe 3 (TN18w35) se derivó (como la estirpe 2) a partir de mezclas de ARNm purificados por HPLC, modificados con pseudoU, que contenían el ARNm de cMyc T58A más corto. La estirpe se ha sometido a 4 pasadas antes de que se formen cuerpos embrioides. Se trata de la estirpe más nueva, pero fue la confirmación de la reprogramación con ARNm purificado por HPLC.

Las iPSC se tiñen positivamente para los marcadores que representan las 3 capas germinales de las células. Se descubrió que las células expresaban el marcador ectodérmico beta-tubulina de clase III neuronal (TUJ1), los marcadores mesodérmicos actina de músculo liso alfa (SMA) (Fig. y desmina y los marcadores endodérmicos SOX17. Los resultados se muestran en la FIG. 48.

Ejemplo 26. Uso de ARNm que contienen pseudouridina monocatenaria codificantes de factores de inducción de iPSC para la reprogramación exenta de células alimentadoras de células somáticas humanas a células iPS en placas de cultivo tisular que se recubrieron previamente con vitronectina XF o que no se recubrieron con vitronectina o cualquier otra matriz extracelular o sustrato biológico

RNA modificado con pseudouridina codificante de los factores de reprogramación SOX2, KLF4, LIN28, OCT4 y cMYC(T58A) se transcribieron *in vitro*-, se trataron con RNasa III con acetato de magnesio 2 mM, y luego se protegieron enzimáticamente con caperuza y se añadió cola de poli(A), todo como se ha descrito previamente.

Para la reprogramación sin células alimentadoras en placas recubiertas de Vitronectin XF, se recubrieron multiplacas sin tratar Nunc de Thermo Scientific (Fisher Scientific, catálogo n.º 12-566-80, Thermo Scientific n.º 150239), con Vitronectin XF™ (Primorigen Biosciences, Inc. Madison, WI, EUA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubaron a 37 °C al menos 3 horas antes de sembrar las células.

Para la reprogramación sin células alimentadoras directamente en placas sin recubrimiento (por ejemplo, sin recubrimiento de vitronectina o cualquier otra matriz extracelular o sustrato biológico), se usaron multiplacas tratadas con delta Nunc de Thermo Scientific (Fisher Scientific, n.º de catálogo 14-832-11; Thermo Scientific n.º 140675); este producto figura como "Nunc delta treated", que el proveedor describe como "no recubierto con ningún reactivo químico", sino "una modificación de la superficie que mejora la unión de las células y el crecimiento de las estirpes celulares adherentes".

Se sembraron fibroblastos BJ en cualquiera de las placas de cultivo tisular recubiertas con vitronectina XF o de las placas de cultivo tisular sin vitronectina o cualquier otro recubrimiento a 1×10^5 o 5×10^4 células por pocillo en un medio esencial mínimo (MEM) útil para el crecimiento de fibroblastos que comprendía: MEM avanzado (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) suplementado con FBS al 10 % (Fisher Scientific), GLUTAMAX™-I 2 mM (Invitrogen) y antibióticos de penicilina-estreptomina, y se incubaron durante una noche a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Al día siguiente, el medio se reemplazó por un medio de reprogramación sin células alimentadoras desarrollado por los presentes solicitantes que consistía en medio de Eagle modificado por Dulbecco con mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12; (DMEM/F12; Invitrogen) complementado con sustitución de suero KNOCKOUT™ al 20 % (Invitrogen), GLUTAMAX™-I 2 mM (Invitrogen), solución de aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Invitrogen), 8 micromolar del inhibidor del factor de crecimiento transformante β (TGF β) STEMOLECULE™ SB431542 (Stemgent®, Cambridge, MA, EE.UU.), inhibidor de la vía de señalización de MEK 0,5 micromolar STEMOLECULE™ PD0325901 (Stemgent), y 100 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante (FGFb; Invitrogen) con antibióticos de penicilina-estreptomina. El medio se reemplazó diariamente antes de la transfección de los ARNm de reprogramación usando el reactivo de transfección ARNiMAX (Invitrogen). Se preparó un complejo de ARNm/ARNiMAX en medio de suero reducido Opti-MEM1 (Invitrogen) por separado para cada pocillo que contenía

células que se iban a reprogramar: En resumen, se añadió la mezcla de reprogramación de ARNm de un pocillo de una placa a una primera alícuota de 60 microlitros de medio de suero reducido Opti-MEM1; luego esta primera alícuota que contenía ARNm se combinó con una segunda alícuota de 60 microlitros de medio de suero reducido Opti-MEM1 que contenía 5 microlitros de reactivo de transfección de ARNiMAX por cada microgramo de ARNm añadido; y finalmente, este complejo de ARNm/ARNiMAX en medio de suero reducido Opti-MEM1 se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se añadió gota a gota a las células en el pocillo. Una vez que se añadió la mezcla de medio/ARNm/ARNiMAX a todos los pocillos, se incubaron las placas durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Para la reprogramación sin células alimentadoras en placas recubiertas de Vitronectin XF, las células se transfectaron de esta forma durante 21 días consecutivos. Para la reprogramación exenta de células alimentadoras de células de placas que no se recubrieron previamente con vitronectina u otra matriz extracelular u otro sustrato biológico, las células se transfectaron de esta forma durante 18 días consecutivos. Tras la última transfección, las células se mantuvieron en medio de mantenimiento de iPSC hasta que las colonias fueron lo suficientemente grandes como para recogerlas.

Varios días después de la última transfección, se contó el número de colonias que presentaban la morfología característica de las colonias de iPS en los pocillos de cada tipo de placa usando los protocolos de tratamiento anteriores (es decir, en los pocillos de las placas recubiertas con Vitronectina XF y en los pocillos de las placas no recubiertas previamente con vitronectina u otra matriz extracelular u otro sustrato biológico), y luego se recogieron manualmente las colonias de iPSC representativas de cada tipo de tratamiento y protocolo, y se cultivaron en la mitad de mTESR/la mitad de medio de mantenimiento de iPSC en placas recubiertas con Vitronectin XF™ (Primorigen Biosciences, Inc.) para generar estirpes de células iPSC para su posterior caracterización. Entonces, se transicionaron las supuestas estirpes de células iPS y se mantuvieron en Vitronectin XF en medio mTESR™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). Una vez expandidas, estas estirpes se caracterizaron por tinción de marcadores de pluripotencia y usándolas en el protocolo de diferenciación espontánea de cuerpos embrioides, como se ha descrito previamente.

Resultados de la reprogramación sin células alimentadoras de fibroblastos BJ a células iPS

Se observó a simple vista la formación de colonias características de las células iPS después de 17 transfecciones, tanto en las placas recubiertas con vitronectina XF como en las placas que no se habían recubierto con vitronectina u otra matriz extracelular u otro sustrato biológico.

Las siguientes tablas muestran el número de colonias de iPSC inducidas en los pocillos para cada tipo de placa y protocolo de tratamiento.

Número de colonias de iPSC reprogramadas sobre placas recubiertas con Vitronectina XF exentas de células alimentadoras

Densidad de células sembradas	Dosis de ARNm (µg/pocillo/día)	N.º de colonias de iPSC observadas
1x10 ⁵	Simulación (sin ARN)	0
1 x 10 ⁵	1,0	31
1 x 10 ⁵	1,2	48
5 x 10 ⁴	Simulación (sin ARN)	0
5 x 10 ⁴	1,0	17
5 x 10 ⁴	1,2	18

Número de colonias de iPSC inducidas directamente en multiplacas de cultivo de células Nunc tratadas que se recubrieron con una matriz extracelular u otro sustrato biológico

Densidad de células sembradas	Dosis de ARNm (µg/pocillo/día)	N.º de colonias de iPSC observadas
1 x 10 ⁵	Simulación (sin ARN)	0
1 x 10 ⁵	0,8	11
1 x 10 ⁵	1,0	3
1 x 10 ⁵	1,2	0
1 x 10 ⁵	1,4	1
5 x 10 ⁴	Simulación (sin ARN)	0
5 x 10 ⁴	0,8	3
5 x 10 ⁴	1,0	1
5 x 10 ⁴	1,2	1
5 x 10 ⁴	1,4	2

Las estirpes celulares representativas tanto de placas recubiertas con Vitronectin XF como de placas no recubiertas con vitronectina u otra matriz extracelular u otro sustrato biológico se tiñeron positivamente para los marcadores de

pluripotencia OCT4, NANOG, TRA-1-60, SSEA4 y SOX2, y cuando se sometieron al protocolo de diferenciación espontánea de cuerpos embrioides, las células de estas estirpes celulares se diferenciaron espontáneamente en células de las 3 capas germinales, como se muestra mediante tinción inmunofluorescente positiva para marcadores específicos de células de cada capa germinal, incluyendo para SOX17 (endodermo), DESMINA (mesodermo) y BETA-III tubulina (ectodermo).

Como se ha descrito anteriormente, estos experimentos ilustrativos demostraron además realizaciones de la presente invención, en las que dicha introducción de ARNm modificado que comprende ARNm que contiene pseudouridina codificantes de factores de inducción de iPSC indujeron la reprogramación de células de mamíferos que presentaban un primer estado diferenciado o fenotipo (en este caso, células somáticas que comprenden fibroblastos BJ humanos) a células que presentaron un segundo estado de diferenciación o fenotipo (en este caso, células iPS). Es más, en dicha realización particular, dicha reprogramación se produjo en ausencia de cualquier inhibidor o agente que redujera la expresión o actividad de una vía de respuesta inmune innata (por ejemplo, la proteína B18R no estaba presente antes, durante o después de dicha introducción del ARNm que contenía pseudouridina en dichas células).

Otra realización de la presente invención es un medio de reprogramación libre de alimentador que consiste en medio Eagle modificado de Dulbecco con mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12; Invitrogen) complementado con sustitución de suero KNOCKOUT™ al 20 % (Invitrogen), GLUTAMAX™-I 2 mM (Invitrogen), solución de aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Invitrogen) e inhibidor de la vía de señalización de MEK 0,5-15 micromolar STEMOLECULE™ PD0325901 (Stemgent). En algunas realizaciones, el medio de reprogramación libre de células alimentadoras comprende además el inhibidor del factor de crecimiento transformante β (TGF β) STEMOLECULE™ SB431542 (Stemgent®, Cambridge, MA, EE.UU.). En algunas realizaciones, el medio de reprogramación libre de células alimentadoras comprende además 100 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos recombinante humano básico (FGFb; Invitrogen). En algunas realizaciones, el medio de reprogramación libre de alimentador comprende además antibióticos de penicilina y estreptomina.

Ejemplo 27. Estudios adicionales sobre las capacidades de los ARNm no modificados y modificados con pseudouridina que tienen diferentes caperuzas para reprogramar células somáticas a iPSC con o sin tratamiento de RNasa III o purificación por HPLC

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 27

Síntesis de ARNm para la reprogramación

Se sintetizaron los ARNm que se denominan solo "CAP0 O CAP1" sin designación adicional de un análogo de caperuza dinucleotídico mediante transcripción *in vitro* (IVT) de moldes de ADN codificantes de los 5 factores de reprogramación (KLM_{T58A}OS) como se ha descrito en el Sistema de producción de ARNm convencional T7 mScript™ (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.) para el ARNm sin modificar (GAUC). Se sintetizó de manera similar ARNm modificado con pseudouridina (ψ) mediante IVT, excepto con pseudouridin-5'-trifosfato (ψ TP) en lugar de UTP. A continuación, los ARNm de IVT se protegieron con caperuza tras la transcripción a CAPO usando la enzima de protección con caperuza SCRIPTCAP™ o a CAP1 usando la enzima de protección con caperuza SCRIPTCAP™ y ARN 2'-O-metiltransferasa SCRIPTCAP™, como se ha descrito en el sistema de producción de ARNm convencional T7 mScript™, o como se ha descrito para la enzima de protección con caperuza SCRIPTCAP™ separada y/o productos de ARN 2'-O-metiltransferasa SCRIPTCAP™ (CELLSCRIPT, INC.). Para los ARNm protegidos con los análogos de caperuza dinucleotídicos β -S-ARCA D1 o β -S-ARCA D2, también denominados en el presente documento específicamente D1 o D2 tio-ARCA, o tio-ARCA en general (Grudzien-Nogalska E y col., 2007; Kowalska, J y col., 2008), los ARNm se crearon mediante protección con caperuza durante la transcripción mediante la inclusión del análogo de caperuza dinucleotídico respectivo en la reacción de IVT en una proporción molar de 4 a 1 con GTP, a concentraciones como las descritas en el kit de transcripción MessageMAX™ T 7 ARCA-Capped Message (CELLSCRIPT, INC. N.º de cat. C-MMA60710), a excepción del uso de la respectiva caperuza dinucleotídica β S-ARCA D1 o D2 en lugar de ARCA proporcionado en el kit. Se formaron colas en todos los ARNm enzimáticamente usando Poli-A polimerasa A-PLUS™ (CELLSCRIPT, INC., N.º de catálogo C-PAP5104H) para generar una cola de poli-A de ~150 nt, según lo descrito por el fabricante. Los ARN se trataron usando el tratamiento con RNasa III desvelado en el presente documento en presencia de acetato de magnesio 2 mM. Ciertos ARNm modificados con pseudouridina de CAP1 fueron purificados por HPLC por el Dr. Drew Weissman y el Dr. Katalin Kariko de RNARx LLC (Wayne, PA) usando HPLC como se ha descrito (Kariko y col., 2011).

Reprogramación con mezclas de ARNm no modificadas GAUC

Se prepararon mezclas de reprogramación de ARNm de cinco factores (KLM_{T58A}OS) codificantes de KLF4 (K), LIN28 (L), cMYC(T58A) (MT58A), OCT4 (O) y SOX2 (S) a una proporción molar de 1:1:1:3:1, y se completaron 1,2 microgramos de cada mezcla de ARNm con 4,8 microlitros de reactivo de transfección STEMFECTION™ (Stemgent), y se transfectaron diariamente en 10⁴ fibroblastos BJ (pasada 5) sembrados en placas en 4 x 10⁵ células NuFF. No se usó ningún inhibidor de la vía de respuesta inmune innata (por ejemplo, Proteína B18R) para la reprogramación en los experimentos aquí presentados. En algunos casos, se añadió ácido valproico 2 mM; sin embargo, estos experimentos no se describirán más, ya que todas las células tratadas con ácido valproico murieron. Las células

fueron transfectadas con mezclas de reprogramación de ARNm de GAUC sin modificar para 18 transfecciones diarias, tras lo que las células se cultivaron durante 2 días más, se recogieron unas cuantas colonias para la expansión y el resto se tiñó para detectar la actividad de fosfatasa alcalina, que es indicativa de las iPSC, y se contaron las colonias positivas en fosfatasa alcalina. Se transfectaron células reprogramadas usando mezclas de reprogramación de ARNm de GA ψ C modificado con pseudouridina solo durante 15 transfecciones diarias, y en algunos casos, se transfectaron 1,0, 1,2 o 1,4 microgramos de cada mezcla de reprogramación de ARNm de GA ψ C modificado con pseudouridina con 4, 4,8 o 5,6 microlitros de reactivo de transfección STEMFECT, respectivamente. Las otras etapas del procedimiento de reprogramación usando mezclas de reprogramación de ARNm de GA ψ C modificado con pseudouridina fueron como se ha descrito para el ARNm GAUC no modificado.

Resultados del EJEMPLO 27

Comparación de la inducción de iPSC usando mezclas de reprogramación de ARNm de KLMO₃S, CAP1, modificado con pseudouridina purificado por HPLC frente a tratado con RNasa III

Procedimiento de Purificación o de tratamiento	Microgramos de mezcla de reprogramación de ARNm transfectados al día	Observaciones	N.º de colonias positivas en fosfatasa alcalina
Ninguno	1,2	CÉLULAS MUERTAS	0
HPLC	1,0		148
HPLC	1,2	DPCE	400+
HPLC	1,4	DPCE	400+
RNasa III	1,0		149
RNasa III	1,2	DPCE	400+
RNasa III	1,4	DPCE	400+

DPCE = Demasiadas colonias para contarlas con exactitud.

Los resultados anteriores muestran que las mezclas de reprogramación de ARNm que comprenden ARNm modificados con pseudouridina eran altamente tóxicas para las células en las que se transfectaron diariamente durante 15 días. Sin embargo, cuando las mismas mezclas de reprogramación de ARNm se purificaron por HPLC o se trataron usando los procedimientos de tratamiento con RNasa III descritos en el presente documento, las células sobrevivieron y se indujeron células iPSC. El hecho de que los números de colonias positivas en fosfatasa alcalina, que es indicativo de células iPS, fueran casi idénticos para los pocillos transfectados con los ARNm de reprogramación purificados por HPLC y tratados con RNasa III (por ejemplo, 148 colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina inducidas usando 1,0 microgramo por pocillo de mezcla de reprogramación preparada usando ARNm purificados por HPLC frente a 149 colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina inducidas usando 1,0 microgramo por pocillo de mezcla de reprogramación preparada usando los mismos lotes de ARNm que se trataron usando los procedimientos de tratamiento con RNasa III descritos en el presente documento) indica con fuerza que el ARN bicatenario es el principal contaminante de ARN que produce la muerte celular y la incapacidad para reprogramar células somáticas usando mezclas de reprogramación de ARNm que comprenden ARNm que no han sido purificados por HPLC ni tratados con RNasa III. En vista de la eficacia de los procedimientos de tratamiento con RNasa III descritos en el presente documento equivalente a la purificación por HPLC en la eliminación de moléculas de ARN bicatenarias contaminantes del ARNm, otros beneficios importantes del presente procedimiento de tratamiento con RNasa III lo hacen ventajoso con respecto a la purificación por HPLC.

Reprogramación de células somáticas a células iPS usando ARNm GAUC no modificados sintetizados *in vitro* codificantes de factores de reprogramación KLMO₃S y que comprenden caperuzas tio sintetizadas durante la transcripción o caperuzas Cap0 o cap1 sintetizadas enzimáticamente tras la transcripción

Tipo de caperuza	Mezcla de NTP	Sometido al tratamiento con RNasa III	Observaciones	N.º de colonias positivas en fosfatasa alcalina
Control sin ARN	Ninguno	NO	Sin toxicidad significativa	0
β -S-ARCA	GAUC	NO	Células muertas	0
D1 β -S-ARCA D2	GAUC	NO	Células muertas	0
CAP0	GAUC	SÍ		4
CAP1	GAUC	SÍ		289

Los resultados anteriores mostraron que las mezclas de reprogramación de ARNm que comprenden ARNm no

modificados eran altamente tóxicas para las células en las que se transfectaron diariamente durante 18 días. Sin embargo, cuando las mismas mezclas de reprogramación de ARNm se trataron usando el tratamiento de RNasa III con Mg^{2+} 2 mM, las células sobrevivieron y se indujeron células iPSC. Los resultados demostraron además que las mezclas de reprogramación de ARNm que comprenden ARNm de GAUC sin modificar que presentan una estructura CAP1 eran mucho más eficaces para la reprogramación de células somáticas a células iPS que los ARNm no modificados (GAUC) que presentan una estructura CAP1. Por lo tanto, en realizaciones preferidas de los procedimientos de reprogramación, las composiciones y los kits de la invención que comprenden mezclas de reprogramación de ARNm que comprenden ARNm no modificados, los ARNm sin modificar presentan una estructura CAP1.

10 **Ejemplo 28. Efectos del ARN bicatenario modificado con pseudouridina (GA ψ C) o no modificado (GAUC) en la reprogramación de fibroblastos BJ humanos a células iPS usando GA ψ C tratado con RNasa III, Cap1, cola Poli(A) de ARNm GAUC codificantes de factores de reprogramación KLM_{OS}**

Visión global

Los resultados previos, incluyendo los descritos en el EJEMPLO 27, mostraron la equivalencia de los procedimientos de tratamiento con RNasa III (por ejemplo, usando Mg^{2+} aproximadamente 2 mM) con la HPLC para la eliminación de contaminantes ARN bicatenario a partir de mezclas de reprogramación de ARNm (por ejemplo, se indujeron 148 colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina usando 1,0 microgramos por pocillo de mezcla de reprogramación hecha usando ARNm de KLM_(T58A)OS₃S, CAP1, modificados con pseudouridina y purificados por HPLC, frente a 149 colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina inducidas usando 1,0 microgramos por pocillo de una mezcla de reprogramación hecha usando los mismos lotes de ARNm que se trataron usando los procedimientos de tratamiento con RNasa III descritos en el presente documento). Dado que aproximadamente todos los contaminantes de ARN bicatenario se eliminan usando estos procedimientos, los presentes investigadores vieron esto como una oportunidad para analizar los niveles de ARN bicatenario contaminante que producirían toxicidad y que reducirían o inhibirían la reprogramación, tal como la reprogramación de células somáticas humanas o de mamífero a células iPS. Volviendo a añadir diferentes cantidades conocidas de ARN bicatenario a las mezclas de reprogramación de ARNm. Para evitar un efecto biológico (por ejemplo, un efecto biológico debido a la interferencia del ARN), el ARN bicatenario escogido para su adición a las mezclas de reprogramación de ARNm fue un ARN bicatenario fabricado usando un molde de ADN que no estaba presente en las células en las que se iban a introducir las mezclas de reprogramación de ARNm; un gen de luciferasa de luciérnaga de 1,67 kb (luc2), que no parecía estar presente en las células humanas, se escogió como molde para fabricar el ARN bicatenario con este fin. Tras fabricar el ARN bicatenario con luc2 mediante IVT, se añadieron diversas cantidades del ARN bicatenario con luc2 de 1,6 kb a mezclas de reprogramación de ARNm que comprendían ARNm que se trataron usando el procedimiento de tratamiento de RNasa III con Mg^{2+} 2 mM antes de que se añadiera el reactivo de transfección; en pocillos separados de placas de 6 pocillos, se añadió ARN bicatenario de luc2 modificado con pseudouridina (GA ψ C) o no modificado (GAUC) a una mezcla de reprogramación que comprendía bien ARNm KLM_(T58A)OS₃S, CAP1, modificados con pseudouridina (GA ψ C) y tratados con RNasa III o ARNm KLM_(T58A)OS₃S, CAP1, no modificados (GAUC) tratados con RNasa III para tratar de descubrir cualquier diferencia entre la reacción de las células al ARN bicatenario y la reacción de las células al ARNm modificado con pseudouridina frente al no modificado.

Sumario del protocolo

40 Excepto por los controles, todos los ARNm de las mezclas de reprogramación de ARNm se trataron usando el procedimiento de tratamiento con RNasa III con Mg^{2+} 2 mM.

Todos los ARNm se protegieron con caperuza después de la transcripción usando el sistema enzimático de protección con caperuza SCRIPTCAP[™] y la ARN 2'-O-metiltransferasa SCRIPTCAP[™] para CAP1.

Todos los ARNm recibieron una cola de poli-A con ~150 A usando polimerasa A-PLUS[™] poli-A.

45 Dos mezclas de reprogramación de ARNm diferentes: una que comprende ARNm no modificados (GAUC) y una que comprende ARNm modificados con pseudouridina (GA ψ C).

Se usaron mezclas de reprogramación de ARNm de 5 factores codificantes de KLM_(T58A)OS en una proporción molar de 1:1:1:3:1; K = KLF4; L = LIN28; M_(T58A) = cMYC(T58A); O = OCT4; S = SOX2.

50 Las células se transfectaron con mezclas de reprogramación de ARNm diariamente con un total de 1,2 microgramos de ARNm codificante de los 5 factores proteicos (KLM_(T58A)OS) por pocillo durante 14 días para ARNm con GA ψ C o durante 18 días para ARNm GAUC. Las cantidades indicadas de ARN bicatenario de luc2 se combinaron con la mezcla de reprogramación de ARNm antes de complejarse con el reactivo de transfección STEMFECTION[™], y luego se añadió el complejo reactivo de ARNm/ARN bicatenario/transfección al medio como se ha descrito.

Materiales y procedimientos para el EJEMPLO 28

55 **Síntesis de ARN bicatenario de luc2**

Se produjeron ARN bicatenarios tanto modificados con pseudouridina GA ψ C como sin modificar GAUC que comprendían ARN monocatenario codificante y no codificante para una forma diseñada por ingeniería genética del gen de la luciferasa de la luciérnaga (*Photinus pyralis*) designado "luc2" (~1,67 Kbp) de la siguiente manera: Se generaron dos moldes de ADN lineales para la transcripción *in vitro* separada de ARN monocatenarios codificantes y no codificantes mediante linealización con endonucleasa de restricción de un plásmido pGL4.19 [luc2-Neo] (Promega, Madison, WI, EE.UU.) que se modificó mediante PCR para introducir promotores de la ARN polimerasa T7 y T3, respectivamente. Cada cadena de ARN monocatenario codificante o no codificante se sintetizó por separado mediante transcripción *in vitro* de un molde de ADN de luc2 lineal usando ARN polimerasa de T7 o ARN polimerasa de T3, tal como con un kit de transcripción de ARN con Ψ INCOGNITO™ T7 disponible en el mercado (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.) para fabricar ARN GA ψ C, o un kit de transcripción T7-FLASHSCRIBE™ o un kit de IVT de ARN convencional T7-SCRIBF™ para fabricar ARN GAUC (CELLSCRIPT), o kits internos similares que contenían la ARN polimerasa de T3. El ARN bicatenario de luc2 de luciérnaga no estaba protegido con caperuza ni tenía cola. Se volvió a suspender cada ARN monocatenario codificante o no codificante por separado en T₁₀E1, se combinó en cantidades iguales, se hibridó a 94 °C durante 2 minutos, a 70 °C durante 10 minutos y luego se enfrió lentamente hasta la temperatura ambiente en un vaso de precipitados con agua. Se prepararon diariamente diluciones de ARN bicatenario nuevas en agua debido a las cantidades extremadamente bajas de ARN bicatenario de luc2 añadidas a las mezclas de reprogramación de ARNm. La cantidad de ARN bicatenario de luc2 añadida para cada tratamiento diario y el ARN bicatenario añadido como un porcentaje de la cantidad total de ARN transfectada al día se enumeran en la siguiente tabla.

Protocolo de reprogramación

Como en los experimentos previos, se sembraron 10⁴ fibroblastos BJ (pasada 6) en NUFF, y el medio se cambió a medio PLURITON de Stemgent (con suplemento y pen/estrep) con inhibidor de RNasa añadido a 0,5 U/ml de medio. El reactivo de transfección STEMFECTION se usó como se ha descrito previamente. En resumen, se añadieron 1,2 microgramos de la mezcla de reprogramación de ARNm apropiada al tampón STEMFECTION con cantidades variadas de ARN bicatenario modificado con pseudouridina o no modificado. El reactivo de transfección STEMFECTION se diluyó por separado en tampón de transfección STEMFECTION; las dos mezclas se combinaron y se incubaron a TA durante 15 minutos. Entonces, se añadió la mezcla gota a gota a las células que estaban en 2 ml de medio de reprogramación PLURITON/pocillo. El medio se cambió diariamente antes de la transfección. Las células transfectadas con mezclas de reprogramación de ARNm modificados con pseudouridina se transfectaron diariamente durante un total de 14 veces. Las células transfectadas con mezclas de reprogramación de ARNm de GAUC sin modificar se transfectaron 18 veces. Las observaciones sobre la salud y la morfología de las células se realizaron mientras duró el experimento de 20 días. Se dejó que las células formaran colonias de iPSC durante 1 - 2 días después de las transfecciones antes de que las células se puntuaran en cuanto a la morfología de las colonias adecuada, y se tiñeron para la enumeración de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina.

Descripción general del experimento y del recuento final de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina

N.º de pocillo	ARN bicatenario como % del ARN total transfectado (%)	Tipo de ARN bicatenario de Luc2 FF/ Tipo de ARNm de reprogramación*	Cantidad de ARNm de reprogramación por pocillo (microgramos)	Cantidad de ARN bicatenario por pocillo (nanogramos)	N.º final de colonias positivas en fosfatasa alcalina+
1	0	Ninguno/Ninguno	0	0	0
6	0	Ninguno/U	1,2	0	234
7/8	2,5	U/U	1,2	31	0
9/10	0,5	U/U	1,2	6	0
11/12	0,1	U/U	1,2	1,2	0
13/14	0,05	U/U	1,2	0,6	0
15/16	0,02	U/U	1,2	0,24	0
17/18	0,01	U/U	1,2	0,12	0
19/20	0,008	U/U	1,2	0,096	0
21/22	0,004	U/U	1,2	0,048	0
23/24	0,0008	U/U	1,2	,0096	1/0
25/26	0,00016	U/U	1,2	,00192	50/38
27	0	Ninguno/ Ψ	1,2	0	400+
28	2,5	Ψ / Ψ	1,2	30	0
29	0,5	Ψ / Ψ	1,2	6	0

(continuación)

N.º de pocillo	ARN bicatenario como % del ARN total transfectado (%)	Tipo de ARN bicatenario de Luc2 FF/ Tipo de ARNm de reprogramación*	Cantidad de ARNm de reprogramación por pocillo (microgramos)	Cantidad de ARN bicatenario por pocillo (nanogramos)	N.º final de colonias positivas en fosfatasa alcalina+
30	0,1	Ψ/Ψ	1,2	1,2	0
31	0,05	Ψ/Ψ	1,2	0,6	0
32	0,02	Ψ/Ψ	1,2	0,24	0
33	0,01	Ψ/Ψ	1,2	0,12	0
34	0,008	Ψ/Ψ	1,2	0,096	2
35	0,004	Ψ/Ψ	1,2	0,048	5
36	0,0008	Ψ/Ψ	1,2	,0096	400+
37	0,00016	Ψ/Ψ	1,2	,00192	400+
38	0	Ninguno/Ψ	1,2	0	400+
39	2,5	U/Ψ	1,2	30	0
40	0,5	U/Ψ	1,2	6	0
41	0,1	U/Ψ	1,2	1,2	0
42	0,05	U/Ψ	1,2	0,6	0
43	0,02	U/Ψ	1,2	0,24	0
44	0,01	U/Ψ	1,2	0,12	0
45	0,008	U/Ψ	1,2	0,096	0
46	0,004	U/Ψ	1,2	0,048	0
47	0,0008	U/Ψ	1,2	,0096	15
48	0,00016	U/Ψ	1,2	,00192	400+
2/3	0,1	U/Ninguno	0	1,2	0
4/5	0,004	Ψ/Ninguno	0	0,048	0

*U = ARN de GAUC sin modificar, Ψ = ARN de GAΨC modificado con pseudouridina;
 + 400+ = hay más de 400 colonias, demasiadas para contarlas con exactitud.

Resultados y observaciones para el EJEMPLO 28

Antecedentes e introducción.

- Los presentes inventores determinaron en los experimentos anteriores (por ejemplo, como los de los otros ejemplos anteriores) que no se indujeron colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina cuando mediante fibroblastos BJ o queratinocitos se transfectaron repetidamente con mezclas de reprogramación de ARNm que comprendían ARNm GAΨC CAP1 modificado con pseudouridina o ARNm GAUC codificantes de KLM_(T58A)O₃S a menos que los contaminantes de ARN bicatenario que surgían durante la transcripción *in vitro* se eliminan usando un procedimiento tal como HPLC o el procedimiento de tratamiento con RNasa III descrito en el presente documento.
- Aún más, demostraron en el EJEMPLO 27 que las mezclas de reprogramación de ARNm que comprenden ARNm de CAP1 modificados con pseudouridina que se trataron con el procedimiento de tratamiento con RNasa III con Mg²⁺ 2 mM, como se ha descrito anteriormente, dieron lugar a la reprogramación de casi el mismo número de fibroblastos BJ a colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina que la misma cantidad de la misma mezcla de reprogramación de ARNm que comprendía los mismos ARNm excepto que se purificaron usando HPLC. Esto demostró que el ARN bicatenario era el principal contaminante que inhibía la reprogramación y que los procedimientos de tratamiento con RNasa III descritos en el presente documento eran tan eficaces como la HPLC en la eliminación de las moléculas de ARN bicatenario contaminantes. Por lo tanto, todas las mezclas de reprogramación de ARNm codificantes de KLM_(T58A)O₃S usadas en este EJEMPLO 28, incluyendo tanto las que comprenden ARNm de GAΨC modificado con pseudouridina de CAP1 como las que comprenden ARNm GAUC sin modificar de CAP1, se trataron mediante tratamiento con RNasa III en presencia de Mg²⁺ 2 mM como se ha descrito en el presente documento.

En ausencia de ARN bicatenario añadido, las mezclas de ARNm de reprogramación GAΨC o GAUC tratadas con RNasa III reprogramaron eficazmente los fibroblastos BJ a células iPS

Como se muestra en la tabla anterior, todas las mezclas de reprogramación de ARNm que comprenden ARNm que

se trataron con la RNasa III indujeron grandes cantidades de colonias de iPSC positivas en fosfatasa alcalina cuando no se añadió ARN bicatenario a las mezclas de reprogramación de ARNm. Por lo tanto, los ARNm de reprogramación de GAΨC indujeron > 400 colonias de iPSC por pocillo (pocillos 27 y 38), que eran "demasiado numerosa para contarse con exactitud", y los ARNm de reprogramación GAUC indujeron 234 colonias de iPSC (pocillo 6). Como se descubrió en los experimentos previos, el número de colonias de iPSC inducidas por los ARNm de reprogramación de GAUC sin modificar solo fue aproximadamente la mitad de los números de y tardaron más en formar colonias en comparación con las inducidas por los ARNm de reprogramación de GAΨC modificados. No se indujeron colonias en los pocillos de control que carecían de ARNm de reprogramación (pocillos 1-5).

La adición de ARN bicatenario a mezclas de ARNm de reprogramación GAΨC o GAUC tratados con RNasa III aumentó la toxicidad celular y redujo la capacidad de reprogramación de iPSC

Los solicitantes se sorprendieron por los niveles inesperadamente bajos de ARN bicatenario que eran tóxicos para los fibroblastos BJ y las células alimentadoras y por los niveles aún más bajos de ARN bicatenario que se requerían para reprogramar con éxito los fibroblastos BJ a células iPS.

Por ejemplo, con respecto a la toxicidad, se descubrió que la adición de ARN bicatenario a las mezclas de reprogramación de ARNm a un nivel del 0,01 % o más de la masa total de ARN añadida era tóxica para las células, ya estuvieran el ARN bicatenario o las mezclas de reprogramación de ARNm, o ambos. Compuestos de ARN modificado con GAΨC o ARN de GAUC no modificado. Por lo tanto, todas las células estaban muertas el día 6 de los tratamientos si se añadía más de 1 ng de ARN bicatenario con la mezcla de reprogramación de 1,2 microgramos por pocillo al día de ARNm (es decir, en la que el ARN bicatenario era del 0,1 % o más del ARN total añadido). Todas las células estaban muertas el día 10 cuando se añadieron más de 240 pg de ARN bicatenario con 1,2 microgramos por pocillo al día de mezcla de reprogramación de ARNm (es decir, en la que el ARN bicatenario era el 0,02 % o más de la masa total de ARN añadida por pocillo). Aún más, las células estaban muertas hacia la decimotercera transfección cuando se añadían más de 120 pg de ARN bicatenario con la mezcla de reprogramación de 1,2 microgramos por pocillo al día de mezcla de reprogramación de ARNm (en la que el ARN bicatenario era el 0,01 % o más de la masa total de ARN añadida por pocillo).

Sorprendente e inesperadamente, era necesario reducir mucho más el nivel de ARN bicatenario añadido a la mezcla de reprogramación de ARNm para reprogramar con éxito los fibroblastos BJ a células iPS durante el protocolo de reprogramación de iPSC de 14 a 18 días.

Por ejemplo, en algunas realizaciones del procedimiento de reprogramación de la presente invención en el que se introduce una mezcla de reprogramación de ARNm que comprende ARNm GAΨC modificado con pseudouridina tratado con RNasa III codificante de uno o más factores de reprogramación de forma repetida o continua (por ejemplo, se transfecta) en una célula que presenta un primer estado de diferenciación (por ejemplo, una célula somática, por ejemplo, un fibroblasto o queratinocito) en condiciones en las que la célula presenta un segundo estado de diferenciación (por ejemplo, un estado desdiferenciado, un estado transdiferenciado o un estado diferenciado); por ejemplo, un estado de diferenciación de iPSC), la cantidad de moléculas contaminantes de ARN bicatenario en la mezcla de reprogramación de ARNm usada para dicha introducción en la célula que presenta el primer estado de diferenciación es inferior al aproximadamente 0,01 % (y preferentemente inferior al aproximadamente 0,001 %) del ARN total usado para dicha introducción. Por ejemplo, cuando se transfectaron fibroblastos BJ con ARN bicatenario GAΨC modificado con pseudouridina añadido a una mezcla de reprogramación de ARNm que comprendía ARNm GAΨC modificados con pseudouridina tratados con RNasa III, as iPSC no se indujeron hasta que la cantidad de ARN bicatenario fue del 0,008 % o inferior de la masa total de ARN por pocillo. Incluso a ese nivel de ARN bicatenario, solo se indujeron dos colonias de iPSC (Pocillo 34) en presencia de 96 pg de ARN bicatenario con 1,2 microgramos por pocillo al día de mezcla de reprogramación de ARNm (es decir, en la que el ARN bicatenario era el 0,008% o más de la masa total de ARN añadida por pocillo). Aún más, solo se indujeron 5 colonias de iPSC (Pocillo 35) en presencia de 48 pg de ARN bicatenario con 1,2 microgramos por pocillo al día de mezcla de reprogramación de ARNm (es decir, en la que el ARN bicatenario era el 0,004% o más de la masa total de ARN añadida por pocillo). Cuando se añadieron 1,92 pg de ARN bicatenario GAΨC con 1,2 microgramos por pocillo al día de mezcla de reprogramación de ARNm (es decir, en la que el ARN bicatenario era el 0,0008% o más de la masa total de ARN añadida por pocillo), no se observó inhibición de la inducción de iPSC para la mezcla de reprogramación de ARNm que comprendía ARNm GAΨC modificados (pocillo 36).

Solo se indujo 1 colonia de iPSC en uno de los pocillos (Pocillos 23 y 24) transfectados con 9,6 pg de ARN bicatenario con 1,2 microgramos por pocillo al día de mezcla de reprogramación de ARNm (es decir, en la que el ARN bicatenario era el 0,0008% o más de la masa total de ARN añadida por pocillo). Se indujeron más colonias de iPSC (50 y 38 colonias en los pocillos 25 y 26) con solo 1,92 pg de ARN bicatenario con 1,2 microgramos por pocillo al día de mezcla de reprogramación de ARNm (es decir, en la que el ARN bicatenario era el 0,00016% o más de la masa total de ARN añadida por pocillo), pero incluso esta pequeña cantidad del ARN bicatenario de ~1,67 Kbp disminuyó el número de colonias viables de iPSC reprogramadas en aproximadamente un 80 % en comparación con el número de colonias de iPSC inducidas cuando no se añadió ARN bicatenario a la mezcla de reprogramación de ARNm (234 colonias).

En un conjunto adicional de experimentos, se transfectaron fibroblastos BJ con ARN bicatenario GAUC y una mezcla

de reprogramación de ARNm que comprendía ARNm GAΨC modificados con pseudouridina tratados con RNasa III; se reconocerá que esta es una situación artificial que es poco probable que ocurra, ya que las moléculas contaminantes de ARN bicatenario se generan durante las reacciones de transcripción *in vitro* y comprenderán ARN modificado o no modificado en función de los NTP que se utilicen en la reacción de IVT. Por lo tanto, el ARN bicatenario no comprenderá ARN no modificado y el ARNm fabricado por ARN modificado con IVT. Sin embargo, en este conjunto de experimentos, los fibroblastos BJ se transfectaron con ARN bicatenario GAUC no modificado y una mezcla de reprogramación de ARNm que comprendía ARNm de GAΨC modificados con pseudouridina tratados con RNasa III para determinar si el ARN bicatenario que comprende ARN GAΨC tenía un efecto diferente sobre la toxicidad celular y la reprogramación de células somáticas a células iPSC que el ARN bicatenario que comprende ARN GAUC. Por lo tanto, la dosis más alta de ARN bicatenario a la que se indujeron colonias de iPSC fue la de 9,6 pg de ARN bicatenario añadido con 1,2 microgramos por pocillo al día de mezcla de reprogramación de ARNm (es decir, en la que el ARN bicatenario era el 0,0008% o más de la masa total de ARN añadida por pocillo); a esta dosis, se indujeron 15 colonias de iPSC (pocillo 47). Las células toleran esta mezcla de reprogramación mejor. Las células estaban más sanas y se obtuvieron más colonias con la dosis más baja de ARN bicatenario. Esta cantidad de ARN bicatenario de GAUC no modificado fue similar a la dosis más alta de ARN bicatenario de GAUC no modificado a la que se indujeron colonias de iPSC cuando se usó una mezcla de reprogramación de ARNm que comprendía ARNm GAUC no modificados (pocillos 23 y 24). Sin embargo, en presencia de ARN bicatenario de GAUC no modificado, el uso de una mezcla de reprogramación de ARNm que comprendía ARNm de GAΨC pareció reducir la toxicidad celular y aumentar la eficacia de la reprogramación en comparación con el uso de una mezcla de reprogramación de ARNm que comprendía ARNm de GAUC (por ejemplo, compárese el pocillo 47 con los pocillos 23 y 24, y el pocillo 48 con los pocillos 25 y 26). Los resultados con ARN bicatenario GAΨC con una mezcla de reprogramación de ARNm que comprendía ARNm GAΨC (por ejemplo, los pocillos 35, 36 y 37) demuestran además los beneficios de la toxicidad reducida y una mayor eficacia de reprogramación mediante el uso de ARNm modificado con pseudouridina en las mezclas de reprogramación de ARNm.

Ejemplo 29. Efectos de la adición de ARN bicatenario de Luc2 sin modificar (GAUC), modificado con pseudouridina (GAΨC) y modificado con pseudouridina y 5-metilcitidina (GAΨm⁵C) sobre la reprogramación de células C3H/10T1/2 de ratón a mioblastos usando una mezcla de reprogramación que comprende ARNm tratado con RNasa III, Cap1, con cola poli(A) GAUC, GAΨC OR GAΨm⁵C codificante de proteína MYOD

Síntesis de ARN de luciferasa 2 bicatenario (ARN bicatenario de Luc2)

Se usaron moldes lineales de ADN codificantes de una forma genéticamente modificada del gen de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*), denominado "luc2", para generar ARN monocatenario codificante y no codificante como se ha descrito en el EJEMPLO 28, excepto que se usaron mezclas de NTP GAUC o GAΨC o GAΨm⁵C para la transcripción *in vitro* de los ARN monocatenarios codificantes y no codificantes. Se volvieron a suspender los ARN monocatenarios codificantes y no codificantes por separado en agua, se combinaron en cantidades iguales y se hibridaron para generar ARN bicatenarios de luc2 que comprendían nucleótidos GAUC o GAΨC o GAΨm⁵C usando el siguiente protocolo: se añadieron 250 microlitros de cada uno de los ARN monocatenarios de luc2 codificantes y no codificantes (cada uno a 1 microgramo/ml) que comprendían la misma composición de nucleótidos y se calentaron a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 70 °C (5 minutos), 60 °C (10 minutos), 50 °C (10 minutos), 40 °C (10 minutos), 30 °C (10 minutos) y luego enfriando lentamente hasta la temperatura ambiente durante 30 minutos. Se confirmó que todos los productos de ARN bicatenario GAUC, GAΨC y GAΨm⁵C eran bicatenarios.

Síntesis de ARNm codificantes de MYOD

Se preparó un molde de ADN de MYOD de ratón para la preparación de ARNm de ratón que comprendía o consistía en ARNm de MYOD de ratón sin modificar (GAUC) para su uso en la reprogramación de células madre mesenquimales de ratón a mioblastos de la siguiente manera: Se clonó el ADN codificante de ARNm de MYOD, ARNm que presentaba la secuencia de codificación o cds dadas como SEQ ID NO: 16, en ADN plasmídico basado en pUC19 que contenía un casete que presentaba SEQ ID NO: 1, que comprende un promotor de ARN polimerasa T7 seguido de beta-Globina 5' de *Xenopus* (UTR), un sitio de clonación (en el que se introducen las cds de MYOD directamente corriente abajo del sitio de inicio de la traducción de Kozak GCCACC), y una UTR 3' de beta-Globina de 3' *Xenopus*. Se linealizó el plásmido de ADN con Sal I y se purificó como se ha descrito previamente para otros plásmidos de ADN en el presente documento, y luego se usó como un molde de ADN para la transcripción *in vitro* de ARNm codificante de MYOD (o ARNm de MYOD).

Síntesis de ARNm de MYOD para la reprogramación

Se sintetizó ARNm no modificado (GAUC) de cola de poli (A) (~150 nt) CAP1 codificante de la proteína MYOD, codificado por el molde de ADN de MYOD descrito anteriormente, mediante la transcripción *in vitro* (IVT) de dicho molde de ADN usando el sistema de producción de ARNm convencional mScript™ T7 (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.) según lo descrito por el fabricante. Los ARNm CAP1, de cola poli(A) (~150 nt) modificados con pseudouridina (GAΨC) y los ARNm modificados con pseudouridina y 5-metilcitidina (GAΨm⁵C) se sintetizaron de manera similar mediante IVT usando un sistema de producción convencional T7 mScript™, a excepción del uso de mezcla de NTP que comprendían los NTP GAΨC o los NTP GAΨm⁵C, respectivamente en lugar de UTP o CTP. Se trataron partes de cada uno de estos ARNm no modificados (GAUC) y modificados (GAΨC y GAΨm⁵C) usando el

tratamiento con RNasa III en presencia de acetato de magnesio 2 mM según lo desvelado en el presente documento.

Reprogramación de células madre mesenquimales C3H10T1/2 de ratón a mioblastos usando ARNm de MYOD sin modificar CAP1 y el efecto del ARN bicatenario de Luc2

- 5 Se sembraron células C3H10T1/2 de ratón a 2×10^5 células por pocillo de una placa de 6 pocillos recubierta con gelatina y se dejaron crecer durante la noche en DMEM, FBS al 10%, GLUTAMAX y pen/estrep. Al día siguiente, se cambiaron las células a un medio de diferenciación que comprendía DMEM + suero de caballo al 2 %, GLUTAMAX y pen/estrep. Se transfectaron las células usando reactivo de transfección RNAiMAX (Invitrogen, Inc.) con 1,0 microgramos/ml del ARNm no modificado (GAUC) descrito anteriormente o ARNm modificado con GA ψ C o ARNm
- 10 modificado con GA ψ m⁵C codificante de la proteína MYOD, solo o sin ARN bicatenario de luc2, o junto con ARN bicatenario de luc2 que comprendía el mismo tipo de nucleótidos (GAUC, GA ψ C o GA ψ m⁵C) como ARNm codificante de la proteína MYOD, con cada ARN bicatenario de luc2 respectivo a concentraciones variables de entre 0,000001 y 0,1 microgramos/ml. En resumen, se añadieron cada ARNm de MYOD GAUC, GA ψ C o GA ψ m⁵C, y el correspondiente ARN bicatenario de luc2 a un primer tubo que contenía un volumen total de 60 microlitros, y una
- 15 cantidad de solución de transfección RNAMAX igual a 5 microlitros por microgramo de ARN del primer tubo se añadió a un segundo tubo, ajustándose el volumen final a 60 microlitros. Se mezclaron el primer y el segundo tubo, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadió la mezcla de ARNm/ARNiMAX a 2 ml de medio de diferenciación ya en las células. El medio se cambió por un nuevo medio de diferenciación 4 horas después de la transfección. Veinticuatro horas después de la primera transfección, se administró otra transfección
- 20 con el mismo tratamiento. El medio se cambió nuevamente 4 horas después de la transfección. Cuarenta y ocho horas después de la primera transfección, las células se fijaron y se realizó la inmunofluorescencia para detectar la expresión de la cadena pesada de miosina (MHC), un marcador de mioblastos o diferenciación muscular.

RESULTADOS DEL EJEMPLO 29

- 25 El porcentaje de ARN bicatenario contaminante debe ser inferior al aproximadamente 0,1 % (y preferentemente inferior al aproximadamente 0,01 %) de la cantidad total de ARN para reprogramar las células madre mesenquimales a mioblastos usando ARNm de MYOD no modificado o ARNm de MYOD modificado con GA ψ C.

Cantidad de ARNm de MYOD GAUC o GA ψ C tratado con RNasa III (μ g/ml)	Cantidad de los respectivos ARN bicatenarios de Luc2 GAUC o GA ψ C* transfectados (μ g/ml)	ARN bicatenario como % del ARN total transfectado	Presencia de tinción inmunofluorescente de cadena pesada de miosina
1,0	0	0	SÍ
1,0	0,1	10 %	No
1,0	0,01	1 %	No
1,0	0,001	0,1 %	No
1,0	0,0001	0,01 %	SÍ
1,0	0,00001	0,001 %	SÍ
1,0	0,000001	0,0001 %	SÍ
Sin tratamiento	Sin tratamiento	N/A	No
Transfección simulada	Transfección simulada	N/A	No

*Se usó ARN bicatenario de Luc2 GAUC con ARNm de MYOD GAUC y ARN bicatenario de Luc2 GA ψ C con ARNm de MYOD GA ψ C.
N/A = No aplicable.

El porcentaje de ARN bicatenario contaminante debe ser inferior al 1% (y preferentemente inferior al 0,1 % o inferior) de la cantidad total de ARN para reprogramar las células madre mesenquimales a mioblastos usando ARNm de MYOD modificado con GA ψ m⁵C.

Cantidad de ARNm de MYOD GA ψ m ⁵ C tratado con RNasa III (μ g/ml)	Cantidad de ARN bicatenario de Luc2 GA ψ m ⁵ C transfectada (μ g/ml)	ARN bicatenario como % del ARN total transfectado	Presencia de tinción inmunofluorescente de cadena pesada de miosina
1,0	0	0	SÍ
1,0	0,1	10 %	No
1,0	0,01	1 %	No
1,0	0,001	0,1 %	SÍ
1,0	0,0001	0,01 %	SÍ

(continuación)

Cantidad de ARNm de MYOD GAΨm ⁵ C tratado con RNasa III (μg/ml)	Cantidad de ARN bicatenario de Luc2 GAΨm ⁵ C transfectada (μg/ml)	ARN bicatenario como % del ARN total transfectado	Presencia de tinción inmunofluorescente de cadena pesada de miosina
1,0	0,00001	0,001 %	Sí
1,0	0,000001	0,0001 %	Sí
Sin tratamiento	Sin tratamiento	N/A	No
Transfección simulada	Transfección simulada	N/A	No

Ejemplo 30. Reprogramación directa de fibroblastos humanos a neuronas mediante la introducción repetida de ARNm modificados con pseudouridina (GAΨC) codificantes de los factores de transcripción proteicos ASCL1, MYT1L, NEUROD1 y POU3F2

5 Introducción

Recientemente, Pang y col., y otros (Pang, ZP y col., 2011; Ladewig J., y col., 2012) describieron la conversión de fibroblastos humanos a neuronas mediante la introducción de vectores lentivíricos inducibles por doxiciclina codificantes de cuatro factores de transcripción (ASCL1, MYT1L, NEUROD1 y POU3F2), basándose en el trabajo de otros investigadores (por ejemplo, Vierbuchen T., y col. 2010. Yang N., y col. 2011). En este ejemplo, se muestra la reprogramación directa altamente eficaz (por ejemplo, la transdiferenciación) de fibroblastos humanos a neuronas mediante la introducción repetida en los fibroblastos de una mezcla de reprogramación que comprende ARNm modificados con pseudouridina codificantes de factores de transcripción proteicos (por ejemplo, ASCL1, MYT1L, NEUROD1 y POU3F2), en el que los ARNm se trataron usando el procedimiento de tratamiento con RNasa III con Mg²⁺ 2 mM, reprogramando de este modo los fibroblastos a células neuronales.

15 Materiales y procedimientos para la reprogramación de fibroblastos a neuronas

EJEMPLO 30 Detalles

Se sembraron fibroblastos de pulmón humano MR90 fetales (pasada P15) en placas recubiertas con gelatina a 1,5 x 10⁵ células por pocillo de una placa de 6 pocillos en medio EMEM (ATCC n.º de cat. 30-2003) suplementado con suero bovino fetal al 10 % y penicilina-estreptomicina x1. Las células en cada pocillo se transfectaron diariamente (por ejemplo, en este ejemplo, durante 6 días) con una mezcla de reprogramación que comprendía un total de 0,6 microgramos de ARNm recombinantes tratados con RNasa III (con Mg²⁺ 2 mM), modificados con pseudouridina (GAΨC) (codificantes de cada uno de los factores de transcripción proteicos ASCL1 (A), MYT1L (M), NEUROD1 (N) y POU3F2 (P) a una proporción molar de 1:1:1 de AMNP) formados con el reactivo de transfección STEMFECTION™ (4 microlitros por microgramo de ARNm). Los ARNm recombinantes se prepararon mediante transcripción *in vitro* de moldes de ADN derivados de pUC19 linealizados que contenían un casete (SEC ID NO: 1) que comprendía: un promotor T7, una UTR 5' de β-globina de *Xenopus laevis*, y una UTR 3' de β-globina de *Xenopus*; en el que una secuencia de ADN codificante de ARNm, cuyo ARNm presenta una secuencia codificante como se da en la siguiente SEC ID NO: ASCL1 (SEQ ID NO: 11), MYT1L (SEQ ID NO: 12), NEUROD1 (SEQ ID NO: 13) o POU3F2 (SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15) proteína se inserta. Los ARNm de CAP1 recombinantes (con una cola de poliA de ~ 150 nt) codificantes de ASCL1, NEUROD1 y POU3F2 se prepararon como se ha descrito en la literatura proporcionada con el sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™ (CELLSCRIPT, INC., Madison, WI, EE.UU.), excepto que la uridina-5'-trifosfato (UTP) se sustituyó por pseudouridina-5'-trifosfato (ΨTP) para la IVT, y antes de la protección con caperuza o de la poliadenilación, los ARN transcritos *in vitro* se trataron usando el tratamiento con RNasa III como se describe en el presente documento con una concentración de 2 mM de acetato de magnesio. El ARNm de MYT1L recombinante codificante de MYT1L (con una cola de poliA de ~ 150 nt) se preparó como se ha descrito en la literatura provista con el Kit de Transcripción MessageMAX™ T7 ARCA-Capped Message (CELLSCRIPT), excepto con ΨTP en lugar de UTP durante la IVT y, antes de la poliadenilación con Poli(A) polimerasa A-PLUS™ (CELLSCRIPT), el ARN transcrito *in vitro* se trató usando el tratamiento con RNasa III, como se ha descrito anteriormente, con acetato de magnesio 2 mM; este ARNm no fue tratado con fosfatasa. Las células se mantuvieron en medio EMEM durante los 2 primeros días de transfecciones y luego se cambiaron a medio N3 durante el resto del experimento. El medio N3 (Wernig M., y col., 2002) es un medio DMEM/F12 (Life Technologies) suplementado con 25 microgramos por mililitro de insulina, 50 microgramos por mililitro de transferrina, 30 nanomolar de selenito de sodio, progesterona 20 nanomolar, putrescina 100 nanomolar (todo de SIGMA) y complementado con FGFb fresco diariamente a 10 nanogramos por mililitro (R & D Systems) y penicilina-estreptomicina x1. El medio se cambió diariamente antes de la transfección y se complementó con 0,5 U/ml de inhibidor de RNasa SCRIPT-GUARD™ (CELLSCRIPT). La mezcla de ARNm de AMNP: el complejo de reactivo de transfección STEMFECTION™ se preparó según el protocolo del fabricante (STEMGENT, Cambridge, MA, EE.UU.), se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se añadió a las células. Se tomaron imágenes de contraste de fase de las células el día 6, y las células se fijaron el día 7 y se tiñeron por inmunofluorescencia para la presencia del marcador neuronal proteína-2 asociada a microtúbulos (MAP2). Esta es una proteína de ensamblaje de microtúbulos que se cree que desempeña un papel esencial en la neurogénesis.

Resultados de la reprogramación de fibroblastos a neuronas

Mediante la sexta transfección, la morfología de la mayoría de las células de los pocillos transfectados con AMNP (ASCL1, MYT1L, NEUROD1 y POU3F2) había cambiado drásticamente a una morfología (FIG. 50 y FIG.51) y la tinción inmunofluorescente de las células fue positiva para MAP2, lo que demostraba que los fibroblastos habían sido reprogramados (transdiferenciados directamente a neuronas. Este proceso de reprogramación fue rápido y altamente eficaz.

Estudios sobre los efectos de la adición ARN bicatenario de Luc2 en la reprogramación de los fibroblastos a neuronas

Materiales y procedimientos

En otro experimento, se añadieron diversas cantidades bien de ARN bicatenario de luc2 GAUC sin modificar o ARN bicatenario de luc2 modificado con GA ψ C a mezclas de reprogramación que comprendían ARNm GA ψ C tratados con RNasa III codificantes de ASCL1, MYT1L, NEUROD1 y POU3F2 (AMNP) para determinar y cuantificar los efectos del ARN bicatenario modificado con ψ y sin modificar sobre la reprogramación (transdiferenciación) de los fibroblastos a las neuronas. Como en experimentos similares en todos los EJEMPLOS anteriores, se usó el ARN bicatenario de luc2, porque, como no está presente de forma natural en las células humanas, se creía que no causaría un efecto bioquímico (por ejemplo, debido a la interferencia del ARN) como podría ocurrir si se usara un ARN bicatenario que presentara una secuencia codificada por un gen que estuviera presente en las células.

Como se ha descrito anteriormente para los Detalles del EJEMPLO 30, se sembraron fibroblastos de pulmón fetal IMR90 (P16) sobre placas recubiertas de gelatina a $1,5 \times 10^5$ células por pocillo de una placa de 6 pocillos en medio EMEM. Las células de cada pocillo se transfectaron diariamente con una mezcla de reprogramación de ARNm que comprendía un total de 600 nanogramos de ARNm modificados con pseudouridina tratados con RNasa III codificantes de ASCL1, MYT1L, NEUROD1 y POU3F2 más o menos diversas cantidades de ARN bicatenario de luc2 GAUC sin modificar o modificado con pseudouridina (GA ψ C), todo complejoado con el reactivo de transfección STEMFECT (4 microlitros/microgramo de ARNm), durante 4 días. Los ARN bicatenarios de luc2 se añadieron a mezclas de reprogramación de ARNm como en los experimentos previos para determinar y cuantificar los efectos del ARN bicatenario sobre la reprogramación de los fibroblastos a iPSC (por ejemplo, ver el EJEMPLO 28). Todos los ARNm fueron modificados con pseudouridina y tratados con RNasa III. Todos tenían caperuzas CAP1 añadidas enzimáticamente a excepción de MYT1L, que se protegió con caperuza ARCA durante la transcripción, y todos fueron poliadenilados enzimáticamente para generar una cola de poli (A) de ~ 150 restos de A. Las células se mantuvieron en medio EMEM para la primera transfección, luego se cambiaron a medio N3 para el resto del experimento. El medio se cambió diariamente antes de la transfección y se complementó con 0,5 U/ml de inhibidor de RNasa SCRIPTGUARD.

Resultados de los estudios sobre los efectos de la adición ARN bicatenario de Luc2 en la reprogramación de los fibroblastos a neuronas

Tras la cuarta transfección, algunas células de pocillos transfectados con ARNm codificantes de AMNP habían cambiado la morfología. Se tomaron imágenes de las células el día 5. Se detuvieron las transfecciones y las células se cultivaron durante 5 días más para permitir que las neuronas madurasen. Después, las células se inmunotifaron para detectar la expresión de marcadores neuronales, incluyendo MAP2 y NeuN, y se contaron los números de neuronas de cada pocillo en función de la morfología y la inmunosupresión. Las neuronas se indujeron en ausencia de ARN bicatenario de Luc2 añadido y en presencia de ciertos niveles de ARN bicatenario de Luc2 añadido. Cuando se añadió ARN bicatenario de Luc2 GAUC sin modificar diariamente con los ARNm de GA ψ C codificantes de los factores de reprogramación ASCL1, MYT1L, NEUROD1 y POU3F2 (AMNP), las neuronas solo se indujeron cuando la cantidad de ARN bicatenario de Luc2 no modificado GAUC fue inferior al aproximadamente 0,01 % de la masa total de ARN usada para la reprogramación, y se generaron números significativos de neuronas solo si la cantidad de ARN bicatenario de Luc2 no modificado GAUC añadida fue inferior al aproximadamente 0,001% de la masa total de ARN usada para la reprogramación. Cuando se añadió ARN bicatenario de GA ψ C Luc2 modificado diariamente con los ARNm de GA ψ C codificantes de los factores de reprogramación de AMNP, las neuronas se indujeron solo si la el ARN bicatenario de GA ψ C Luc2 modificado con pseudouridina fue inferior al aproximadamente 0,02 % de la masa total de ARN usada para la reprogramación, y se generaron números significativos de neuronas solo si la cantidad de ARN bicatenario de GAUC Luc2 no modificado añadida fue inferior al aproximadamente 0,004 % de la masa total de ARN usada para la reprogramación.

Referencias

Angel M. y Yanik M. F. 2010. "Innate immune suppression enables frequent transfection with RNA encoding reprogramming proteins". *PLoS ONE* 5(7): e11756.

Aoi T y col., 2008. "Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells". *Science* 321: 699-702. Aasen T y col., 2008. "Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes". *Nature Biotechnology* 26: 1276-1284.

- Banerjee A. K. 1980. "5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids". *Microbiol Rev* 44: 175-205.
- Cazenave, C., y Uhlenbeck, O. C. 1994. "RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 91: 6972-6976.
- 5 Chan E. M., y col. 2009. "Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells". *Nat Biotechnol* 27: 1033-1037.
- Dahl G. y Sooknanan R. 2011. "Synthesis of tagged nucleic acids". Patente de EE.UU. n.º 8.039.214.
- Dahl G. y Sooknanan R. 2012. "Synthesis of tagged nucleic acids". Patente de EE.UU. n.º 8.329.887.
- Dunn, J. J. 1976. "RNase III cleavage of single-stranded RNA". *J Biol Chem* 25: 3807-3814.
- 10 Dunn, J. J. 1982. "Ribonuclease III". En *The Enzymes* vol. 15 (P Boyer, ed.) Academic Press, NY. 485-499.
- Drews K. y col., 2012. "The cytotoxic and immunological hurdles associated with non-viral mRNA-mediated reprogramming of human fibroblasts". *Biomaterials* 33: 4059-4068.
- Ebert A. D. y col., 2009. "Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient". *Nature* 457: 277-280.
- 15 Edmonds M. 1990. "Polyadenylate polymerases". *Methods Enzymol* 181: 161-170.
- Filippov V. y col., 2000. "A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes". *Gene*. 245: 213-221.
- Gantier M. P. y Williams B. R. G. 2007. "The response of mammalian cells to double-stranded RNA". *Cytokine Growth Factor Rev* 18: 363-371.
- Gershon P. D. 2000. "Poly(A)-tail of two polymerase structures". *Nat Struct Biol* 7: 819-821.
- 20 Gonzalez F., y col. 2009. "Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 106: 8918-8922.
- Graf T y Enver T. 2009. "Forcing cells to change lineages". *Nature* 462: 587-594.
- Grudzien E. y col., 2004. "Novel cap analogs for *in vitro* synthesis of mRNAs with high translational efficiency". *RNA* 10: 1479-1487.
- 25 Grudzien-Nogalska E. y col., 2007. "Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells". *RNA* 13: 1745-1755.
- Guillerez, J y col., patente de EE.UU. n.º 7.335.471 y solicitud de patente de EE.UU. n.º 20040091854.
- Hagen F. S. y Young E. T. 1978. "Effect of RNase III on efficiency of translation of bacteriophage T7 lysozyme mRNA". *J Virol* 26: 793-804.
- 30 Higman M. A y col., 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 M. A y col., 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.
- 35 Hornung V. y col., 2006. "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I". *Science* 314: 994-997.
- Huangfu D. y col., 2008. "Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2". *Nat Biotechnol* 26: 1269-1275.
- Jemielity J. y col., 2003. "Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties". *RNA* 9: 1108-1122.
- 40 Jendrisak J y col., "Kits and methods for generating 5' capped RNA". Solicitud de patente de EE.UU. con n.º de serie 11/787352; Publicación n.º 20070281336.
- Jiang F. y col., 2011. "Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I". *Nature* 479: 423-427.
- 45 Kalal M. y col., 2002. "Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA". *Cell Death and Differentiation* 9: 981-994.

- Kariko K. y col., 2004. "mRNA is an endogenous ligand for toll-like receptor 3". *J Biol Chem* 279: 12542-12550.
- Kariko y col., 2005. "Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA". *Immunity* 23: 165-175.
- 5 Kariko K. y col., 2008. "Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability". *Mol Ther* 16: 1833-1840.
- Kariko K. y col., 2011(A). "RNA preparations comprising purified modified RNA for reprogramming cells". Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20110143397.
- 10 Kariko K. y col., 2011(B). "Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA". *Nucleic Acids Res.* 39: e142.
- Kariko K. y Weissman D. 2012. "RNA containing modified nucleosides and methods of use thereof". Patente de EE.UU. n.º 8.278.036.
- Kato H. y col., 2008. "Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-1 and melanoma differentiation-associated gene 5". *J Exp. Med.* 205: 1601-1610.
- 15 Kiyota E. y col., 2011. "An Arabidopsis RNase III-like protein, AtRTL2, cleaves double-stranded RNA *in vitro*". *J Plant Res.* 124: 405-414.
- Kowalska J. y col., 2008. "Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS". *RNA* 14: 1119-1131.
- 20 Kozak M. 1987. "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs". *Nucleic Acids Res.* 15: 8125-8148.
- Ladewig J., y col. 2012. "Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts". *Nat Methods* 9:575-578.
- Lee Y. y col., 2003. "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing". *Nature* 425: 415-419.
- 25 Lee G., y col. 2009. "Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs". *Nature* 461: 402-406.
- Leonard J. y col., 2008. "The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 105: 258-263.
- 30 Li H-L. y col., 1993. "Ribonuclease III cleavage of bacteriophage T7 processing signal. Divalent cation specificity, and specific anion effects". *Nucleic Acids Res* 21: 1919-1925.
- Lukacs N. 1994. "Detection of virus infection in plants and differentiation between coexisting viruses by monoclonal antibodies to double-stranded RNA". *J. Virol. Methods* 47: 255-272.
- Lukacs N. 1997. "Detection of sense: antisense duplexes by structure-specific anti-RNA antibodies". En: *Antisense Technology. A Practical Approach*, C. Lichtenstein y W. Nellen (eds), pág. 281-295. IRL Press, Oxford.
- 35 Mackie GA. 1988. "Vectors for the synthesis of specific RNAs *in vitro*". *Biotechnology* 10: 253-267.
- Maehr R. y col., 2009. "Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 106: 15768-15773.
- Martin S. A. y col., 1975. "Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-) methyltransferase from vaccinia virions". *J Biol Chem* 250: 9322-9329.
- 40 Matsuda, S y col., 2000. "Molecular cloning and characterization of a novel human gene HER-NA which encodes a putative RNA-helicase". *Biochim. Biophys. Acta.* 1490: 163-169.
- McAllister W. T. y Raskin C. A. 1993. "The phage RNA polymerases are related to DNA polymerases and reverse transcriptases". *Molecular Microbiology* 10: 1-6.
- 45 Mellits K. H. y col., 1990. "Removal of double-stranded contaminants from RNA transcripts: synthesis of adenovirus VA RNA1 from a T7 vector". *Nucleic Acids Res* 18: 5401-5406.
- Minskaia E. y col., 2006. "Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 103: 5108-5113.

- Myette J. R. y Niles E. G. 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.
- 5 Nakagawa M. y col., 2008. "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts". *Nat Biotechnol* 26: 101-106.
- Nicholson, A. W. 1996. "Structure, reactivity, and biology of double-stranded RNA". *Progr Nucleic Acid Res Mol Biol* 52: 1-65.
- Okita K. y col., 2008. "Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors". *Science* 322: 949-953.
- 10 Ozawa T. y col., 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.
- Pang Z. P. y col., 2011. "Induction of human neuronal cells by defined transcription factors". *Nature* 476: 220-223.
- 15 Peng Z. H. y col., 2002. "Synthesis and application of a chain-terminating dinucleotide mRNA cap analog". *Org Lett* 4: 161-164.
- Pe'ery T. y Mathews M. B. 1997. "Synthesis and purification of single-stranded RNA for use in experiments with PKR and in cell-free translation systems". *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 11: 371-381.
- Pichlmair A. y col., 2006. "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-triphosphates". *Science* 314: 997-1001.
- 20 Plews J. R. y col., 2010. "Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach". *PLoS ONE* 5: e14397.
- Probst J. y col., 2006. "Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface". *Genet Vaccines Ther.* 4: 4 doi:10.1186/1479-0556-4-4.
- 25 Qi, X. y col., 2010. "Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure". *Nature* 468: 779-783.
- Robertson, H. D. y col., 1968. "Purification of Ribonuclease III from *Escherichia coli*". *J Biol Chem* 243: 82-91.
- Robertson H. D. y Hunter T. 1975. "Sensitive methods for detection and characterization of double helical ribonucleic acid". *J Biol Chem* 250: 418-425.
- Robertson H. D. 1982. "*Escherichia coli* ribonuclease III cleavage sites". *Cell* 30: 669-672.
- 30 Robertson H. D y col., 1996. "Paradoxical interactions between human delta hepatitis agent RNA and cellular protein kinase PKR". *J Virology* 70: 5611-5617.
- Sahin U. y col., 2011. "Use of RNA for reprogramming somatic cells". Solicitud de patente de EE.UU. n.º 20110065103.
- 35 Saito T. y col., 2008. "Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA". *Nature* 454: 523-527.
- Schlee M. y col., 2009. "Approaching the RNA ligand for RIG-I". *Immunol Rev* 227: 66-74.
- Schönborn J. y col., 1991. "Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts". *Nucleic Acids Res.* 19: 2993-3000.
- Shuman S. 1995. "Capping enzyme in eukaryotic mRNA synthesis". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50: 101-129.
- 40 Shuman. 2001. "Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 1-40.
- 45 Shuman S. y col., 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.
- Stadtfeld M. y col., 2008. "Induced pluripotent stem cells generated without viral integration". *Science* 322: 945-949.

- Stepinski J. y col., 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.
- Stewart II, W. E. y col., 1972. "Increased susceptibility of cells treated with interferon to the toxicity of polyriboinosinic: polyribocytidylic acid". *Proc Nat Acad Sci EE.UU.* 69: 1851-1854.
- 5 Studier F. W. y Moffatt B. A. 1986. "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes". *J Mol Biol* 189: 113-130.
- Sul, J-Y y col., 2012. "Perspectives on cell reprogramming with RNA". *Trends in Biotechnology* 30: 243-249.
- Takahashi K. y Yamanaka S. 2006. "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors". *Cell* 126: 663-676.
- 10 Takahashi K. y Yamanaka S. 2006. "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors". *Cell* 126: 663-676.
- Takahashi K y col., 2007. "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors". *Cell* 131: 861-872.
- 15 Triana-Alonso F. J y col., 1995. "Self-coded 3'-extension of run-off transcripts produces aberrant products during *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase". *J Biol Chem* 270: 6298-6307.
- Wan Y. y Chang H. Y. 2010. "HOTAIR: Flight of noncoding RNA in genome regulation: Prospects and mechanisms". *Cell Cycle* 9: 3391-3392.
- Uzri D. y Gehrke L. 2009. "Nucleotide sequences and modifications that determine RIG-I/RNA binding and signaling activities". *J. Virol.* 83: 4174-4184.
- 20 Vierbuchen T., y col. 2010. "Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors". *Nature* 463: 1035-1041.
- Wang S. P. y col., 1997. "Phylogeny of mRNA capping enzymes". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 94: 9573-9578.
- Wang X. y col., 2011. "Phosphorylation regulates c-Myc's oncogenic activity in the mammary gland". *Cancer Res.* 71: 925-936.
- 25 Warren L. y col., 2010. "Highly efficient programming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA". *Cell Stem Cell* 7: 618-630.
- Warren L. y col., 2012. "Feeder-Free Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cells with Messenger RNA", *Scientific Reports* 2: 657-663.
- 30 Wasylshen A. R. y col., 2011. "New model systems provide insights into Myc-induced transformation". *Oncogene.* 30: 3727-3734.
- Wernig M., y col. 2002. "Tau EGFP embryonic stem cells: an efficient tool for neuronal lineage selection and transplantation". *J. Neurosci. Res.* 69: 918-924.
- Wianny F. y Zernicka-Goetz M. 2000. "Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development". *Nat. Cell Biol.* 2: 70-75.
- 35 Wilusz J. y 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.
- Woo C.J. y Kingston R. E., 2007). "HOTAIR lifts noncoding RNAs to new levels". *Cell* 129: 1257-1259.
- 40 Wu, H., Xu, H., Miraglia, L. J., y Crooke, S. T. 2000. "Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing [In Process Citation]". *J. Biol. Chem.* 275: 36957-65.
- Xu C. y col., 2001. "Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells". *Nat Biotechnol* 19: 971-974.
- 45 Yakubov E. y col., 2010. "Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors". *Biochim Biophys Res Comm* 394: 189-193.
- Yang S. y col., 2001. "Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem

cells". *Mol Cell Biol* 21: 7807-7816.

Yang N., y col. 2011. "Induced neuronal cells: how to make and define a neuron". *Cell Stem Cell* 9: 517-525.

Yanik M. F. y Angel M. 2010. Solicitud de patente de EE.UU. n.º de serie US 12/428.378, publicada como US 2010/0273220.

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

Yu J. y col., 2009. "Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences". *Science* 324: 797-801.

10 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.

Zust, R. y col., 2011. "Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5". *Nature Immunol.* 12: 137-143.

15 La presente descripción se refiere a la literatura de productos, incluyendo todas las descripciones y protocolos de la misma, para el kit de formación de colas de poli(A) polimerasa A-PLUS™, el kit de mensajes de alto rendimiento AMPLICAP-MAX™ T7, el kit de mensajes de alto rendimiento AMPLICAP™ SP6, análogo de caperuza antiinverso (ARCA), el kit de transcripción de ARN con Ψ INCOGNITO™ SP6, el kit de transcripción de ARN con 5mC y Ψ INCOGNITO™ T7 ARCA, el kit de transcripción de ARN con 5mC y Ψ INCOGNITO™ T7, el kit de transcripción de ARN con Ψ INCOGNITO™ T7, El kit de transcripción MESSAGEMAX™ T7 ARCA-capped message, el sistema de protección con caperuza de m⁷G SCRIPTCAP™, el kit de 2'-O-metiltransferasa SCRIPTCAP™, el inhibidor de la RNasa SCRIPTGUARD™, el kit de IVT de ARN convencional SP6-SCRIBE™, el sistema de producción de ARNm convencional T7 mSCRIPT™ y el kit de IVT de ARN convencional T7-SCRIBE™ (todos disponibles en Internet, en
20 www.cellscript.com o de CELLSCRIPT, Inc., Madison, WI, USA) y el anticuerpo monoclonal J2 y el anticuerpo monoclonal K1 (disponibles en English Scientific & Consulting, Szirák, Hungary).

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CELLSCRIPT, LLC.

<120> FABRICACIÓN Y USO DE ARN MONOCATENARIO SINTETIZADO *IN VITRO* PARA LA INTRODUCCIÓN EN CÉLULAS DE MAMÍFERO PARA INDUCIR UN EFECTO BIOLÓGICO O BIOQUÍMICO

30 <130> CESR001PEP03

<140> EP

<141> 31-12-2012

<150> EP16186283.4

<151> 31-12-2012

35 <150> EP12815983.7

<151> 31-12-2012

<150> PCT/US2012/072301

<151> 31-12-2012

<150> US 61/582,050

40 <151> 30-12-2011

<150> US 61/582,080

<151> 30-12-2011

<150> US 61/651,738

<151> 25-05-2012

45 <160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 269

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

5 <400> 1
taatacgact cactataggg taatacaagc ttgcttggtc tttttgcaga agctcagaat 60
aaacgctcaa ctttggcaga tctgatatca ctagtgactg actaggatct ggttaccact 120
aaaccagcct caagaacacc cgaatggagt ctctaagcta cataatacca acttacactt 180
acaaaatggt gtcccccaaa atgtagccat tcgtatctgc tcctaataaa aagaaagttt 240
cttcacattc tggatcctct agagtgcac 269

<210> 2
<211> 4017
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 2

tcgcgcggttt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacgggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcagggccc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcggggc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaaggg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	ctaatacgac	tcactatagg	420
gtaatacaag	cttgcttgtt	ctttttgcag	aagctcagaa	taaacgctca	actttggcag	480
atctcggtcg	ccaccatggc	gggacacctg	gcttcagatt	ttgccttctc	gccccctcca	540
ggtggtggag	gtgatgggcc	agggggggccg	gagccgggct	gggttgatcc	tcggacctgg	600
ctaagcttcc	aaggccctcc	tggagggcca	ggaatcgggc	cgggggttgg	gccaggctct	660
gaggtgtggg	ggattccccc	atgccccccg	ccgtatgagt	tctgtggggg	gatggcgtag	720
tgtgggcccc	aggttggagt	ggggctagtg	ccccaaaggcg	gcttggagac	ctctcagcct	780
gagggcgaag	caggagtccg	ggtggagagc	aactccgatg	gggcctcccc	ggagccctgc	840
accgtcacc	ctggtgccgt	gaagctggag	aaggagaagc	tggagcaaaa	cccgaggag	900
tcccaggaca	tcaaagctct	gcagaaagaa	ctcgagcaat	ttgccaagct	cctgaagcag	960
aagaggatca	ccctgggata	tacacaggcc	gatgtggggc	tcaccctggg	ggttctatct	1020
gggaaggat	tcagccaaac	gaccatctgc	cgctttgagg	ctctgcagct	tagcttcaag	1080
aacatgtgta	agctgcggcc	cttgetgcag	aagtgggtgg	aggaagctga	caacaatgaa	1140
aatcttcagg	agatatgcaa	agcagaaacc	ctcgtgcagg	cccgaaagag	aaagcgaacc	1200
agtatcgaga	accgagttag	aggcaacctg	gagaatttgt	tcctgcagtg	cccgaaacct	1260
acactgcagc	agatcagcca	catgcccag	cagcttgggc	tcgagaagga	tgtggtccga	1320
gtgtggttct	gtaaccggcg	ccagaagggc	aagcgatcaa	gcagcgacta	tgcacaacga	1380
gaggattttg	aggctgctgg	gtctcctttc	tcagggggac	cagtgtcctt	tcctctggcc	1440
ccagggcccc	attttggtac	cccaggctat	gggagccctc	acttcaactgc	actgtactcc	1500
tcggtccctt	tcctgaggg	ggaagccttt	ccccctgtct	ctgtcaccac	tctgggctct	1560
cccatgcatt	caaactgaga	tatcactagt	gactgactag	gatctgggta	ccactaaacc	1620
agcctcaaga	acaccgaat	ggagtctcta	agctacataa	taccaactta	cactttacaa	1680
aatgttgtcc	cccaaatgt	agccattcgt	atctgtctct	aataaaaaga	aagtttcttc	1740
acattctgga	tcctctagag	tcgacctgca	ggcatgcaag	cttggcgtaa	tcatgggtcat	1800
agctgtttcc	tgtgtgaaat	tgttatccgc	tcacaattcc	acacaacata	cgagccggaa	1860
gcataaagtg	taaagcctgg	ggtgcctaata	gagtgcagta	actcacatta	attgcgttgc	1920

gctcactgcc	cgctttccag	tcgggaaacc	tgctgtgcca	gctgcattaa	tgaatcggcc	1980
aacgcgcggg	gagaggcggg	ttgcgtattg	ggcgcctctc	cgcttcctcg	ctcactgaact	2040
cgctgcgcgc	ggcgcgttcg	ctgcggcgag	cggtatcagc	tcactcaaag	gcggtaatac	2100
ggttatccac	agaatcaggg	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	2160
agggcaggaa	ccgtaaaaag	gccgcgttgc	tggcgttttt	ccataggctc	cgccccctg	2220
acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	agagggtggcg	aaacccgaca	ggactataaa	2280
gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	tcgtgcgcgc	tcctgttccg	accctgcgcg	2340
ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccctt	cgggaagcgt	ggcgcctttc	catagctcac	2400
gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggctg	ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	2460
cccccgttca	gcccgaaccg	tgccgcttat	ccggtaacta	tcgtcttgag	tccaacccgg	2520
taagacacga	cttatcgcca	ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	agagcgagggt	2580
atgtaggcgg	tgctacagag	ttcttgaagt	ggtggcctaa	ctacggctac	actagaagaa	2640
cagtatttgg	tatctgcgct	ctgctgaagc	cagttacctt	cggaaaaaga	gttggttagct	2700
cttgatccgg	caaacaaacc	accgctggta	gcggtggttt	ttttgtttgc	aagcagcaga	2760
ttacgcgcag	aaaaaaagga	tctcaagaag	atcctttgat	cttttctacg	gggtctgacg	2820
ctcagtgga	cgaaaactca	cgttaaggga	ttttggtcat	gagattatca	aaaaggatct	2880
tcacctagat	cctttttaat	taaaaatgaa	gttttaaatc	aatctaaagt	atatatgagt	2940
aaacttggtc	tgacagttac	caatgcttaa	tcagtgaggc	acctatctca	gcgatctgtc	3000
tatttcgctc	atccatagtt	gctgactcc	cgcgtgtgta	gataactacg	atacgggagg	3060
gcttaccatc	tggccccagt	gctgcaatga	taccgcgaga	cccacgctca	ccggctccag	3120
atztatcagc	aataaaccag	ccagccggaa	gggccgagcg	cagaagtggg	cctgcaactt	3180
tatccgcctc	catccagtct	attaattgtt	gccgggaagc	tagagtaagt	agttcgccag	3240
ttaatagttt	gcgcaacggt	gttgccattg	ctacaggcat	cgtgggtgtca	cgctcgctgt	3300
ttggatggc	ttcattcagc	tcgggttccc	aacgatcaag	gcgagttaca	tgatccccca	3360
tggtgtgcaa	aaaagcgggt	agtcctctcg	gtcctccgat	cgttgtcaga	agtaagttgg	3420
ccgcagtgtt	atcactcatg	gttatggcag	cactgcataa	ttctcttact	gtcatgccat	3480
ccgtaagatg	cttttctgtg	actggtgagt	actcaaccaa	gtcattctga	gaatagtgtg	3540
tgccggcgacc	gagttgctct	tgcccgcggt	caatacggga	taataccgcg	ccacatagca	3600
gaactttaaa	agtgtcatc	attggaaaac	gttcttcggg	gcgaaaactc	tcaaggatct	3660
taccgctgtt	gagatccagt	tcgatgtaac	ccactcgtgc	acccaactga	tcttcagcat	3720
cttttacttt	caccagcgtt	tctgggtgag	caaaaacagg	aaggcaaaat	gccgcaaaaa	3780

aggggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt	3840
gaagcattta tcaggggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa	3900
ataaacaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa	3960
ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat caccaggccc tttcgtc	4017

<210> 3
 <211> 3888
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética
 <400> 3

tgcgcgcttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggtg acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt ctaatacgac tcaactatagg	420
gtaatacaag cttgcttggt ctttttgcag aagctcagaa taaacgctca actttggcag	480
atctcggtcg ccacatgta caacatgatg gagacggagc tgaagccgcc gggcccgag	540
caaaacttcg ggggcggcg cggcaactcc accgcggcg cggccggcg caaccagaaa	600
aacagcccg accgcgtcaa gcggcccatg aatgccttca tgggtgtggtc ccgcgggcag	660
cggcgcaaga tggcccagga gaacccaag atgcacaact cggagatcag caagcgccctg	720
ggcgccgagt ggaaactttt gtcggagacg gagaagcggc cgttcacga cgaggctaag	780
cggctgcgag cgctgcacat gaaggagcac ccggattata aataccggcc ccggcgga	840
accaagacgc tcatgaagaa ggataagtac acgctgcccg gcgggctgct ggccccggc	900
ggcaatagca tggcgagcgg ggtcgggggtg ggcgcggcc tgggcgcggg cgtgaaccag	960
cgcattggaca gttacgcga catgaacggc tggagcaacg gcagctacag catgatgcag	1020
gaccagctgg gctacccgca gcaccgggc ctcaatgcgc acggcgagc gcagatgcag	1080
cccatgcacc gctacgacgt gagcgccctg cagtacaact ccatgaccag ctgcagacc	1140
tacatgaacg gctcgccac ctacagcatg tctactcgc agcagggcac ccctggcatg	1200
gctcttggct ccatgggttc ggtggtcaag tccgaggcca gctccagccc ccctgtggtt	1260
acctcttcct cccactccag ggcgcctgc caggccgggg acctccggga catgatcagc	1320
atgtatctcc ccggcgccga ggtgccggaa cccgccgcc ccagcagact tcacatgtcc	1380

cagcactacc agageggccc ggtgcccggc acggccatta acggcacact gcccctctca	1440
cacatgtgag atatcactag tgactgacta ggatctgggt accactaaac cagcctcaag	1500
aacacccgaa tggagtctct aagctacata ataccaactt acactttaca aaatgttgtc	1560
ccccaaaatg tagccattcg tatctgctcc taataaaaag aaagtttctt cacattctgg	1620
atcctctaga gtgcacctgc aggcattgcaa gcttggcgta atcatgggtca tagctgtttc	1680
ctgtgtgaaa ttgttatccg ctccacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt	1740
gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgaagt aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc	1800
ccgctttcca gtccgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg	1860
ggagaggcgg tttgogtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct	1920
cggtcgttcg gctgcggcga ggggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca	1980
cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga	2040
accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc	2100
acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg	2160
cgtttccccc tggaaagctcc ctgctgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat	2220
acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgctgtaggt	2280
atctcagttc ggtgttaggtc gtctcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc	2340
agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg	2400
acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg	2460
gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg	2520
gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg	2580
gcaaacaaac caccgctggc agcgggtgggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca	2640
gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtggc	2700
acgaaaactc acgttaaggg attttgggtc tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga	2760
tcctttttaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc	2820
ctgacagtta ccaatgctta atcagtggg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt	2880
catccatagt tgccctgactc ccgctcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat	2940
ctggccccag tgcctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag	3000
caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct	3060
ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt	3120
tgcgcgaagt tggtgccatt gctacaggca tcgtgggtgtc acgctcgtcg tttggtagg	3180
cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca	3240

aaaaagcggg	tagctccttc	ggtcctccga	tcgttgctcag	aagtaagttg	gccgcagtgt	3300
tatcactcat	ggttatggca	gcactgcata	attctcttac	tgtcatgccca	tccgtaagat	3360
gcttttctgt	gactgggtgag	tactcaacca	agtcattctg	agaatagtgt	atgcggcgac	3420
cgagttgctc	ttgcccggcg	tcaatacggg	ataataccgc	gccacatagc	agaactttaa	3480
aagtgctcat	cattggaaaa	cgttcttcgg	ggcgaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	3540
tgagatccag	ttcgtatgtaa	cccactcgtg	cacccaactg	atcttcagca	tcttttactt	3600
tcaccagcgt	ttctgggtga	gcaaaaacag	gaaggcaaaa	tgccgcacaaa	aagggaataa	3660
gggcgacacg	gaaatggtga	atactcatat	tcttcctttt	tcaatattat	tgaagcattt	3720
atcaggggta	ttgtctcatg	agcggatata	tatttgaatg	tatttagaaa	aataaacaaa	3780
taggggttcc	gcgcacattt	ccccgaaaag	tgccacctga	cgtctaagaa	accattatta	3840
tcatgacatt	aacctataaa	aataggcgta	tcacgaggcc	ctttcgtc		3888

<210> 4
 <211> 4369
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética
 <400> 4

tgcgcggttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggetgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt ctaatacgac tcactatagg	420
gtaatacaag cttgcttggt ctttttgcag aagctcagaa taaacgctca actttggcag	480
atctgccacc atgaggcagc cacctggcga gtctgacatg gctgtcagcg acgcgctgct	540
cccatctttc tccacgttcg cgtctggccc ggcggaagg gagaagacac tgcgtcaagc	600
aggtgccccg aataaccgct ggcgggagga gctctccac atgaagcgac ttccccagt	660
gcttccccgc cggccctatg acctggcggc ggcgaccgtg gccacagacc tggagagcgg	720
cggagccggt gcggcttgcg gcggtagcaa cctggcgccc ctacctcgga gagagaccga	780
ggagttcaac gatctcctgg acctggactt tattctctcc aattcgctga cccatcctcc	840
ggagtcagtg gccgccaccg tgtcctcgtc agcgtcagcc tcctcttcgt cgtcgccgtc	900
gagcagcggc cctgccagcg cgcctccac ctgcagcttc acctatccga tccgggcccg	960

gaacgacccg ggcgtggcgc cgggcggcac gggcggaggg ctcctctatg gcagggagtc	1020
cgctccccct ccgacggctc ccttcaacct ggcggacatc aacgacgtga gccctcggg	1080
cggtctcgtg gccgagctcc tgcggccaga attggacccg gtgtacattc cgccgcagca	1140
gccgcagccg ccaggtggcg ggctgatggg caagttcgtg ctgaaggcgt cgctgagcgc	1200
ccctggcagc gagtacggca gcccgctcgg catcagcgtc agcaaaggca gccctgacgg	1260
cagccacccg gtggtggtgg cgcctacaa cggcggggccg ccgcgcacgt gcccgaagat	1320
caagcaggag gcggtctctt cgtgcacca cttgggcgtt ggacccctc tcagcaatgg	1380
ccaccggccg gctgcacacg acttccccct ggggcggcag ctcccagca ggactacccc	1440
gacctgggt cttgaggaag tgcctgagcag cagggactgt cacctgcc tgcgcttcc	1500
tcccggcttc catccccacc cggggcccaa ttaccatcc ttctgcccg atcagatgca	1560
gccgcaagtc ccgcgcctcc attaccaaga gctcatgcc cccggttcc gcctgccaga	1620
ggagcccaag ccaaagaggg gaagacgac gtggccccgg aaaaggaccg ccaccacac	1680
ttgtgattac ggggctgcg gcaaaacct cacaagagt tccatctca aggcacacct	1740
gcgaaccac acaggtgaga aacctacca ctgtgactgg gacggctgtg gatggaaatt	1800
cgcccgctca gatgaactga ccaggcacta ccgtaaacac acggggcacc gcccgttcca	1860
gtgcaaaaaa tgcgaccgag cttttccag gtccgaccac ctgccttac acatgaagag	1920
gcatttttaa gatatacta gtgactgact aggatctggt taccactaaa ccagcctcaa	1980
gaacacccga atggagtctc taagctacat aataccaact tacactttac aaaatgttgt	2040
ccccaaaat gtagccattc gtatctgctc ctaataaaaa gaaagtttct tcacattctg	2100
gatcctctag agtcgacctg caggcatgca agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt	2160
cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag	2220
tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgag taactcacat taattgcgtt gcgctcactg	2280
cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg	2340
gggagagggc gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcc cgctcactga ctgcgtgcgc	2400
tccgtcgttc ggctgcggcg agcggatatc gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc	2460
acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg	2520
aaccgtaaaa aggcgcgctt gctggcgctt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat	2580
cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag	2640
gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga	2700
tacctgtccg cttttctccc ttccggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg	2760
tatctcagtt cgggtgtagg cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt	2820

cagcccgacc gctgcgccctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac 2880
gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc 2940
ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag aacagtatctt 3000
ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc 3060
ggcaaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtggg ttttttggtt gcaagcagca gattacgcg 3120
agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atctttttcta cggggtctga cgctcagtgg 3180
aacgaaaact cacgttaagg gattttgggc atgagattat caaaaaggat cttcacctag 3240
atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg 3300
tctgacagtt accaatgctt aatcagttag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt 3360
tcatccatag ttgctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca 3420
tctggcccca gtgctgcaat gataccgcca gaccacgct caocggctcc agatttatca 3480
gcaataaacc agccagccgg aaggggcgag cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgcc 3540
tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt 3600
ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacagc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg 3660
gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgtgtg 3720
aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgtgtgca gaagtaagtt ggcgcagtg 3780
ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga 3840
tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga 3900
cagagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataatacgg cggcacatag cagaacttta 3960
aaagtgtca tcattgaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg 4020
ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact 4080
ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgcgcgaaa aaagggaata 4140
agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt 4200
tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia 4260
ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt 4320
atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtc 4369

<210> 5
<211> 3559
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sintética
<400> 5

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca

6

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt ctaatacgac tcaactatagg	420
gtaatacaag cttgcttggt ctttttgcag aagctcagaa taaacgctca actttggcag	480
atctgccacc atgggctccg tgtccaacca gcagtttgca ggtggctgcg ccaaggcggc	540
agaagaggcg ccgaggagg cgccggagga cgcggcccg gggcgggacg agcctcagct	600
gctgcacggt gcgggcatct gtaagtgggt caacgtgcgc atggggttcg gcttcctgtc	660
catgaccgcc cgcgcggggg tcgcgctcga cccccagtg gatgtctttg tgcaccagag	720
taagctgcac atggaagggt tccggagctt gaaggagggt gaggcagtgg agttcacctt	780
taagaagtca gccaaagggtc tggaatccat ccgtgtcacc ggacctggtg gagtattctg	840
tattgggagt gagaggcggc caaaaggaaa gagcatgcag aagcgcagat caaaaggaga	900
caggtgctac aactgtggag gtctagatca tcatgccaaag gaatgcaagc tgccacccca	960
gcccagaag tgccacttct gccagagcat cagccatatg gtagcctcat gtccgctgaa	1020
ggcccagcag ggccctagt cccagggaaa gccaacctac ttccgagagg aagaagaaga	1080
aatccacagc cctaccctgc tcccggaggc acagaattga gatatacta gtgactgact	1140
aggatctggt taccactaaa ccagcctcaa gaacaccga atggagtctc taagctacat	1200
aataccaact tacactttac aaaatgttgt ccccaaaat gtagccattc gtatctgctc	1260
ctaataaaaa gaaagtttct tcacattctg gatcctctag agtcgacctg caggcatgca	1320
agcttggcgt aatcatgggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt	1380
ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc	1440
taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc	1500
cagctgcatt aatgaatcg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat tgggcgctct	1560
tccgcttct cgtcactga ctgcgtgcgc tcggctcgttc ggctgcggcg agcggtatca	1620
gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac	1680
atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcggtt	1740
ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat caaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg	1800
cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc	1860
tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttccgggaagc	1920

gtggcgcttt ctcatagtct acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc 1980
aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac 2040
tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt 2100
aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct 2160
aactacggct acactagaag aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc 2220
ttcggaaaaa gagttagtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtggt 2280
ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg 2340
atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc 2400
atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa 2460
tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag 2520
gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg 2580
tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga 2640
gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag 2700
cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa 2760
gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc 2820
atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca 2880
aggcgagtta catgatcccc catggtgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg 2940
atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat 3000
aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc 3060
aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg 3120
gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg 3180
gggcgaaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt 3240
gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca 3300
ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata 3360
ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac 3420
atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa 3480
gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt 3540
atcacgaggc cctttcgtc 3559

<210> 6
<211> 3847
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> Sintética

<400> 6

tcgcgcgttt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctccc	gagacgggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagccc	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcacaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcgggcc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaaggg	ggatgtgctg	caagggcatt	aagttgggta	acgccagggt	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	ctaatacgac	tcactatagg	420
gtaatacaag	cttgcttgtt	ctttttgcag	aagctcagaa	taaacgctca	actttggcag	480
atctgccacc	atgagtgtgg	atccagcttg	tcccaaagc	ttgccttgct	ttgaagcatc	540
cgactgtaaa	gaatcttcac	ctatgcctgt	gatttgtggg	cctgaagaaa	actatccatc	600
cttgcaaatt	tcttctgctg	agatgcctca	cacagagact	gtctctcctc	tctcttctc	660
catggatctg	cttattcagg	acagccctga	ttcttccacc	agtcccaaag	gcaaacaacc	720
cacttctgca	gagaatagt	tcgcaaaaaa	ggaagacaag	gtcccgggtca	agaaacagaa	780
gaccagaact	gtgttctctt	ccaccagct	gtgtgtactc	aatgatagat	ttcagagaca	840
gaaataacct	agcctccagc	agatgcaaga	actctccaac	atcctgaacc	tcagctacaa	900
acaggtgaag	acctggttcc	agaaccagag	aatgaaatct	aagaggtggc	agaaaaacaa	960
ctggccgaag	aatagcaatg	gtgtgacgca	gaaggcctca	gcacctacct	acccagcct	1020
ctactcttcc	taccaccagg	gatgcctgg	gaaccgact	gggaaccttc	caatgtggag	1080
caaccagacc	tggaacaatt	caacctggag	caaccagacc	cagaacatcc	agtcctggag	1140
caaccactcc	tggaacactc	agacctggtg	caccacatcc	tggaacaatc	aggcctggaa	1200
cagtcccttc	tataactgtg	gagaggaatc	tctgcagtcc	tgcatgcaact	tccagccaaa	1260
ttctctgccc	agtgacttgg	aggctgcctt	ggaagctgct	ggggaaggcc	ttaatgtaat	1320
acagcagacc	actaggtatt	ttagtactcc	acaaaccatg	gatttattcc	taaactactc	1380
catgaacatg	caacctgaag	acgtgtgaga	tatcactagt	gactgactag	gatctggtta	1440
ccactaaacc	agcctcaaga	acacccgaat	ggagtctcta	agctacataa	taccaactta	1500
cactttacaa	aatgttgtcc	cccaaatgt	agccattcgt	atctgtctct	aataaaaaga	1560
aagtttcttc	acattctgga	tcctctagag	tcgacctgca	ggcatgcaag	cttggcgtaa	1620
tcattggtcat	agctgtttcc	tgtgtgaaat	tggtatccgc	tcacaattcc	acacaacata	1680
cgagccggaa	gcataaagt	taaagcctgg	ggtgcctaata	gagtgaagta	actcacatta	1740
attgcgttgc	gctcactgcc	cgttttccag	tcgggaaacc	tgctcgtcca	gctgcattaa	1800

tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg	1860
ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cgttatcagc tcaactcaaag	1920
gcggtaatac ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	1980
ggccagcaaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc	2040
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca	2100
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tccgtgtccg	2160
accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct	2220
catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg ttcgctccaa gctgggctgt	2280
gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag	2340
tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc	2400
agagcgagggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac	2460
actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga	2520
gttggttagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc	2580
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg	2640
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat gagattatca	2700
aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt	2760
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca	2820
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg	2880
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca	2940
ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggg	3000
cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaaagt	3060
agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca	3120
cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca	3180
tgatccccc tggtgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtccctccgat cgttgtcaga	3240
agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcoat gttatggcag cactgcataa ttctcttact	3300
gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga	3360
gaatagtgtg tgccggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg	3420
ccacatagca gaactttaaa agtgcctcat attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc	3480
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga	3540
tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat	3600
gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt	3660
caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt	3720

atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 3780
gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat cagcaggccc 3840
tttcgtc 3847

<210> 7
<211> 4304
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 7

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat 300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt ctaatacgac tcaactatagg 420
gtaatacaag cttgcttgtt ctttttgcag aagctcagaa taaacgctca actttggcag 480
atctgataat tcgccaccat ggattttttt cgggtagtgg aaaaccagca gcctcccgcg 540
acgatgcccc tcaacgttag cttcaccaac aggaactatg acctcgacta cgactcgggtg 600
cagccgtatt tctactgcga cgaggaggag aacttctacc agcagcagca gcagagcgag 660
ctgcagcccc cggcgcccag cgaggatatc tggaagaaat tcgagctgct gccacccccg 720
ccctgtccc ctagccgccg ctccgggctc tgctcgccct cctacgttgc ggtcacacccc 780
ttctcccttc ggggagacaa cgacggcggg ggccgggagct tctccacggc cgaccagctg 840
gagatggtga ccgagctgct gggaggagac atggtgaacc agagtttcat ctgcgacccc 900
gacgacgaga ccttcatcaa aaacatcatc atccaggact gtatgtggag cggcttctcg 960
gccgccgcca agctcgtctc agagaagctg gcctcctacc aggctgcgcg caaagacagc 1020
ggcagcccga accccgcccg cggccacagc gtctgctcca cctccagctt gtacctgcag 1080
gatctgagcg ccgcgcctc agagtgcac gaccctcggg tggctctccc ctaccctctc 1140
aacgacagca gctcgcccaa gtctgcgcc tcgcaagact ccagcgccct ctctccgtcc 1200
tcggattctc tgctctctc gacggagtcc tccccgagg gcagccccga gccctggtg 1260
ctccatgagg agacaccgcc caccaccagc agcgactctg aggaggaaca agaagatgag 1320
gaagaaatcg atgttgtttc tgtggaaaag aggcaggctc ctggcaaaaag gtcagagtct 1380

ggatcacctt	ctgctggagg	ccacagcaaa	cctcctcaca	gcccactggt	cctcaagagg	1440
tgccacgtct	ccacacatca	gcacaactac	gcagcgctc	cctccactcg	gaaggactat	1500
cctgctgcca	agaggggtcaa	gttggacagt	gtcagagtcc	tgagacagat	cagcaacaac	1560
cgaaaatgca	ccagccccag	gtcctcggac	accgaggaga	atgtcaagag	gogaacacac	1620
aacgtcttgg	agcgccagag	gaggaacgag	ctaaaacgga	gcttttttgc	cctgcgtgac	1680
cagatcccg	agttggaaaa	caatgaaaag	gcccccaagg	tagttatcct	taaaaaagcc	1740
acagcataca	tcctgtccgt	ccaagcagag	gagcaaaaagc	tcatttctga	agaggacttg	1800
ttgcggaaac	gacgagaaca	gttgaaacac	aaacttgaac	agctacggaa	ctcttgtgcg	1860
taaggatcat	cactagtgc	tgactaggat	ctggttacca	ctaaaccagc	ctcaagaaca	1920
cccgaatgga	gtctctaagc	tacataatac	caacttacac	tttacaaaat	gttgtcccc	1980
aaaatgtagc	cattcgtatc	tgctccta	aaaaagaaag	tttcttcaca	ttctggatcc	2040
tctagagtcg	acctgcaggc	atgcaagctt	ggcgtaatac	tggtcatagc	tgtttcctgt	2100
gtgaaattgt	tatccgctca	caattccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	2160
agcctgggg	gcctaatag	tgagctaact	cacattaatt	gcgttgcgct	cactgcccgc	2220
tttccagtcg	ggaaacctgt	cgtgccagct	gcattaatga	atcggccaac	gcgcggggag	2280
aggcggtttg	cgtattgggc	gctcttcgc	ttcctcgctc	actgactcgc	tgcgctcggt	2340
cgttcggctg	cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacgg	tatccacaga	2400
atcaggggat	aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccg	2460
taaaaaggcc	gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacia	2520
aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgcagga	ctataaagat	accaggcggt	2580
tccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	tggtccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	2640
gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	2700
cagttcggtg	taggtcgctc	gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	2760
cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtcc	aacccggtaa	gacacgactt	2820
atcgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggcgggtgc	2880
tacagagttc	ttgaagtgg	ggcctaacta	cggctacact	agaagaacag	tatttggtat	2940
ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	3000
acaaaccacc	gctggtagcg	gtggtttttt	tggttgcaag	cagcagatta	cgcgcagaaa	3060
aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaaacga	3120
aaactcacgt	taagggattt	tggtcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	3180
tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaatcaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggtctga	3240
cagttaccaa	tgcttaatac	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttogttcatc	3300

catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 3360
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 3420
 aaaccagcca gccggaagg cgcgagcgag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 3480
 ccagtctatt aattggtgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 3540
 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 3600
 attcagctcc gggtcccaac gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa 3660
 agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 3720
 actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 3780
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 3840
 ttgctcttgc ccggcgtaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 3900
 gctcatcatt ggaaaacggt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 3960
 atccagttcg atgtaaccca ctcgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 4020
 cagcgtttct gggtgagcaa aacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 4080
 gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca 4140
 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 4200
 gggtccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 4260
 gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtc 4304

<210> 8
 <211> 4251
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética

<400> 8

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
 attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300
 tacgccagct ggcgaaagg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccaggtt 360
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt ctaatacgac tcaatagag 420
 gtaatacaag cttgcttgtt ctttttgag aagctcagaa taaacgctca actttggcag 480
 atctgccacc atgcccctca acgttagctt caccaacagg aactatgacc tcgactacga 540

ctcgggtgcag ccgtatttct actgcgacga ggaggagaac ttctaccagc agcagcagca	600
gagcgagctg cagcccccg cgcccagcga ggatatctgg aagaaattcg agctgctgcc	660
cgcgcgcgcc ctgtccccta gccgcccgtc cgggctctgc tcgccctcct acgttgcggt	720
cacacccttc tcccttcggg gagacaacga cggcggtggc gggagcttct ccacggccga	780
ccagctggag atggtgaccg agctgctggg aggagacatg gtgaaccaga gtttcatctg	840
cgacccggac gacgagacct tcatcaaaaa catcatcatc caggactgta tgtggagcgg	900
cttctcggcc gccgccaaagc tcgtctcaga gaagctggcc tcctaccagg ctgcgcgcaa	960
agacagcggc agcccgaacc ccgcccggc ccacagcgtc tgctccacct ccagcttgta	1020
cctgcaggat ctgagcgccg ccgcctcaga gtgcatcgac ccctcggtag tcttccccta	1080
ccctctcaac gacagcagct cgcccaagtc ctgcgcctcg caagactcca gcgccttctc	1140
tccgtcctcg gattctctgc tctcctcgac ggagtcctcc ccgcagggca gcccogagcc	1200
cctggtgctc catgaggaga caccgcccac caccagcagc gactctgagg aggaacaaga	1260
agatgaggaa gaaatcgatg ttgtttctgt ggaaaagagg caggctcctg gcaaaaggtc	1320
agagtctgga tcaccttctg ctggaggcca cagcaaacct cctcacagcc cactggtcct	1380
caagagggtc cacgtctcca cacatcagca caactacgca gcgcctccct ccactcgga	1440
ggactatcct gctgccaaaga ggtcaagtt ggacagtgtc agagtcctga gacagatcag	1500
caacaaccga aaatgcacca gcccaggtc ctcgacacc gaggagaatg tcaagaggcg	1560
aacacacaac gtcttgagc gccagaggag gaacgagcta aaacggagct tttttgcct	1620
gcgtgaccag atcccgaggt tggaaaacaa tgaaaaggcc cccaaggtag ttatccttaa	1680
aaaagccaca gcatacatcc tgtccgtcca agcagaggag caaaagctca tttctgaaga	1740
ggacttggtg cggaaacgac gagaacagtt gaaacacaaa cttgaacagc tacggaactc	1800
ttgtgcgtaa ggatcatcac tagtgactga ctaggatctg gttaccacta aaccagcctc	1860
aagaacaccc gaatggagtc tctaagctac ataataccaa cttacacttt acaaaatggt	1920
gtcccccaaa atgtagccat tcgtatctgc tctaataaaa aagaaagttt cttcacattc	1980
tggatcctct agagtcgacc tgcaggcatg caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt	2040
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa	2100
agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaatgctg ttgcgctcac	2160
tgcccgtttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg	2220
cggggagagg cggtttgctt attgggcgct cttccgcttc ctgcgtcact gactcgctgc	2280
gctcggctgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat	2340
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	2400
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc	2460

atcacaaaaa	tcgacgctca	agtcagaggt	ggcgaaaccc	gacaggacta	taaagatacc	2520
aggcgtttcc	ccttggaagc	tccctcgtgc	gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccg	2580
gatacctgtc	cgccttttctc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgctgta	2640
ggtatctcag	ttcggtgtag	gtcgttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	2700
ttcagcccca	ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaagac	2760
aogacttato	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	aggatatgtag	2820
gcggtgctac	agagttcttg	aagtgggtggc	ctaactacgg	ctacactaga	agaacagtat	2880
ttggtatctg	cgtctctgtg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagttggt	agctcttgat	2940
ccggcaaaaa	aaccaccgct	ggtagcgggtg	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	3000
gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatcttttc	tacggggtct	gacgctcagt	3060
ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	3120
agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaactt	3180
ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	3240
gttcatccat	agtgcctga	ctccccgtcg	tgtagataac	tacgatacgg	gagggccttac	3300
catctggccc	cagtgtgca	atgataccgc	gagacccacg	ctcaccggct	ccagatttat	3360
cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagggccg	agcgcagaag	tggtcctgca	actttatccg	3420
cctccatcca	gtctattaat	tgttgccggg	aagctagagt	aagtagttcg	ccagttaata	3480
gtttgcgcaa	cgttggtgcc	attgctacag	gcacgtgggt	gtcacgctcg	togtttggtg	3540
tggcttcatt	cagctccggg	tcccaacgat	caaggcgagt	tacatgatcc	cccattgtgt	3600
gcaaaaaagc	ggttagctcc	ttcggctctc	cgatcgttgt	cagaagtaag	ttggccgcag	3660
tgttatcact	catggttatg	gcagcactgc	ataattctct	tactgtcatg	ccatccgtaa	3720
gatgcttttc	tgtgactggg	gagtactcaa	ccaagtcatt	ctgagaatag	tgtatgcggc	3780
gaccgagttg	ctcttgcccg	gcgtcaatac	gggataatac	cgcgccacat	agcagaactt	3840
taaaagtgc	catcattgga	aaacgttctt	cggggcgaaa	actctcaagg	atcttaccgc	3900
tgttgagatc	cagttcgatg	taaccactct	gtgcacccaa	ctgatcttca	gcattcttta	3960
ctttcaccag	cgtttctggg	tgagcaaaaa	caggaaggca	aatgccgca	aaaaagggaa	4020
taagggcgac	acggaaatgt	tgaatactca	tactcttcct	ttttcaatat	tattgaagca	4080
tttatcaggg	ttattgtctc	atgagcggat	acatatttga	atgtatttag	aaaaataaac	4140
aaataggggt	tccgcgcaca	tttccccgaa	aagtgccacc	tgacgtctaa	gaaaccatta	4200
ttatcatgac	attaacctat	aaaaataggc	gtatcacgag	gccctttcgt	c	4251

<210> 9
 <211> 4251
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 9

tcgcgcggttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt ctaatacgac tcaactatagg	420
gtaatacaag ottgottgtt ctttttgcag aagctcagaa taaacgctca actttggcag	480
atctgccacc atgcccctca acgttagctt caccaacagg aactatgacc tcgactacga	540
ctcggtgacg ccgtatttct actgcgacga ggaggagaac ttctaccagc agcagcagca	600
gagcgagctg cagcccccg cgcccagcga ggatatctgg aagaaattcg agctgctgcc	660
caccccgccc ctgtccccta gccgcgcctc cgggctctgc tcgccctcct acgttgcggt	720
cacacccttc tcccttcggg gagacaacga cggcgggtggc gggagcttct ccacggccga	780
ccagctggag atggtgaccg agctgctggg aggagacatg gtgaaccaga gtttcatctg	840
cgacccggac gacgagacct tcatcaaaaa catcatcatc caggactgta tgtggagcgg	900
cttctcggcc gccgccaaagc tcgtctcaga gaagctggcc tcctaccagg ctgcgcgcaa	960
agacagcggc agcccgaacc ccgcccgcgg ccacagcgtc tgctccacct ccagcttgta	1020
cctgcaggat ctgagcgcgg ccgcctcaga gtgcatcgac cctcgggtgg tcttccccta	1080
ccctctcaac gacagcagct cgcocaagtc ctgcgcctcg caagactoca gcgccttctc	1140
tccgtcctcg gattctctgc tctcctcgac ggagtcctcc ccgcagggca gccccagacc	1200
cctggtgctc catgaggaga caccgccac caccagcagc gactctgagg aggaacaaga	1260
agatgaggaa gaaatcgatg ttgtttctgt ggaaaagagg caggctcctg gcaaaaggtc	1320
agagtctgga tcaccttctg ctggaggcca cagcaaacct cctcacagcc cactggtcct	1380
caagagggtgc caogtctcca cacatcagca caactacgca gcgcctccct ccactcgga	1440
ggactatcct gctgccaaga ggtcaagtt ggacagtgtc agagtctga gacagatcag	1500
caacaaccga aaatgcacca gccccaggtc ctgggacacc gaggagaatg tcaagaggcg	1560
aacacacaac gtcttggagc gccagaggag gaacgagcta aaacggagct tttttgcct	1620
gcgtgaccag atcccgaggt tggaaaacaa tgaaaaggcc cccaaggtag ttatccttaa	1680

aaaagccaca gcatacatcc tgtccgtcca agcagaggag caaaagctca tttctgaaga	1740
ggacttggtg cggaacgac gagaacagtt gaaacacaaa cttgaacagc tacggaactc	1800
ttgtgcgtaa ggatcatcac tagtgactga ctaggatctg gttaccacta aaccagcctc	1860
aagaacacccc gaatggagtc tctaagctac ataataccaa cttacacttt acaaaatggt	1920
gtcccccaaa atgtagccat tcgtatctgc tcctaataaa aagaaagttt cttcacattc	1980
tggatcctct agagtcgacc tgcaggcatg caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt	2040
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa	2100
agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac	2160
tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg	2220
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgt cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc	2280
gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat	2340
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	2400
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc	2460
atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc	2520
aggcggtttc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg	2580
gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta	2640
ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg	2700
ttcagccoga ccgctgcgc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagac	2760
acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag	2820
gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat	2880
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat	2940
ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc	3000
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt	3060
ggaacgaaaa ctacagttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct	3120
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaacct	3180
ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc	3240
gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac	3300
catctggccc cagtgtgcga atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat	3360
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg	3420
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata	3480
gtttgcgcaa cgttggtgcc attgctacag gcctcgtggg gtcacgctcg tcgtttggta	3540

tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt 3600
 gcaaaaaagc ggtagctcc ttccggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag 3660
 tggtatcact catgggtatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa 3720
 gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc 3780
 gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 3840
 taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 3900
 tggtgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcctctttta 3960
 ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa 4020
 taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca 4080
 tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 4140
 aaataggggt tccgcgcaca tttcccccga aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta 4200
 ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt c 4251

<210> 10

<211> 4018

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 10

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
 attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt ctaatacgac tcaatatagg 420
 gtaatacaag cttgcttggt ctttttgagc aagctcagaa taaacgctca actttggcag 480
 atctgccacc atggactacg actcgtacca gcaactattc tacgactatg actgcgggga 540
 ggatttctac cgctccacgg cgcacagcga ggacatctgg aagaaattcg agctggtgcc 600
 atgcgggggc acgtgcgcgc cctggggctt gggtcggggc gcaggggacc cggcccccgg 660
 gattggtccc ccggagccgt ggcccggagg gtgcaccgga gacgaagcgg aatcccgggg 720
 ccactcgaaa ggctggggca ggaactacgc ctccatcata cgcctgact gcattgtggag 780
 cggcttctcg gcccgggaac ggctggagag agctgtgagc gaccggctcg ctctggcg 840
 gcccggggg aaccgcccga aggcgtccgc cgcggcgac tgactccca gcctogaagc 900

cggcaacccg gcgcccgcg cccctgtcc gctgggcgaa cccaagacc aggccgtgctc	960
cgggtccgag agcccaagcg actcggagaa tgaagaaatt gatgttgtga cagtagagaa	1020
gaggcagctc ctgggtattc ggaagccggt caccatcacg gtgcgagcag accccctgga	1080
tccctgcatg aagcatttcc acatctccat ccatcagcaa cagcacaact atgctgcccg	1140
ttttcctcca gaaagctgct cccaagaaga ggcttcagag aggggtcccc aagaagaggt	1200
tctggagaga gatgctgcag gggaaaagga agatgaggag gatgaagaga ttgtgagtcc	1260
cccacctgta gaaagtgagg ctgccagtc ctgccacccc aaacctgtca gttctgatac	1320
tgaggatgtg accaagagga agaatacaca ctctctggag cgcaagaggc ggaatgacct	1380
gcgttcgcga ttcttggcgc tgagggacca ggtgccacc ctggccagct gctccaaggc	1440
ccccaaagta gtgactctaa gcaaggcctt ggaatacttg caagccctgg tgggggctga	1500
gaagaggatg gctacagaga aaagacagct ccgatgccg cagcagcagt tgcagaaaag	1560
aattgcatac ctactggct actaaactag tgactgacta ggatctggtt accactaaac	1620
cagcctcaag aacaccgaa tggagtctct aagctacata ataccaactt acactttaca	1680
aaatgttgtc cccaaaatg tagccattcg tatctgctcc taataaaaag aaagtttctt	1740
cacattctgg atcctctaga gtcgacctgc aggcattgcaa gcttggcgta atcatggtca	1800
tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga	1860
agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg	1920
cgctcactgc ccgctttcca gtccgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc	1980
caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac	2040
tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata	2100
cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa	2160
aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct	2220
gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa	2280
agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgctgcgt ctctgttcc gaccctgccg	2340
cttaccggat acctgtccgc tttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca	2400
cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttegtccca agctgggctg tgtgcacgaa	2460
cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg	2520
gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg	2580
tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta actacggcta cactagaaga	2640
acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc	2700
tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcggtaggt tttttgttg caagcagcag	2760

attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tctttttctac ggggtctgac 2820
gctcagtga acgaaaactc acgttaaggg attttgggtca tgagattatc aaaaaggatc 2880
ttcacctaga tctttttaaa ttaaaaatga agtttttaa ataatctaaag tatatatgag 2940
taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta atcagtggag cacctatctc agcgatctgt 3000
ctatttcgtt catccatagt tgctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag 3060
ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accgggtcca 3120
gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcttgcaact 3180
ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca 3240
gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tctgtggtgtc acgctcgtcg 3300
tttgggtatg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc 3360
atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctcoga tctgtgtcag aagtaagttg 3420
gccgcagtgt tatcactcat gggtatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca 3480
tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt 3540
atgcggcgac cgagttgctc ttgccccggc tcaatacggg ataataccgc gccacatagc 3600
agaacttta aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc 3660
ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg caccocactg atcttcagca 3720
tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa 3780
aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat 3840
tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa 3900
aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa 3960
accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtc 4018

<210> 11
<211> 738
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 11

auggaaagcu cugccaagau ggagagcggc ggcgcgggcc agcagcccca gccgcagccc	60
cagcagcccu uccugccgcc cgcagccugu uucuuugcca cggccgcagc cgcggcggcc	120
gcagccgccg cagcggcagc gcagagcggc cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	180
cagcagcagc aggcgccgca gcugagaccg gcggccgacg gccagcccuc agggggcggu	240
cacaagucag cgccaagca agucaagcga cagcgcucgu cuucgcccga acugaugcgc	300
ugcaaacgcc ggcucaacuu cagcggcuuu ggcucagacc ugccgcagca gcagccggcc	360
gccguggcgc gccgcaacga gcgcgagcgc aaccgcguca aguuggucaa ccugggcuuu	420
gccacccuuc gggagcacgu ccccaacggc gcggccaaca agaagaugag uaagguggag	480
acacugcgcu cggcggucca guacaucgcg gcgcugcagc agcugcugga cgagcaugac	540
gcggugagcg ccgccuucca ggcaggcguc cugucgccc ccaucucucc caacuacucc	600
aacgacuuga acuccauggc cggcucgccc gucucauccu acucgucgga cgagggcucu	660
uacgacccgc ucagccccga ggagcaggag cuucucgacu ucaccaacug guucagaucu	720
gauaucacua gugacuga	738

<210> 12
 <211> 3576
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

auggaggugg	acaccgagga	gaagcggcau	cgcacgcggu	ccaaaggggu	ucgaguuccc	60
guggaaccag	ccauacaaga	gcuguucagc	ugucccaccc	cuggcuguga	cggcaguggu	120
caugucagug	gcaaaauagc	aagacacaga	aguguauaug	guugucccuu	ggcgaaaaaa	180
agaaaaacac	aagauaaaca	gccccagga	ccugcuccua	aacgaaagcc	auuugccgug	240
aaagcagaca	gcuccucagu	ggaugagugu	gacgacagug	augggacuga	ggacauggau	300
gagaaggagg	aggauaggag	ggaggaguac	uccgaggaca	augacgagcc	aggggaugag	360
gacgaggagg	acgaggagg	ggaccgggag	gaggaggagg	agaucgagga	ggaggauag	420
gacgaugacg	aggauaggaga	agauguggag	gaugaagaag	aggaagagga	ggaggaggag	480
gaggagggaag	aggaagaaga	aaacgaagac	caucaaauga	auugucacaa	uacucgaaua	540
augcaagaca	cagaaaagga	ugauaacaau	aaugacgaau	augacaauua	cgaugaacug	600
guggccaagu	cauuguuaaa	ccucggcaaa	aucgcugagg	augcagccua	ccggggccagg	660
acugagucag	aaaugaacag	caauaccucc	aaugucuggg	aagacgauag	ugacaaaaac	720
gaaaaccugg	gucggaaaag	ugaguugagu	uuagacuuag	acagugaugu	uguuagagaa	780
acaguggacu	cccuuaaacu	auuagcccaa	ggacacggug	uugugcucuc	agaaaacaug	840
aaugacagaa	auuaugcaga	cagcaugucg	cagcaagaca	guagaaauau	gaauuacguc	900
auguugggga	agcccaugaa	caauggacuc	auggaaaaga	ugguggagga	gagcgaugag	960
gagguguguc	ugagcagucu	ggaguguuug	aggaaucagu	gcuuugaccu	ggccagggaag	1020
cucagugaga	ccaacccgca	ggagagggaau	ccgcagcaga	acaugaacau	ccgucagcau	1080
guccggccag	aagaggacuu	cccagggaag	acgccggaca	gaaacuacuc	ggacaugcug	1140
aaccucaugc	ggcuggagga	gcaguugagc	ccccggucga	gaguguuugc	cagcugugcg	1200
aaggagggaug	ggugucauga	gcgggacgac	gauaccaccu	cugugaacuc	ggacaggucu	1260
gaagaggugu	ucgacaugac	caagggggaac	cugacccugc	uggagaaagc	caucgcuuug	1320

gaaacggaaa	gagcaaaggc	caugagggag	aagauggcca	uggaagcugg	gaggagggac	1380
aaauagaggu	cauauagagga	ccagucuccg	agacaacuuc	ccggggagga	cagaaagccu	1440
aaauccagug	acagccaugu	caaaaagcca	uacuaugauc	ccucaagaac	agaaaagaaa	1500
gagagcaagu	guccaacccc	cgggugugau	ggaaccggcc	acguaacugg	gcuguaccca	1560
caucaccgca	gccuguccgg	augcccgac	aaagauaggg	ucccuccaga	aauccuugcc	1620
augcaugaaa	guguccucaa	gugccccacu	ccgggucgca	cggggcgcg	gcaugucaac	1680
agcaacagga	acucccaccg	aagccucucc	ggaugcccga	ucgcugcagc	agagaaacug	1740
gccaaaggcac	aggaagca	ccagagcugc	gacgugucca	aguccagcca	ggccucggac	1800
cgcgugcuca	ggccaauug	cuuugugaag	cagcuggaga	uuccucagua	uggcuacaga	1860
aacaugucc	ccacaacuac	gccgcguucc	aaccuggcca	aggagcucga	gaaauauucc	1920
aagaccucgu	uugaauacaa	caguuacgac	aaccuauucu	auggcaagcg	agccauagcu	1980
cccaaggugc	aaaccaggga	uauaucccc	aaaggauaug	augaugcgaa	gcgguacugc	2040
aaggaccca	gcccagcag	cagcagcacc	agcagcuacg	cgcacagcag	cagcagcaac	2100
cugagcugcg	gcggggcgag	cagcgccagc	agcacgugca	gcaagagcag	cuucgacuac	2160
acgcacgaca	uggagcgcg	ccacauggcg	gccaccgcca	uccucaaccu	guccacgcgc	2220
ugcccgagga	ugcccgagaa	ccugagcacc	aagccgcagg	accugugcg	cacgcggaac	2280
ccugacaugg	agguggauga	gaacgggacc	cuggaccuca	gcaugaacaa	gcagaggccg	2340
cgggacagcu	gcugccccau	ccugaccccu	cuggagccca	ugucccccca	gcagcaggca	2400
gugaugaaca	accgguguuu	ccagcugggc	gagggcgacu	gcugggacu	gcccguagac	2460
uacaccaaaa	ugaaaccccg	gaggauagac	gaggacgagu	ccaaagacau	uacuccagaa	2520
gacuuggacc	cauuccagga	ggcucuagaa	gaaagacggu	aucccgggga	ggugaccauc	2580
ccaaguccca	aaccaagua	cccucagugc	aaggagagca	aaaaggacu	aaauaacucug	2640
ucuggcugcc	cccugcgga	caaaagcauu	cgaaguaugc	uggccaccag	cucccaagaa	2700
cucaagugcc	ccacgcccug	cugugauggu	ucuggacaua	ucacgggcaa	uuauugcuuc	2760
caucggagcc	uuucagguug	cccaagagca	aagaaaagug	guaucaggau	agcacagagc	2820
aaagaagaua	aagaagauca	agaacccauc	agguguccgg	uccccgggug	cgacggccag	2880
ggccacauca	cugggaagua	cgcgucuccu	cgcagcgccu	ccgggugccc	cuuggcgcc	2940
aagaggcaga	aagacgggua	ccugaauggc	ucccaguucu	ccuggaaguc	ggucaagacg	3000
gaaggcaugu	ccugccccac	gccaggauuc	gacggcucag	gccacgucag	cggcagcuuc	3060
cucacacacc	gcagcuuguc	aggaucccg	agagccacgu	cagcgaugaa	gaaggcaaag	3120
cuuucuggag	agcagaugcu	gaccuacaaa	cagcgggcca	gcaacggua	agaaaugau	3180
gaagaaaauca	aacaguuaga	ugaagaaauc	aaggagcuua	augaauccaa	uucccagaug	3240

gaagccgaua ugauuaaacu cagaacucag auuaccacga uggagagcaa ccugaagacc 3300
 aucgaagagg agaacaaagu gauugagcag cagaacgagu cucuccucca cgagcuggcg 3360
 aaccugagcc agucucugau ccacagccug gcuaacaucc agcugccgca cauggaucca 3420
 aucaaugaac aaaaauuuga ugcuuacgug acuacuuuga cggaaugua uacaaaucac 3480
 gaucguuau agaguccaga aaauaaagcc cuacuggaaa auauaaagca ggcugugaga 3540
 ggaauucagg ucagaucuga uaucacuagu gacuga 3576

<210> 13
 <211> 1281
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 13
 augggcgagc cucagcccca agguccucca agcuggacag acgagugucu caguucucag 60
 gacgaggagc acgaggcaga caagaaggag gacgaccucg aagccaugaa cgcagaggag 120
 gacucacuga ggaacggggg agaggaggag gacgaagaug aggaccugga agaggaggaa 180
 gaagaggaag aggaggauga cgaucaaaag cccaagagac gcggcccccac aaagaagaag 240
 augacuaagc cucgcccuga gcguuuuaa uugagacgca ugaaggcuua cggccgggag 300
 cggaaaccgca ugcacggacu gaacgcggcg cuagacaacc ugcgcaaggu ggugccuugc 360
 uauucuaaga cgcagaagcu guccaaaau gagacucugc gcuuggccaa gaacuacau 420
 ugggcucugu cggagaucuu gcgcucaggc aaaagcccag accuggucuc cuucguucag 480
 acgcuuugca agggcuuau ccaaccacc accaaccugg uugcgggcug ccugcaacuc 540
 aauccucgga cuuuucugcc ugagcagaac caggacaugc cccccaccu gccgacggcc 600
 agcgcuuucc ucccuguaca cccuacucc uaccagucgc cugggcugcc caguccgccu 660
 uacgguacca uggacagcuc ccaugucuuc cacguuaagc cuccgccgca cgcuaacagc 720
 gcagcgcugg agcccuucuu ugaaagccu cugacugauu gcaccagccc uoccuuugau 780
 ggaccocuca gcccgccgu cagcaucaau ggcaacuuc cuuucaaaac cgaaccgucc 840
 gccgaguug agaaaaaua ugccuuuacc augcacuau cugcagcgac acuggcaggg 900
 gcccaaagcc acggaucaau cuucucaggc accgcugccc cucgcugcga gaucaccaua 960
 gacaauaua uguccuucga uagccauuca caucaugagc gagucaugag ugcccagcuc 1020
 aaugccauau uucaugauua gaggcacgcc aguuuaccca uuuccgggaa acgaaccac 1080
 ugugcuuaca gugacugucg uguuuacaaa aggcagcccu uuggguacua cugcugcaaa 1140
 gugcaauuac uccaagcuuc aagugauua uguauuuuu gucauuacug ccuuuggaag 1200
 aaacagggga ucaaaguucc uguuacccu augauuuuu uucuaauagcu cuucuaauua 1260
 aaaaauaaaa aaauacagua a 1281

<210> 14

<211> 1311
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintética

<400> 14

```

auggcgaccg cagcgucuaa ccacuacagc cugcucaccu ccagcgccuc caucgugcac      60
gccgagccgc ccggcgggcau gcagcagggc gccggggggcu accgcgaagc gcagagccug      120
gugcagggcg acuacggcg cugcagagc aacggacacc cgcucagcca cgcucaccag      180
uggaucacag cgcuguccca cggcggcggc gggggcgggcg gcgacggcuc cccguggucc      240
accagcccc ugggccagcc ggacaucaag ccucggugg ugguagcagca gggcgggccgc      300
ggagacgagc ugcacggggc aggcgcccug cagcagcagc aucagcagca gcaacagcaa      360
cagcagcagc aacagcagca acagcagcag cagcagcagc aacagcggcc gccgcaucug      420
gugcaccacg ccgcuaacca ccaccggga cccggggcau ggcgagcgc gccggcugca      480
gcgccaccuc caccuccau gggagcgucc aacggcgggcu ugcucuacuc gcagcccagc      540
uucacgguga acggcaugcu gggcgccggc gggcagucgg ccgggcugca ccaccacggc      600
cugcgggacg cgcacgacga gccacaccau gccgaccacc acccgcaccc gcacucgcac      660
ccacaccagc agccgcccgc cccgcccgc cgcaggguc cgcugggcca cccaggcgcg      720
caccacgacc cgcacucgga cgaggacacg ccgaccucgg acgaccugga gcaguucgcc      780
aagcaguuca agcagcggcg gaucaaacug ggauuuacac aagcggacgu ggggcuggcu      840
cugggcaccc uguauggcaa cguguucucg cagaccacca ucugcagguu ugaggccucg      900
cagcugagcu ucaagaacau gugcaagcug aagccuuugu ugaacaagug guuggaggag      960
gcggacucgu ccucgggcag cccacgagc auagacaaga ucgcagcgca agggcgcaag      1020
cgaaaaagc ggaccuccau cgaggugagc gucaaggggg cucuggagag ccauuuccuc      1080
aaugcccca agccucggc ccaggagauc accuccucg cggacagcuu acagcuggag      1140
aaggaggugg ugagaguug guuuuguaac aggagacaga aagagaaaag gaugaccccu      1200
cccggaggga cucugccggg cgccgaggau guguacgggg ggaguaggga cacuccacca      1260
caccacgggg ugcagacgcc cguccagaga ucaucacuag ugacugacua g      1311
    
```

<210> 15
 <211> 1332
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 15

```

auggcgaccg cagcgucuaa ccacuacagc cugcucaccu ccagcgccuc caucgugcac      60
    
```

gccgagccgc ccggcgccau gcagcagggc gcggggggcu accgcgaagc gcagagccug 120
gugcagggcg acuaacggcg ucugcagagc aacggacacc cgcucagcca cgcucaccag 180
uggaucaccg cgcuguccca cggcgccggc ggcgggggcg guggcgggcg cggggggggc 240
ggggcgggcg gcggggggcg cggcgacggc uccccguggu ccaccagccc ccuggggccag 300
ccggacauca agcccucggu gguggugcag cagggcggcc gcggagacga gcugcacggg 360
ccaggcgccc ucagcagca gcaucagcag cagcaacagc aacagcagca gcaacagcag 420
caacagcagc agcagcagca gcaacagcgg ccgccgcauc uggugcacca cggcgcuac 480
caccaccccg gaccggggg auggcggagc gcggcgggcg cagcgcaccu cccaccucc 540
augggagcgu ccaacggcg cuugcucuac ucgcagccca gcuucacggu gaacggcaug 600
cuggcgccg gcggcgagcc ggccggucug caccaccacg gccugcgga cgcgcacgac 660
gagccacacc augccgacca ccaccgcac ccgcacucgc accacacca gcagccgccg 720
ccccgcggc ccccgaggg uccgccuggc caccaggcg cgcaccacga cccgcacugc 780
gacgaggaca cgccgaccuc ggacgaccug gagcaguucg ccaagcaguu caagcagcgg 840
cggaucaaac ugggauuuac ccaagcggac guggggcugg cucugggcac ccuguauggc 900
aacguguucu cgcagaccac caucugcagg uuugaggccc ugcagcugag cuucaagaac 960
augugcaagc ugaagccuu guugaacaag ugguuggagg aggcggacuc guccucgggc 1020
agccccacga gcauagacaa gaucgcagcg caagggcgca agcggaaaaa gcggaccucc 1080
aucgagguga gcgucaaggg ggcucuggag agccauuucc ucaaauccc caagccucg 1140
gcccaggaga ucaccucccu cgcggacagc uuacagcugg agaaggaggu ggugagaguu 1200
ugguuuuua acaggagaca gaaagagaaa aggaugaccc cucccgagg gacucugccg 1260
ggcgccgagg auguguacgg ggggaguagg gacacuccac cacaccacgg ggugcagacg 1320
cccguccagu ga 1332

<210> 16
<211> 1215
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 16

ggguaauaca agcuugcuug uucuuuuugc agaagcucag aaauaacgcu caacuunuggc	60
agaucugcca ccauggagcu acugucgcca ccgcuccgcg acguagaccu gacggccccc	120
gacggcucuc ucugcuccuu ugccacaacg gacgacuuc augacgaccc guguuucgac	180
uccccggacc ugcgcuuuuu cgaagaccug gacccgcgcc ugaugcacgu gggcgcguc	240
cugaaacccg aagagcacuc gcacuucccc gcggcgguug acccgcccc gggcgcacgu	300
gaggacgagc augugcgcg gcaccagcgg caccaccagg cgggcccug ccuacugug	360
gccugcaagg cgugcaagcg caagaccacc aacgccgacc gccgcaaggc cgccaccaug	420
cgcgagcggc gccgccugag caaaguauu gaggccuuug agacacucua gcgcugcacg	480
ucgagcaauc caaacccagc guugcccaag guggagaucc ugcgcaacgc cauccgcuau	540
aucgaggggc ugcaggcucu gcugcgcgac caggacgccg cggcccccug cgccgcagcc	600
gccuucuaug cggcgggccc gcugcccccg ggccgcggcg gcgagcacua cagcggcgac	660
uccgacgcu ccagcccgcg cuccaacugc uccgacggca ugauggacua cagcgggccc	720
ccgagcggcg cccggcgggc gaacugcuac gaaggcgccu acuacaacga ggcgccagc	780
gaaccaggc ccgggaagag ugcggcgguug ucgagccuag acugccuguc cagcaucgug	840
gagcgcaucu ccaccgagag ccugcgggc cccgccucc ugcuggcgga cgugccuuu	900
gagucgccuc cgcgcaggca agaggcugcc gccccagcg agggagagag cagcggcgac	960
cccaccagc caccggacgc cggcccgag ugcccugcg gugcgaaccc caaccgaua	1020
uaccaggugc ucugaacuag ugacugacua ggaucugguu accacuaaac cagccucaag	1080
aacacccgaa uggagucucu aagcuacua auaccaacu acacuuuaca aaauugugc	1140
ccccaaaug uagccauucg uaucugcucc uaauaaaag aaaguucuu cacauucgg	1200
auccucuaga gucga	1215

REIVINDICACIONES

1. Una composición de ARN tratado que comprende ARN monocatenario o ARNm sintetizado *in vitro*, en la que menos del 0,01 %, preferentemente menos del 0,001 %, más preferentemente menos del 0,0002 % de la masa de ARN en dicha composición de ARN tratado es ARN bicatenario (ARNbc) de un tamaño superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud;
 5 en la que dicha composición de ARN tratado se ha obtenido tratando ARN monocatenario sintetizado *in vitro* con una proteína endorribonucleasa III específica del ARN bicatenario en una solución acuosa tamponada que comprende cationes de magnesio a una concentración de aproximadamente 1-4 mM y una sal que proporciona una fuerza iónica equivalente a al menos aproximadamente 50mM de acetato de potasio o glutamato de potasio.
- 10 2. La composición de ARN tratado de la reivindicación 1, en la que dicho tratamiento comprende además purificar o limpiar dicho ARN monocatenario o ARNm eliminando los componentes de reacción de la endorribonucleasa III y los productos de digestión de ARN bicatenario.
3. La composición de ARN tratado de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho ARN monocatenario o ARNm **está caracterizado por** al menos uno de los siguientes:
 - 15 i) es un producto de transcripción *in vitro* de un molde de ADN por una ARN polimerasa;
 - ii) es ARNm o un precursor de ARN monocatenario del ARNm antes de que se ponga la caperuza y/o se poliadenile;
 - iii) codifica al menos una proteína;
 - iv) codifica un factor de transcripción;
 - 20 v) codifica una proteína CD, que significa una proteína identificada en el agrupamiento del sistema de diferenciación;
 - vi) codifica una enzima;
 - vii) codifica una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas;
 - viii) codifica una citocina o quimiocina;
 - 25 ix) codifica una proteína receptora de la superficie celular;
 - x) codifica una proteína de una vía de señalización celular;
 - xi) codifica un anticuerpo;
 - xii) codifica un receptor de linfocitos T;
 - xiii) codifica una proteína indicadora;
 - 30 xiv) contiene uno o más ribonucleósidos modificados seleccionados del grupo que consiste en pseudouridina, 1-metilpseudouridina, 5-metiluridina, 2'-O-metiluridina y 2-tiouridina en lugar de al menos una parte de los correspondientes ribonucleósidos de uridina sin modificar y 5-metilcitidina en lugar de al menos una parte de los correspondientes ribonucleósidos de citidina sin modificar;
 - xv) presenta una caperuza en 5';
 - 35 xvi) presenta una caperuza con una estructura Cap 1;
 - xvii) presenta una cola de poli A;
 - xviii) está libre de ribonucleósidos modificados distintos de aquellos ribonucleósidos que comprenden la estructura de caperuza en 5', si está presente una caperuza en 5', incluyendo el penúltimo nucleósido 5' cuando el ARN monocatenario sintetizado *in vitro* presenta una estructura de cap1;
 - 40 xix) presenta al menos una secuencia heteróloga seleccionada entre: una secuencia de UTR 5', secuencia de Kozak, una secuencia IRES y secuencia UTR 3';
 - xx) no codifica una proteína o un polipéptido, sino que comprende al menos un ARN largo no codificante (ARNnc);
 - xxi) codifica una proteína;
 - 45 xxii) codifica una proteína funcional;
 - xxiii) codifica una proteína que está presente sobre o en una membrana celular;
 - xxiv) codifica una proteína efectora inmune;
 - xxv) codifica una proteína de complemento de un sistema inmune de vertebrado; y
 - xxvi) codifica una proteína que comprende un receptor para una vía de señalización.
- 50 4. La composición de ARN tratado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición de ARN o ARN monocatenario o ARNm codifica al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en: una proteína que reduce o suprime una respuesta inmune innata que comprende producción o respuesta de interferón (IFN), tal como ARNm codificante de la proteína B18R, o la proteína E3L o K3L del virus vaccinia o un fragmento funcional o variante de cualquiera de las mismas.
- 55 5. La composición de ARN tratado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición de ARN o ARN monocatenario o ARNm codifica al menos una proteína seleccionada 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 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 betal (TGF-beta1), factor de
 - 60

crecimiento de tipo insulínico (IGF) y hormona estimulante de alfa-melanocitos (alfa-MSH); factor de crecimiento de tipo insulínico I (IGF-I); IL-4; IL-13; IL-10; óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); una proteína de choque térmico; y regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR); o un fragmento funcional o variante de cualquiera de las mismas;

5 una enzima con actividad antioxidante seleccionada de entre catalasa, fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa-1 y superóxido dismutasa-2; tirosina quinasa de Bruton; adenosina desaminasa; y ecto-nucleósido trifosfato difosfololasa, o un fragmento funcional o variante de cualquiera de las mismas.

10 6. La composición de ARN tratado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición de ARN comprende moléculas de ARN monocatenario o ARNm que codifican una o más de las proteínas seleccionadas de uno cualquiera de los grupos A) a F) a continuación:

A) MYOD; o

B) ASCL1, MYT1L, NEUROD1 y POU3F2 (AMNP) o un fragmento funcional o una variante de cualquiera de las mismas; o

15 C) ETS2, MESP1, GATA4, HAND2, TBX5 y MEF2C o un fragmento funcional o una variante de cualquiera de las mismas; o

D) ASCL1, EN1, FOXA2, LMX1A, NURR1 y PITX3 o un fragmento funcional o una variante de cualquiera de las mismas; o

20 E) HNF1 α , HNF4 α , FOXA1, FOXA2, FOXA3, y GATA4 o un fragmento funcional o una variante de cualquiera de las mismas; o

F) OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG y una proteína MYC seleccionada de c-MYC, c-MYC(T58A) y L-MYC, o un fragmento funcional o una variante de cualquiera de las anteriores.

7. La composición de ARN tratado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición de ARN o ARN monocatenario o ARNm codifica al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en: CD1a; CD1b;

25 CD1c; CD1d; CD1e; CD2; CD3d; CD3e; CD3g; CD4; CD5; CD6; CD7; CD8a; CD8b; CD9; CD10; CD11a; CD11b; CD11c; CD11d; CDw12; CD14; CD16a; CD16b; CD18; CD19; CD20; CD21; CD22; CD23; CD24; CD25; CD26; CD27; CD28; CD29; CD30; CD31; CD32; CD33; CD34; CD35; CD36; CD37; CD38; CD39; CD40; CD41; CD42a;

CD42b; CD42c; CD42d; CD44; CD45; CD46; CD47; CD48; CD49a; CD49b; CD49c; CD49d; CD49e; CD49f; CD50; CD51; CD52; CD53; CD54; CD55; CD56; CD57; CD58; CD59; CD61; CD62E; CD62L; CD62P; CD63; CD64; CD66a;

30 CD66b; CD66c; CD66d; CD66e; CD66f; CD68; CD69; CD70; CD71; CD72; CD74; CD79a; CD79b; CD80; CD81; CD82; CD83; CD84; CD85a; CD85c; CD85d; CD85e; CD85f; CD85g; CD85h; CD85i; CD85j; CD85k; CD86; CD87;

CD88; CD89; CD90; CD91; CD92; CD93; CD94; CD95; CD96; CD97; CD98; CD99; CD100; CD101; CD102; CD103; CD104; CD105; CD106; CD107a; CD107b; CD108; CD109; CD110; CD111; CD112; CD113; CD114; CD115;

CD116; CD117; CD118; CD119; CD120a; CD120b; CD121a; CD121b; CD122; CD123; CD124; CD125; CD126; CD127; CD129; CD130; CD131; CD132; CD133; CD134; CD135; CD136; CD137; CD138; CD139; CD140a;

CD140b; CD141; CD142; CD143; CD144; CD146; CD147; CD148; CD150; CD151; CD152; CD153; CD154; CD155; CD156a; CD156b; CD157; CD158a; CD158b1; CD158b2; CD158c; CD158d; CD158e; CD158f1; CD158g; CD158h;

CD158i; CD158j; CD158k; CD158z; CD159a; CD159c; CD160; CD161; CD162; CD163; CD163b; CD164; CD165; CD166; CD167a; CD167b; CD168; CD169; CD170; CD171; CD172a; CD172b; CD172g; CD173; CD177; CD178;

40 CD179a; CD179b; CD180; CD181; CD182; CD183; CD184; CD185; CD186; CD191; CD192; CD193; CD194; CD195; CD196; CD197; CDw198; CDw199; CD200; CD201; CD202b; CD203a; CD203c; CD204; CD205; CD206;

CD207; CD208; CD209; CD210; CDw210b; CD212; CD213a1; CD213a2; CD214; CD215; CD217; CD218a; CD218b; CD220; CD221; CD222; CD223; CD224; CD225; CD227; CD228; CD229; CD230; CD231; CD232; CD233;

CD234; CD235a; CD235b; CD236; CD238; CD239; CD240CE; CD240D; CD241; CD242; CD243; CD244; CD245; CD246; CD247; CD248; CD249; CD252; CD253; CD254; CD256; CD257; CD258; CD261; CD262; CD263; CD264;

45 CD265; CD266; CD267; CD268; CD269; CD270; CD271; CD272; CD273; CD274; CD275; CD276; CD277; CD278; CD279; CD280; CD281; CD282; CD283; CD284; CD286; CD288; CD289; CD290; CD292; CDw293; CD294; CD295;

CD296; CD297; CD298; CD299; CD300a; CD300b; CD300c; CD300d; CD300e; CD300f; CD300g; CD301; CD302; CD303; CD304; CD305; CD306; CD307a; CD307b; CD307c; CD307d; CD307e; CD309; CD312; CD314; CD315;

50 CD316; CD317; CD318; CD319; CD320; CD321; CD322; CD324; CD325; CD326; CD327; CD328; CD329; CD331; CD332; CD333; CD334; CD335; CD336; CD337; CD338; CD339; CD340; CD344; CD349; CD350; CD351; CD352;

CD353; CD354; CD355; CD357; CD358; CD360; CD361; CD362; y CD363, o un fragmento funcional o una variante de cualquiera de las anteriores.

8. La composición de ARN tratado de la reivindicación 1 **caracterizada por** al menos uno de los siguientes:

55 i) dicha sal en dicha solución acuosa tamponada proporciona una fuerza iónica al menos tan alta como la del acetato de potasio a una concentración de aproximadamente 50-300 mM;

ii) dicho tratamiento comprende además purificar o limpiar el ARN monocatenario o ARNm en la composición de ARN por precipitación salina, PAGE, electroforesis en gel de agarosa, cromatografía en columna giratoria o HPLC, por lo que se eliminan las moléculas de ARN bicatenario contaminantes digeridas;

60 iii) dicho tratamiento comprende además purificar o limpiar el ARN monocatenario o ARNm en la composición de ARN tratado usando al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en poner en contacto la solución con una o más desoxirribonucleasas, extraer la preparación de ARN con fenol y/o cloroformo, precipitación de

alcohol, precipitar el ARN monocatenario con acetato de amonio y lavado de los precipitados de ARN con etanol al 70 % y no comprende el uso de cromatografía en columna, incluyendo flujo de gravedad, HPLC o FPLC;

iv) dicho ARN monocatenario o ARNm contiene al menos un ribonucleósido modificado, seleccionado del grupo que consiste en pseudouridina, 1-metilpseudouridina, 5-metilcitidina, 5-metiluridina, 2'-O-metiluridina y 2-tiouridina en lugar de al menos una parte del correspondiente ribonucleósido canónico sin modificar, que reduce la inducción o la activación de un sensor de ARN o una ruta de respuesta inmune innata en una célula;

v) dicho ARN monocatenario o ARNm está libre de ribonucleósidos modificados distintos de aquellos ribonucleósidos que comprenden la estructura de nucleótido de caperuza en 5' si está presente una caperuza en 5', incluyendo el penúltimo nucleósido 5' cuando el ARN monocatenario sintetizado *in vitro* exhibe una estructura de caperuza cap1, si está presente.

9. La composición de ARN tratado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que dicho ARN monocatenario o ARNm codifica una proteína terapéutica para su uso en terapia de reemplazo enzimático.

10. La composición de ARN tratado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en tratamiento para medicina regenerativa, reprogramación celular, una terapia basada en células, una terapia de reemplazo enzimático, trasplante o reparación de células, tejidos y órganos, ingeniería de tejidos u órganos o inmunoterapia.

11. Una dosis eficaz de una composición de ARN tratado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en la reducción o la eliminación de un síntoma o enfermedad en un sujeto humano o animal.

12. Uso de la composición de ARN tratado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la preparación de un medicamento para un tratamiento para medicina regenerativa, reprogramación celular, una terapia basada en células, una terapia de reemplazo enzimático, trasplante o reparación de células, tejidos y órganos, ingeniería de tejidos u órganos o inmunoterapia.

13. Uso de una dosis eficaz de una composición de ARN tratado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en la preparación de un medicamento para la reducción o la eliminación de un síntoma o enfermedad en un sujeto humano o animal.

14. Uso de una solución acuosa tamponada que contiene una proteína endorribonucleasa III específica del ARN bicatenario, cationes de magnesio a una concentración de aproximadamente 1-4 mM y una sal que proporciona una fuerza iónica equivalente a al menos aproximadamente 50 mM de acetato de potasio o glutamato de potasio para tratar una composición de ARN que comprende bien ARNm o un precursor de ARN monocatenario a dicho ARNm antes de que se ponga la caperuza y/o se poliadenile de tal manera que la cantidad de ARN bicatenario que es superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud después de dicho tratamiento es menos del 0,01 %, preferentemente menos del 0,001 %, más preferentemente menos del 0,0002 % de la masa de ARN en dicha composición de ARN tratado.

15. Uso de una solución acuosa tamponada que contiene una proteína endorribonucleasa III específica del ARN bicatenario, cationes de magnesio a una concentración de aproximadamente 1-4 mM y una sal que proporciona una fuerza iónica equivalente a al menos aproximadamente 50 mM de acetato de potasio o glutamato de potasio para tratar una composición de ARN que comprende bien ARNm o un ARN monocatenario que codifica una proteína funcional para terapia de reemplazo enzimático, en el que la cantidad de ARN bicatenario que es superior a aproximadamente 40 pares de bases de longitud después de dicho tratamiento es menos del 0,01 %, preferentemente menos del 0,001 %, más preferentemente menos del 0,0002 % de la masa de ARN en dicha composición de ARN tratado.

FIG. 1

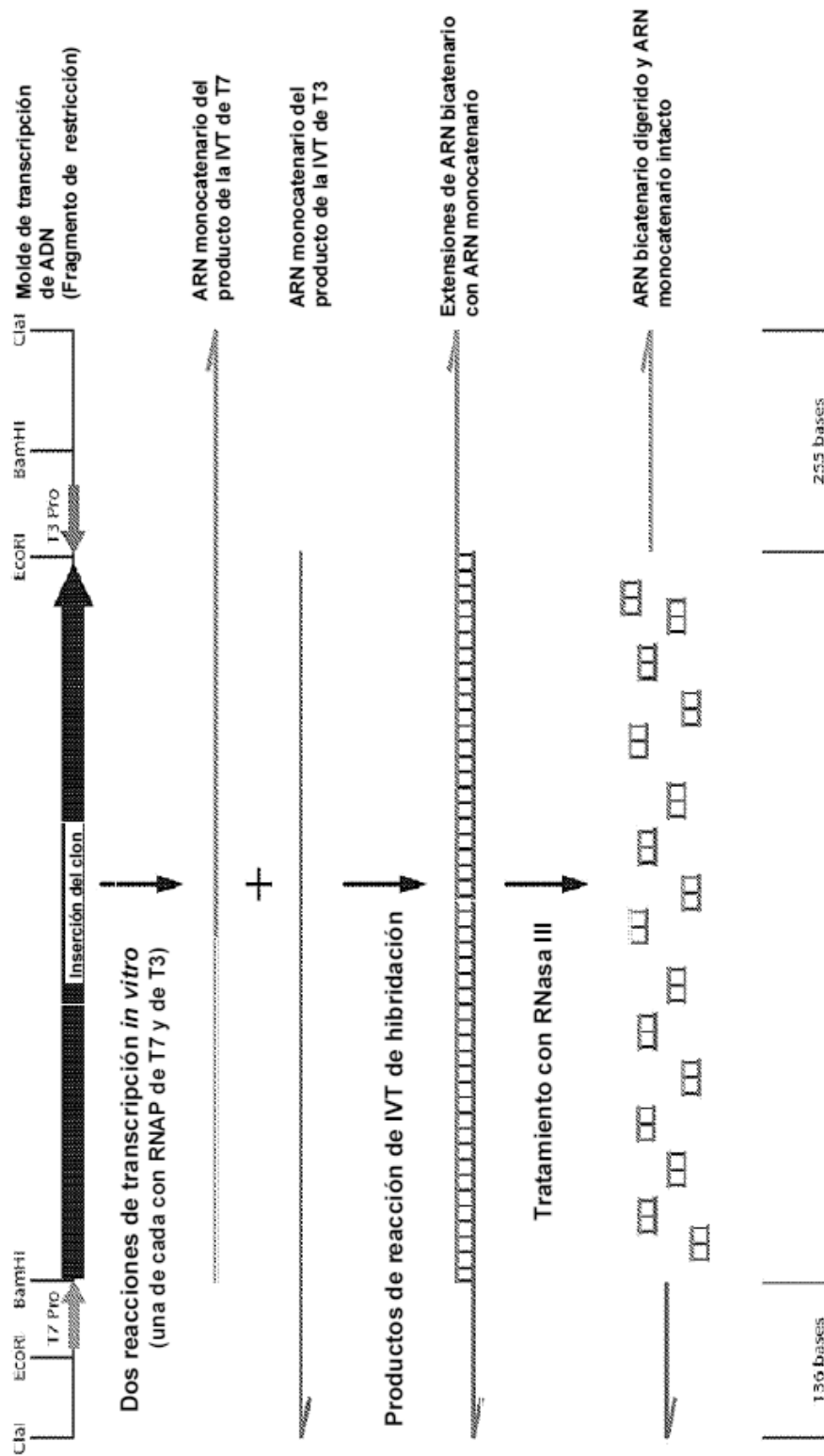


FIG. 2

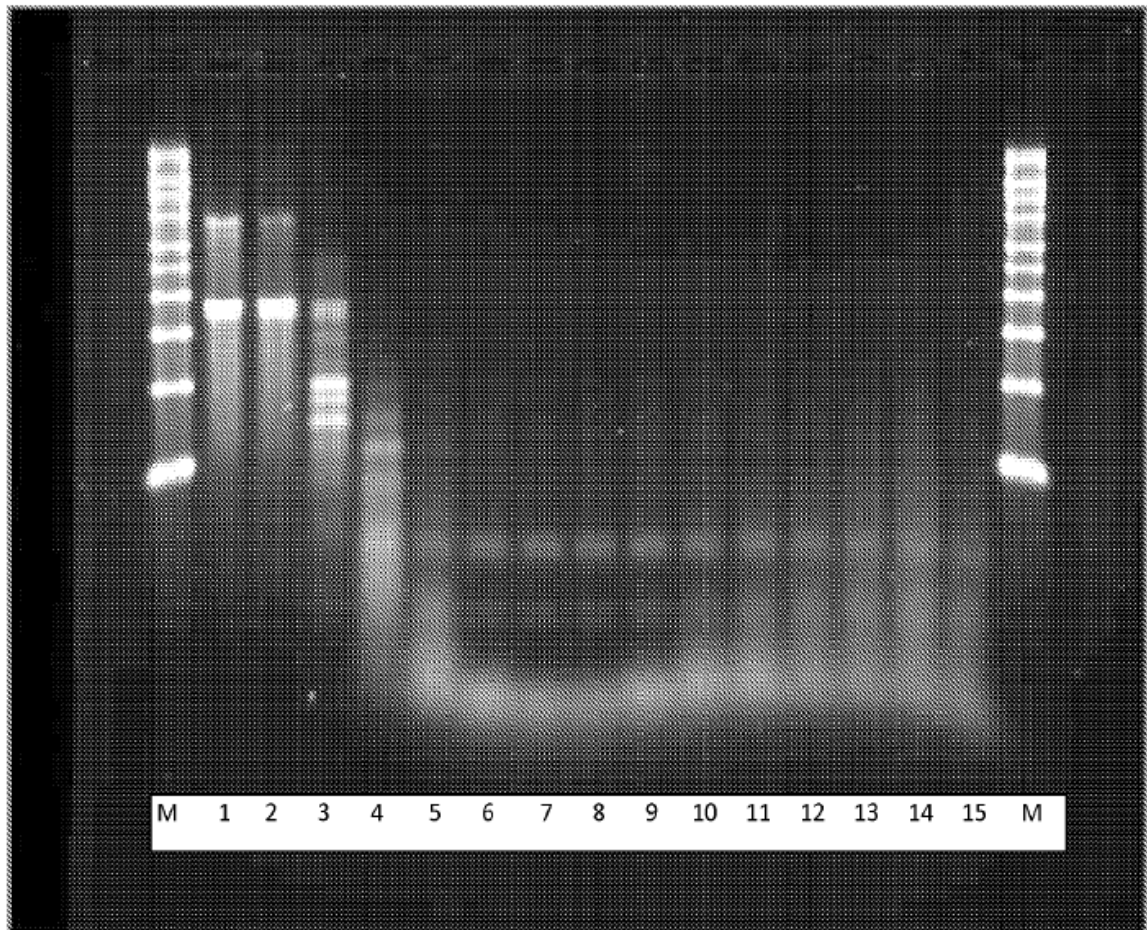


FIG. 3

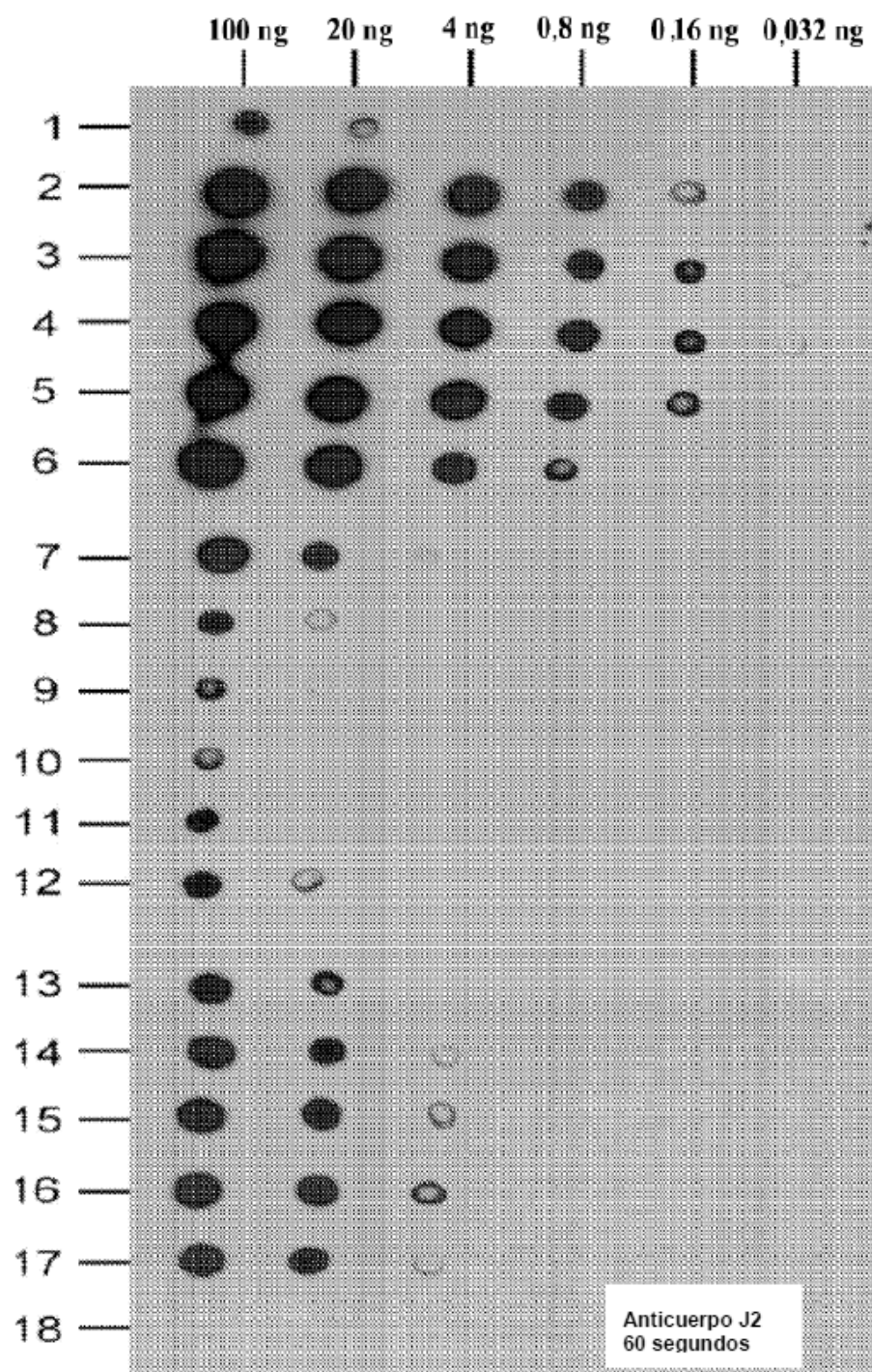


FIG. 4

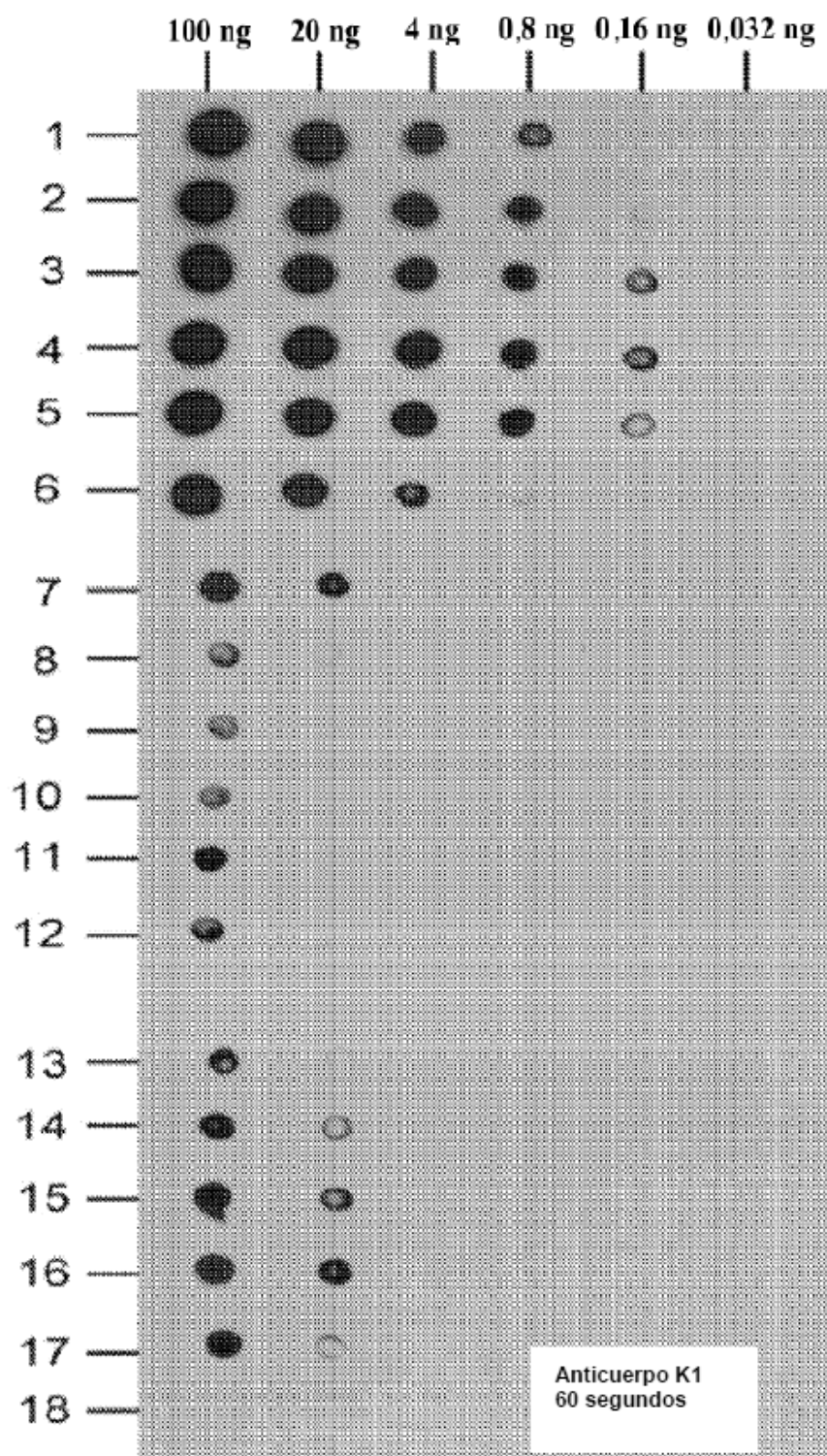


FIG. 5

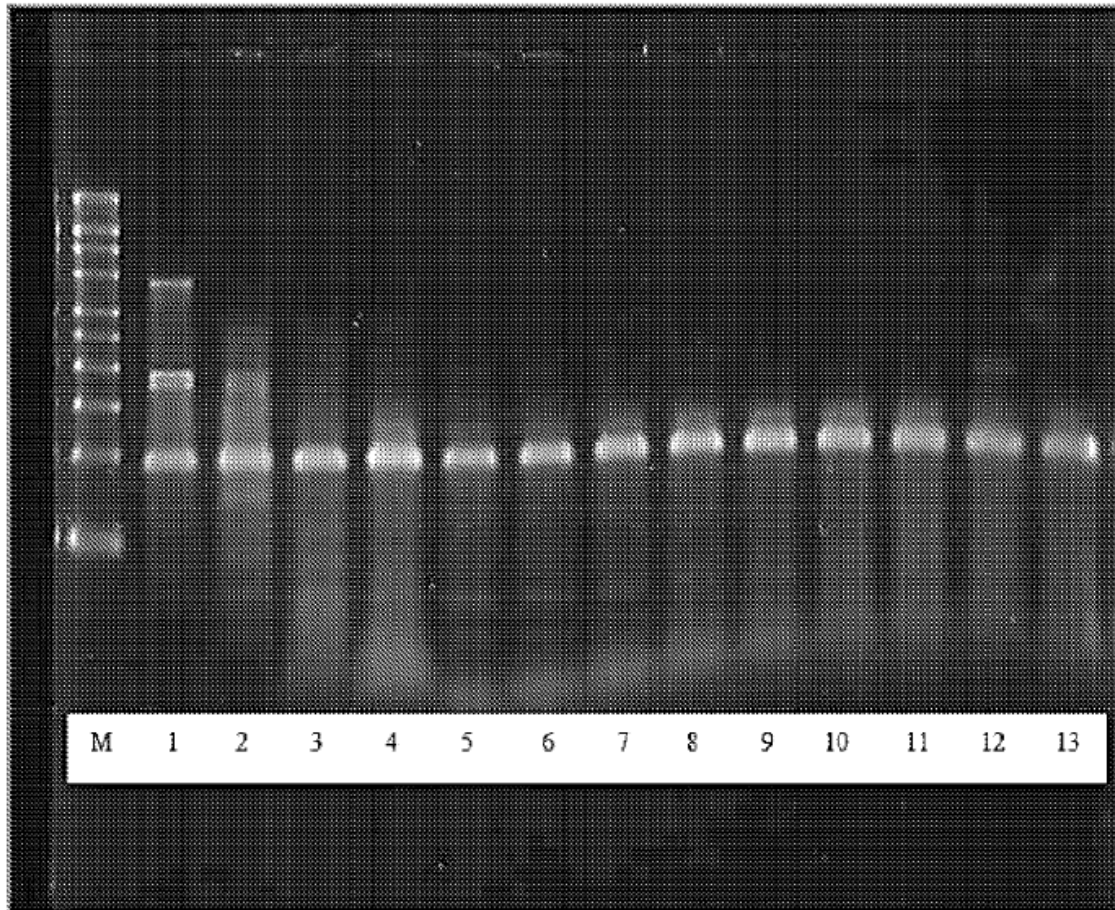


FIG. 6

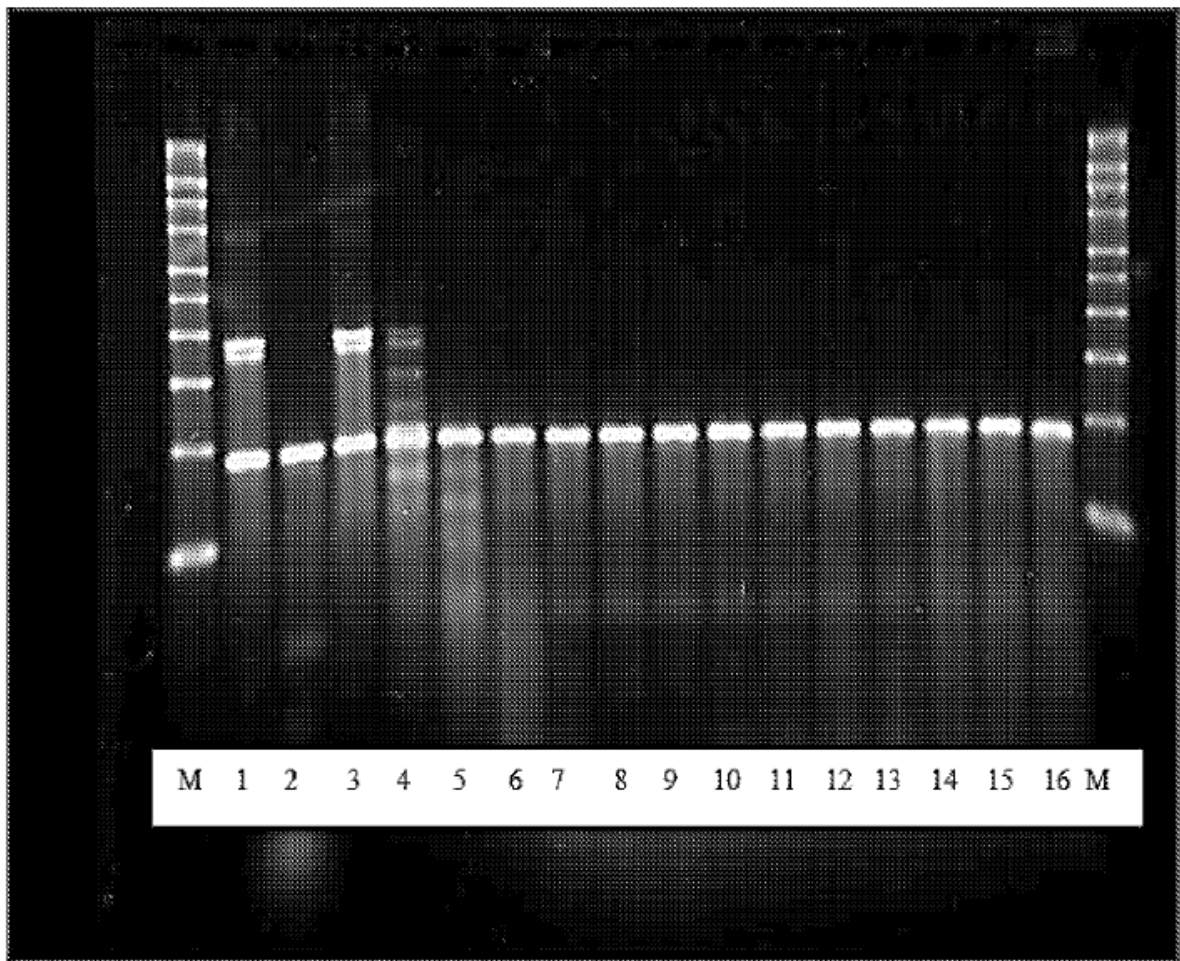


FIG. 7

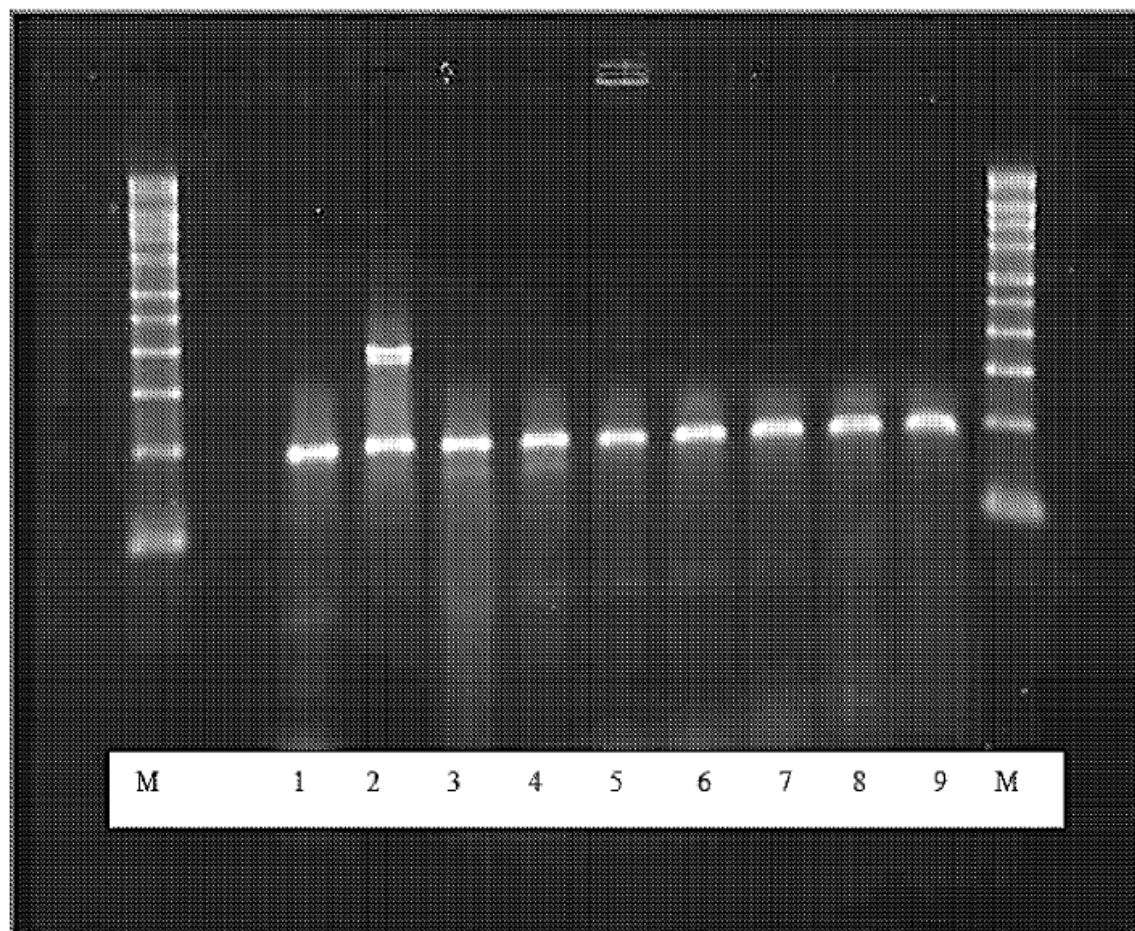


FIG. 8

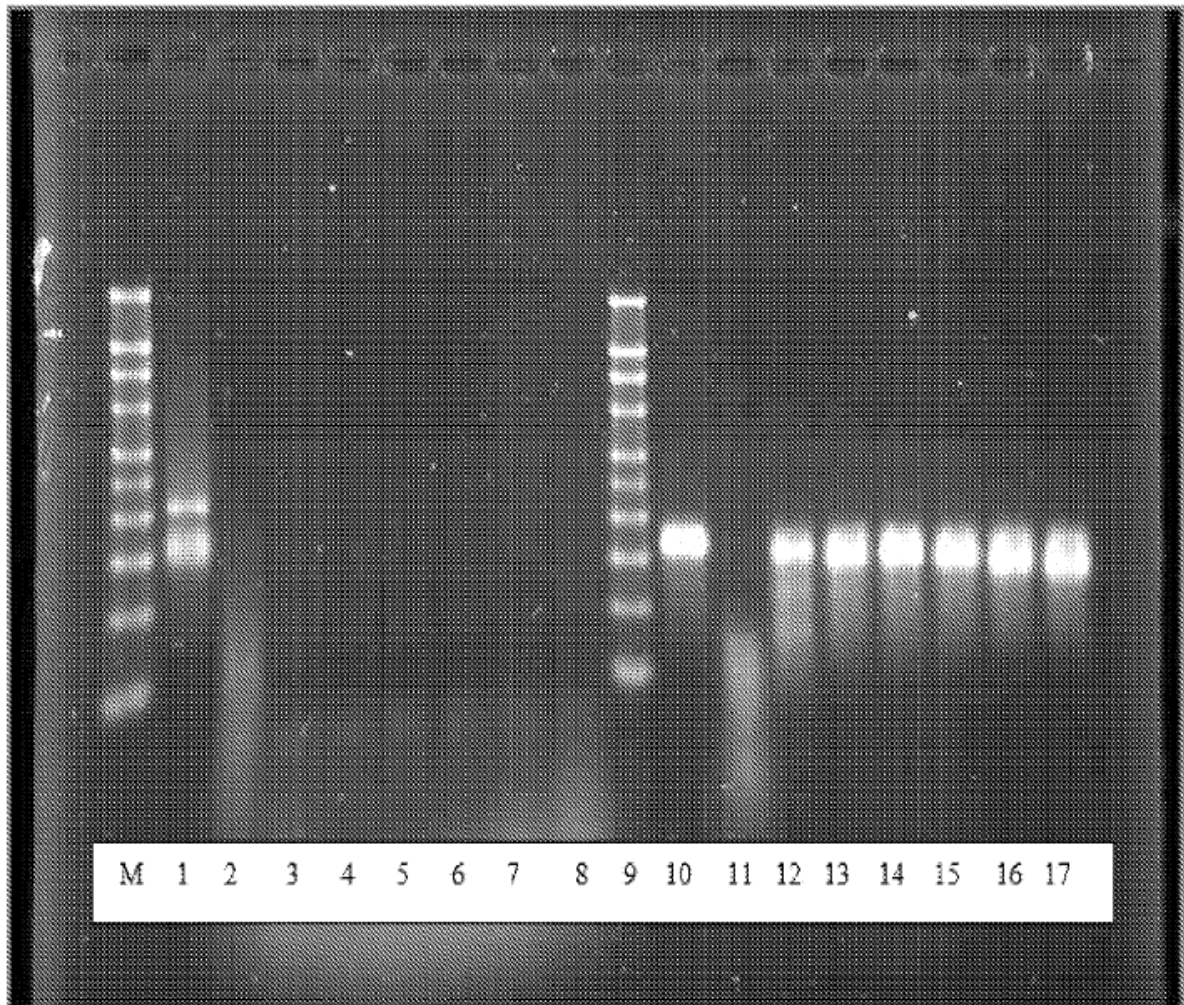


FIG. 9

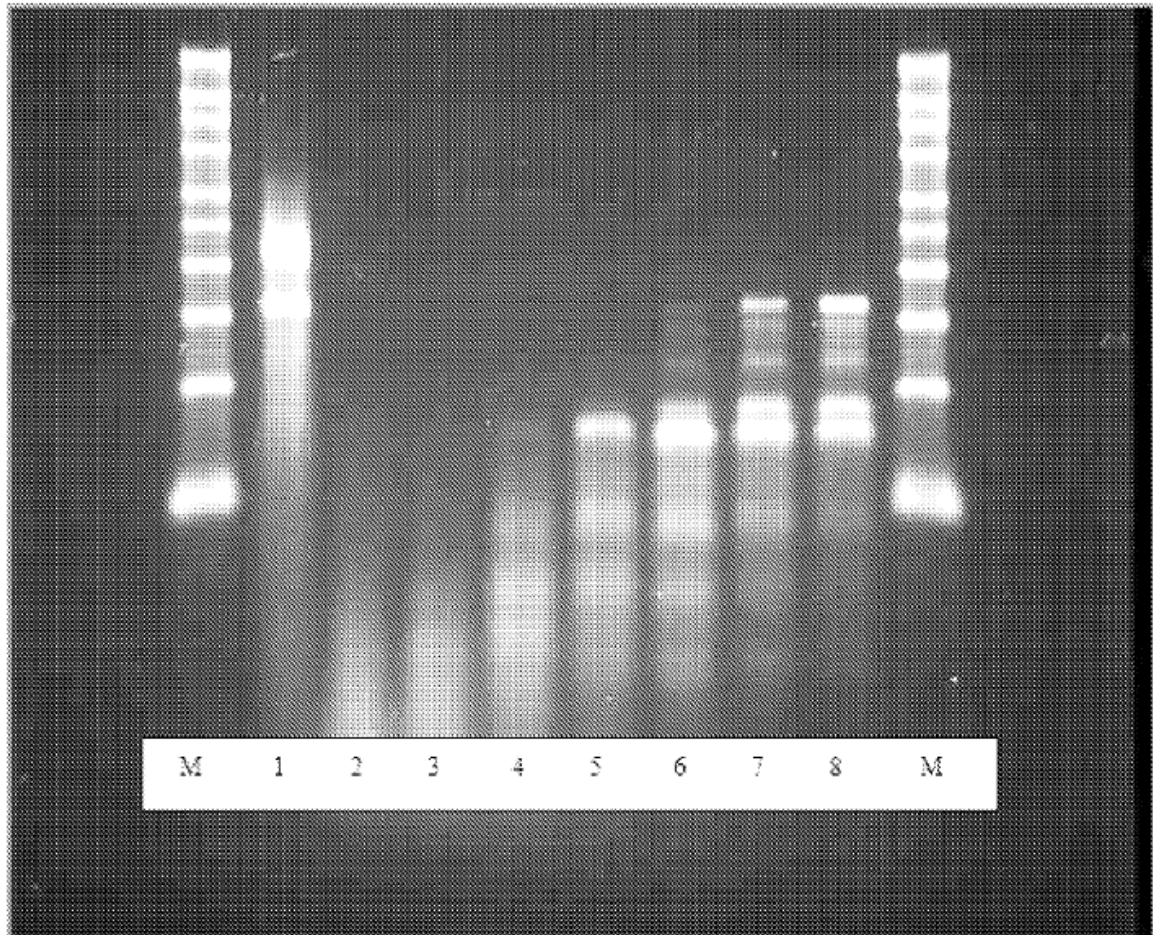


FIG. 10

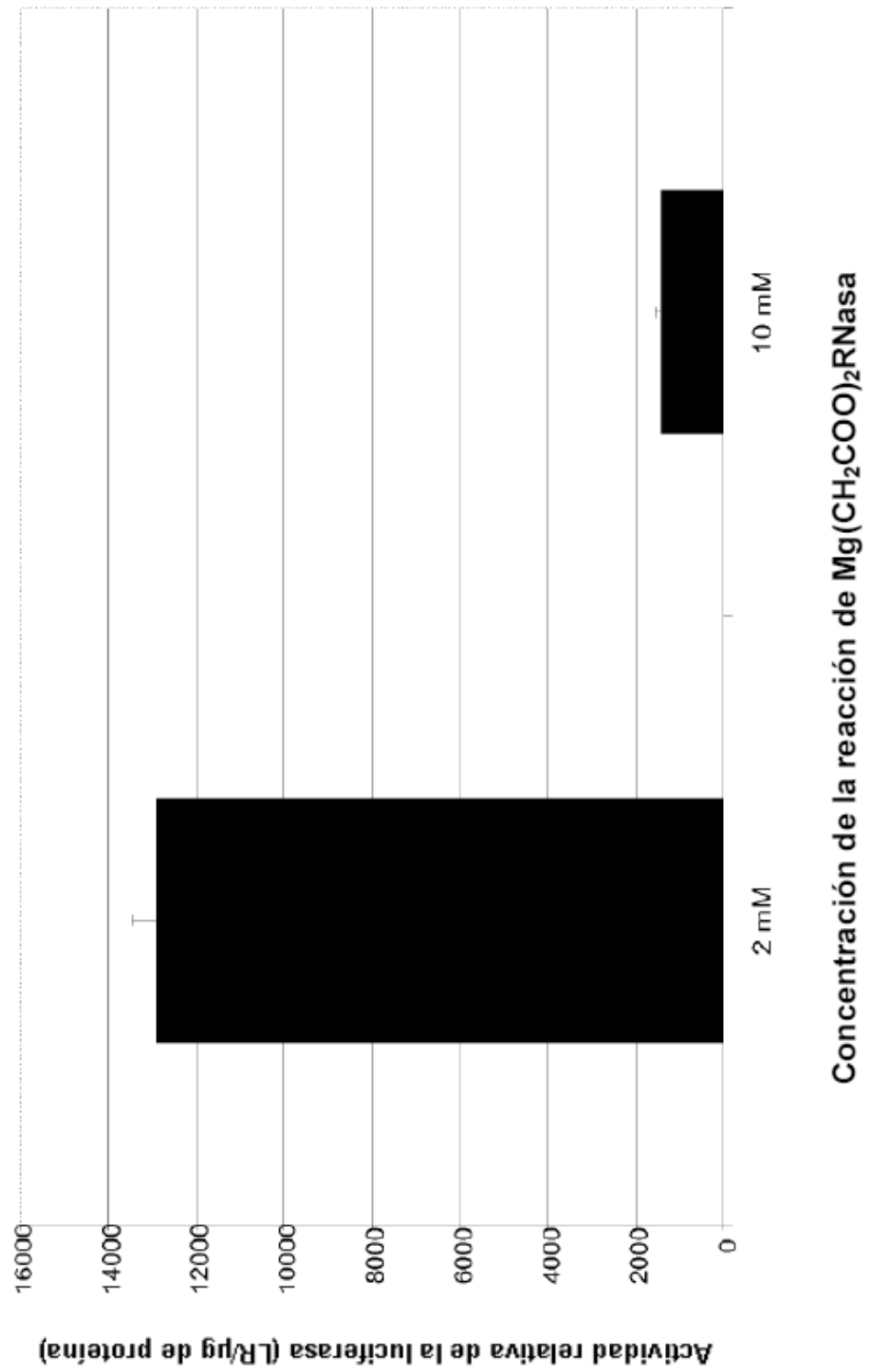


FIG. 11

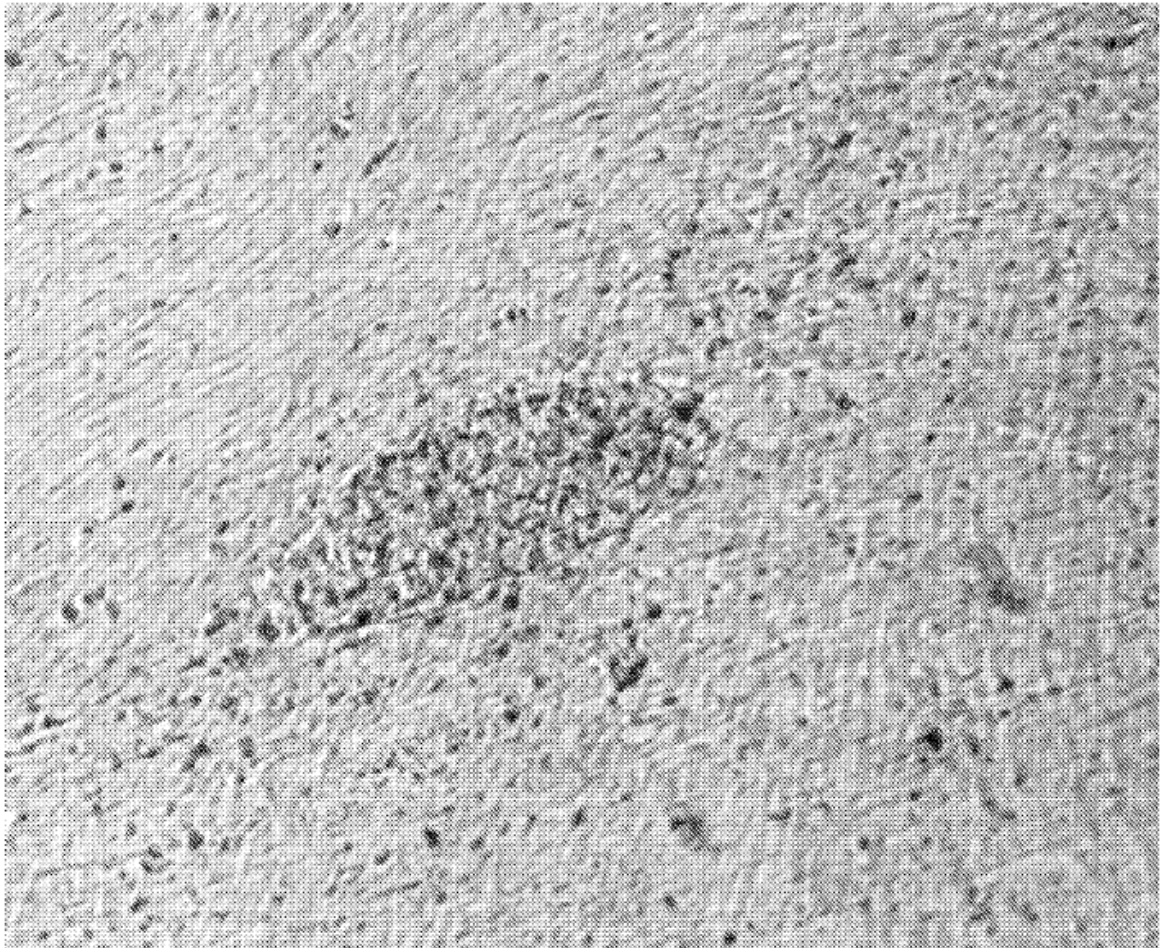
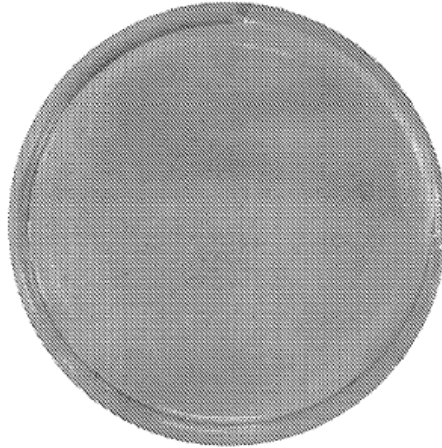
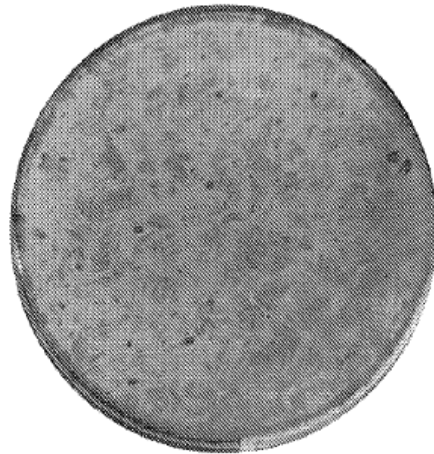


FIG. 12

A.



B.



C.

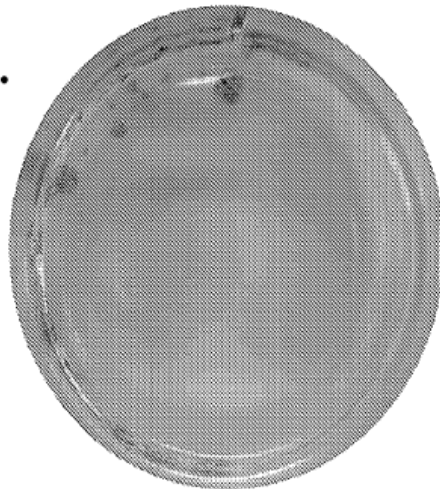


FIG. 13

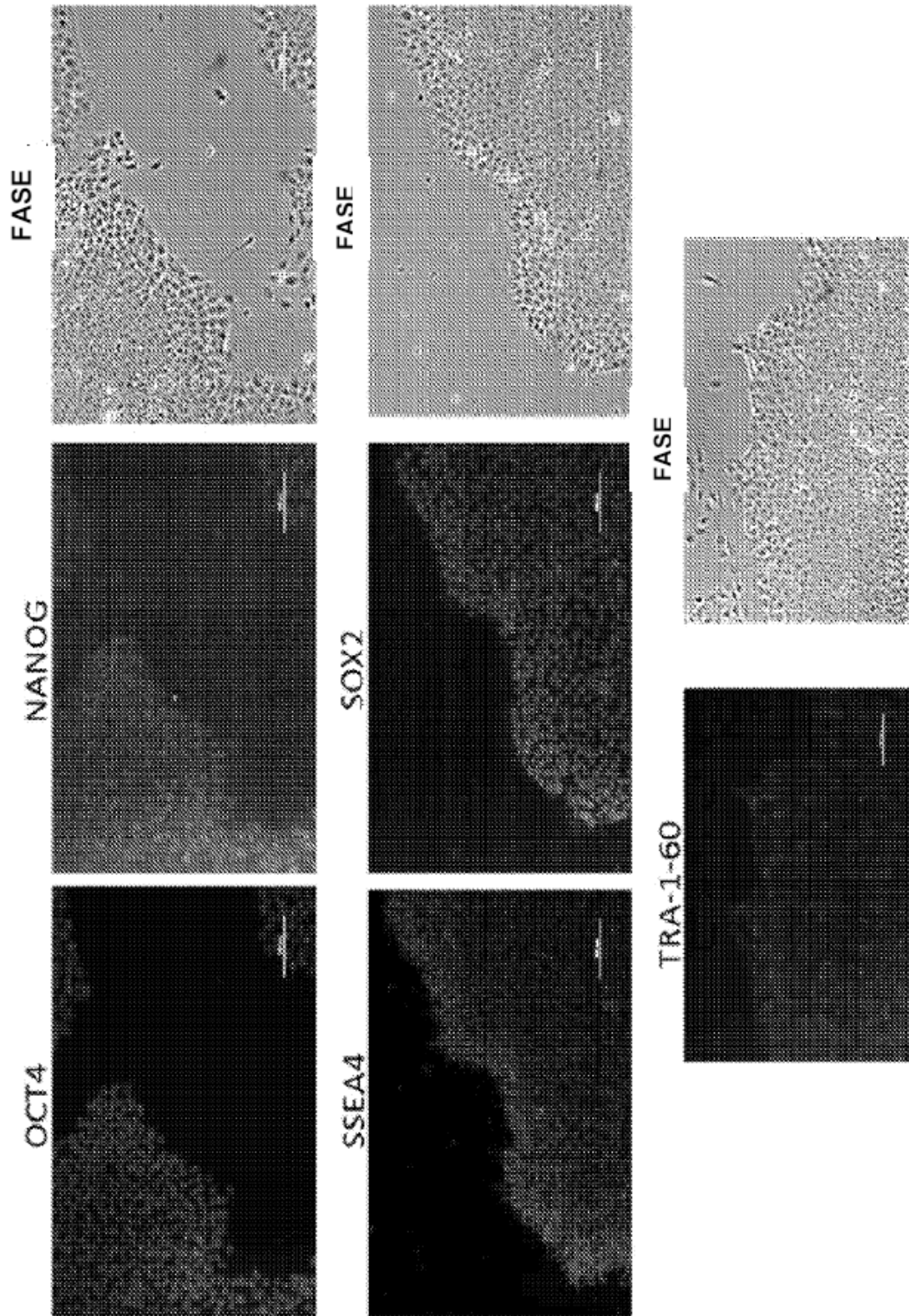


FIG. 14

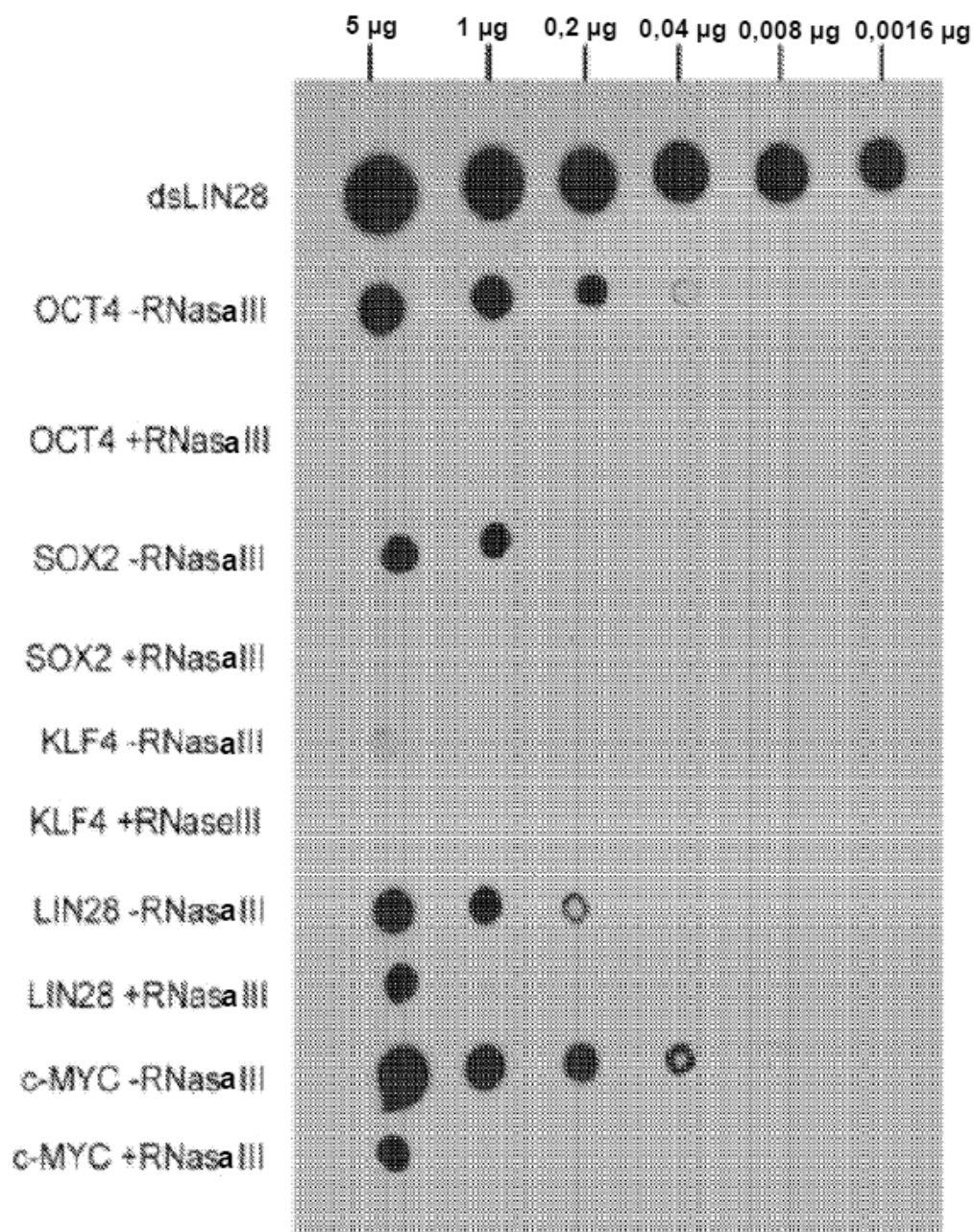


FIG. 15

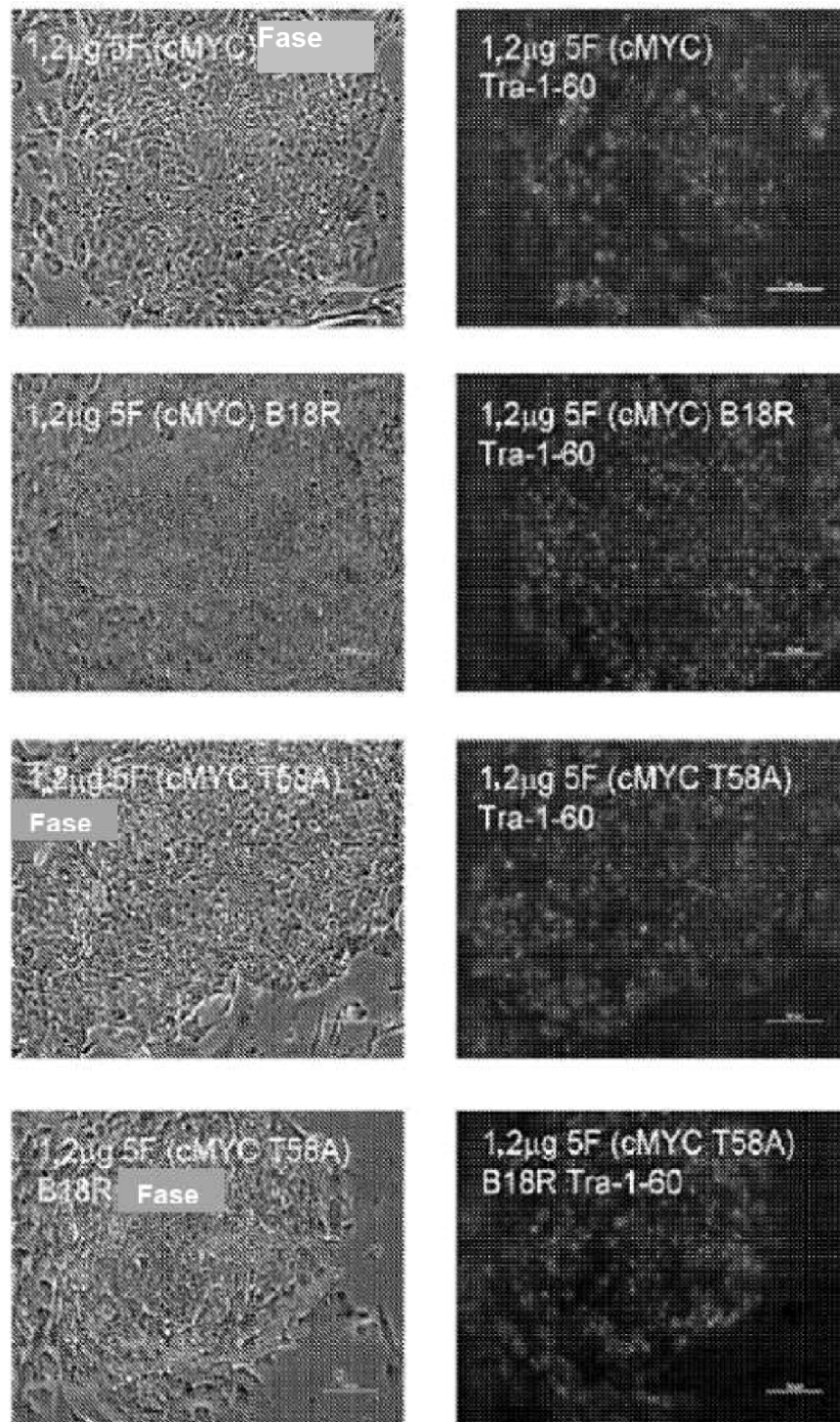


FIG. 16

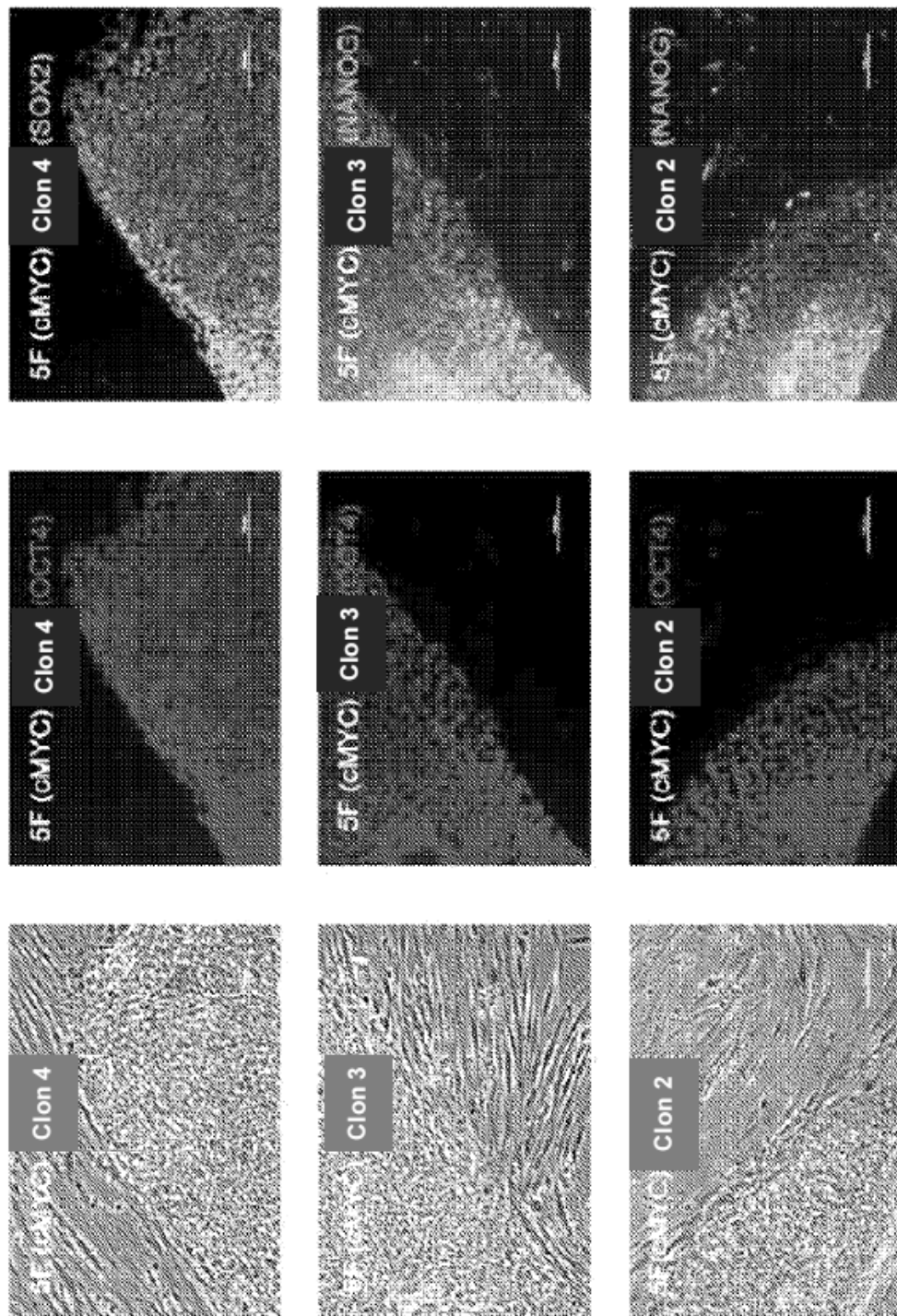


FIG. 17A

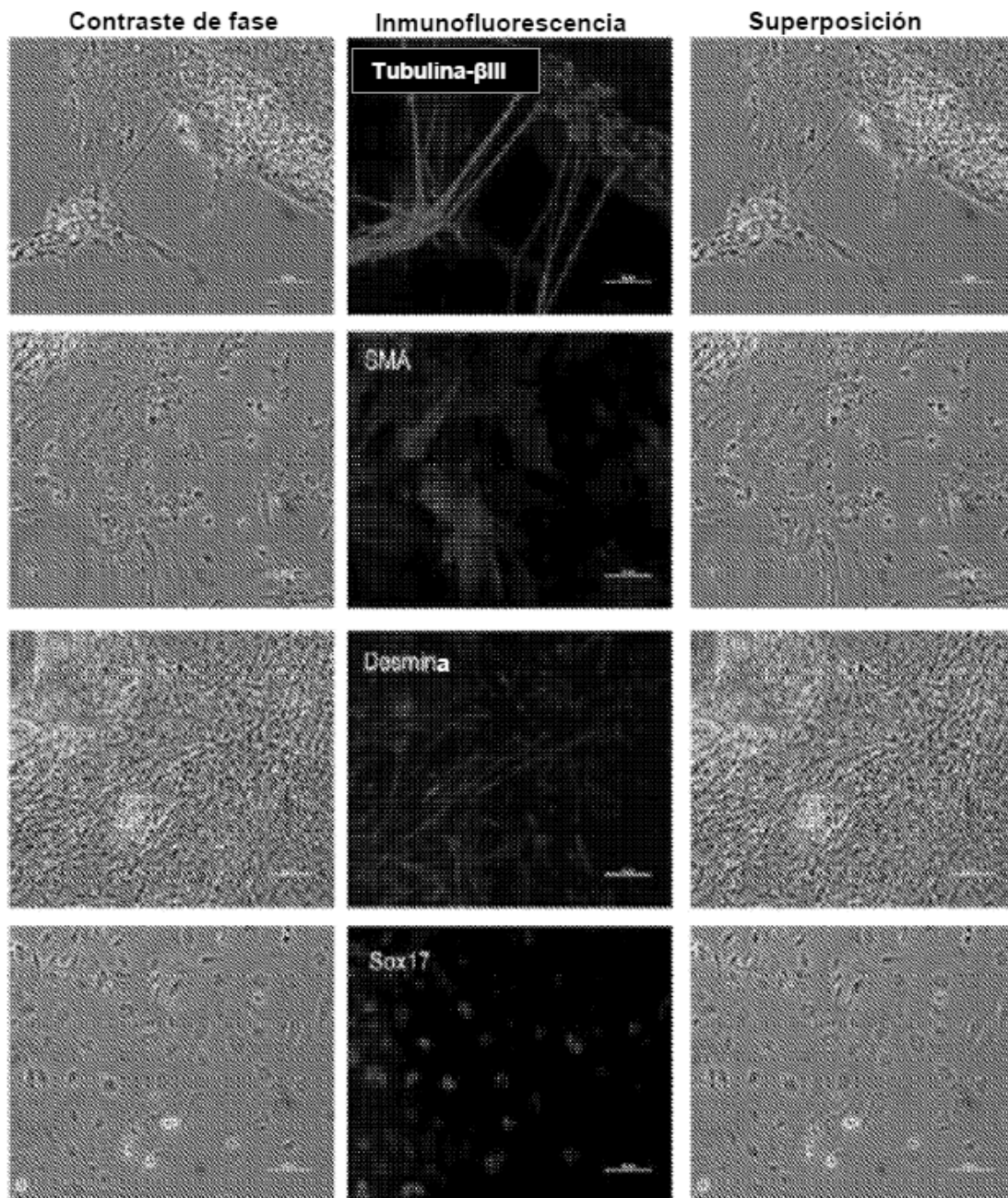


FIG. 17B

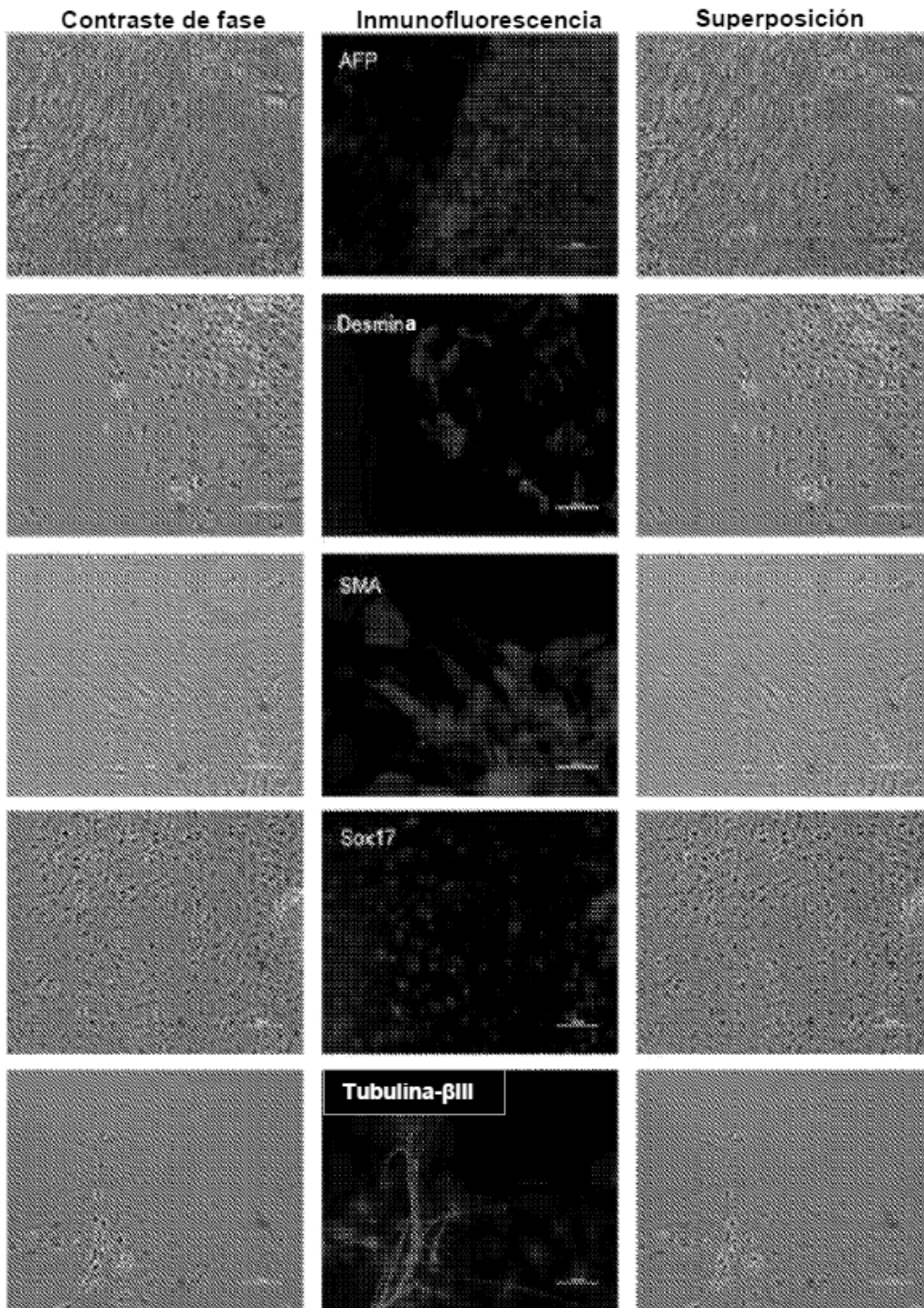


FIG. 17C

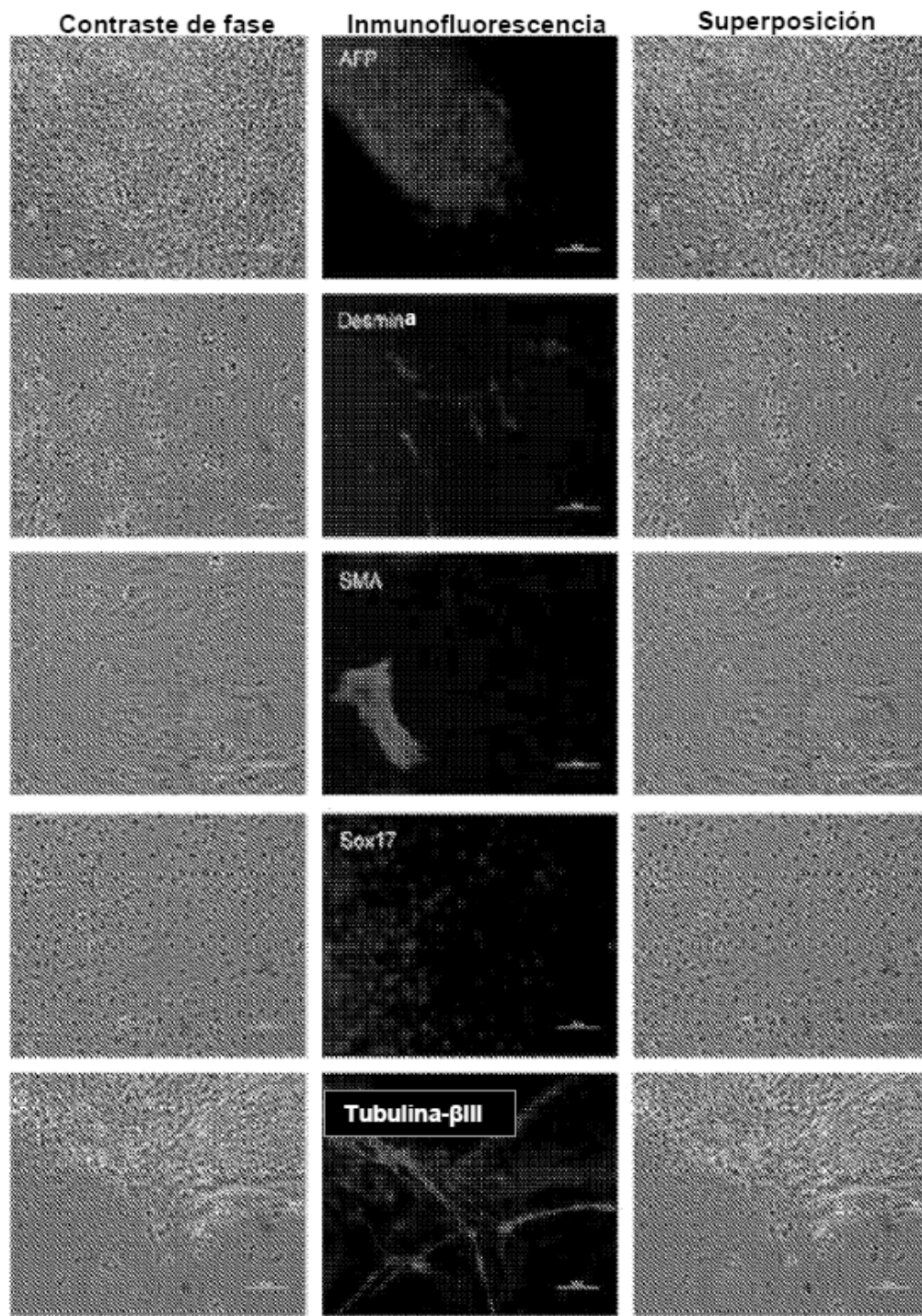


FIG. 18

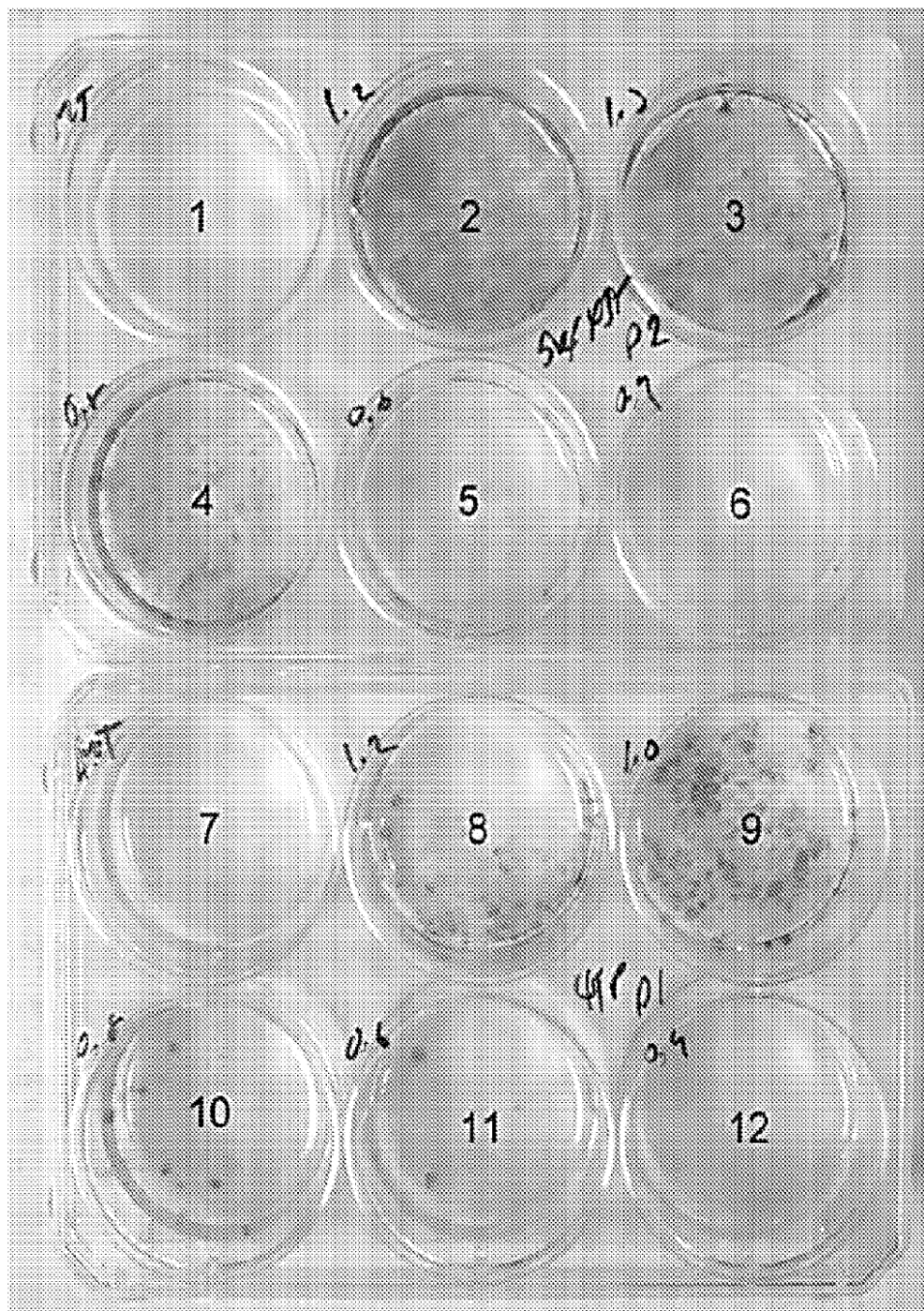


FIG. 19

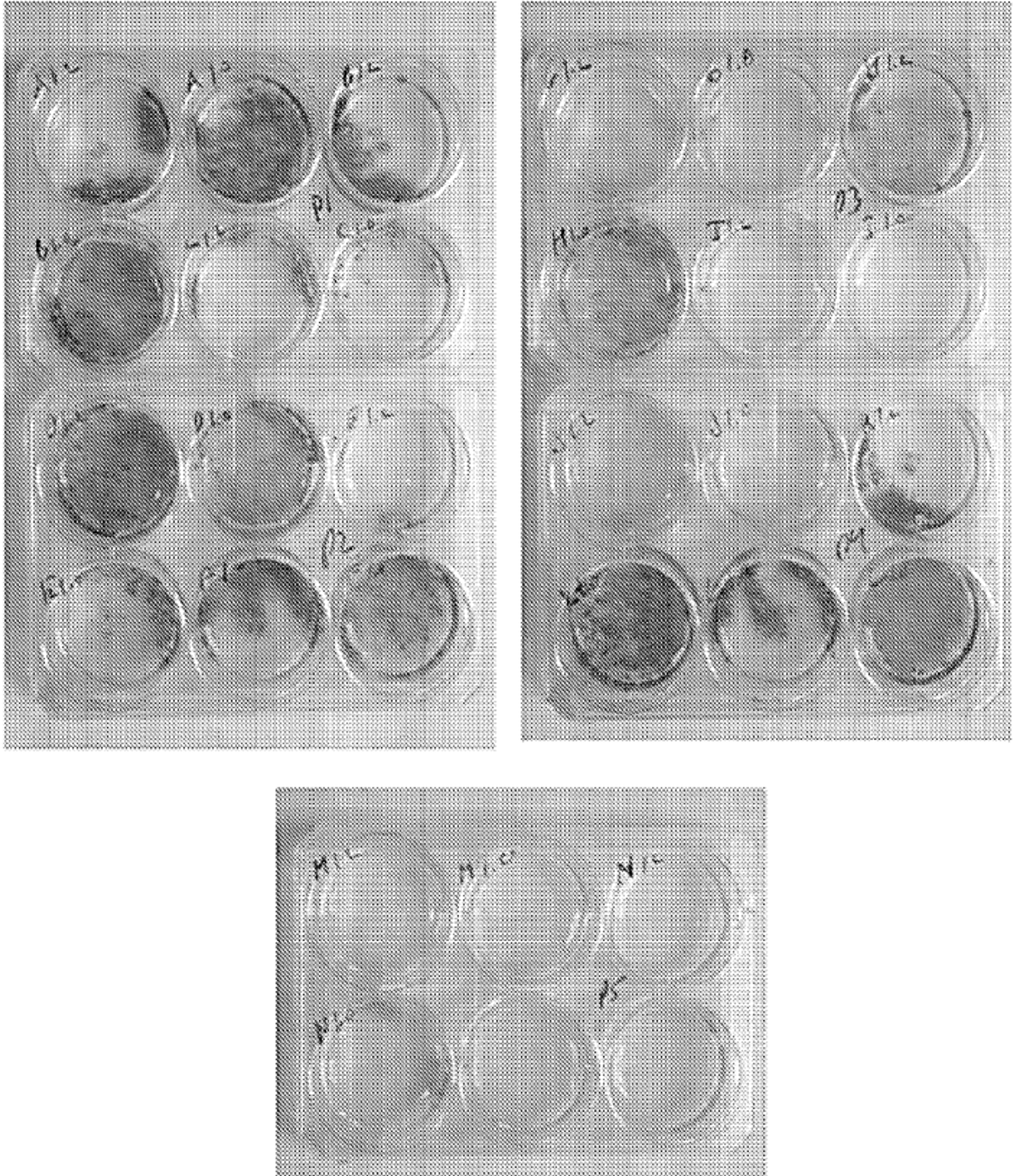


FIG. 20

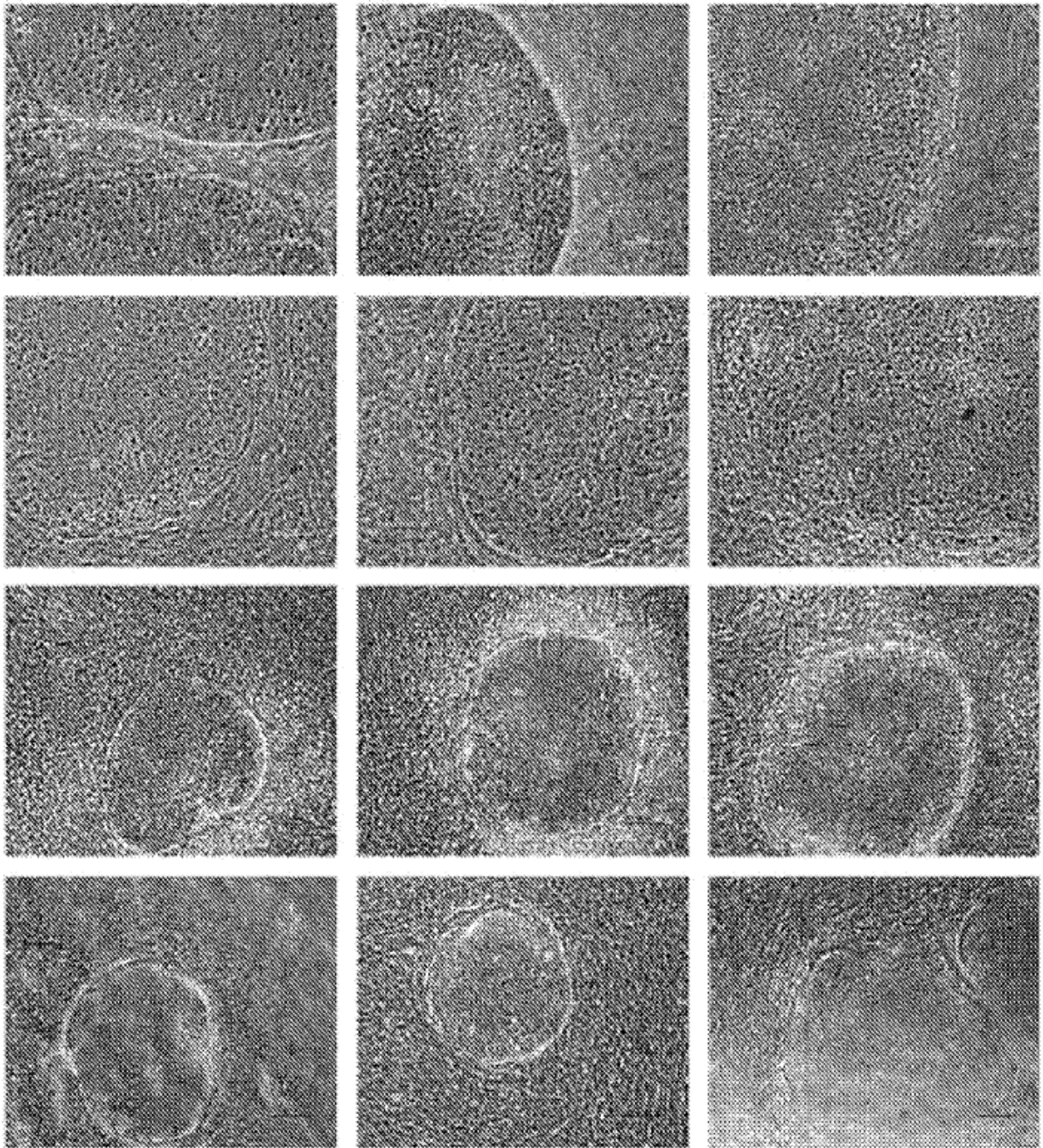


FIG. 21A

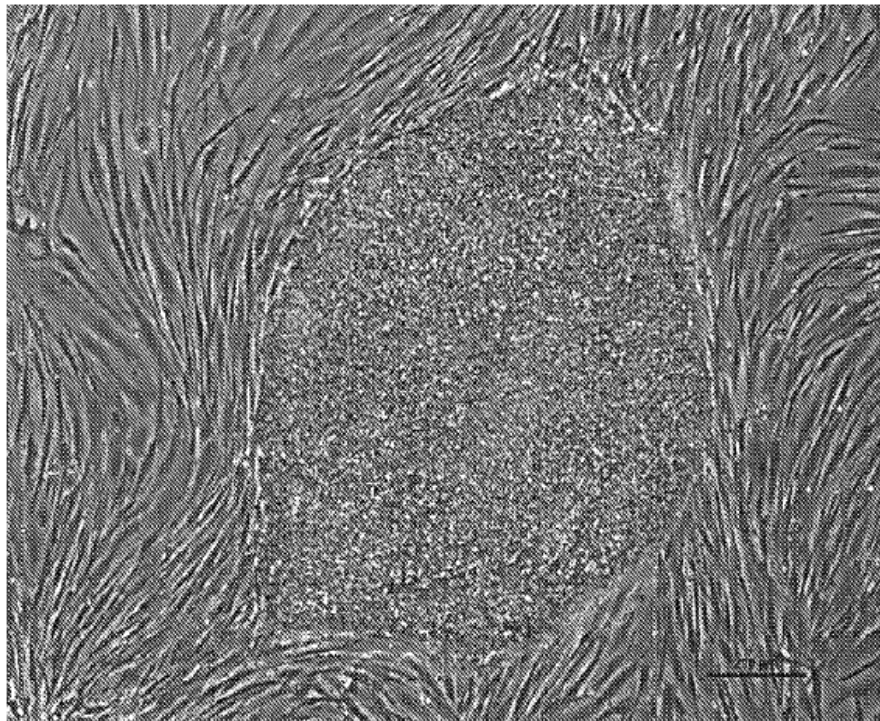
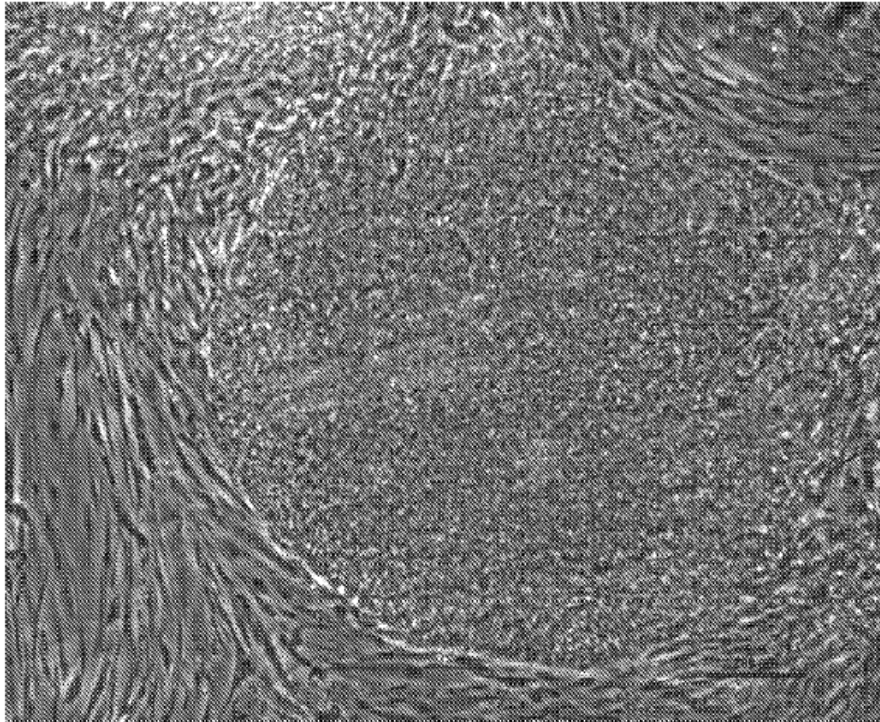


FIG. 21B

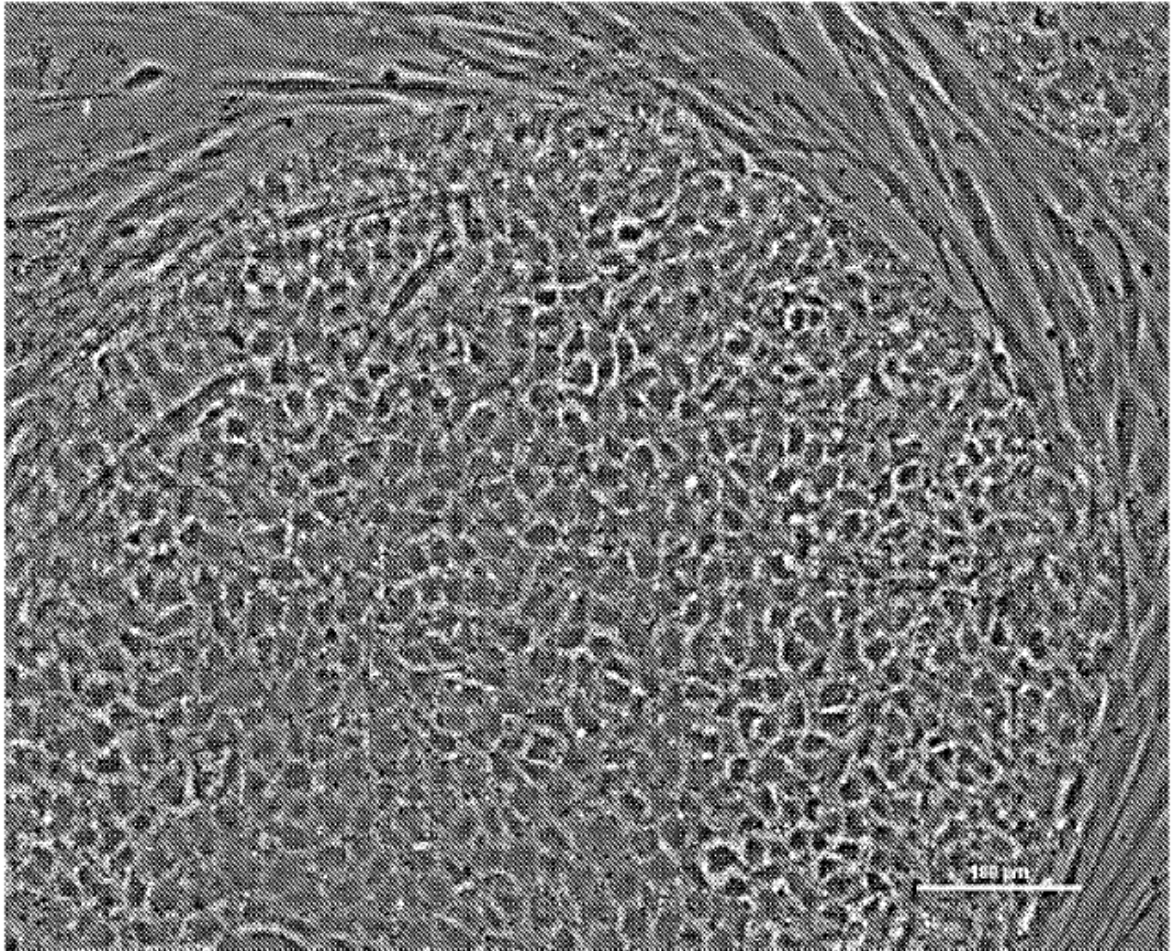


FIG. 22A

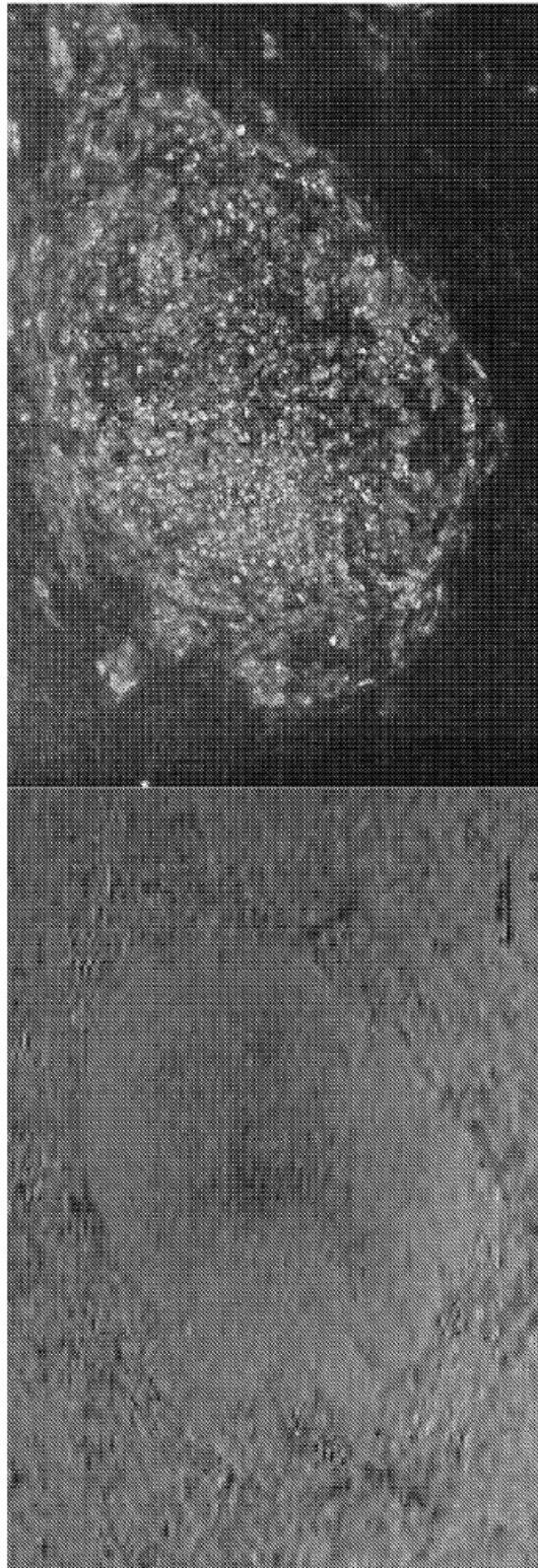


FIG. 22B

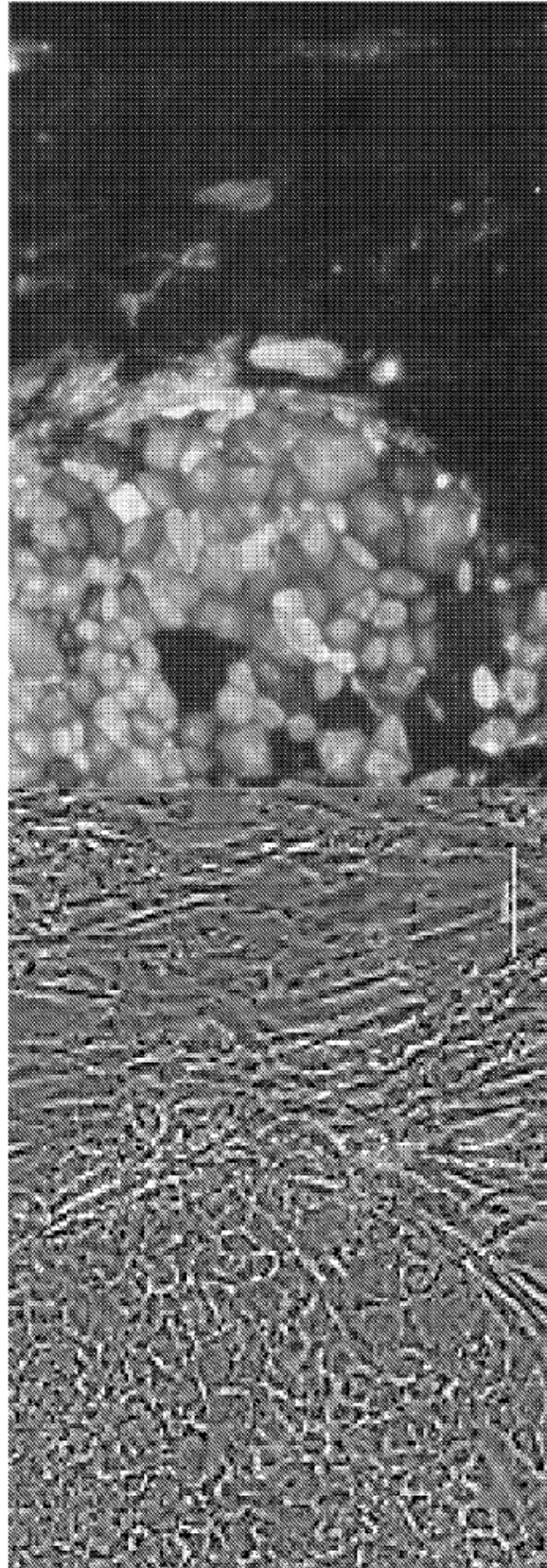


FIG. 22C

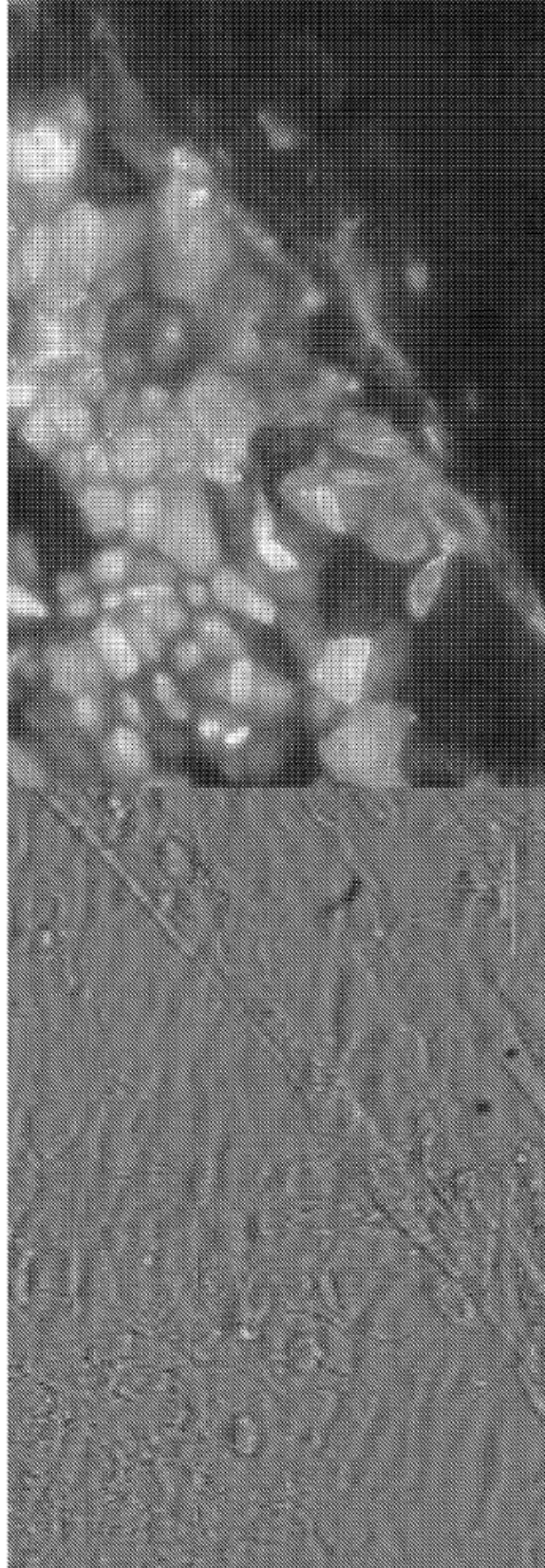
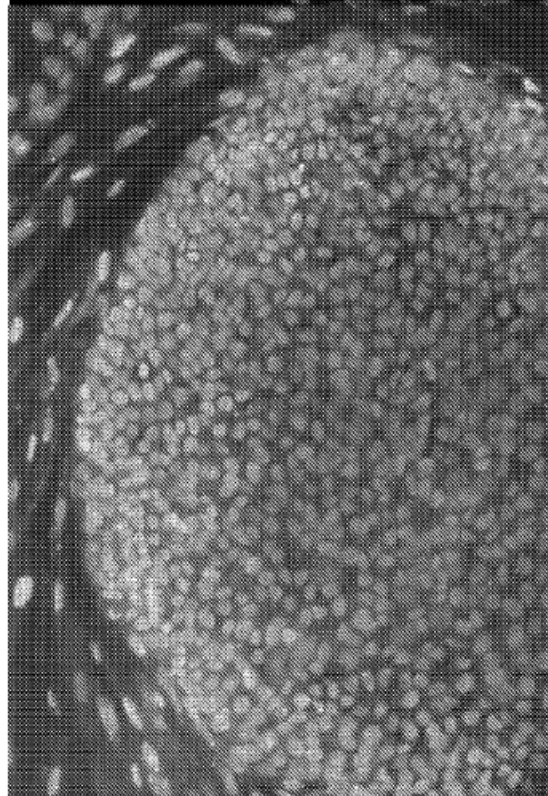


FIG. 23

A. OCT4



B. TRA-1-60

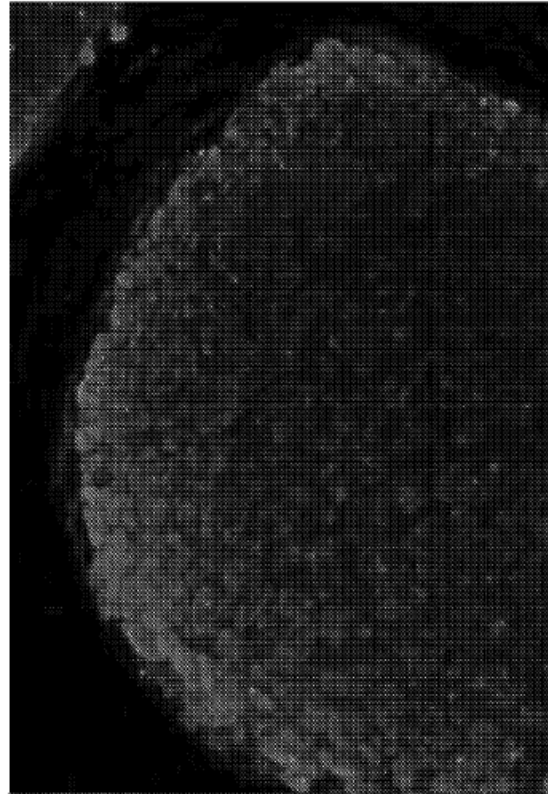


FIG. 23

D. LIN28

C. 20 aumentos

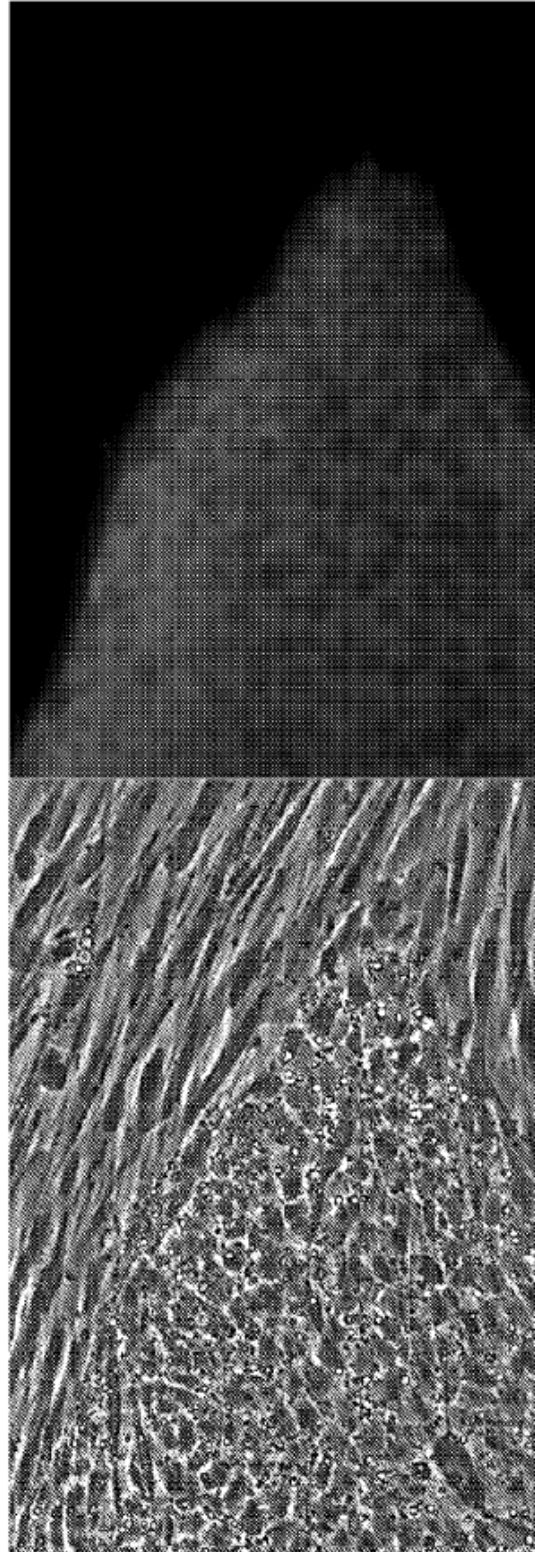


FIG. 23E

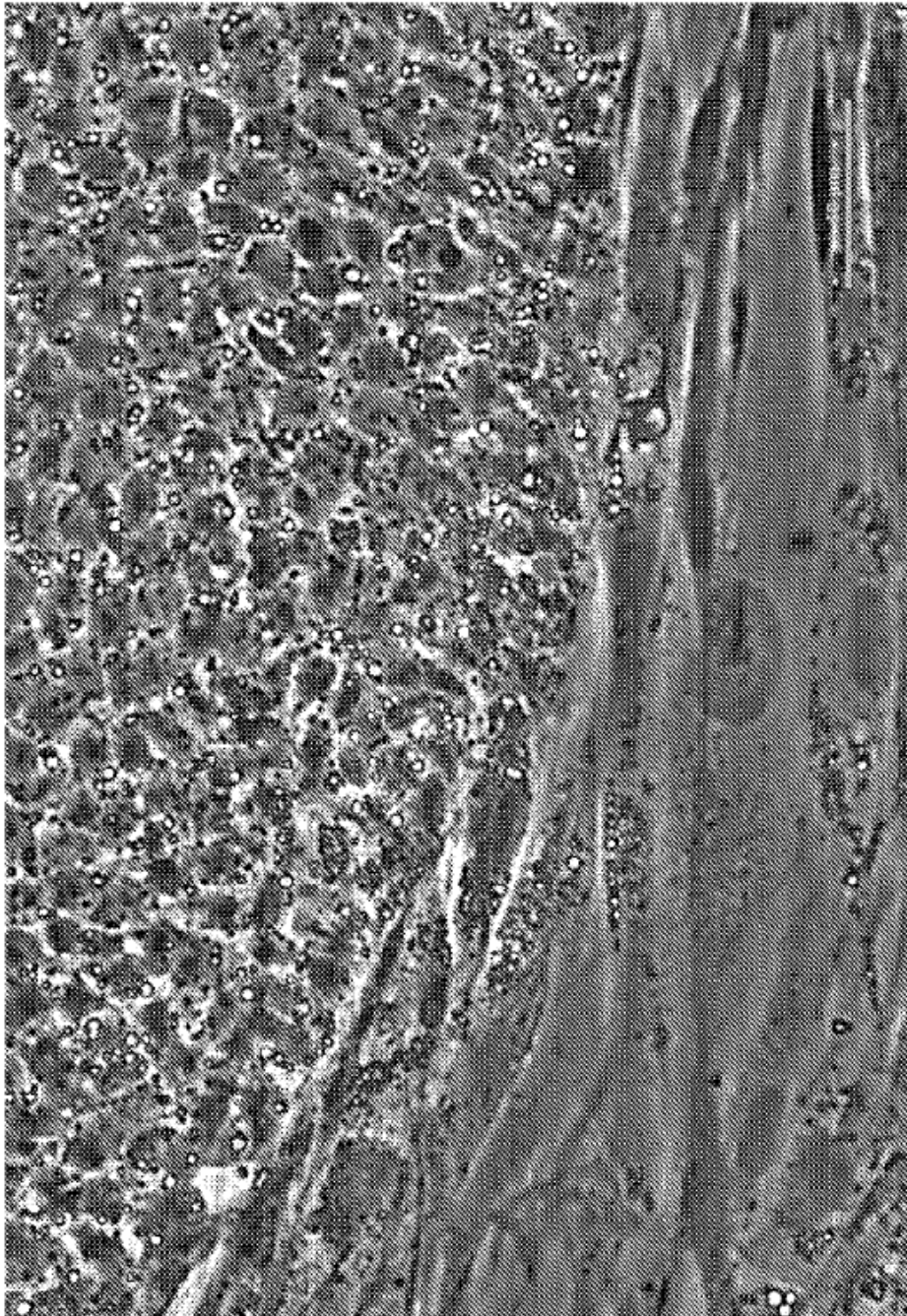


FIG. 23

F. NANOG

G. SSEA4

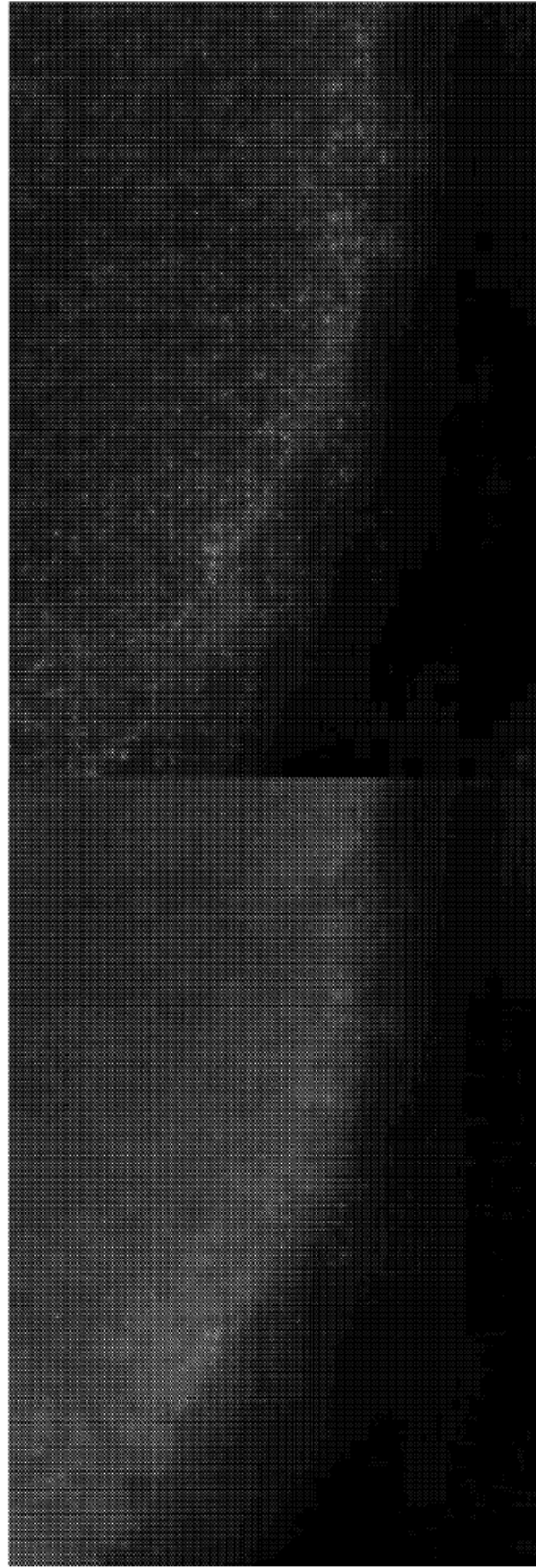


FIG. 23H

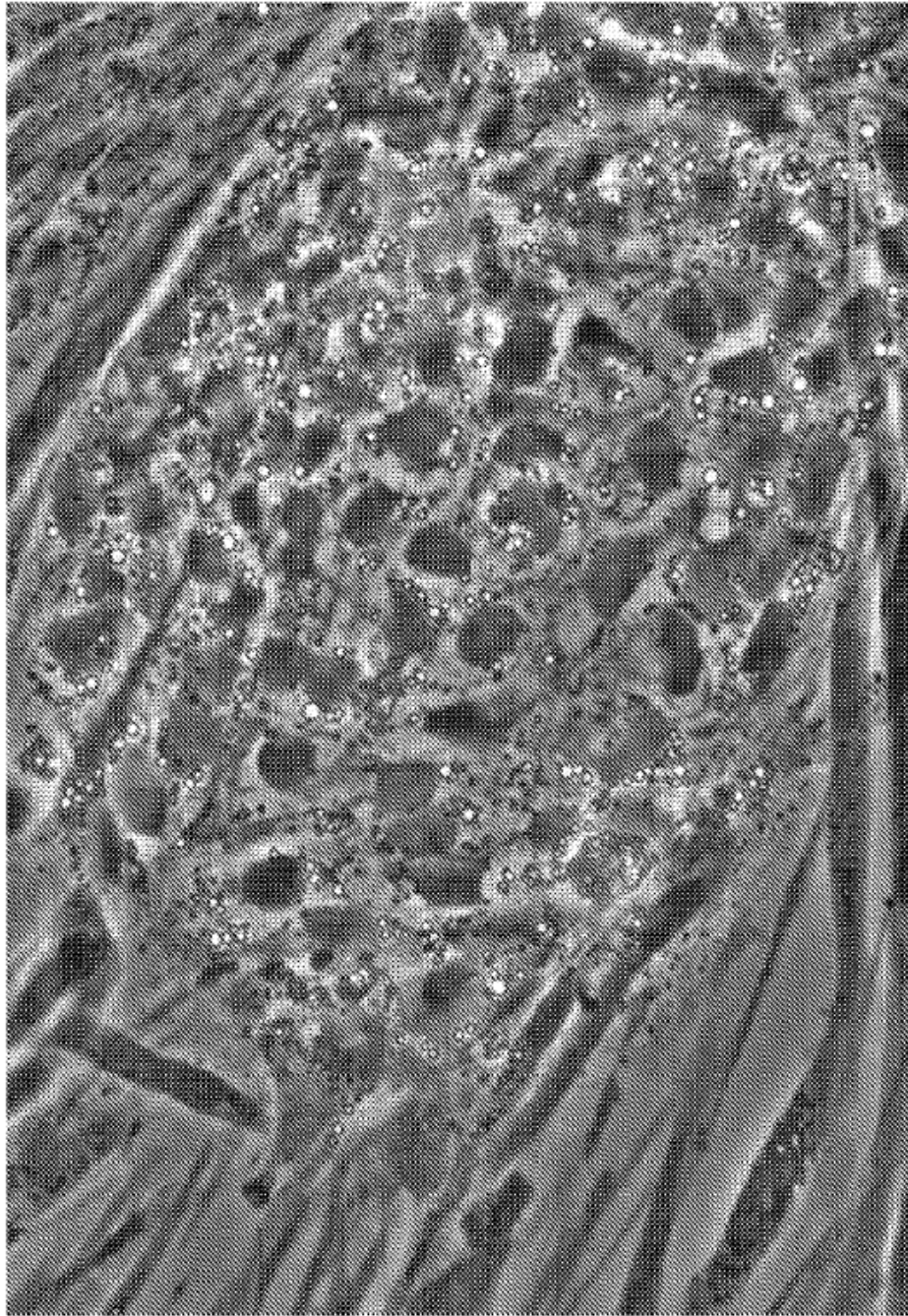


FIG. 23

I. NANOG

J. SSEA4

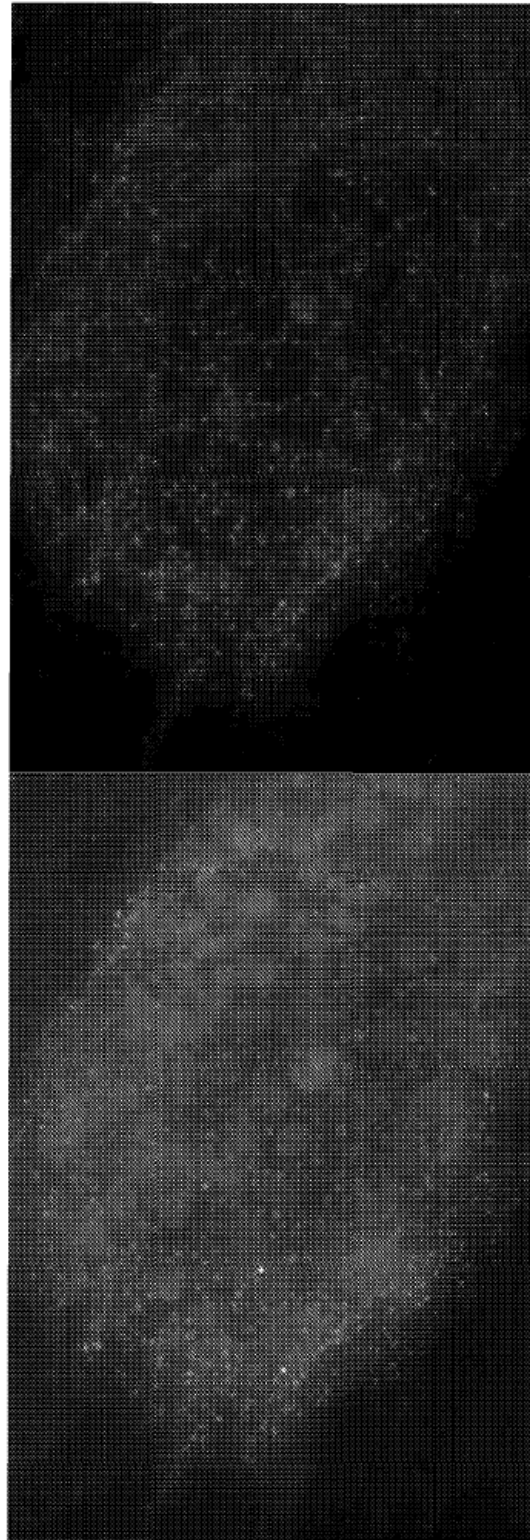


FIG. 24

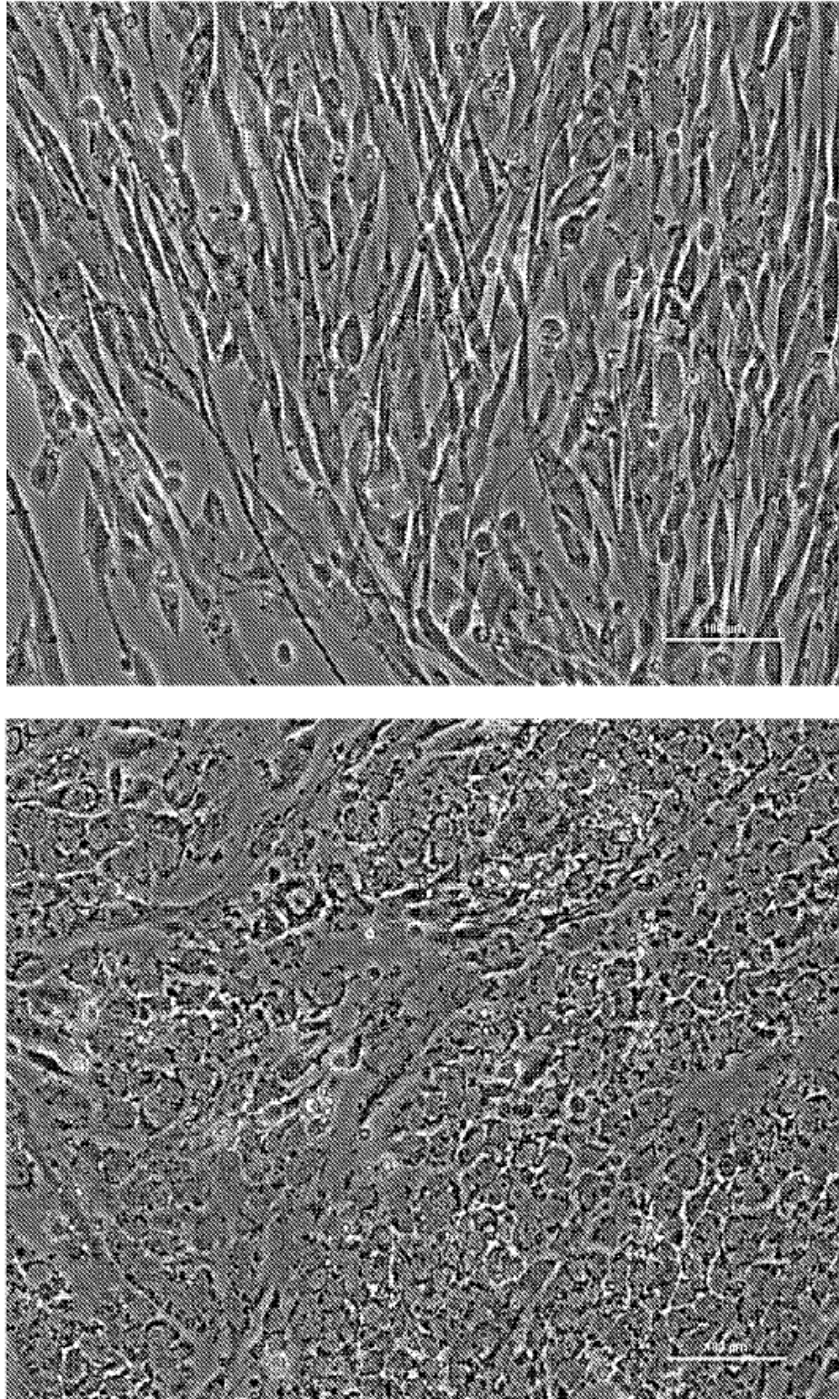


FIG. 25

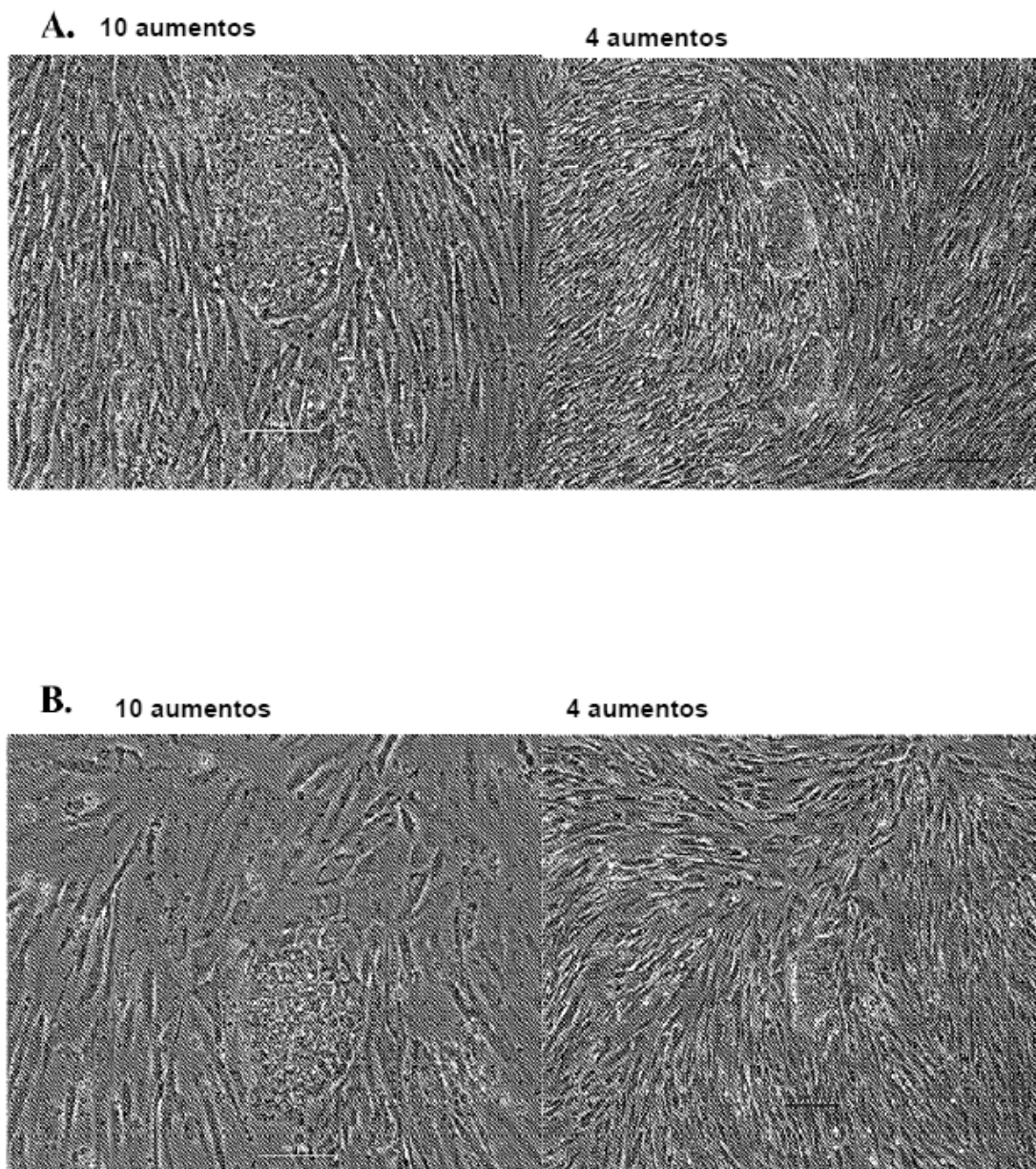
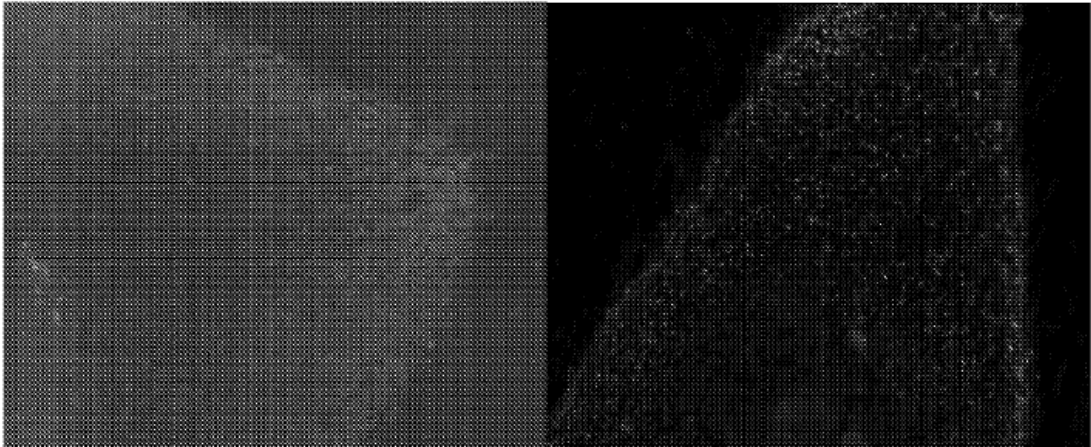


FIG. 26A

NANOG

SSEA4



TRA-1-81

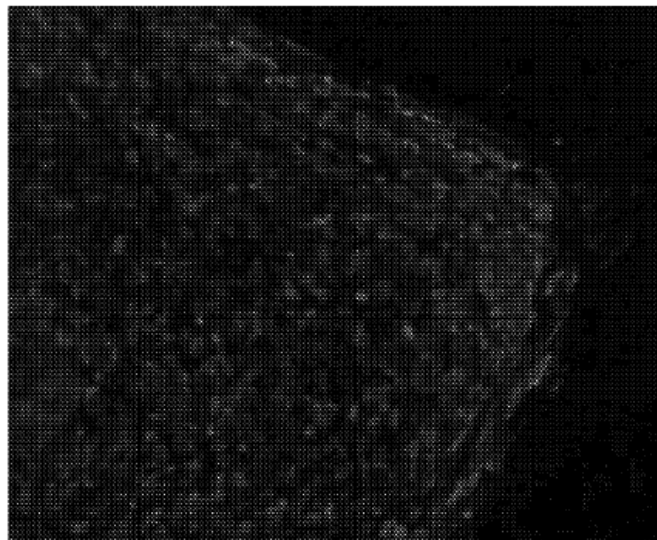


FIG. 26B

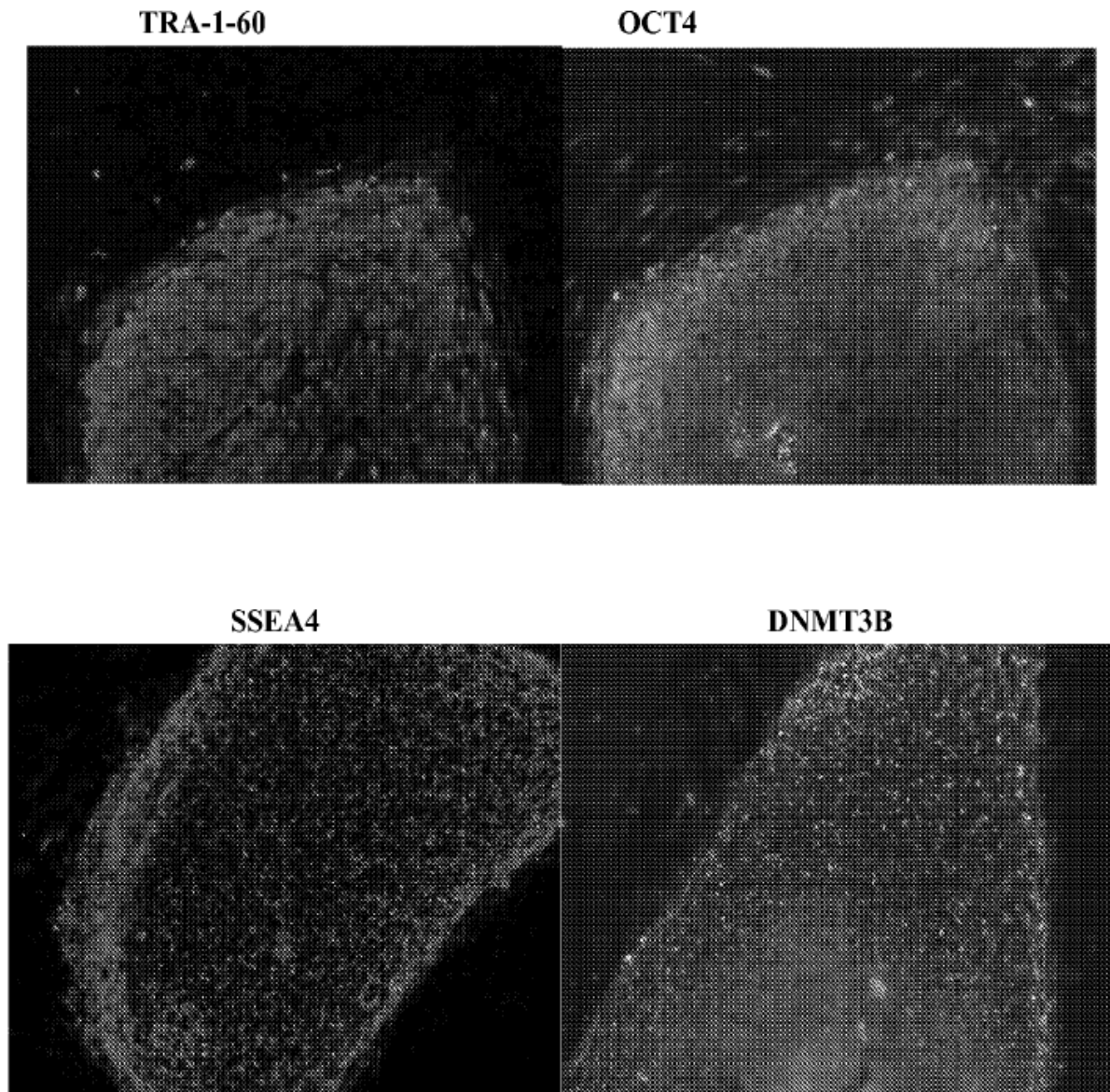


FIG 27A

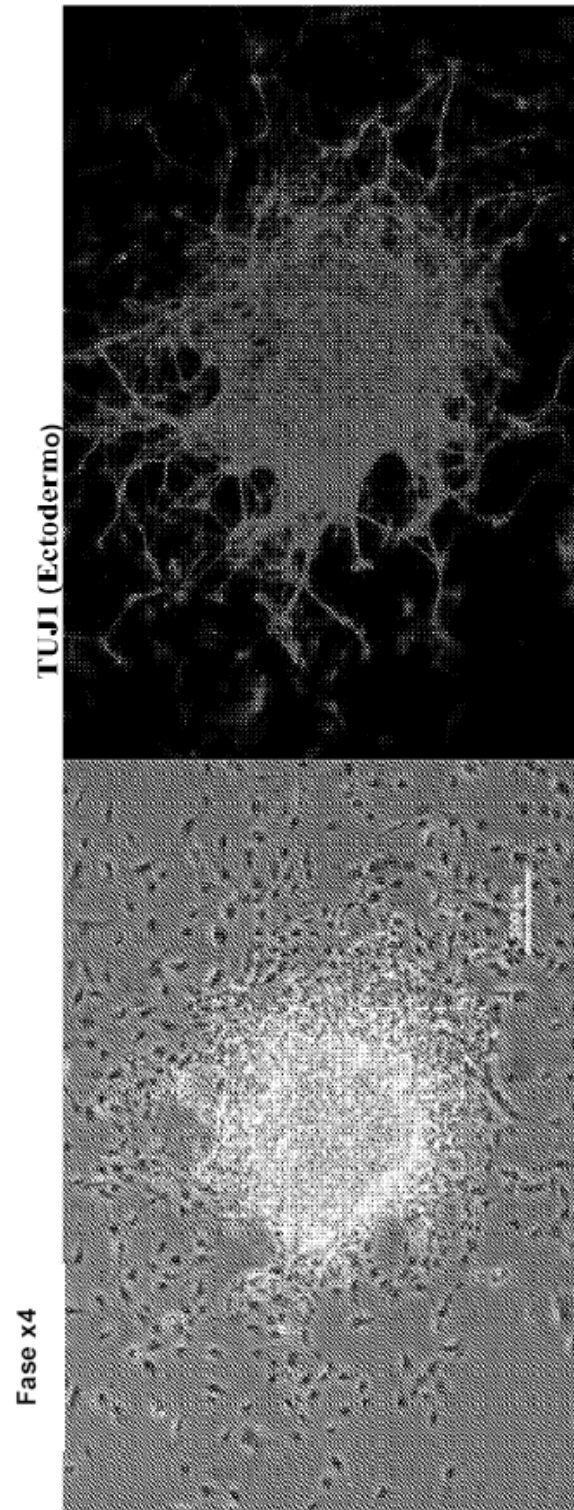


FIG. 27B

Fase x20

TUJ1

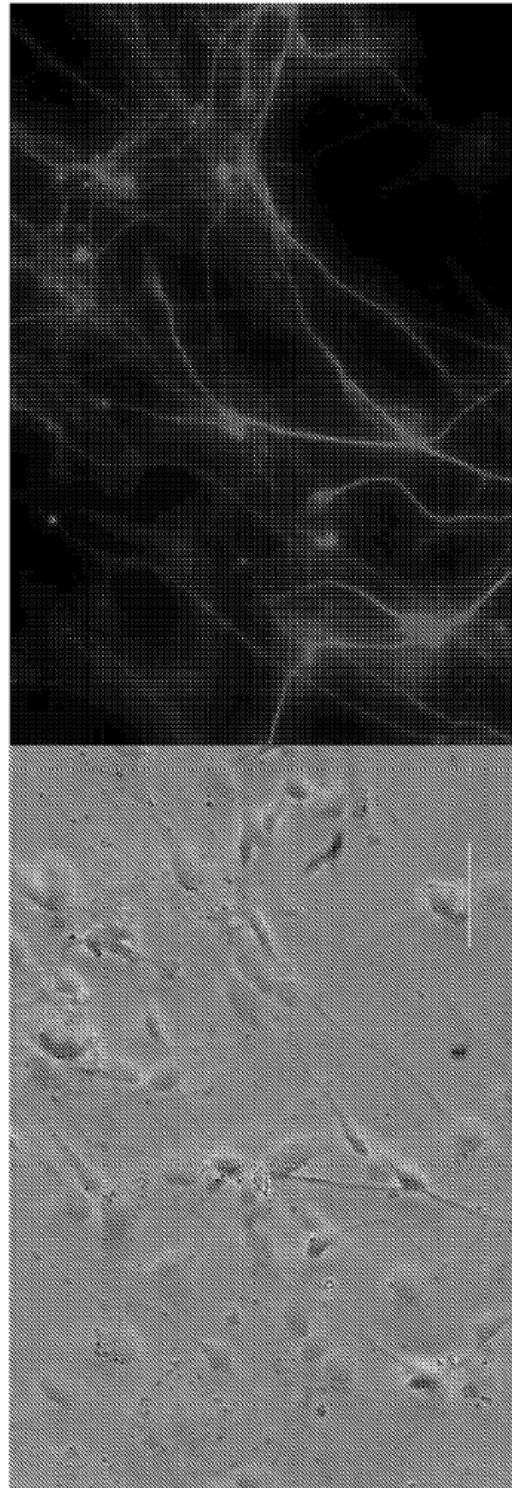


FIG. 27C

Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) – (Ectodermo)

Fase x20

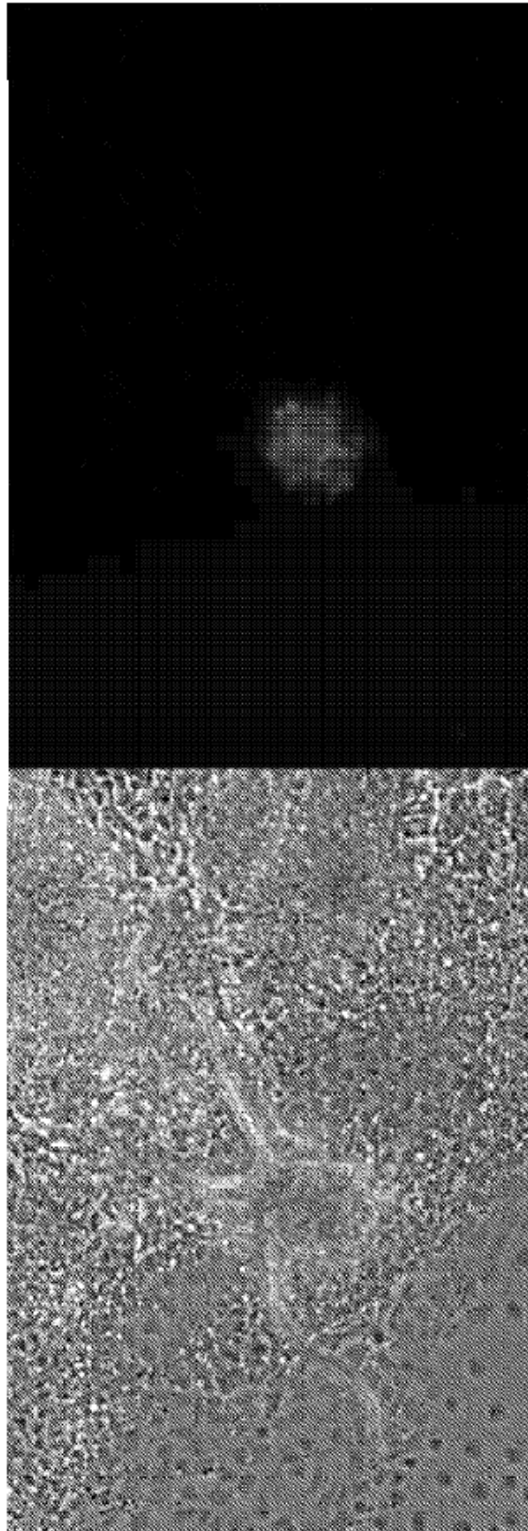


FIG. 27D

Fase x4

Cadena ligera de neurofilamento (NFL) – (Ectodermo)

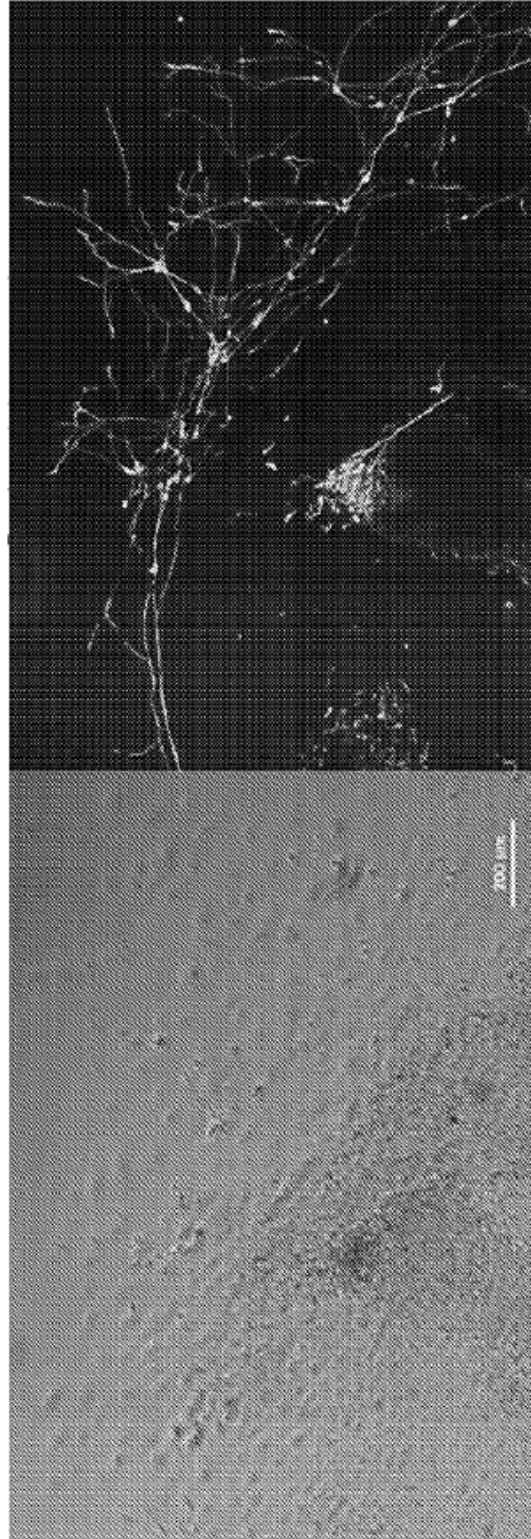


FIG. 27E

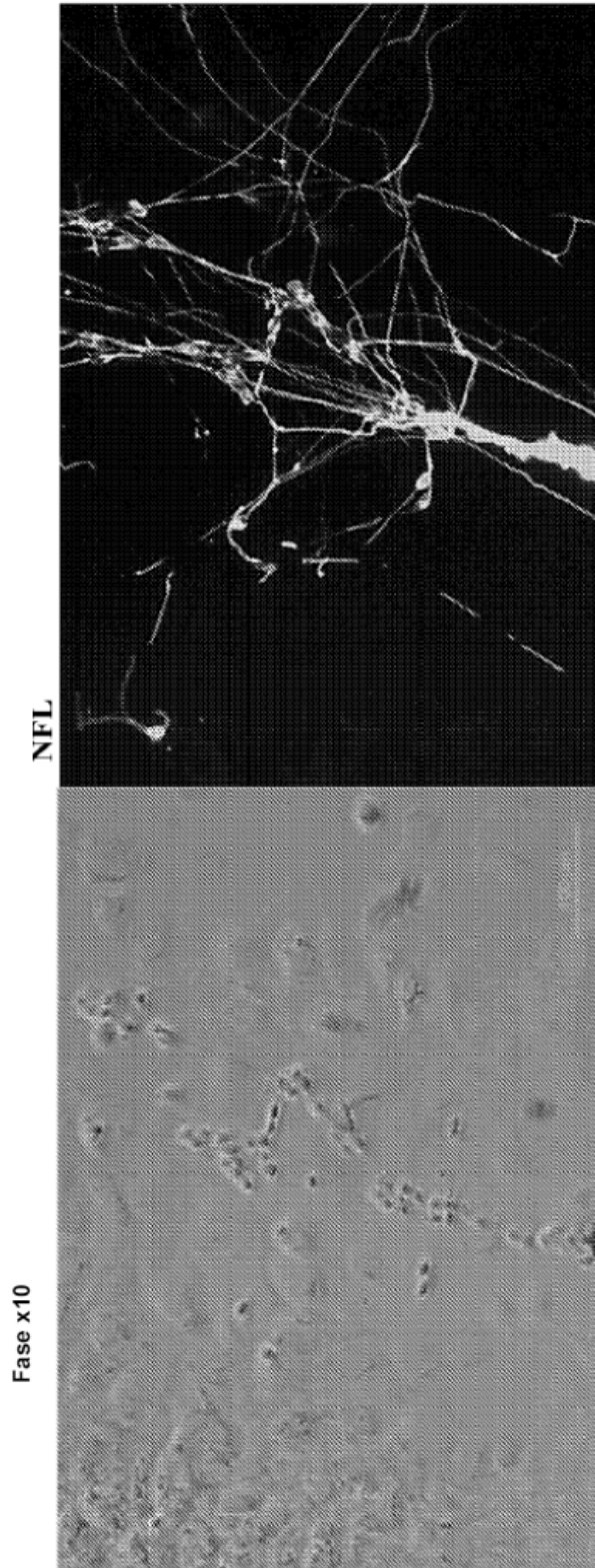


FIG. 27F

Actina de músculo liso α (SMA) – (Mesodermo)

Fase x10

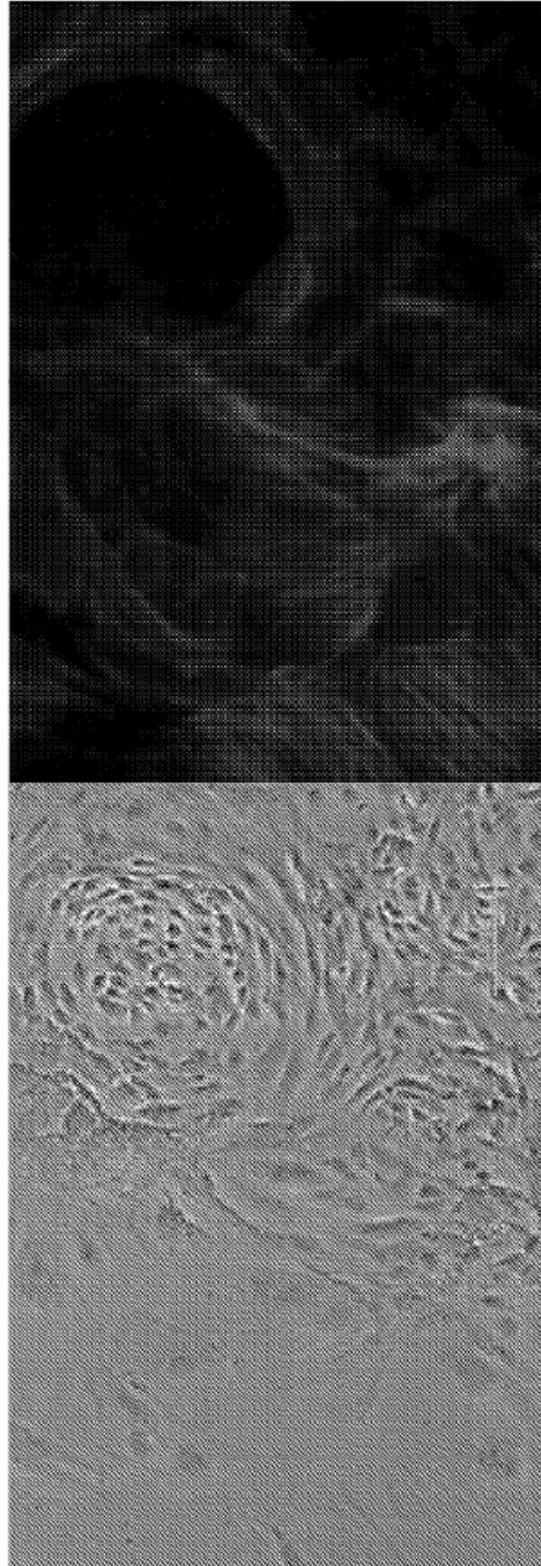


FIG. 27G

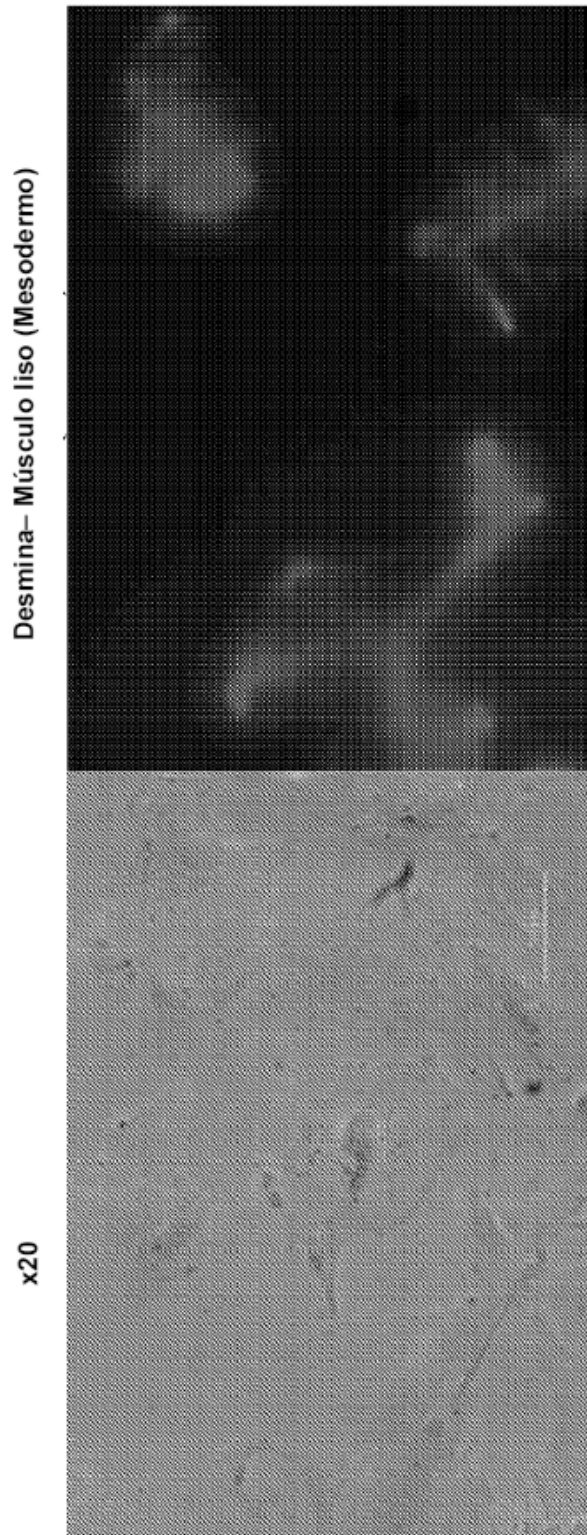


FIG. 27H

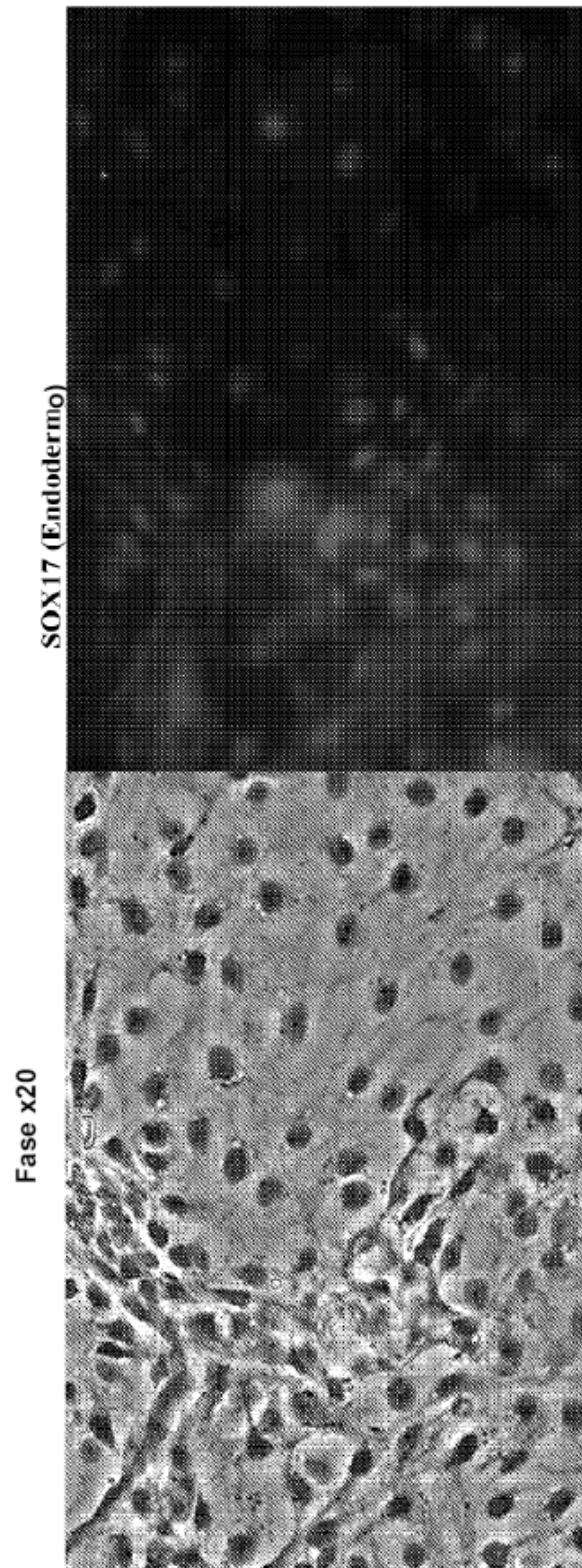


FIG. 27I

Proteína fetal alfa (AFP) (Endodermo)

X10

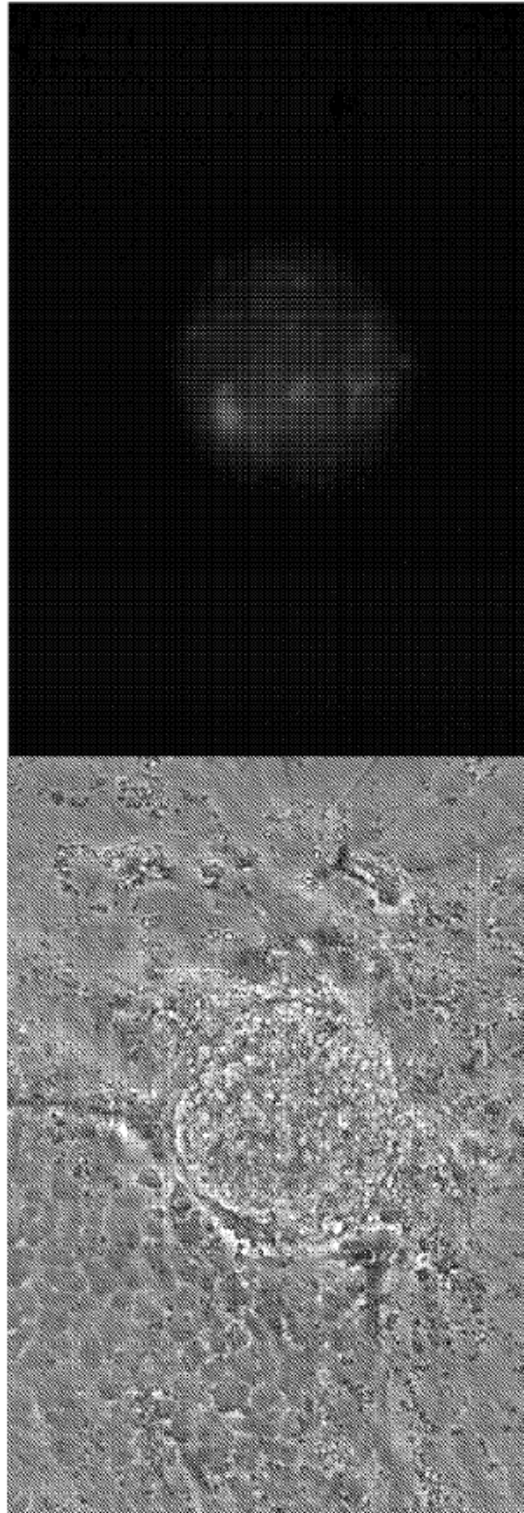


FIG. 27J

X10

AFP (Endodermo)

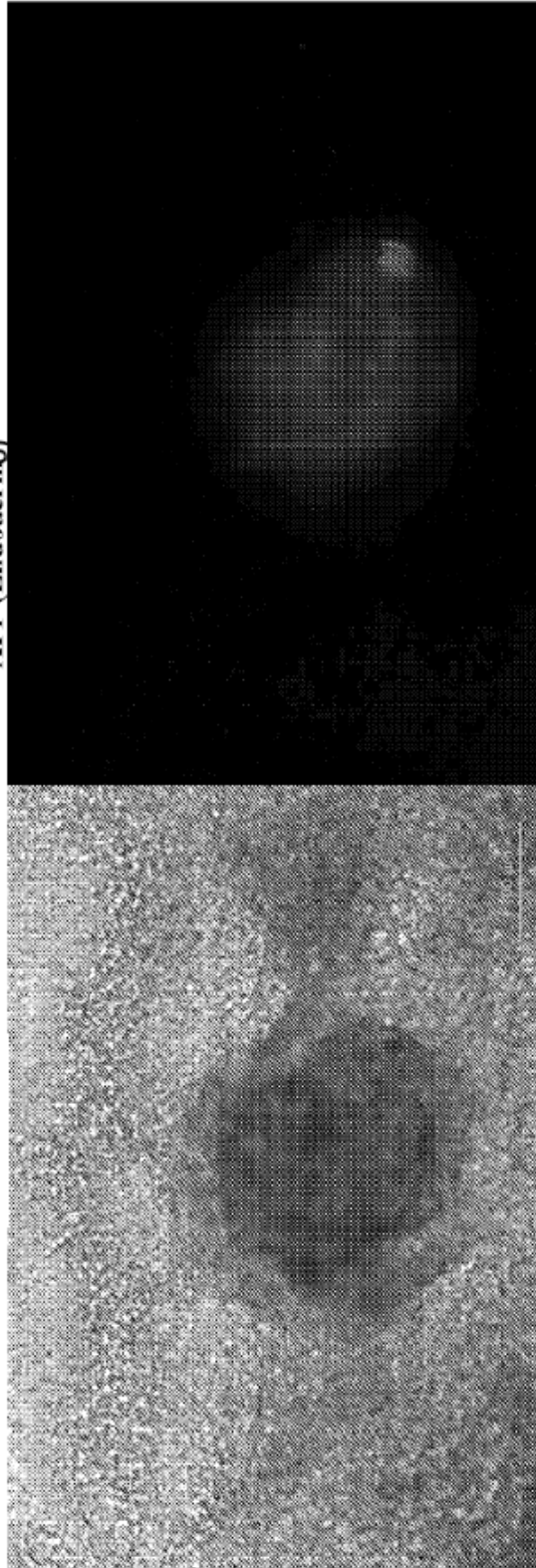


FIG. 28

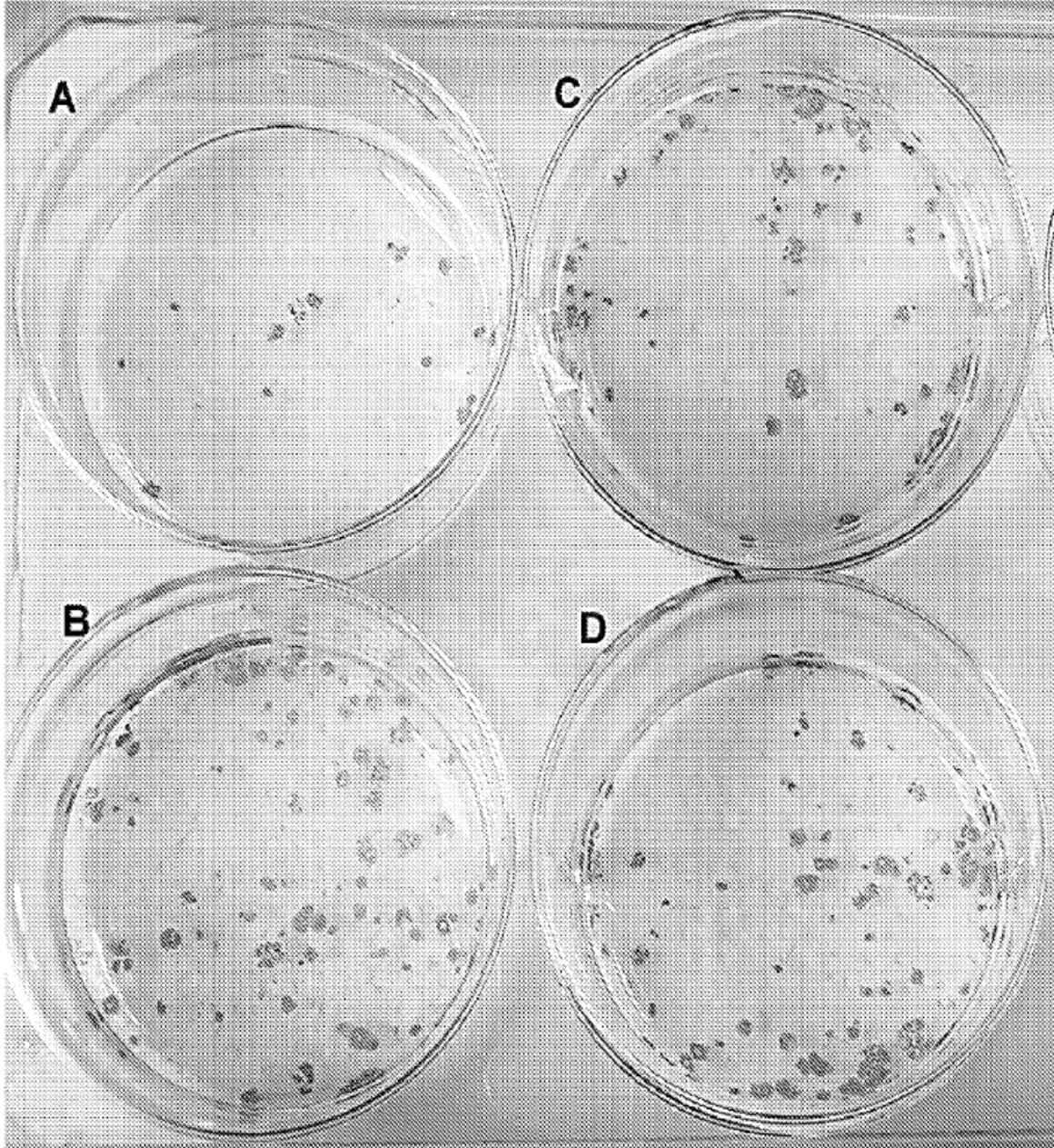


FIG. 29A

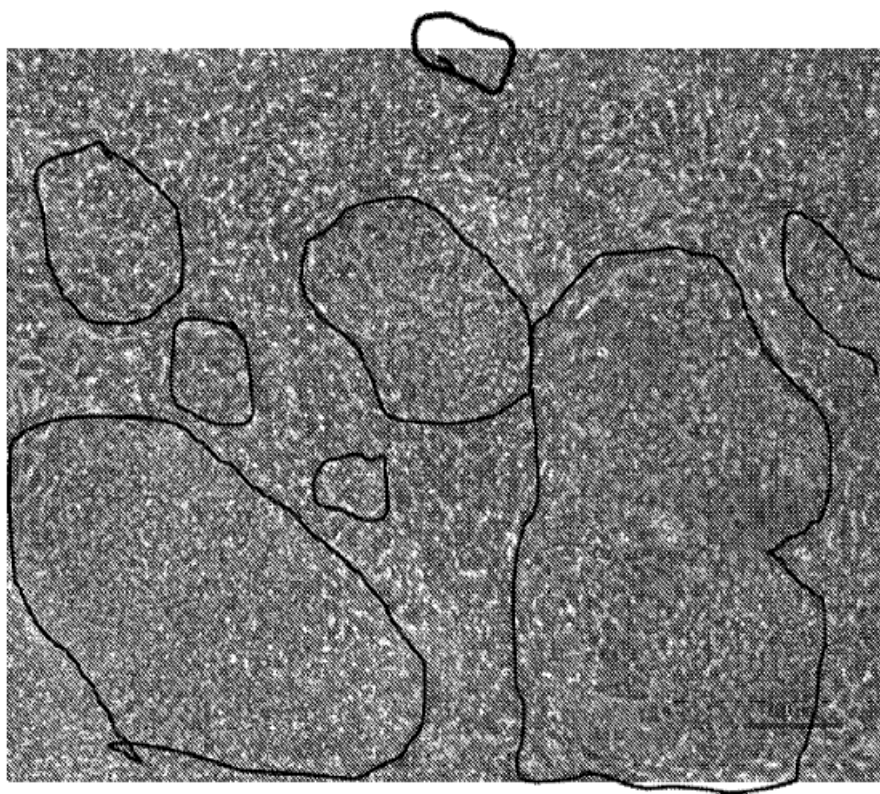
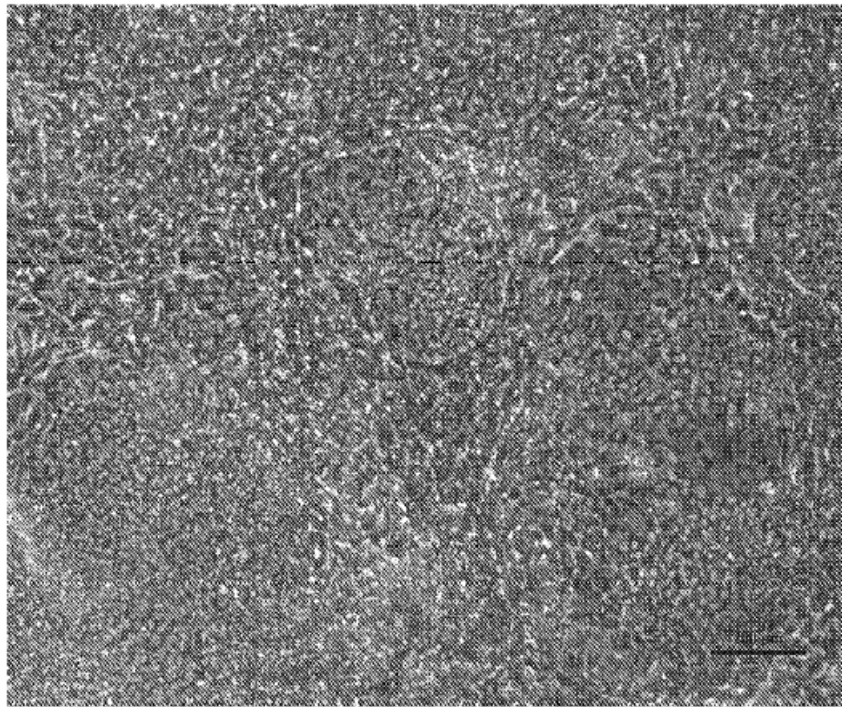


FIG. 29B

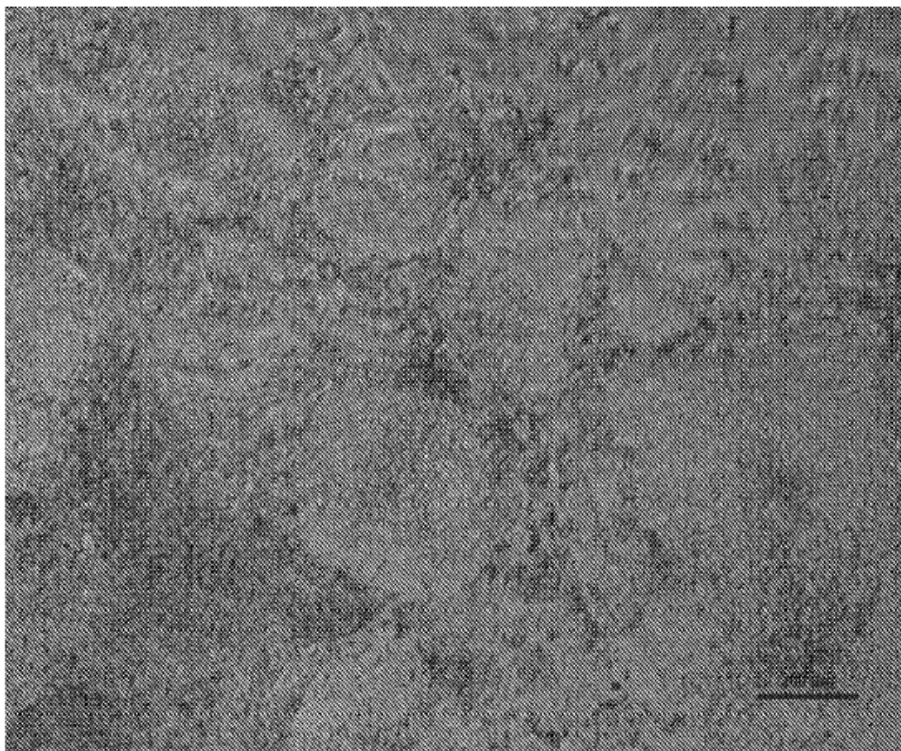
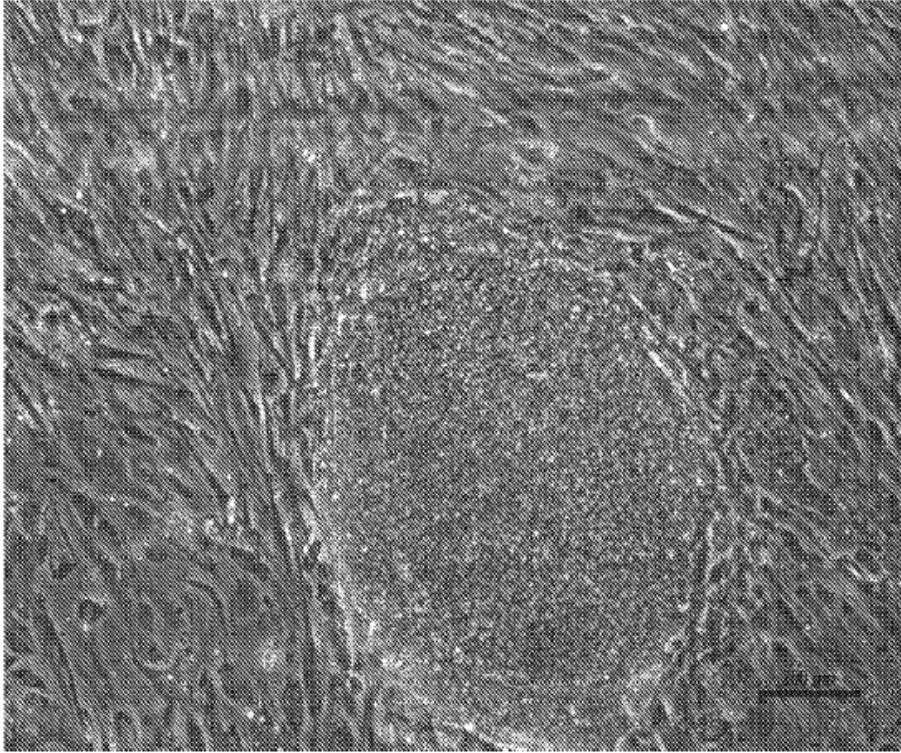


FIG. 30

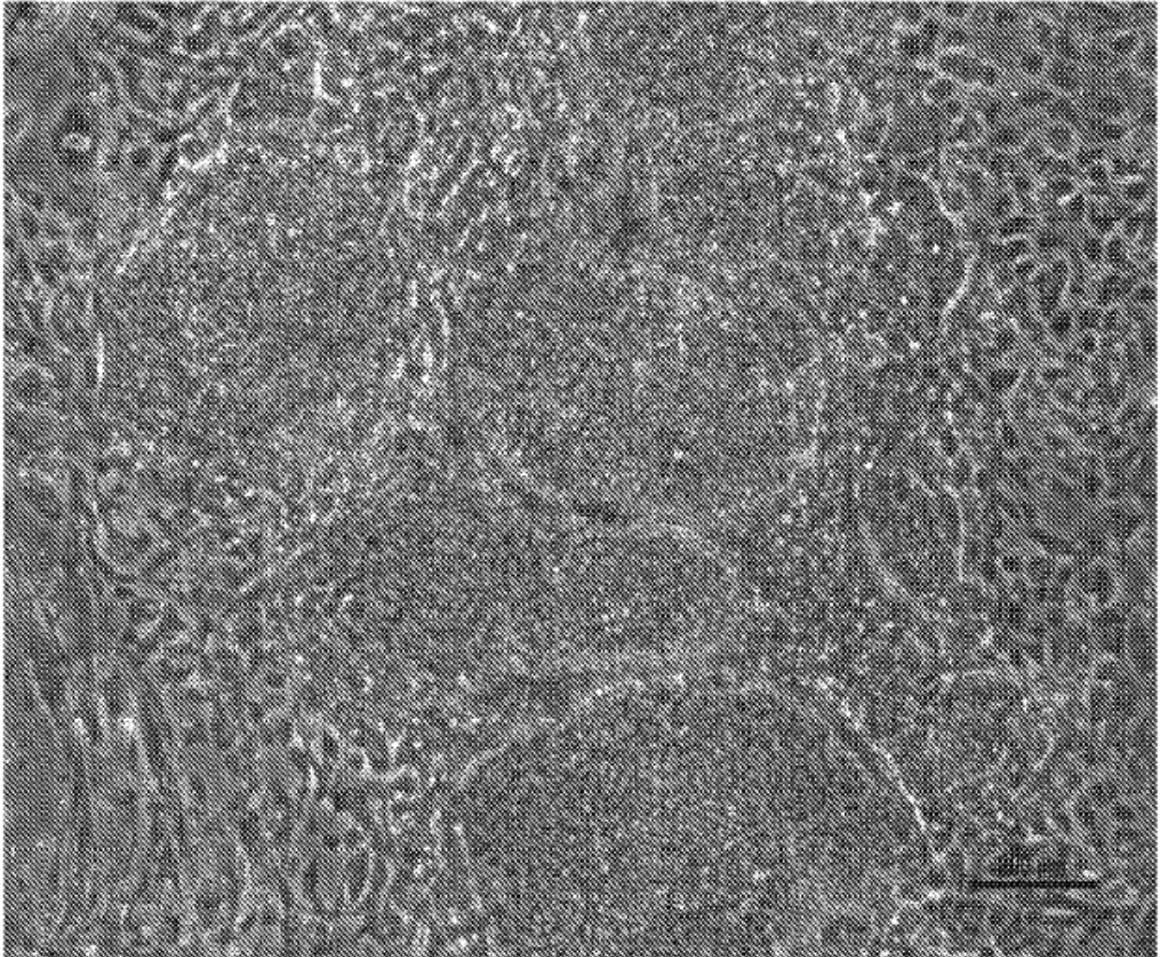


FIG. 31

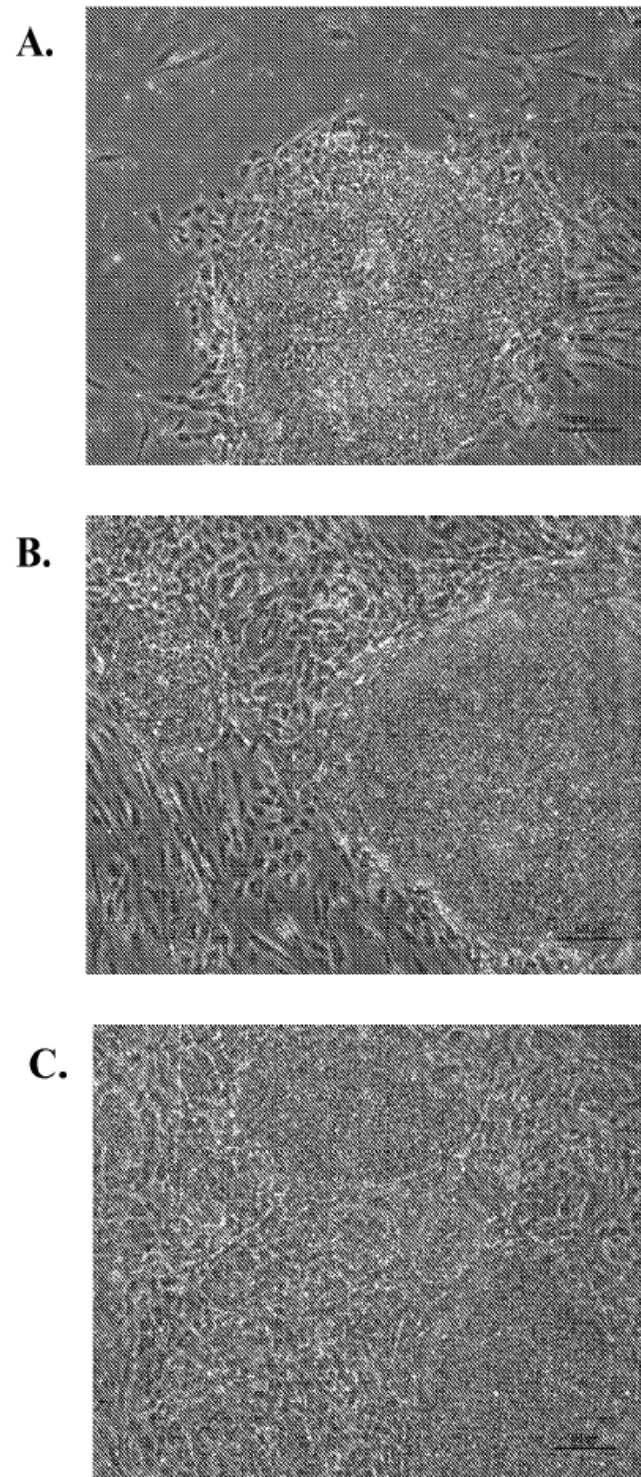
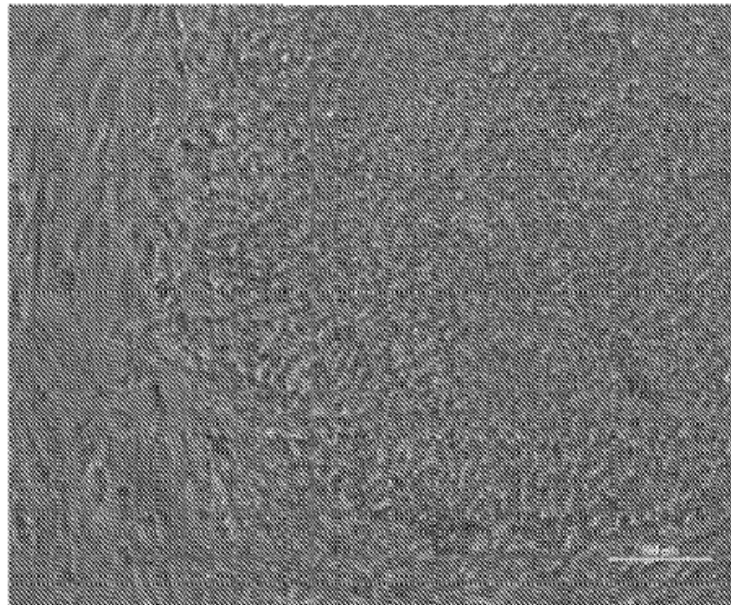


FIG. 32A

Fase x10



OCT4

TRA-1-60

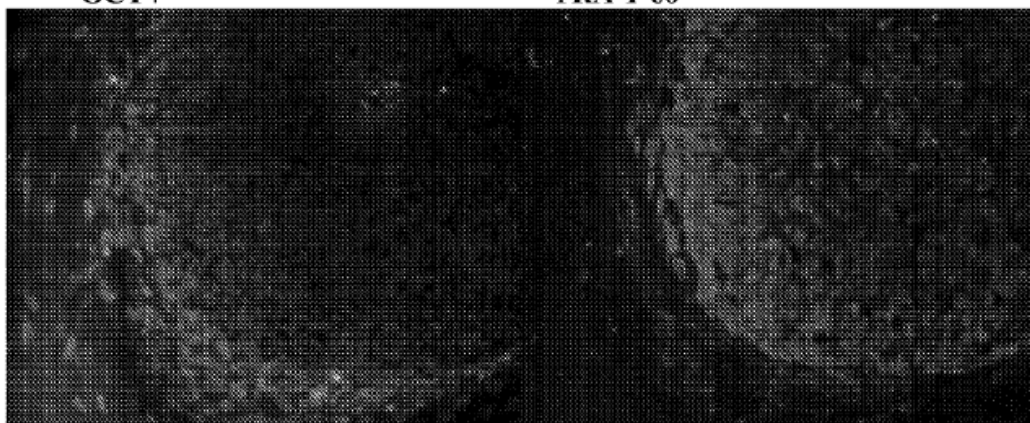


FIG. 32B

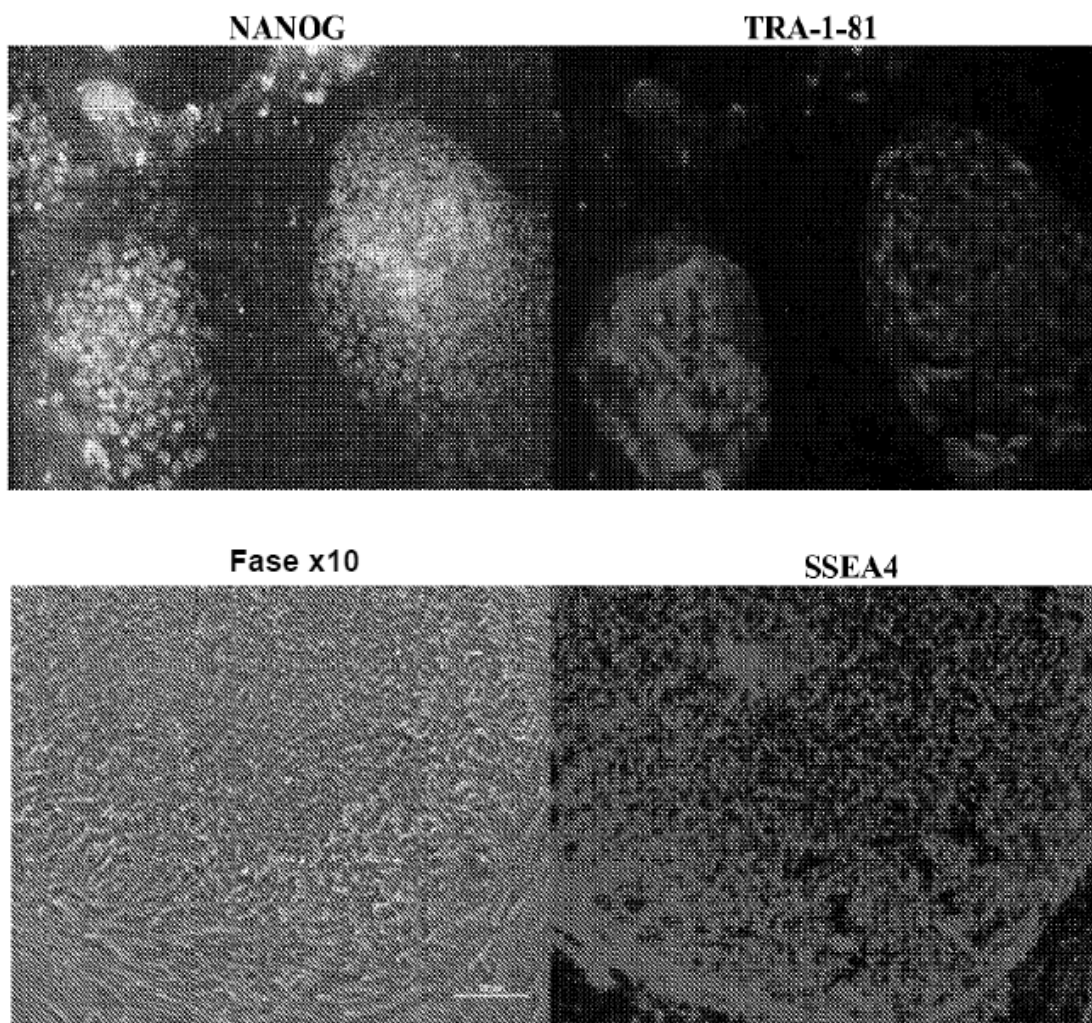


FIG. 33A

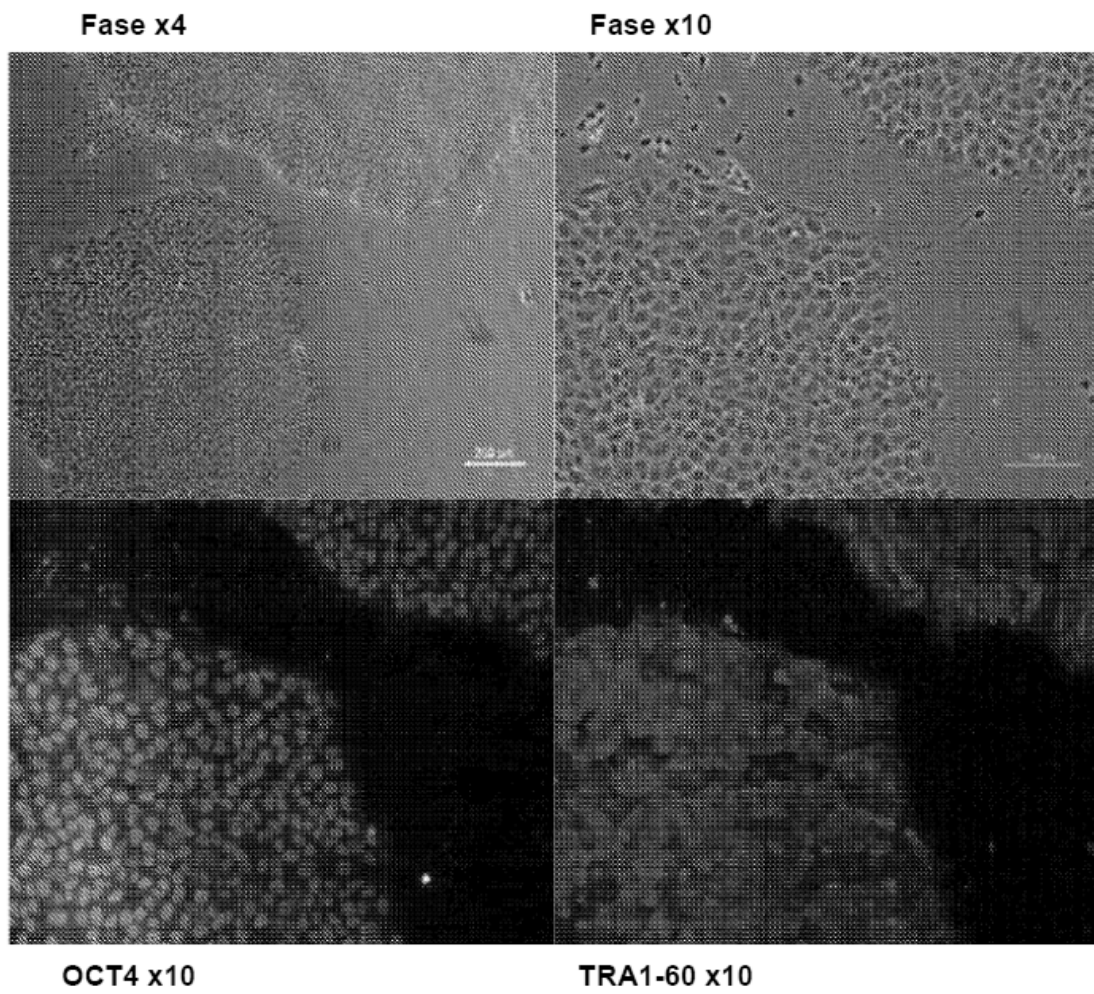


FIG. 33B

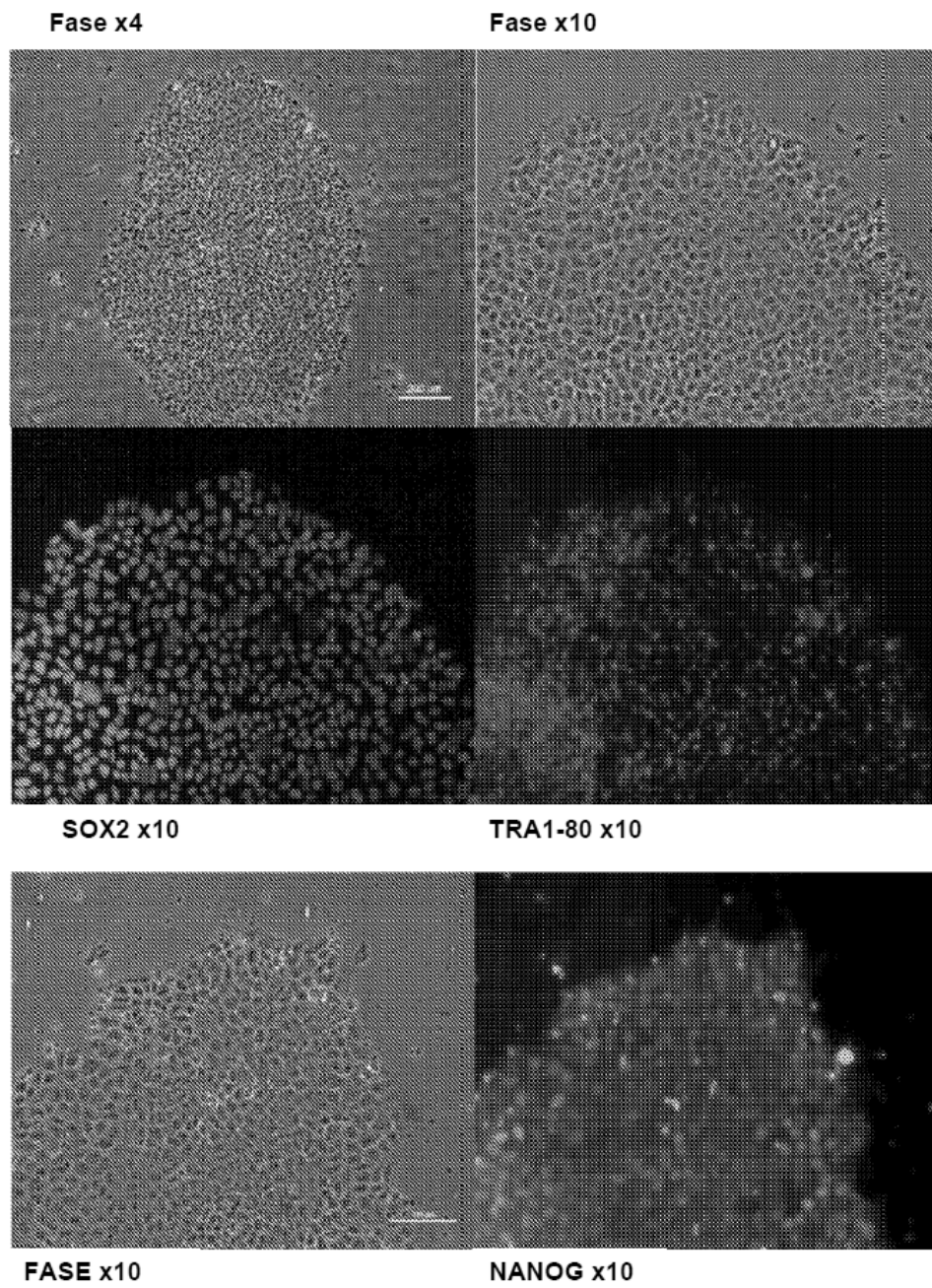


FIG. 34

Fibroblastos BJ	CT para GAPDH	18,56 +/- 0,20
Células iPS	CT para GAPDH	18,70 +/- 0,07

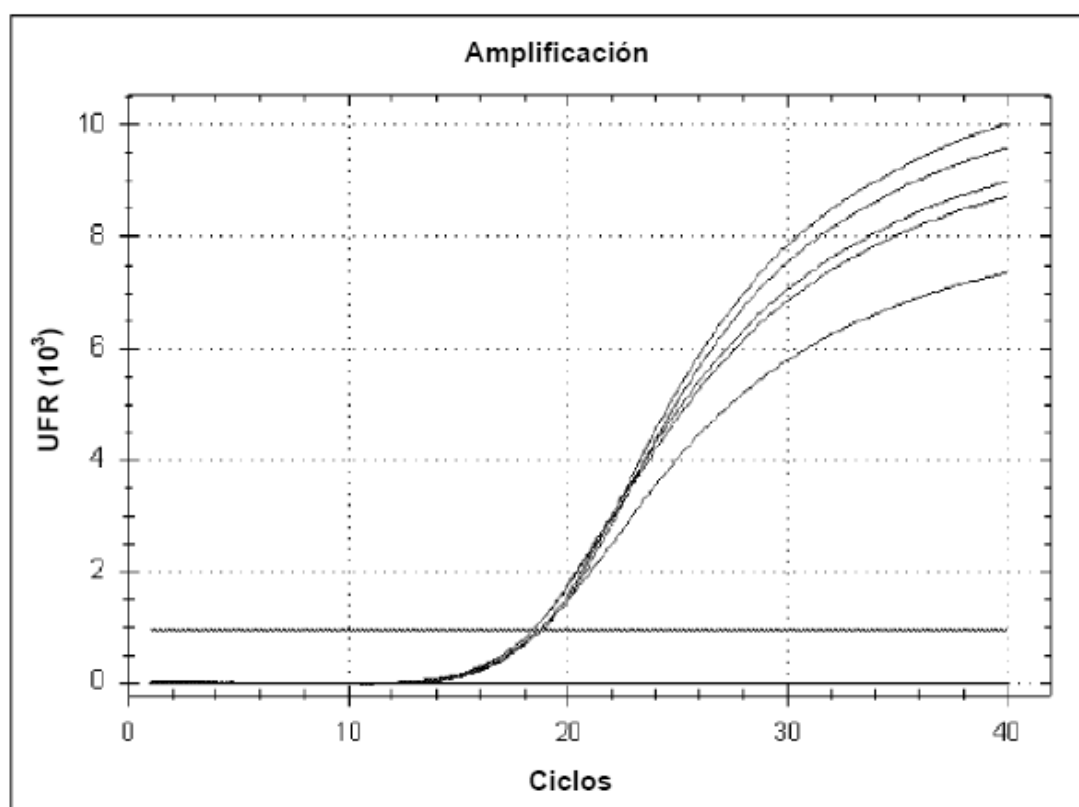


FIG. 35

Fibroblastos BJ	CT medio para CRIPTO	30,1 +/- 0,07
Células iPS	CT medio para CRIPTO	20,9 +/- 0,02

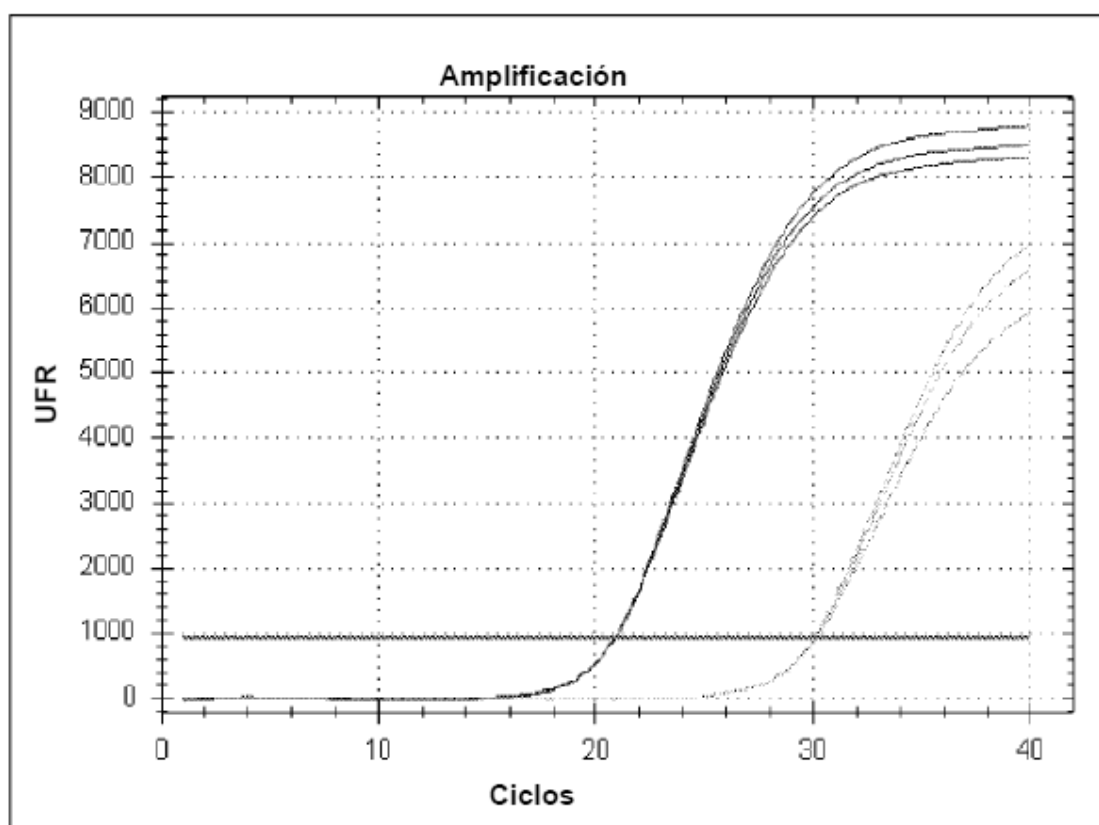


FIG. 36

Fibroblastos BJ	CT medio para NANOG	30,4 +/- 0,08
Células iPS	CT medio para NANOG	22,9 +/- 0,03

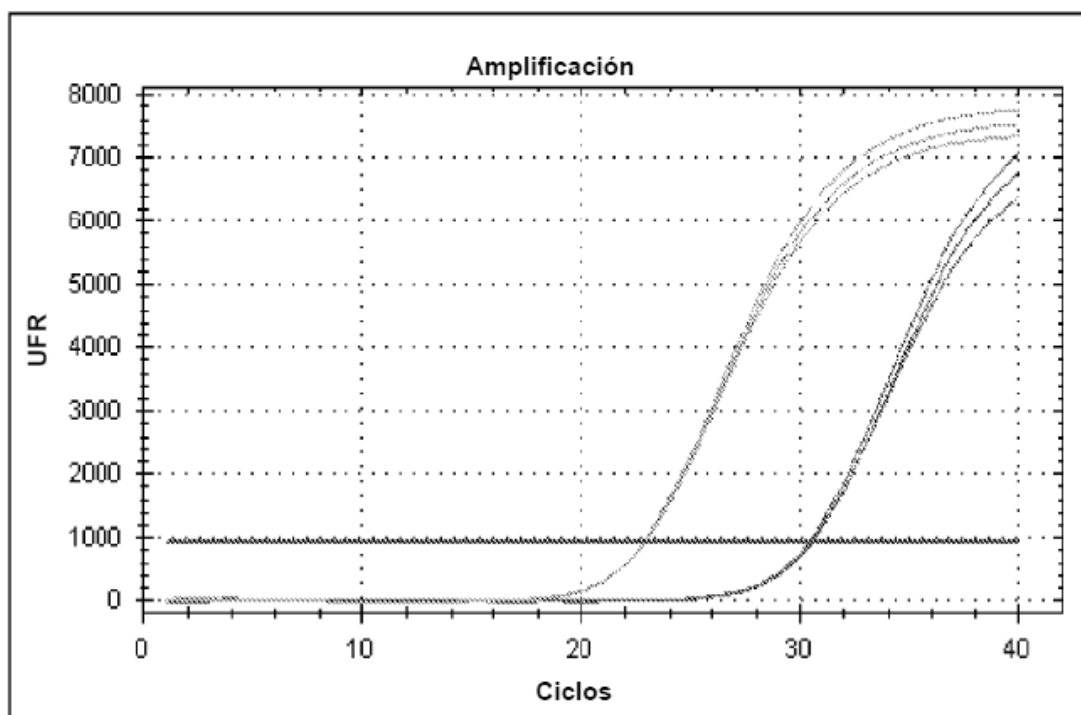


FIG. 37

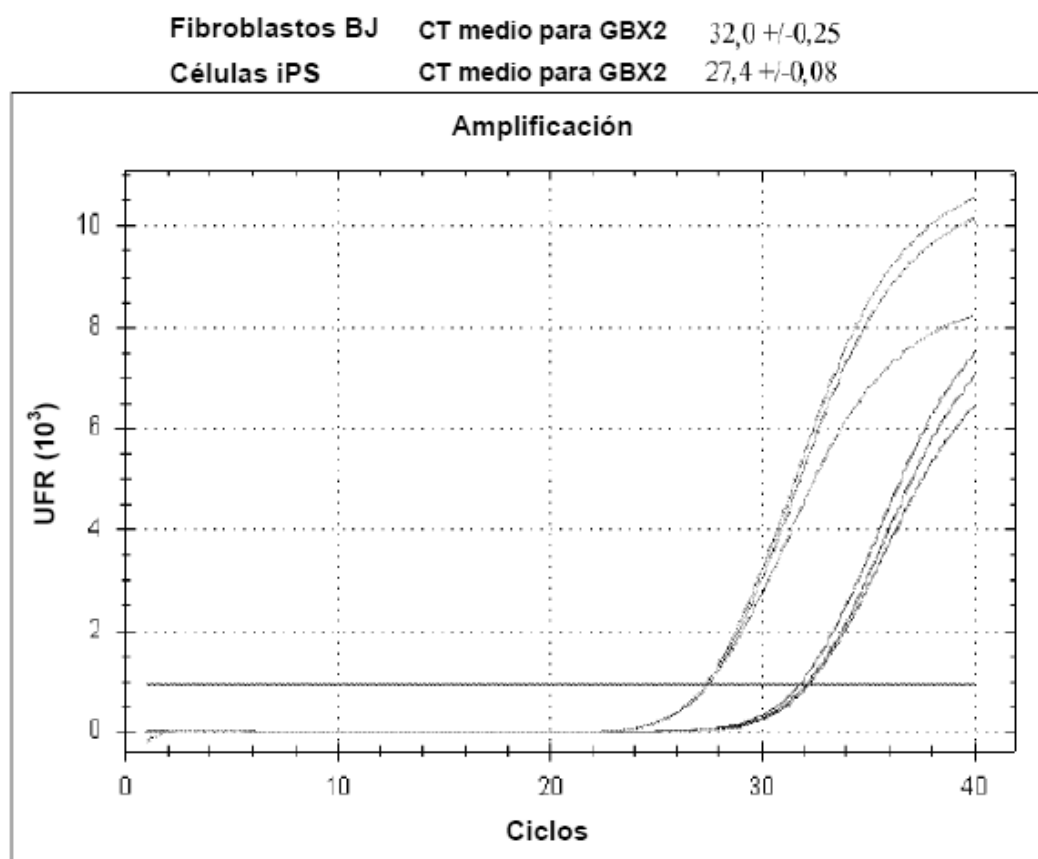


FIG. 38

4 aumentos

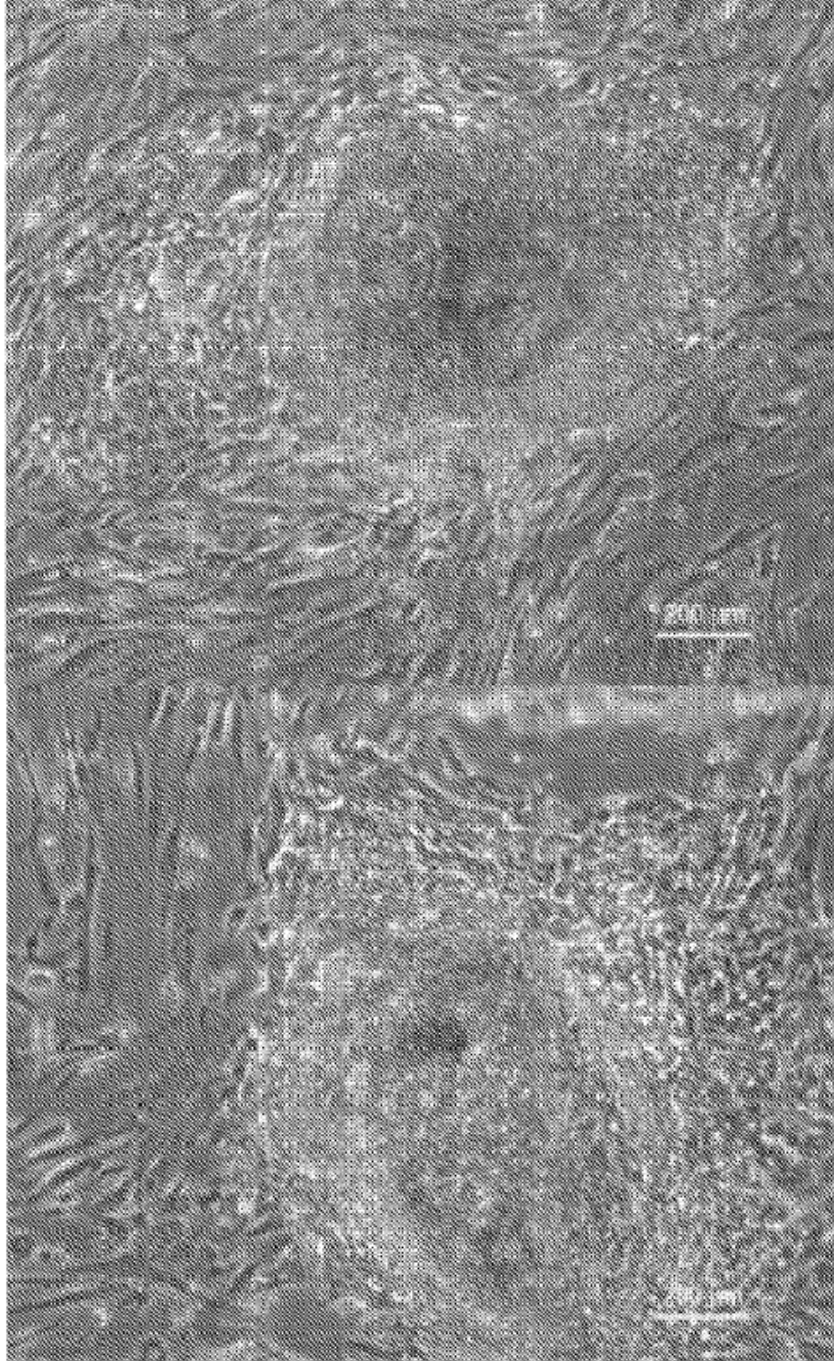


FIG. 39

4 aumentos

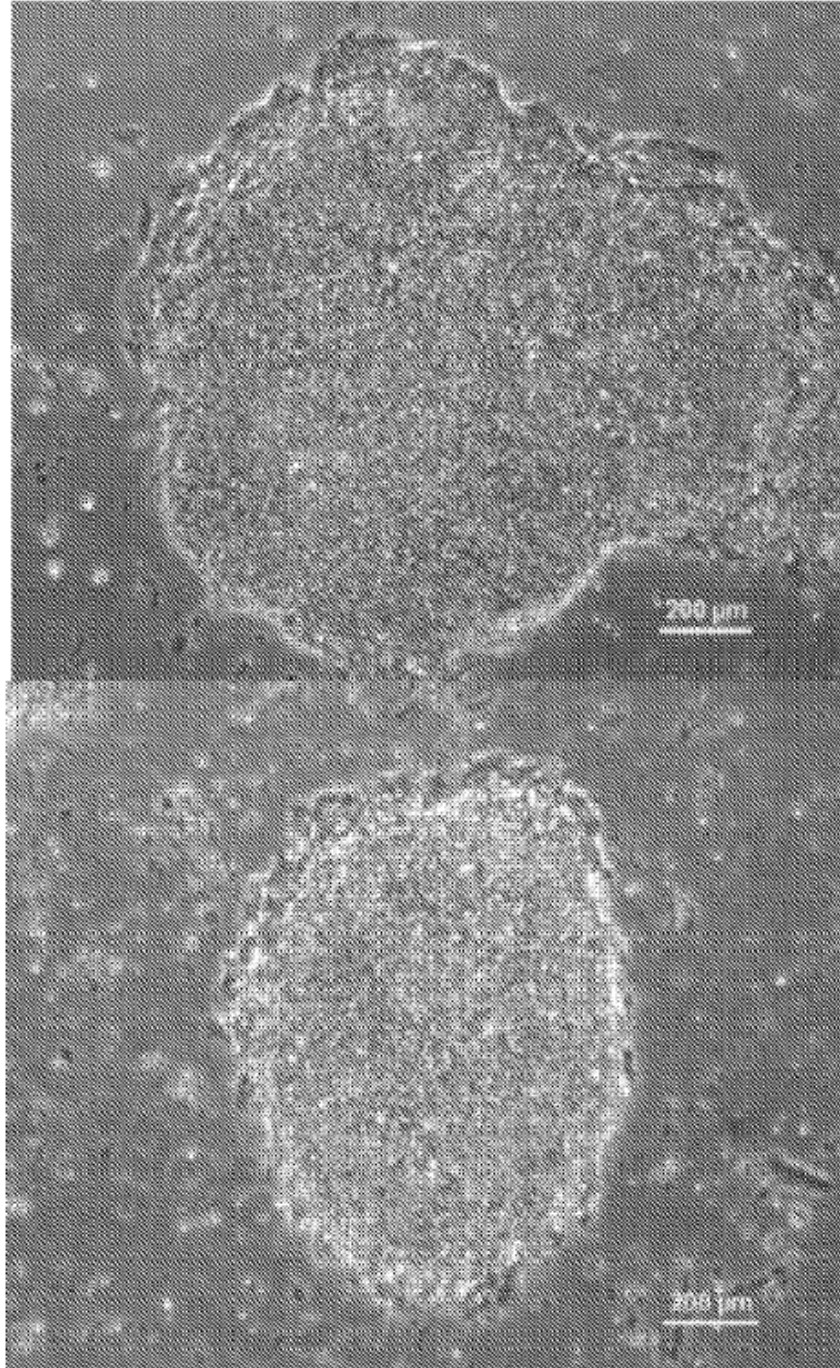
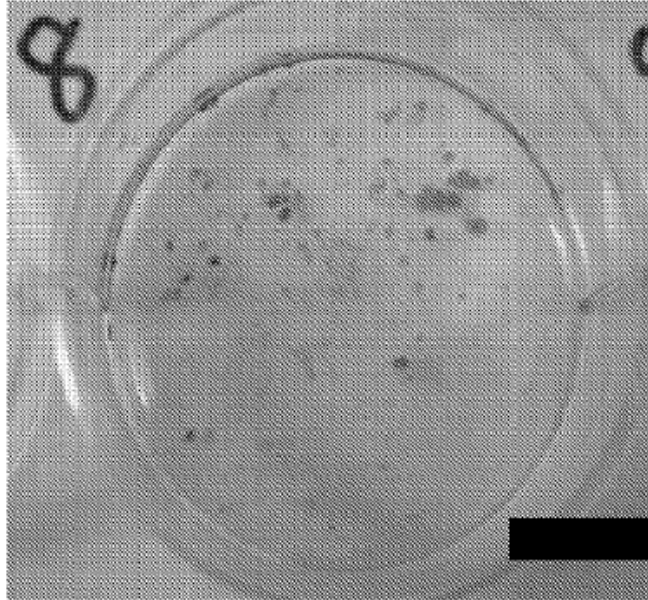


FIG. 40

A. Colonias de KLM03S con RIII, Pseudouridina , 5 factores



B. Colonias de K3LMO3S con RIII, Pseudouridina , 5 factores

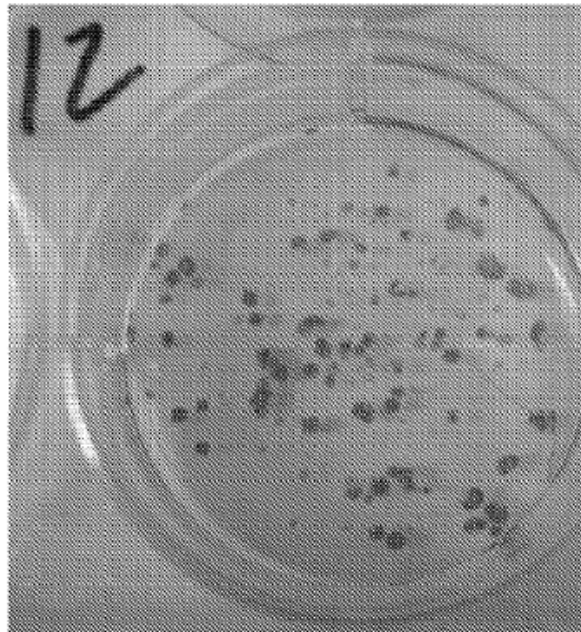


FIG. 41

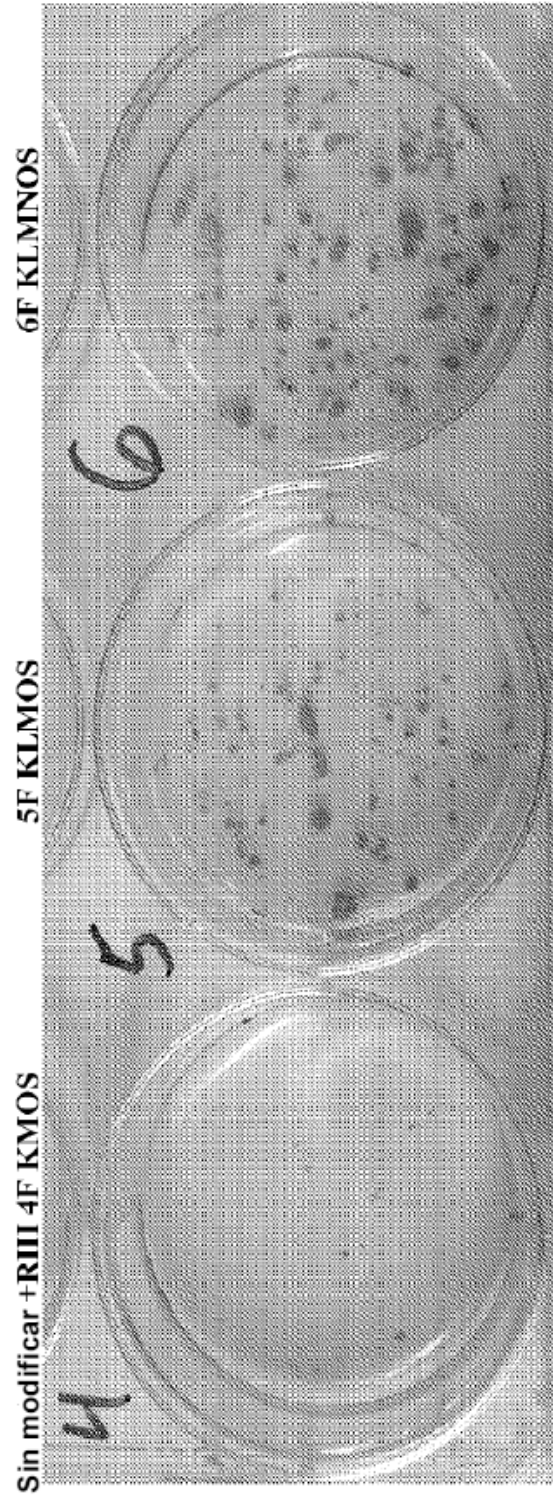


FIG. 42

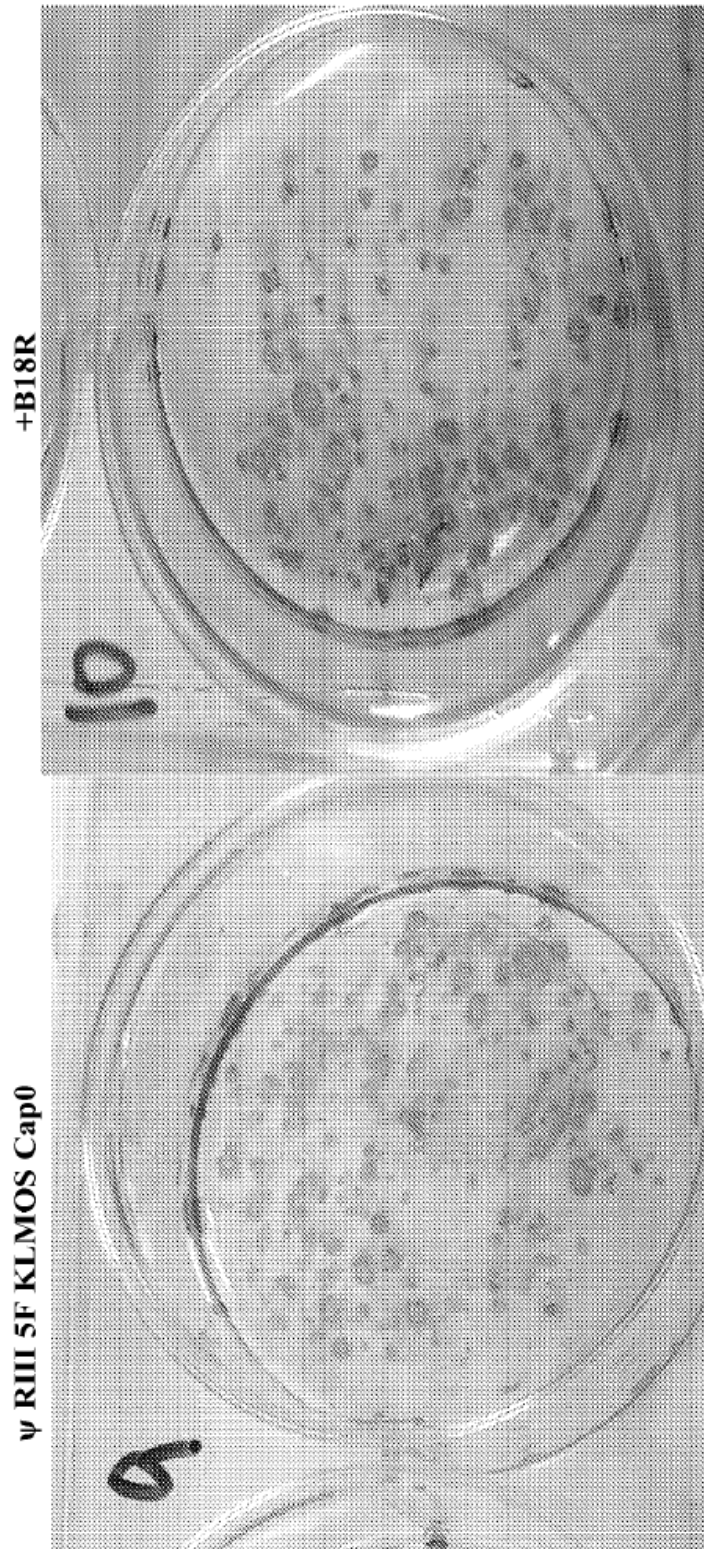
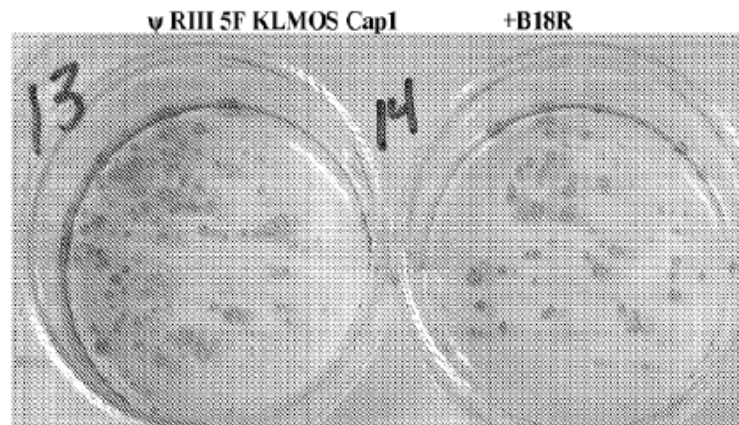
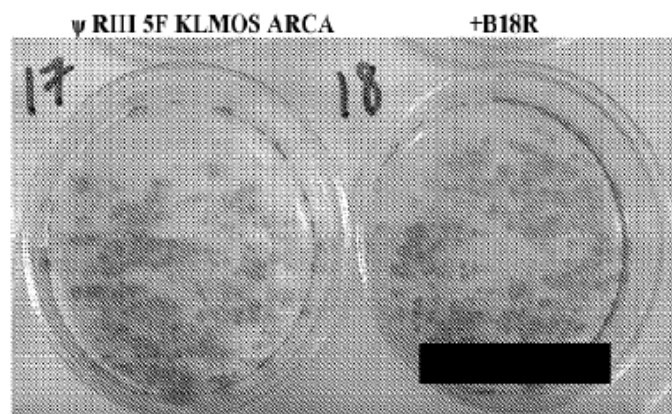


FIG. 43

A.



B.



C.

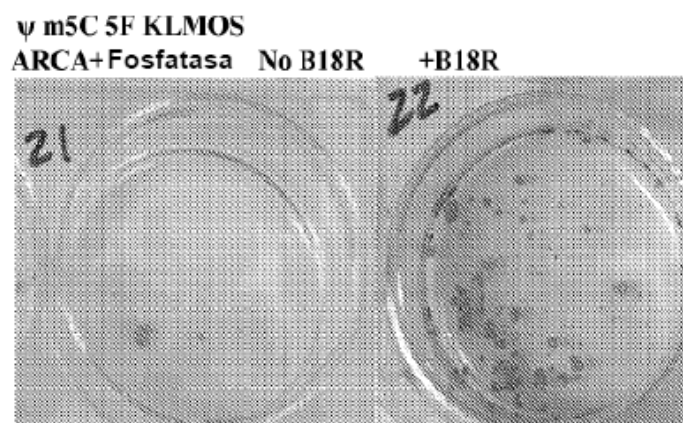
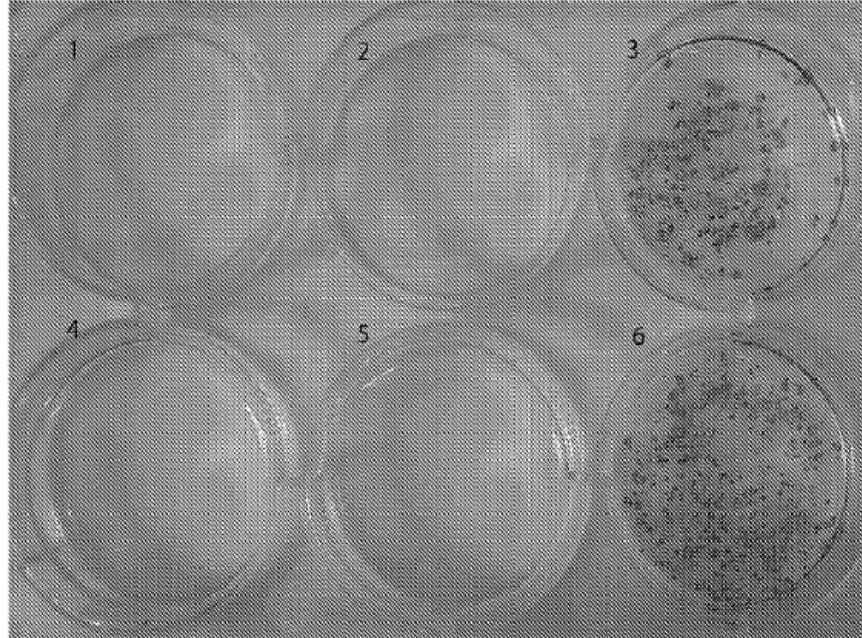


FIG. 44

A.



B.

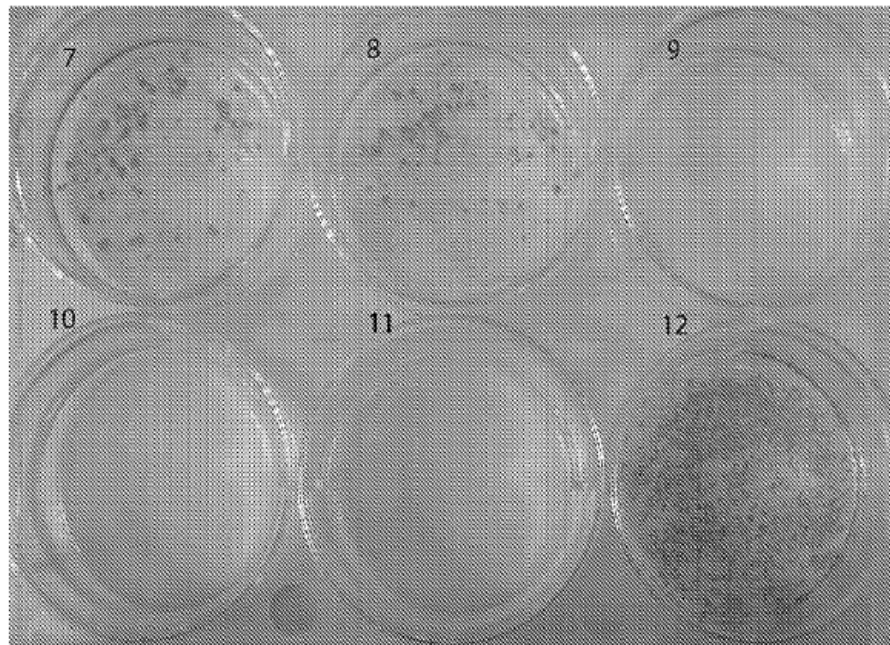
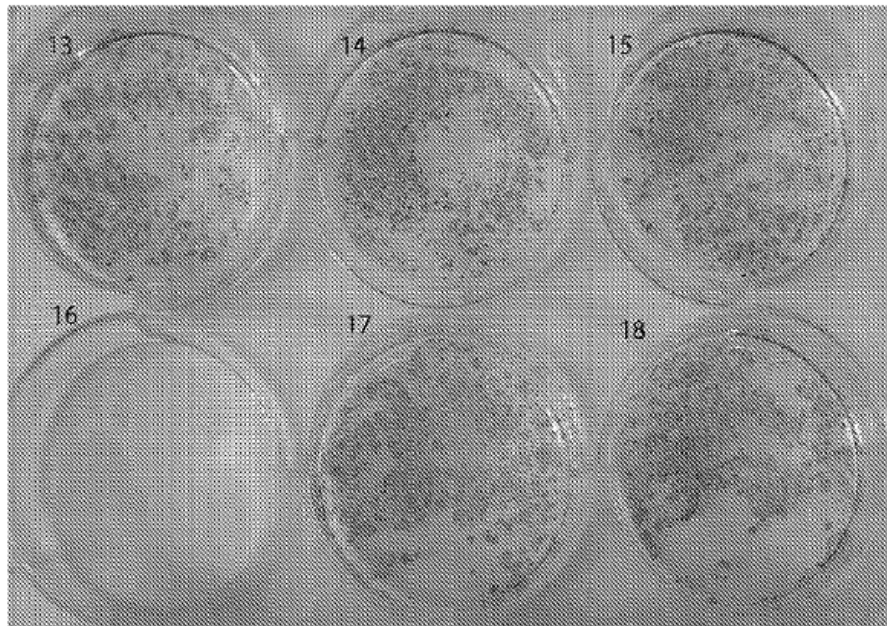


FIG. 44

C.



D.

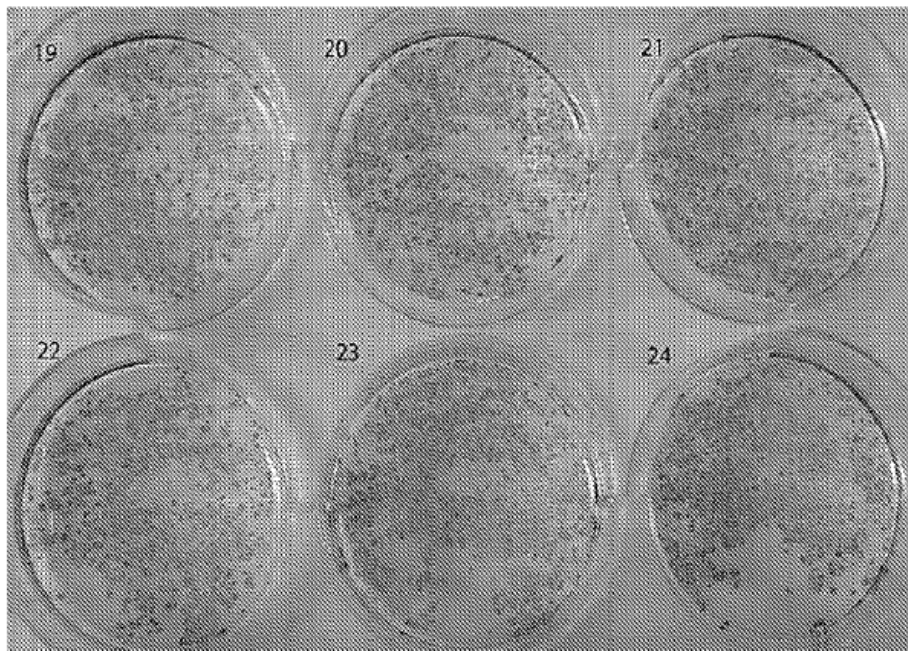


FIG. 45A

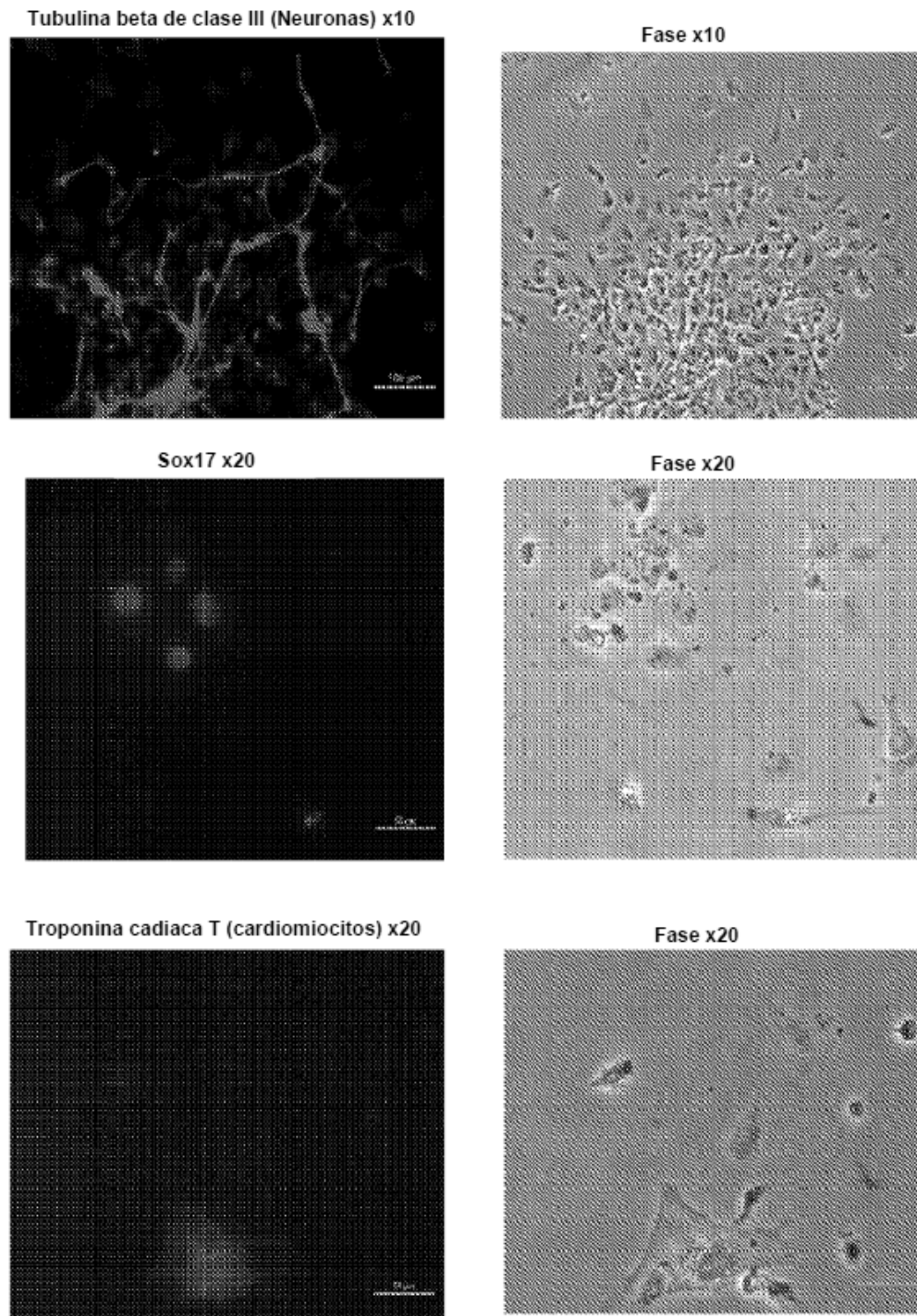


FIG. 45 B

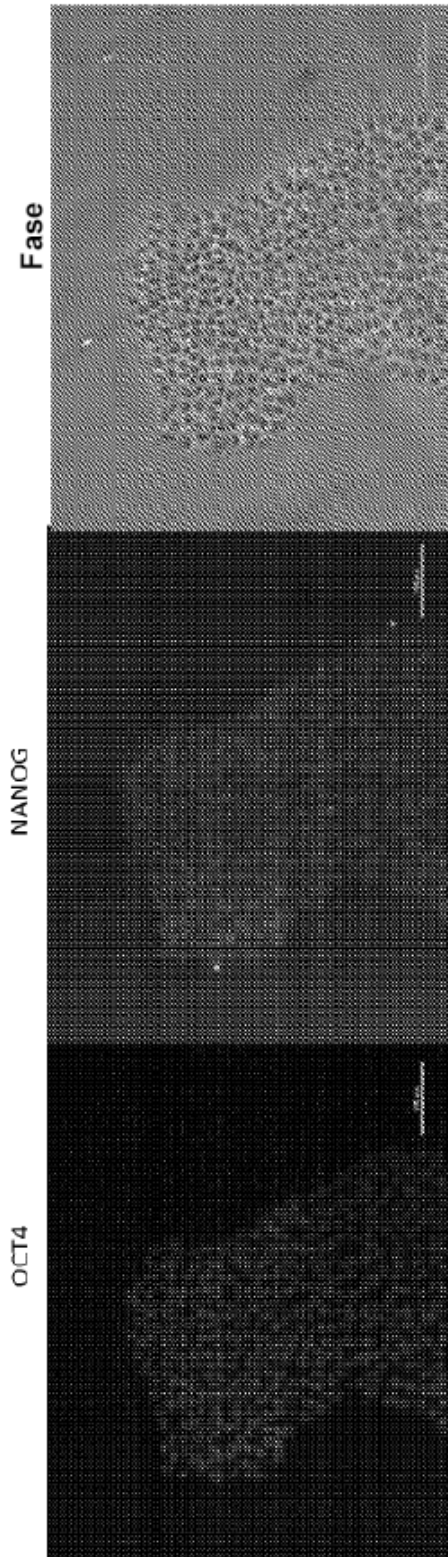


FIG. 45C

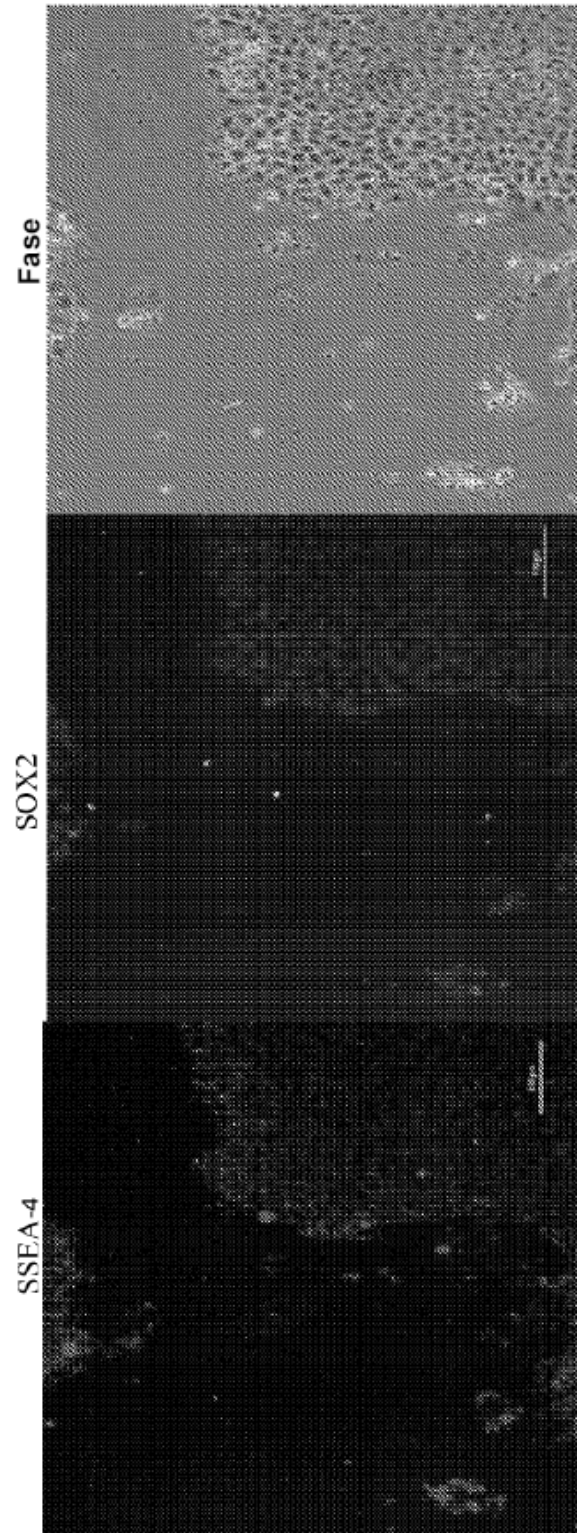


FIG. 45D

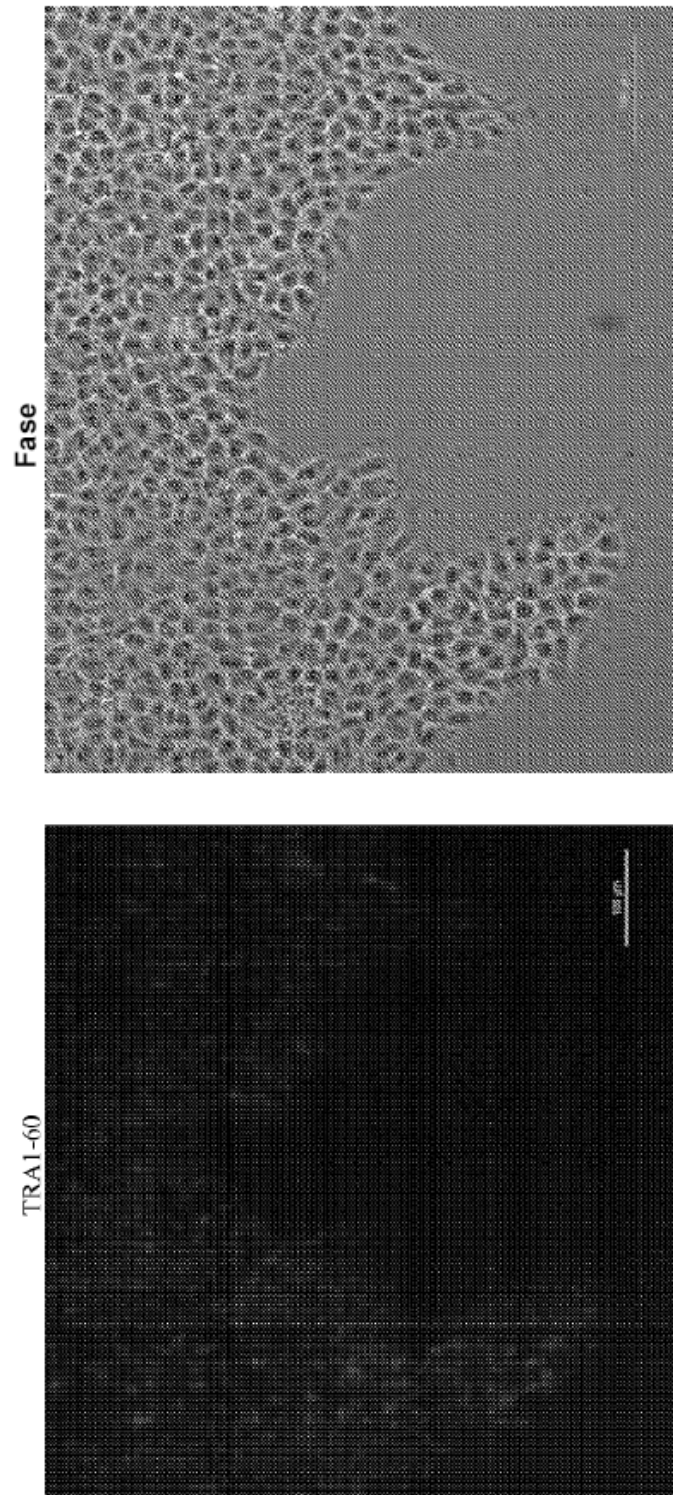


FIG. 46A

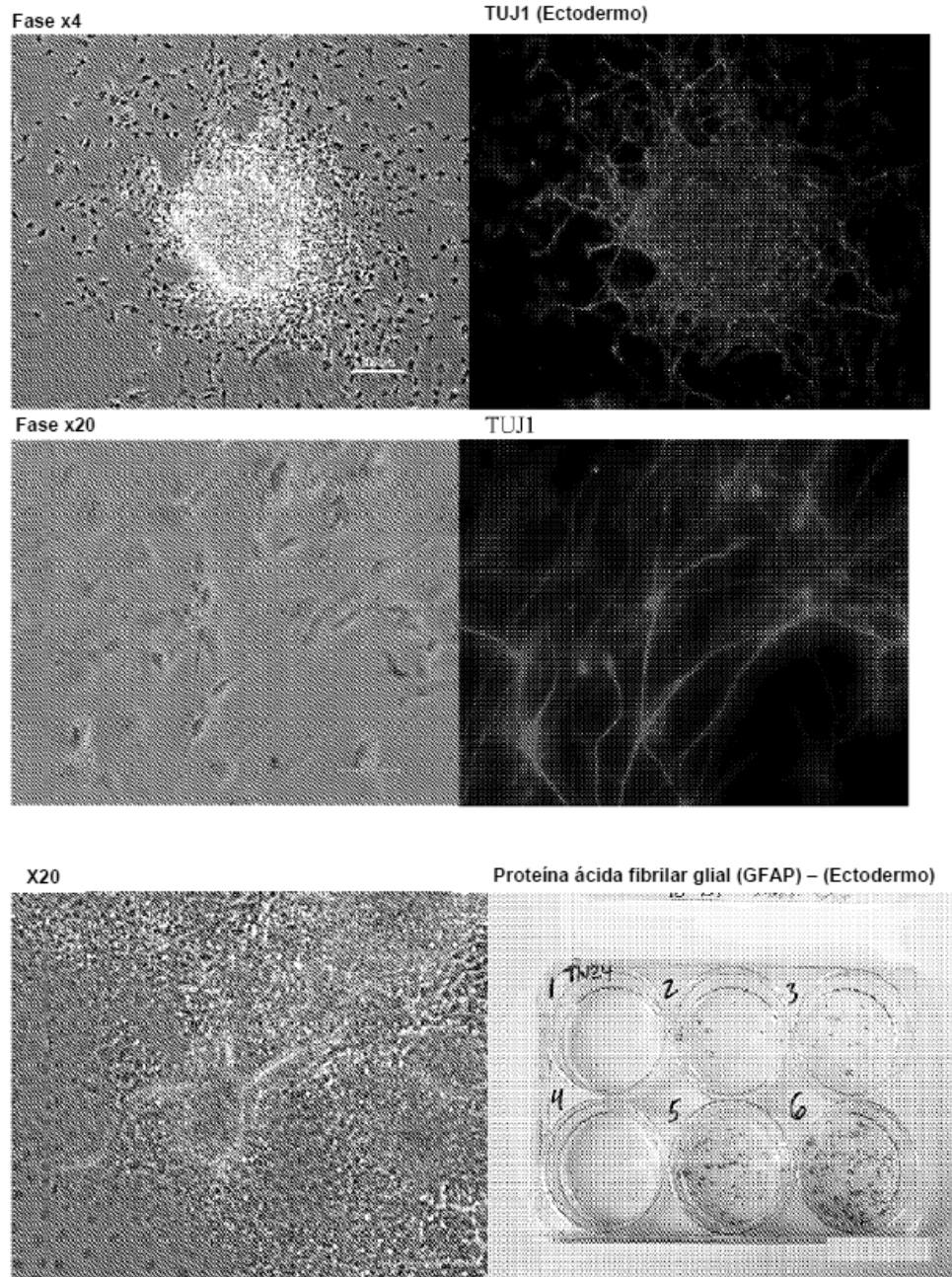


FIG. 46B

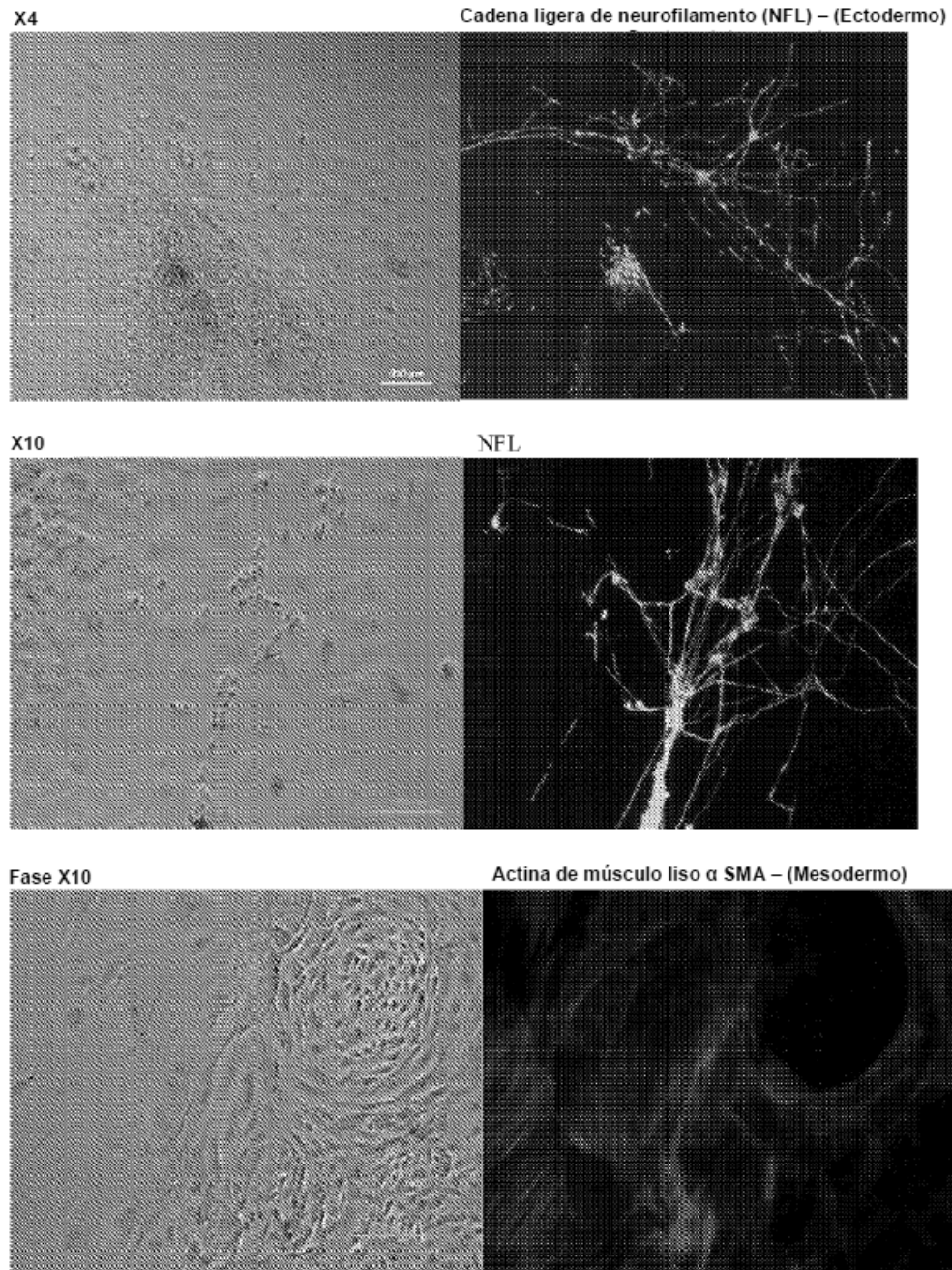


FIG. 46C

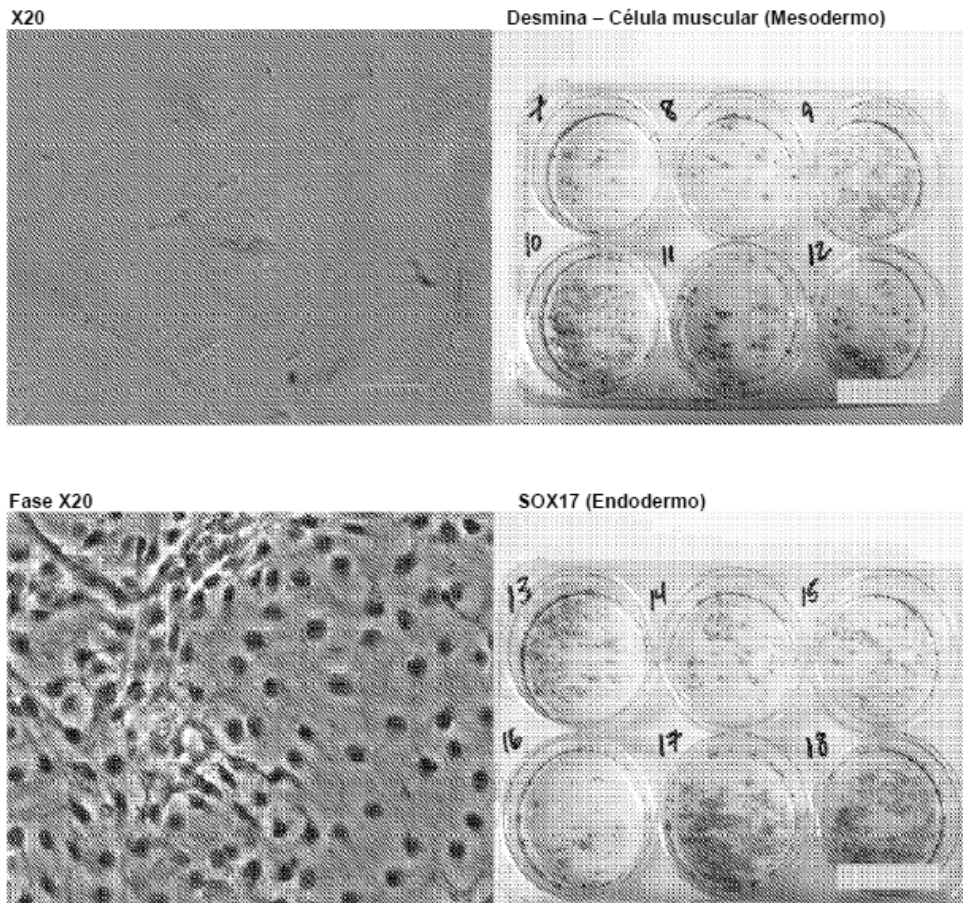


FIG. 46D

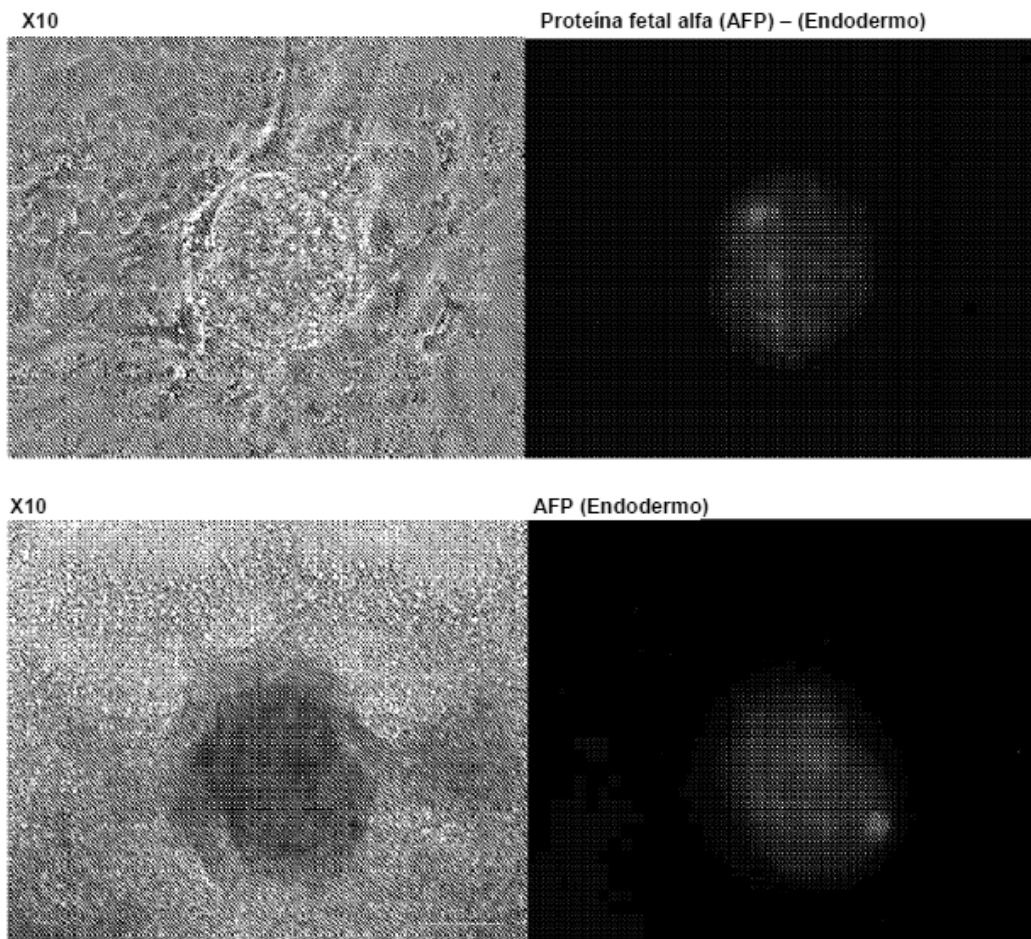


FIG. 47A

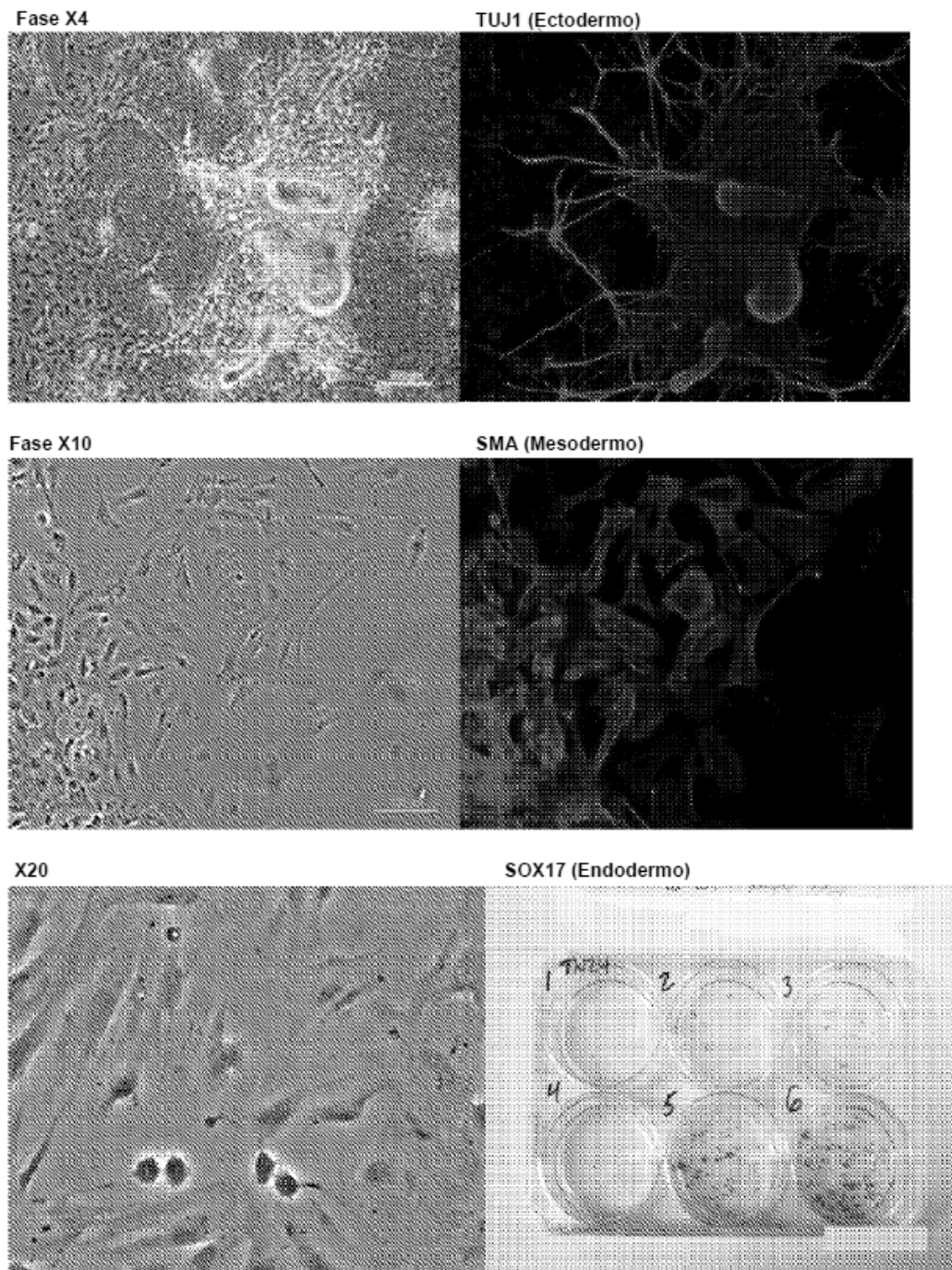


FIG. 47B

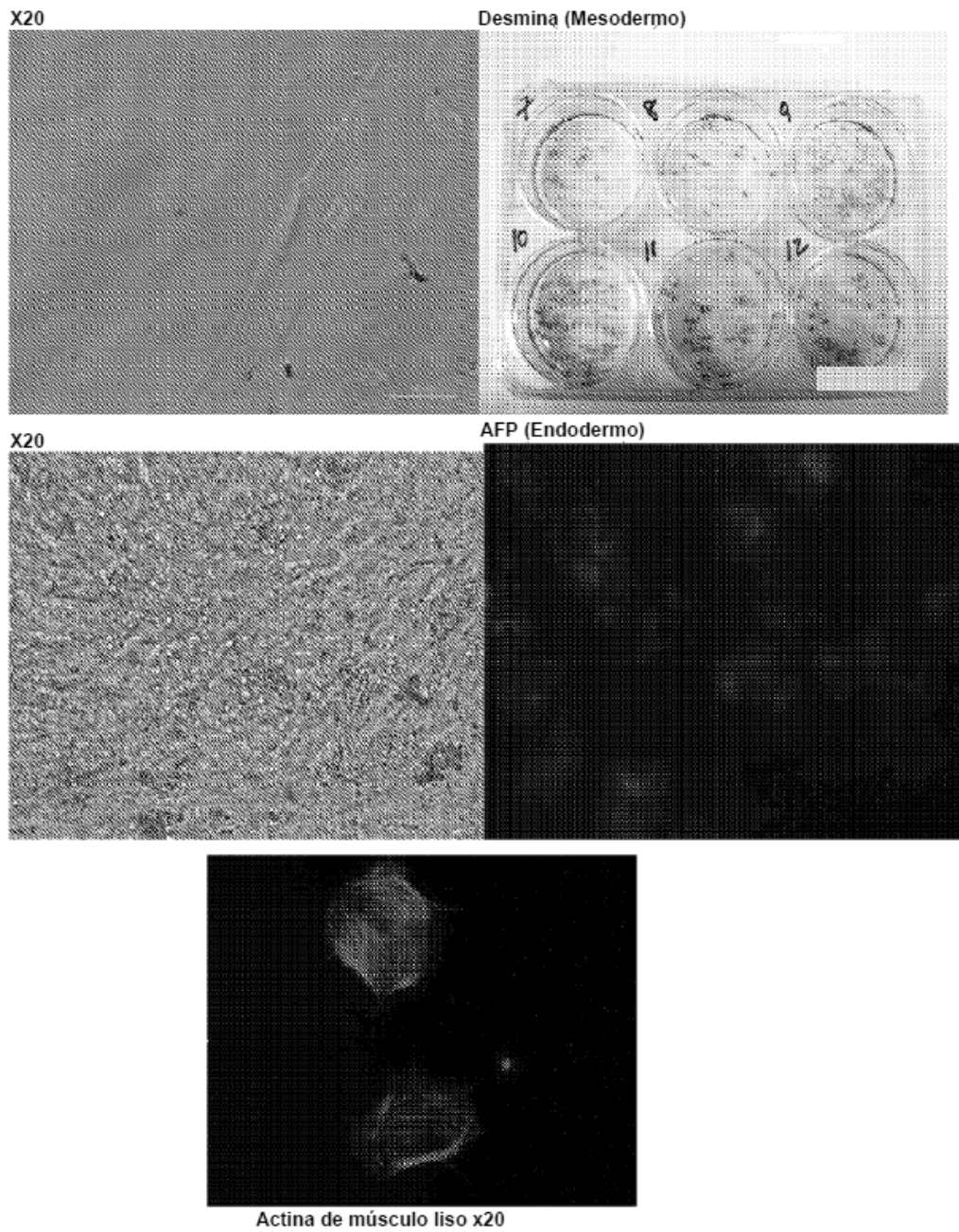


FIG. 48A

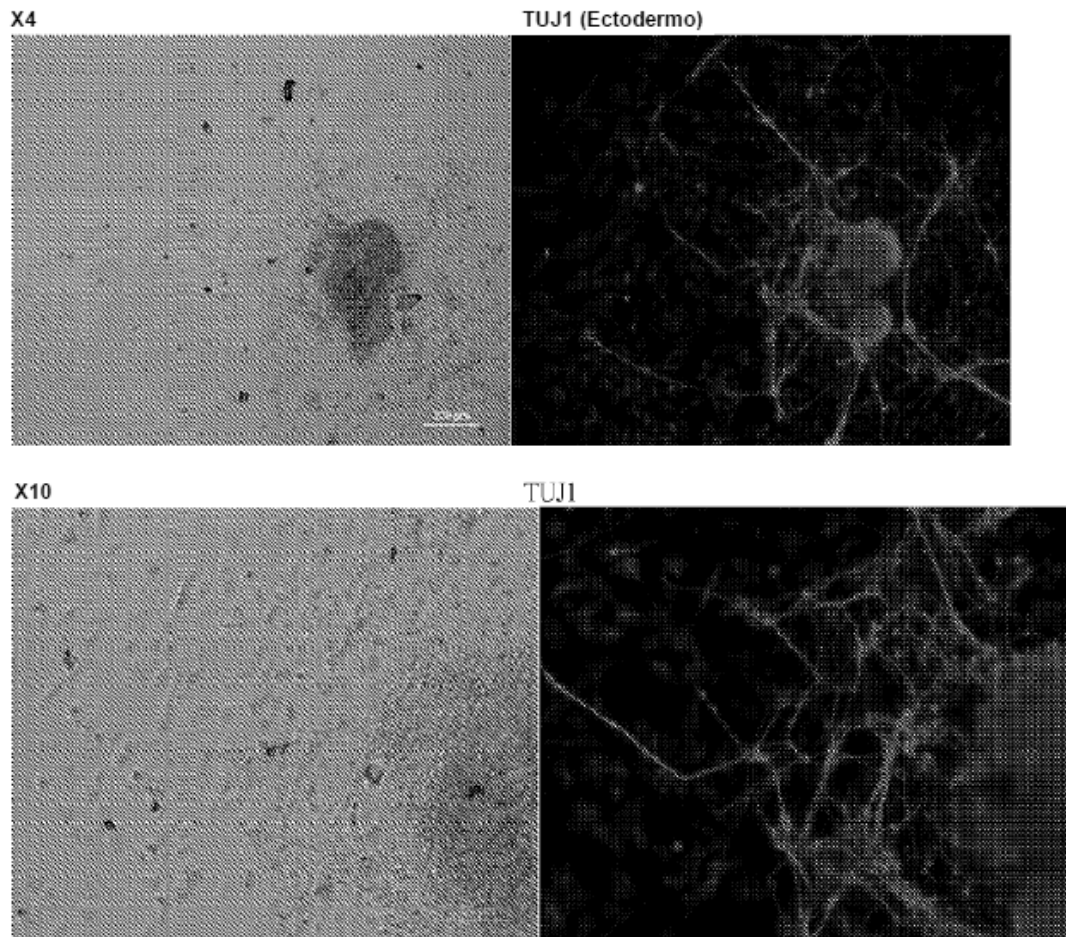


FIG. 48B

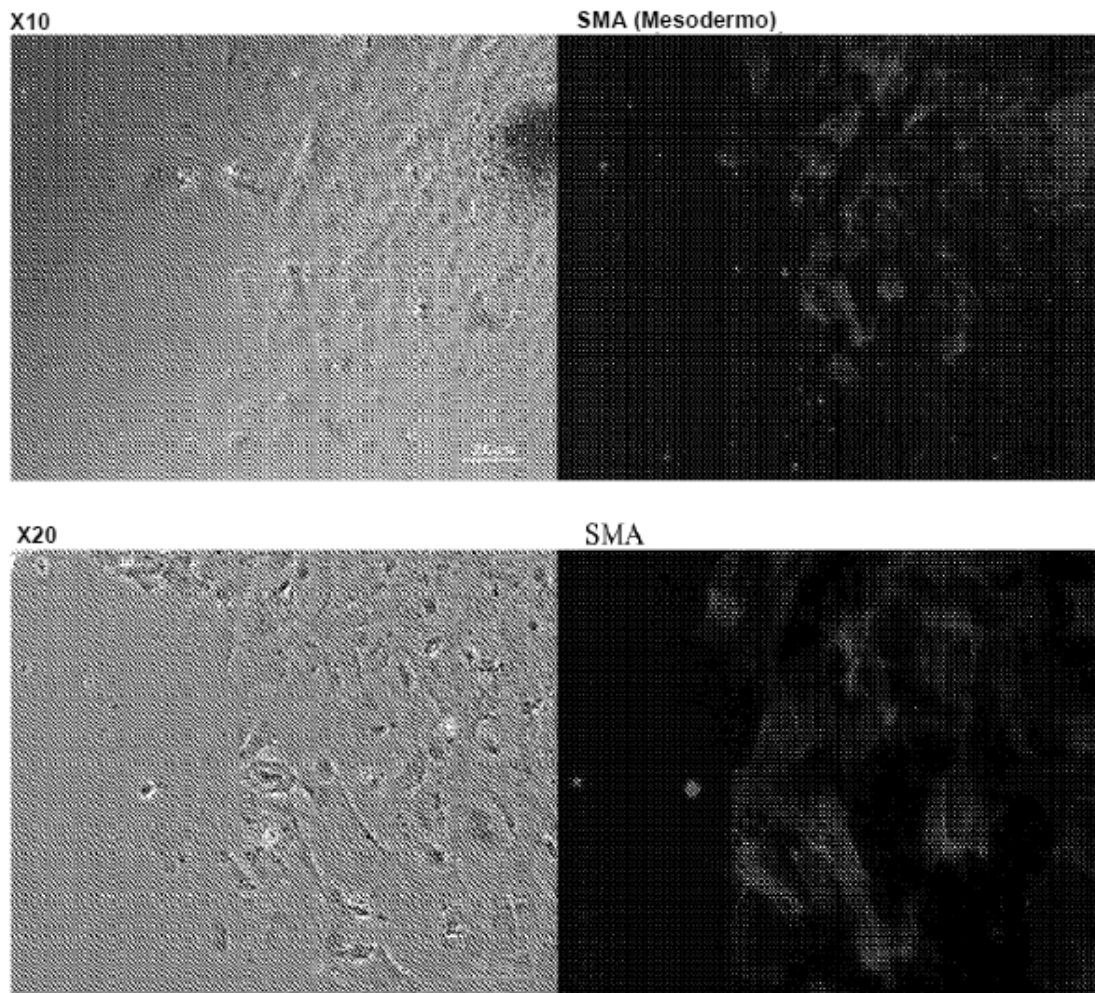


FIG. 48C

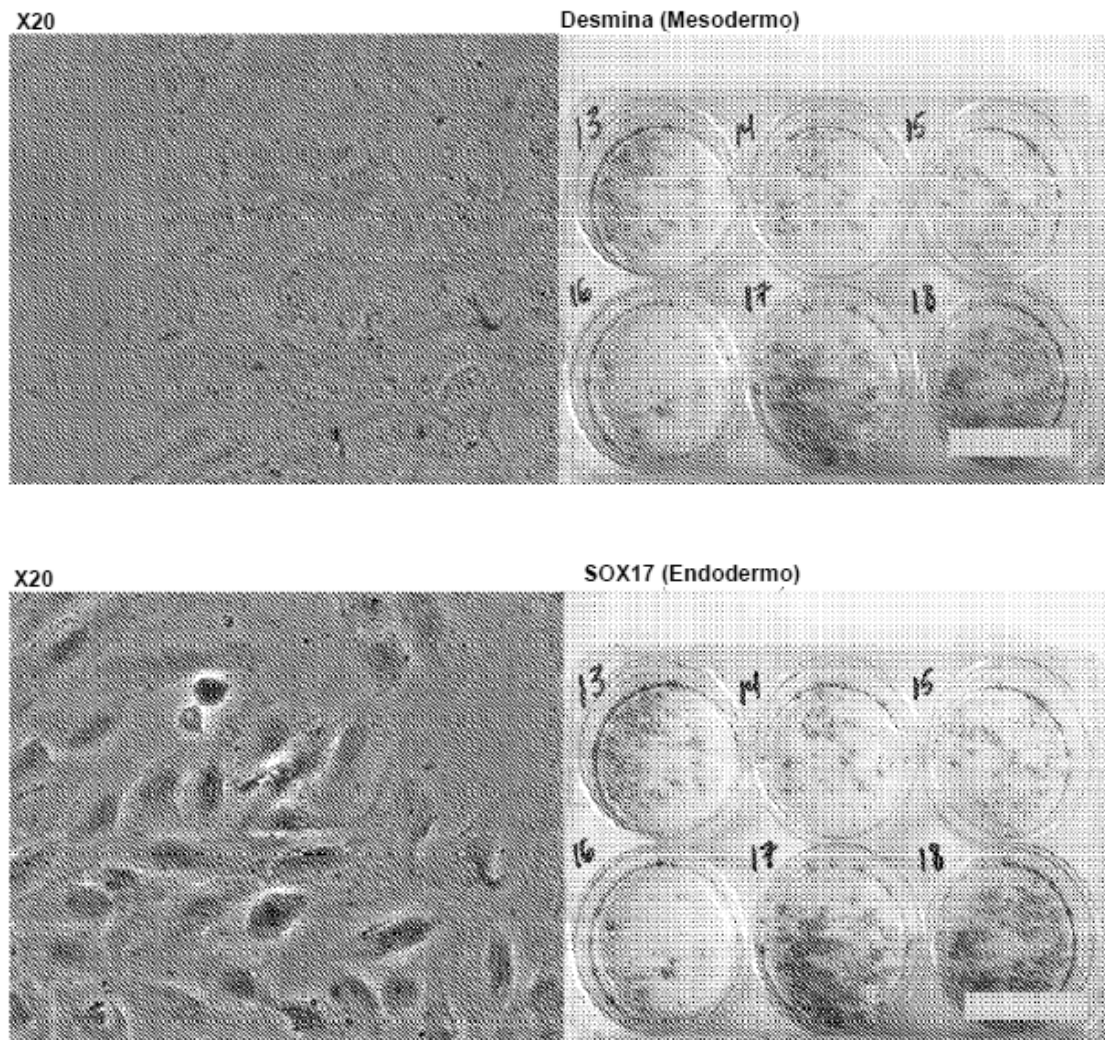


FIG. 49

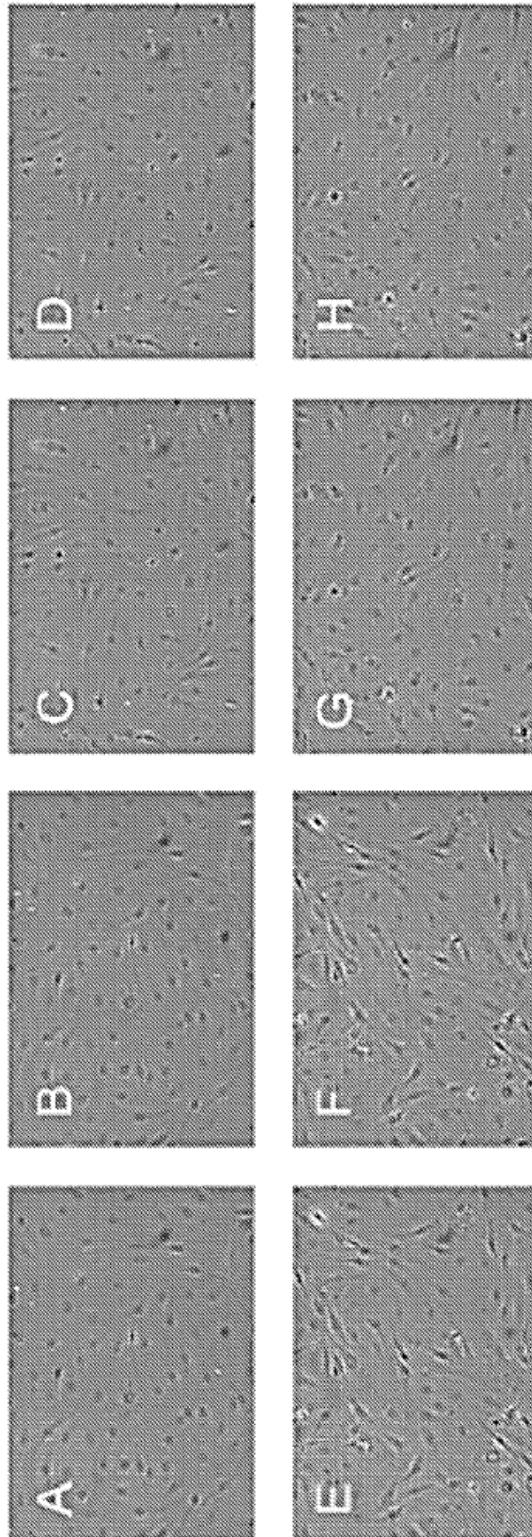


FIG. 49

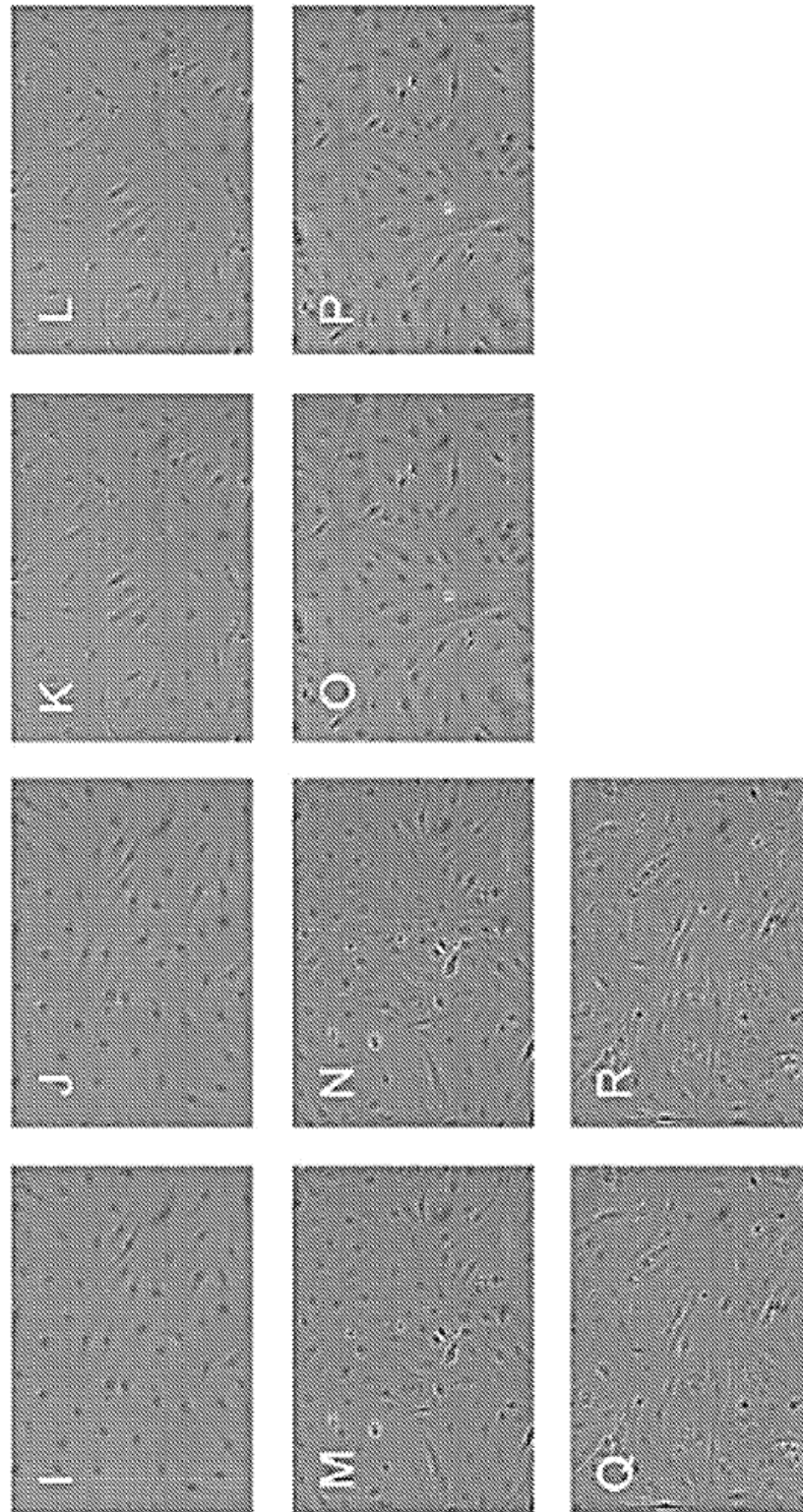


FIG. 50

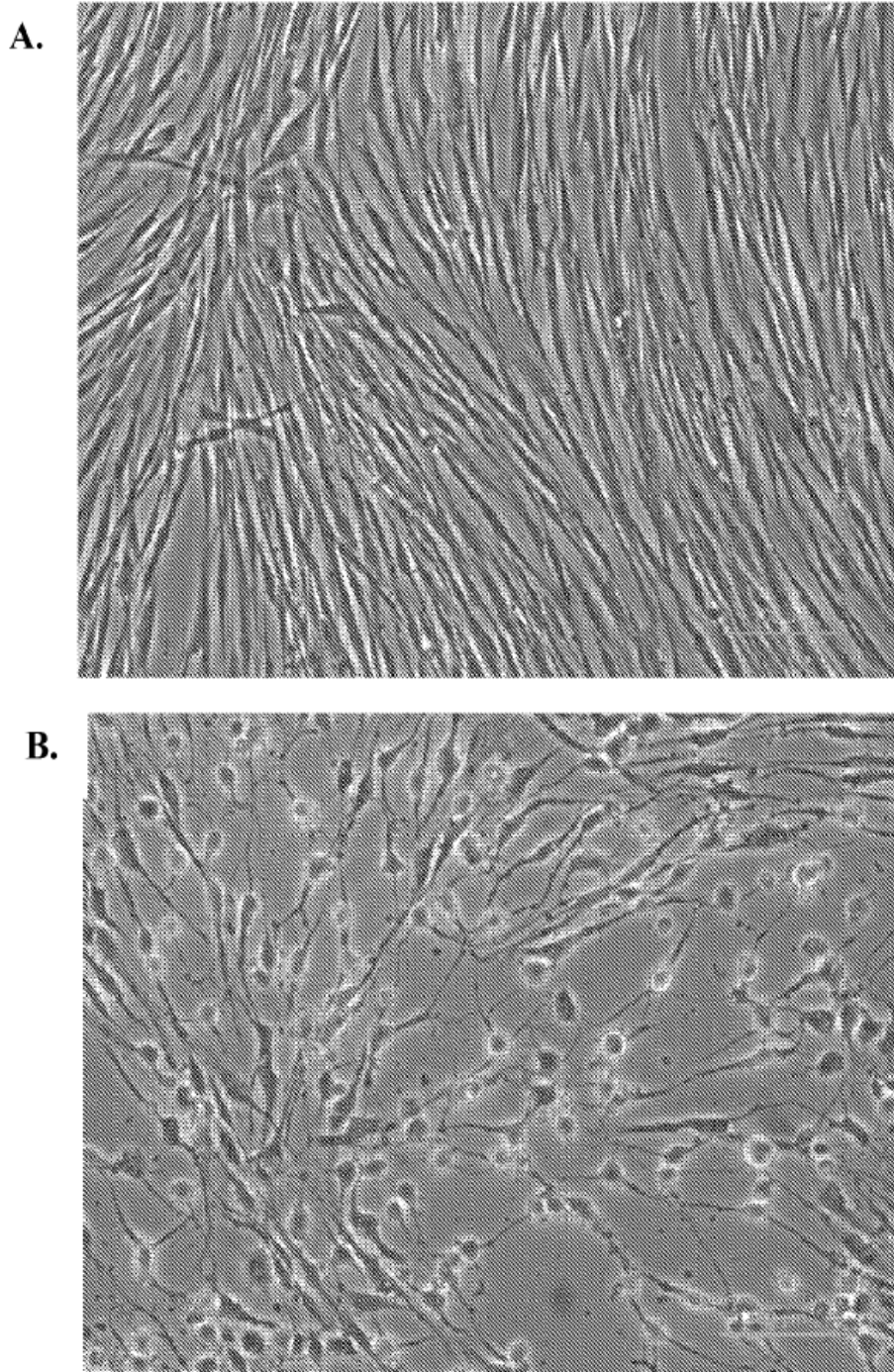


FIG. 51

