

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 611**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2018** **PCT/EP2018/074449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2019** **WO19053003**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2018** **E 18769331 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 3681901**

54 Título: **Método para mejorar la expresión de ARN en una célula**

30 Prioridad:

13.09.2017 WO PCT/EP2017/073065

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.08.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

POLEGANOV, MARCO ALEXANDER;
PERKOVIC, MARIO;
SAHIN, UGUR;
BEISSERT, TIM y
KUHN, ANDREAS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 977 611 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para mejorar la expresión de ARN en una célula

Campo técnico

5 La presente enseñanza describe un factor derivado de virus que cuando se proporciona a las células, por ejemplo, transfectando las células con ARN que codifica el factor derivado de virus, mejora la expresión del ARN que codifica un péptido o proteína en las células. En particular, el factor derivado de virus mejora la supervivencia de las células, en particular cuando se transfectan repetidamente con ARN, y reduce la respuesta de IFN de las células al ARN transfectado. Por consiguiente, la presente enseñanza proporciona métodos y medios para mejorar la expresión de ARN en células. Preferiblemente, las células se transfectan con el ARN.

10 Antecedentes

El uso de ARN para el suministro de información genética extraña a células diana ofrece una alternativa atractiva al ADN. Las ventajas de utilizar ARN incluyen expresión transitoria y un carácter no transformante. El ARN no necesita entrar en el núcleo para expresarse y además no puede integrarse en el genoma del huésped, eliminando así el riesgo de oncogénesis.

15 Se ha descrito que el ARN es útil para desdiferenciar células somáticas en células similares a células madre sin generar embriones ni fetos. La desdiferenciación de células somáticas en células que tienen características de células madre, en particular pluripotencia, puede efectuarse mediante la introducción de factores codificantes de ARN que inducen la desdiferenciación de células somáticas en células somáticas (también denominados factores de transcripción de reprogramación (rTF) o simplemente factores de reprogramación) y cultivar las células somáticas permitiendo que las
20 células se desdiferencien. Después de desdiferenciarse, se puede inducir que las células se vuelvan a diferenciar en el mismo tipo de célula somática o en uno diferente, tal como tipos de células neuronales, hematopoyéticas, musculares, epiteliales y otros. Por lo tanto, dichas células similares a células madre tienen aplicaciones médicas para el tratamiento de enfermedades degenerativas mediante "terapia celular" y pueden utilizarse en nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de trastornos cardíacos, neurológicos, endocrinológicos, vasculares, retinianos,
25 dermatológicos, musculoesqueléticos y otras enfermedades.

Weber et al. (Journal of Virology, 2002, 76(16):7949-7955) divulgan que la proteína no estructural NSs del virus Bunyamwera, un elemento de la familia *Bunyaviridae*, contrarresta la inducción de interferón alfa/beta. Gori-Savellini et al. (Journal of Virology 2013, 87(12):6660-6667) describen que la proteína NSs del virus *Toscana*, también elemento de la familia *Bunyaviridae*, inhibe la inducción de interferón tipo I al interactuar con RIG-I.

30 El documento WO 2014/072061 A1 se relaciona con la expresión de ARN en células y con la mejora de la viabilidad de las células en las que se va a expresar el ARN. Los métodos para expresar ARN en células comprenden etapas para prevenir la participación del receptor de IFN por parte del IFN extracelular e inhibir la señalización de IFN intracelular en las células. Esto permite la transferencia repetitiva de ARN al interior de las células.

35 Poleganov et al. (Human Gene Therapy 2015, 26(11):751-766) describen la reprogramación de fibroblastos humanos y células progenitoras endoteliales derivadas de la sangre utilizando ARN no modificado para la reprogramación y la evasión inmune.

Sin embargo, el ARN monocatenario exógeno activa mecanismos de defensa en las células de mamíferos. Por lo tanto, la transferencia de genes basada en ARN generalmente va acompañada de una inducción de una respuesta de IFN que dificulta la expresión continua del ARN administrado.

40 Sumario de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para expresar una o más cadenas de un receptor de células T o de un receptor de células T artificial en una célula T o en una célula presentadora de antígeno, comprendiendo el método las etapas de

45 (i) introducir ARN que codifica una o más cadenas de un receptor de células T o de un receptor de células T artificial en la célula y
(ii) proporcionar proteína NSs del virus *Toscana* a la célula,

en el que proporcionar la proteína NSs del virus *Toscana* a la célula comprende introducir ARN que codifica la proteína NSs del virus *Toscana* en la célula.

50 En una realización, el ARN se introduce en la célula de forma repetitiva. En algunas realizaciones, el ARN se introduce en la célula mediante electroporación o lipofección. En algunas realizaciones, el ARN es ARN transcrito *in vitro*.

En algunas realizaciones, el método comprende además proporcionar virus vacuna B18R y/o virus vacuna E3 a la célula, en donde proporcionar virus vacuna B18R y/o virus vacuna E3 a la célula comprende introducir ARN que codifica el virus vacuna B18R y/o ARN que codifica el virus vacuna E3 en la célula.

En algunas realizaciones, la célula es una célula humana.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para producir células inmunorreactivas que comprende la etapa de

(i) introducir en una célula T o un progenitor de la misma una o más moléculas de ARN que codifican las cadenas de un receptor de células T o la(s) cadena(s) de un receptor de célula T artificial, y
(ii) proporcionar proteína NSs del virus *Toscana*,

- 10 en el que proporcionar proteína NSs del virus *Toscana* a la célula comprende introducir ARN que codifica la proteína NSs del virus *Toscana* en la célula.

- 15 En una realización, las células inmunorreactivas comprenden células T tales como células T citotóxicas, células T cooperadoras o células T infiltrantes de tumores. En algunas realizaciones, las células inmunorreactivas comprenden células T CD4+ y/o CD8+. En una realización preferida, las células inmunorreactivas comprenden células que pueden madurar hasta convertirse en células inmunitarias, tales como células T, en particular células T cooperadoras, o células T citolíticas, con una estimulación adecuada. En otra realización preferida, las células inmunorreactivas comprenden células madre hematopoyéticas CD34+, células T maduras e inmaduras.

- 20 En algunas realizaciones, el receptor de células T comprende cadenas de TCR α y β . En algunas realizaciones, el receptor de células T artificial comprende un dominio de unión a antígeno tal como porciones de anticuerpos de unión a antígeno y receptores de células T tales como fragmentos variables monocatenarios (scFv), un dominio de señalización de células T, tal como el endodominio de CD3-zeta, y opcionalmente uno o más dominios de coestimulación, tales como CD28, CD137 (4-1 BB), CD134 (OX40) y CD278 (ICOS).

Resumen de la enseñanza

- 25 La presente divulgación proporciona enseñanzas que, en algunos aspectos, van más allá de la invención como tal, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. Las enseñanzas se proporcionan para ubicar la invención real en un contexto técnico más amplio e ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Dicha información técnica adicional que no entra dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, no forma parte de la invención. En particular, no se debe interpretar que los términos "realización" y "aspecto" se refieren necesariamente a una realización de la invención, a menos que la "realización" o "aspecto" en cuestión esté dentro del alcance de las reivindicaciones.

- 30 Se ha observado de acuerdo con la enseñanza que la proteína de escape viral NSs (N) del virus *Toscana* es un potente inhibidor de la respuesta de IFN y puede usarse en combinación con la transfección de ARN. Además, se ha observado de acuerdo con la enseñanza que la proteína de escape viral NSs (N) de virus *Toscana* se puede utilizar para sustituir EKB (E3, K3, B18R) para una expresión exitosa basada en ARN de proteínas de interés.

- 35 En un aspecto, la enseñanza se refiere a un método para expresar un péptido o proteína (también denominado péptido o proteína de interés en el presente documento) en una célula que comprende las etapas de (i) introducir ARN que codifica el péptido o proteína en la célula y (ii) proporcionar un factor derivado de virus que comprende la proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de la proteína NSs del virus *Toscana* a la célula.

En una realización, el factor derivado de virus comprende proteína NSs del virus *Toscana*.

- 40 En una realización, el ARN se introduce en la célula de forma repetitiva. En una realización, el ARN se introduce en la célula mediante electroporación o lipofección.

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

En una realización, proporcionar el factor derivado de virus a la célula comprende introducir ácido nucleico tal como ARN que codifica el factor derivado de virus en la célula.

- 45 En una realización, el método de la enseñanza puede comprender adicionalmente (i) prevenir la participación del receptor de IFN por parte del IFN extracelular y/o (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular. Por lo tanto, en una realización, el método de la enseñanza comprende proporcionar uno o más de virus vacuna B18R, virus vacuna E3 y virus vacuna K3 tales como virus vacuna B18R y/o virus vacuna E3 a la célula. En una realización, proporcionar uno o más de virus vacuna B18R, virus vacuna E3 y virus vacuna K3 a la célula comprende introducir ácido nucleico tal como ARN que codifica el mismo en la célula.

- 50 Sin embargo, se ha observado de acuerdo con la enseñanza que la proteína de escape viral NSs (N) de virus *Toscana* se puede utilizar para sustituir completamente EKB (E3, K3, B18R) para una expresión exitosa basada en ARN de proteínas de interés. Por lo tanto, en una realización, el método de la enseñanza comprende proporcionar el factor

derivado de virus a la célula, pero no comprende proporcionar uno o más de virus vacuna B18R, virus vacuna E3 y virus vacuna K3 a la célula, preferiblemente no comprende proporcionar cualquiera de los virus vacuna B18R, virus vacuna E3 y virus vacuna K3 a la célula, y más preferiblemente no comprende proporcionar ningún inhibidor de la respuesta de IFN excepto el factor derivado de virus a la célula.

- 5 En una realización, proporcionar el factor derivado de virus a la célula mejora la estabilidad y/o la expresión del ARN en la célula en comparación con la situación en la que no se proporciona el factor derivado de virus.

En una realización, la mejora de la expresión del ARN en la célula comprende preferiblemente un aumento en el nivel de expresión y/o un aumento en la duración de la expresión del ARN en la célula.

- 10 En una realización, proporcionar el factor derivado de virus a la célula mejora la viabilidad celular en comparación con la situación en la que no se proporciona el factor derivado de virus.

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

- 15 La enseñanza también se refiere a un método para proporcionar células que tienen características de células madre que comprende las etapas de (i) proporcionar una población celular que comprende células somáticas, (ii) proporcionar un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de la proteína NSs del virus *Toscana* a las células somáticas, (iii) introducir ARN que codifica uno o más factores de reprogramación en las células somáticas, y (iv) permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre.

En una realización, el factor derivado de virus comprende proteína NSs del virus *Toscana*.

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

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

- 25 En una realización, proporcionar el factor derivado de virus a las células somáticas comprende introducir ácido nucleico tal como ARN que codifica el factor derivado de virus en las células somáticas.

En una realización, el método de la enseñanza puede comprender adicionalmente (i) prevenir la participación del receptor de IFN por parte del IFN extracelular y/o (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular. Por lo tanto, en una realización, el método de la enseñanza comprende proporcionar uno o más de virus vacuna B18R, virus vacuna E3 y virus vacuna K3 tales como virus vacuna B18R y/o virus vacuna E3 a las células somáticas. En una realización, proporcionar uno o más del virus vacuna B18R, virus vacuna E3 y virus vacuna K3 a las células somáticas comprende introducir ácido nucleico tal como ARN que codifica el mismo en las células somáticas.

- 30 Sin embargo, se ha observado de acuerdo con la enseñanza que la proteína de escape viral NSs (N) de virus *Toscana* se puede utilizar para sustituir completamente EKB (E3, K3, B18R) para una expresión exitosa basada en ARN de proteínas de interés. Por lo tanto, en una realización, el método de la enseñanza comprende proporcionar el factor derivado de virus a las células somáticas pero no comprende proporcionar uno o más de virus vacuna B18R, virus vacuna E3 y virus vacuna K3 a las células somáticas, preferiblemente no comprende proporcionar cualquiera de los virus vacuna B18R, virus vacuna E3 y virus vacuna K3 a las células somáticas, y más preferiblemente no comprende proporcionar ningún inhibidor de la respuesta de IFN excepto el factor derivado de virus a las células somáticas.

- 35 En una realización, proporcionar el factor derivado de virus a las células somáticas mejora la estabilidad y/o la expresión del ARN en las células somáticas en comparación con la situación en la que no se proporciona el factor derivado de virus.

En una realización, la mejora de la expresión del ARN en las células somáticas comprende preferiblemente un aumento en el nivel de expresión y/o un aumento en la duración de la expresión del ARN en las células somáticas.

- 45 En una realización, proporcionar el factor derivado de virus a las células somáticas mejora la viabilidad celular en comparación con la situación en la que no se proporciona el factor derivado de virus.

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

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

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

5 En una realización, la etapa de permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre comprende cultivar las células somáticas en condiciones de cultivo de células madre embrionarias.

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

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

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

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

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

20 La enseñanza también se refiere a un método para proporcionar tipos de células diferenciadas que comprende las etapas de (i) proporcionar células que tienen características de células madre usando el método para proporcionar células que tienen características de células madre de acuerdo con la enseñanza, y (ii) cultivar las células que tienen características de células madre bajo condiciones que inducen o dirigen la diferenciación parcial o completa a un tipo de célula diferenciada.

25 La enseñanza también se refiere a una composición que comprende ácido nucleico tal como ARN que codifica un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana*. Además, la enseñanza también se refiere a un kit que comprende la composición de la enseñanza. En una realización, la composición o kit de la enseñanza es útil en los métodos de la enseñanza. Por consiguiente, el kit puede comprender instrucciones tales como instrucciones impresas relacionadas con el uso del kit en los métodos descritos en el presente documento. Varias realizaciones de la composición o kit de la enseñanza se describieron anteriormente para los métodos de la enseñanza.

30 En una realización, la composición o kit de la enseñanza comprende ARN que se introducirá en una célula para su expresión, por ejemplo, ARN que codifica uno o más péptidos o proteínas de interés tales como uno o más factores de reprogramación.

35 La enseñanza puede utilizarse, por ejemplo, para aumentar la expresión de péptidos o proteínas de interés tras la transfección de células con ARN que codifica dichos péptidos o proteínas de interés. Más específicamente, es posible, cuando se producen proteínas recombinantes, utilizar los métodos y agentes de la enseñanza para la expresión de proteínas recombinantes en sistemas basados en células. Esto permite, entre otras cosas, reducir los costes de producción.

40 También es posible utilizar los métodos y agentes de la enseñanza para aplicaciones de terapia génica. Por consiguiente, el ARN que se va a transfectar puede ser un vector de terapia génica y puede usarse para la expresión de un transgén. Las células se pueden transfectar con estos vectores *in vitro*, por ejemplo, en linfocitos o células dendríticas, o bien *in vivo* por administración directa.

45 El ARN se puede utilizar, por ejemplo, para la expresión transitoria de genes, siendo posibles campos de aplicación vacunas basadas en ARN que se transfectan en células *in vitro* o administrado directamente *in vivo*, expresión transitoria de proteínas recombinantes funcionales *in vitro*, por ejemplo, para iniciar procesos de diferenciación en células o estudiar funciones de proteínas y expresión transitoria de proteínas recombinantes funcionales tales como eritropoyetina, hormonas, inhibidores de la coagulación, etc., *in vivo*, en particular como productos farmacéuticos.

El ARN se puede utilizar en particular para transfectar células presentadoras de antígeno y, por lo tanto, como herramienta para administrar el antígeno a presentar y para cargar células presentadoras de antígeno con dicho antígeno a presentar *in vitro* e *in vivo*. Estas células presentadoras de antígenos pueden usarse para estimular las células T, en particular células T CD4⁺ y/o CD8⁺.

50 Descripción detallada

La presente enseñanza se describe en detalle a continuación. La terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica.

A continuación, se describirán los elementos de la presente enseñanza. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas; sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Se debe entender que esta descripción respalda y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe considerarse divulgada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario.

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

La práctica de la presente enseñanza empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en el campo (consúltese, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende" y variaciones tales como "que comprende" implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa o grupo indicado de elementos, números enteros o etapas, pero sin exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas. Los términos "un" y "uno, una" y "el, la" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de la enseñanza (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o claramente sean contradichos por el contexto. La enumeración de intervalos de valores en este documento simplemente pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como si se enumerara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o ejemplo de expresión (por ejemplo, "tal como"), proporcionados en este documento tiene como objetivo ilustrar mejor la enseñanza.

Se ha observado de acuerdo con la enseñanza que la proteína de escape viral NSs (N) de virus *Toscana* es un potente inhibidor de la respuesta de IFN y puede usarse en combinación con la transfección de ARN para mejorar la expresión de un péptido o proteína de interés codificado por el ARN.

En una realización, un método de enseñanza es un método *in vitro*. En una realización, un método de la enseñanza comprende o no la eliminación de células de un sujeto humano o animal, por ejemplo, mediante cirugía. Las células resultantes de los métodos de la enseñanza podrán administrarse a un sujeto. Las células pueden ser autólogas, singénicas, alogénicas o heterólogas con respecto al sujeto. Las células transfectadas pueden introducirse en un sujeto utilizando cualquier medio conocido en la técnica. En otras realizaciones, las células pueden estar presentes en un sujeto, tal como un paciente. En estas realizaciones, los métodos de enseñanza son métodos *in vivo* que comprenden la administración de ARN al sujeto.

En una realización de la enseñanza, a las células se les proporciona un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* antes, simultáneamente y/o después de la introducción de ARN que codifica el péptido o proteína que se va a expresar, por ejemplo, uno o más factores de reprogramación, o la primera introducción (por ejemplo, en caso de transfecciones repetidas) de ARN. En una realización, las células cuentan con un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* antes, preferentemente inmediatamente después de la introducción de ARN o de la primera introducción (por ejemplo, en el caso de transfecciones repetidas) de ARN.

En una realización particularmente preferida, las células se proporcionan con un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* mediante la introducción de ARN que codifica el factor derivado de virus en las células. En una realización de la enseñanza, el ARN que codifica el factor derivado de virus se introduce en las células antes, simultáneamente y/o después de la introducción del ARN que codifica el péptido o proteína que se va a expresar, o la primera introducción (por ejemplo, en caso de transfecciones repetidas) de ARN que codifica el péptido o proteína a expresar. En una realización, el ARN que codifica el factor derivado de virus se introduce en las células después, preferiblemente inmediatamente después de la introducción del ARN que codifica el péptido o proteína que se va a expresar o la primera introducción (por ejemplo, en el caso de transfecciones repetidas) del ARN que codifica el péptido o proteína a expresar.

La familia Bunyaviridae incluye los géneros Orthobunyavirus, Phlebovirus, Hantavirus y Nairovirus que infectan animales y el género Tospovirus que infecta plantas. Los Phlebovirus se componen del grupo de la fiebre por flebótomos y del grupo Uukuniemi. Varios miembros del grupo de la fiebre por flebótomos, incluido el virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV), el virus *Toscana* (TOSV), el virus de la fiebre siciliana por los flebótomos (SFSV) y el virus de Punta Toro (PTV), son patógenos para los humanos. TOSV es un virus con envoltura que porta un genoma de ARN monocatenario de sentido negativo que comprende tres segmentos, que se denominan L (grande), M (mediano) y S

(pequeño). El segmento L codifica la polimerasa viral (L), el segmento M codifica las glicoproteínas de la envoltura Gn y Gc, y el segmento S codifica la nucleoproteína (N). Además, el segmento S también codifica las proteínas no estructurales NSs en ambos sentidos. Las proteínas NSs de los Phlebovirus desempeñan un papel importante en la evasión viral de las respuestas inmunes innatas del huésped.

- 5 De acuerdo con la enseñanza, el término "proteína NSs del virus *Toscana*" se refiere a las proteínas NSs no estructurales del virus *Toscana*. En particular, el término se refiere a una proteína que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQSRAVILKHRSGSGHKRSLPRFYIDCDLDTDFEKGCSLIENEFPIYINNYEVVYKS
KPTLSHFLIEKEFFPAVLGPGMISAVRTRLYEPTMRELYQESIHQLKRNNKKYLLSALR
WPTGIPTLEFIDYYFEELLFLSEFDPGSIQRYLKLLVKASGLYNSTIEEQVLEIHRRLI
EGKKHGLTAFDLPGNDILGDICVQAARVTRLVAKTFSKMTRDTHLMIYFSSISPVELV
LNKLDKKEDKRAKAKGLMSMCAARSYDYFMRTDLGFRGTALSTFWAKDWPTLQET
ILSDKRCLKEDMRVTKWLPSPPHYPL (SEQ ID NO: 1).

- 10 El término "variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana*" se refiere a cualquier proteína, en particular cualquier proteína derivada de virus que exhiba funciones similares a proteína NSs del virus *Toscana*. Una función particular es mejorar la expresión del ARN que codifica un péptido o proteína en las células. Por consiguiente, el término incluye proteínas que comprenden fragmentos funcionales de proteína NSs del virus *Toscana* o variantes de secuencia funcional de proteína NSs del virus *Toscana* o fragmentos de la misma.

- 15 "Fragmento", con referencia a una secuencia de aminoácidos (péptido o proteína), se refiere a una parte de una secuencia de aminoácidos, es decir, una secuencia que representa la secuencia de aminoácidos acortada en el extremo terminal N y/o en el extremo terminal C. Un fragmento acortado en el extremo terminal C (fragmento del extremo terminal N) se puede obtener, por ejemplo, por traducción de un marco de lectura abierto truncado que carece del extremo 3' del marco de lectura abierto. Un fragmento acortado en el extremo terminal N (fragmento del extremo terminal C) se puede obtener, por ejemplo, mediante traducción de un marco de lectura abierto truncado que carece del extremo 5' del marco de lectura abierto, siempre que el marco de lectura abierto truncado comprenda un codón de inicio que sirva para iniciar la traducción. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende, por ejemplo, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % de los residuos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos.

- 25 El término "variante" incluye todas las variantes de corte y empalme, variantes modificadas postraduccionalmente, conformaciones, isoformas y homólogos de especies, en particular aquellos que son expresados naturalmente por las células.

- Para los fines de la presente enseñanza, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de eliminación de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos particular. En el caso de variantes de secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, se insertan uno o más residuos de aminoácidos en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible una inserción aleatoria con un cribado apropiado del producto resultante. Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones en los extremos terminales amino y/o carboxi de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las variantes de eliminación de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como por la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las eliminaciones pueden estar en cualquier posición de la proteína. Las variantes de eliminación de aminoácidos que comprenden la eliminación en el extremo terminal N y/o el extremo terminal C de la proteína también se denominan variantes de truncamiento del extremo terminal N y/o terminal C. Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de al menos un residuo de la secuencia y la inserción de otro residuo en su lugar. Se prefieren las modificaciones en posiciones de la secuencia de aminoácidos que no están conservadas entre proteínas o péptidos homólogos y/o la sustitución de aminoácidos por otros que tengan propiedades similares. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos en variantes de proteínas son cambios de aminoácidos conservadores, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar. Un cambio de aminoácido conservador implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos naturales generalmente se dividen en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y no polares cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

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

para una región de aminoácidos que es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 100 % de la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consta de 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se proporciona preferiblemente para al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180 o aproximadamente 200 aminoácidos, preferiblemente aminoácidos continuos. En realizaciones preferidas, el grado de similitud o identidad se proporciona para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia. La alineación para determinar la similitud de secuencia, preferiblemente la identidad de secuencia, se puede realizar con herramientas conocidas en la técnica, preferiblemente usando la mejor alineación de secuencia, por ejemplo, usando Align, usando configuraciones estándar, preferiblemente EMBOSS::needle, Matriz: Blosum62, abertura de hueco 10.0, extensión de hueco 0.5.

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

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

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

Las secuencias de aminoácidos homólogas presentan de acuerdo con la enseñanza al menos el 40 %, en particular al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % y preferentemente al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de los residuos de aminoácidos.

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

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

En una realización, los métodos de la enseñanza pueden comprender adicionalmente (i) prevenir la participación del receptor de IFN por parte del IFN extracelular y/o (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular. Esto se puede lograr proporcionando a una célula (i) un agente que previene la participación del receptor de IFN por parte del IFN extracelular y/o (ii) un agente que inhibe la señalización de IFN intracelular.

En una realización, las células se tratan para (i) prevenir la participación del receptor de IFN por parte del IFN extracelular y/o (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular antes, simultáneamente y/o después de la introducción del ARN que codifica el péptido o proteína que se va a expresar o la primera introducción (por ejemplo, en caso de transfecciones repetidas) de ARN. En una realización, las células se tratan para (i) prevenir la participación del receptor

de IFN por parte del IFN extracelular y/o (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular después, preferiblemente inmediatamente después de la introducción de ARN o la primera introducción (por ejemplo, en caso de transfecciones repetidas) de ARN.

Los interferones son citoquinas importantes caracterizadas por actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. Los interferones se pueden agrupar en dos tipos. El IFN-gamma es el único interferón de tipo II; todos los demás son interferones tipo I. Los interferones tipo I y tipo II difieren en la estructura genética (los genes del interferón tipo II tienen tres exones; el tipo I, uno), la ubicación de los cromosomas (en humanos, el tipo II se encuentra en el cromosoma 12; los genes del interferón tipo I están vinculados y en el cromosoma 9), y los tipos de tejidos donde se producen (los interferones de tipo I se sintetizan de forma ubicua, los de tipo II por los linfocitos). Los interferones de tipo I inhiben competitivamente la unión de otros a los receptores celulares, mientras que el interferón de tipo II tiene un receptor distinto. De acuerdo con la enseñanza, el término "interferón" o "IFN" se refiere preferentemente a interferones de tipo I, en particular IFN-alfa e IFN-beta.

Los IFN inducen la expresión de una gran cantidad de genes antivirales, que pueden interferir con el ciclo de replicación viral. De acuerdo con la enseñanza, el término "proteína efectora antiviralmente activa" se refiere a un grupo de proteínas codificadas por genes estimulados por IFN (ISG) cuya transcripción está señalizada por IFN de tipo I. Estas proteínas se dirigen a distintos componentes virales y distintas etapas del ciclo de vida viral, con el objetivo de eliminar los virus invasores. Las "proteínas efectoras antiviralmente activas" están involucradas en diferentes vías efectoras que bloquean individualmente la transcripción viral, degradan el ARN viral, inhiben la traducción y modifican la función de las proteínas para controlar todas las etapas de la replicación viral. Dichas proteínas incluyen 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS), en particular 2',5'-oligoadenilato sintetasa 1 (OAS1), proteína quinasa R dependiente de ARN (PKR) y RNasaL. Tanto PKR como OAS son activados directamente por ARNbc. Por lo tanto, el ARNbc induce la expresión de estas proteínas efectoras antiviralmente activas y también es necesario para su activación.

De acuerdo con la enseñanza, el término "prevención de la interacción del receptor de IFN por el IFN extracelular" se refiere a una inhibición, es decir, bloqueo o reducción, de la interacción de los IFN, en particular los IFN de tipo I, con sus receptores específicos, inhibiendo o reduciendo así la función del IFN. La interacción del receptor de IFN con el IFN extracelular puede evitarse, por ejemplo, proporcionando un agente de unión para el IFN extracelular. Aquellos aspectos de la presente enseñanza que implican una o más proteínas o péptidos para prevenir la participación del receptor de IFN por parte del IFN extracelular, tales como las proteínas o péptidos divulgados en el presente documento, por ejemplo, uno o más agentes de unión para IFN extracelular, puede implicar el suministro de ácidos nucleicos, en particular ARN, que codifiquen estas una o más proteínas o péptidos a las células, por ejemplo, introduciendo los ácidos nucleicos en las células.

Por ejemplo, la proteína B18R es un receptor de interferón de tipo I codificado por el virus vacuna con especificidad por interferones de tipo I de ratón, ser humano, conejo, cerdo, rata y vaca, que tiene una potente actividad neutralizante. La proteína B18R codificada por el gen B18R de la cepa del virus vacuna Western Reserve. La glicoproteína de 60-65 kD está relacionada con los receptores de interleucina-1 y es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, a diferencia de otros receptores de IFN de tipo I, que pertenecen a la familia de receptores de citoquinas de clase II. La proteína B18R tiene una alta afinidad (KD, 174 pM) por el IFN alfa humano. Entre los modificadores de la respuesta viral del huésped, la proteína B18R es única porque existe como una proteína extracelular soluble, así como una proteína de la superficie celular, lo que permite el bloqueo de las funciones de IFN tanto autocrinas como paracrin. Se ha demostrado que la proteína B18R inhibe la potencia antiviral de IFN-alfa1, IFN-alfa2, IFN-alfa-8/1/8 e IFN-omega en células humanas. La proteína B18R soluble es muy potente para neutralizar los interferones de tipo I, que incluyen IFN-alfa, beta, delta, kappa.

La interacción del receptor de IFN con el IFN extracelular puede evitarse, además, por ejemplo, reduciendo el nivel de IFN, en particular el IFN extracelular. En una realización, la interacción del receptor de IFN con el IFN extracelular se evita interfiriendo con la expresión del gen de IFN. Por ejemplo, el complejo proteico NS3/4A de serina proteasa del virus de la hepatitis C es capaz de interferir y reducir la actividad del promotor de IFN y es un inhibidor específico de la expresión del gen de IFN.

De acuerdo con la enseñanza, el término "señalización de IFN intracelular" se refiere a eventos de señalización intracelular y funciones efectoras, en particular funciones antivirales, activadas por IFN que interactúan con sus receptores específicos e incluye las funciones de proteínas que son inducidas por IFN, en particular proteínas efectoras antiviralmente activas. En particular, el término "señalización de IFN intracelular" incluye la propagación de señales y funciones efectoras, en particular funciones antivirales, ejercidas por proteínas que forman parte de la vía dependiente de PKR, en particular PKR y eIF2-alfa, y/o la vía dependiente de OAS, en particular OAS y RNasaL.

El término "inhibir la señalización de IFN intracelular" se refiere a una inhibición o reducción de la señalización de IFN intracelular y puede lograrse inhibiendo la expresión, actividad o activación de proteínas que están implicadas en la señalización de IFN intracelular, en particular proteínas que son parte de la vía dependiente de PKR y/o la vía dependiente de OAS. Por ejemplo, muchos virus han desarrollado mecanismos para contrarrestar las vías PKR y OAS/RNasa L. Estos mecanismos pueden usarse de acuerdo con la enseñanza para inhibir la señalización de IFN intracelular. Aquellos aspectos de la presente enseñanza que implican una o más proteínas o péptidos en la inhibición de la señalización intracelular de IFN, tales como las proteínas o péptidos divulgados en el presente documento, por

ejemplo, una o más proteínas o péptidos que inhiben la vía dependiente de PKR y/o la vía dependiente de OAS, pueden implicar el suministro de ácidos nucleicos, en particular ARN, que codifiquen estas una o más proteínas o péptidos a las células, por ejemplo, introduciendo los ácidos nucleicos en las células.

De acuerdo con las enseñanzas, la vía dependiente de PKR puede inhibirse mediante un agente que inhibe o reduce la actividad o activación de PKR o mediante un agente que desfosforila eIF2-alfa o previene su fosforilación, terminando así la señal inducida por PKR. Por ejemplo, la señalización de IFN intracelular puede inhibirse de acuerdo con la enseñanza utilizando cualquiera de los mecanismos de defensa viral contra la cascada de señalización de PKR. A este respecto, la enseñanza puede implicar el uso de ARNbc señuelo (por ejemplo, ARN de adenovirus VAI; virus EBER de Epstein-Barr; TAR de VIH), compuestos que efectúan la degradación de PKR (por ejemplo, poliovirus 2Apro), compuestos que inhiben la activación de PKR, por ejemplo, ocultando ARNbc viral (por ejemplo, virus vacuna E3/E3L; reovirus sigma3; virus de la influenza NS1, virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) US11), compuestos que bloquean la dimerización (por ejemplo, virus de la influenza p58IPK; virus de la hepatitis C NS5A), pseudosustratos (por ejemplo, virus vacuna K3/K3L; Tat de VIH) o desfosforilación del sustrato (por ejemplo, virus del herpes simple ICP34.5). El virus vacuna E3 es una proteína de unión a ARNbc de 25 kDa (codificada por el gen E3L) que se une y secuestra ARNbc para prevenir la activación de PKR y OAS. E3 puede unirse directamente a PKR e inhibir su actividad, lo que resulta en una fosforilación reducida de eIF2-alfa. El gen K3L del virus vacuna codifica un homólogo de 10.5 kDa de la subunidad eIF2-alfa que actúa como un pseudosustrato no fosforilable de PKR e inhibe competitivamente la fosforilación de eIF2-alfa. El virus vacuna C7/C7L inhibe la fosforilación de eIF2-alfa. La proteína ICP34.5 del HSV-1 funciona como una subunidad reguladora de la fosfatasa PP1 celular, dirigiéndola a desfosforilar eIF2-alfa, terminando así la señal inducida por PKR. Las proteínas m142 y m143 del citomegalovirus murino (MCMV) se han caracterizado como proteínas de unión a ARNbc que inhiben la activación de PKR, la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 y la posterior interrupción de la síntesis de proteínas.

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

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

En una realización, reducir la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en una célula comprende tratar la célula con un inhibidor de la expresión y/o actividad de PKR. De acuerdo con la enseñanza, la frase "inhibir la expresión y/o actividad" incluye una inhibición completa o esencialmente completa de la expresión y/o actividad y una reducción de la expresión y/o actividad.

En una realización, dicho inhibidor de PKR está dirigido a la proteína PKR y preferiblemente es específico para PKR. La PKR se puede inhibir de varias formas, por ejemplo, mediante la inhibición de la autofosforilación y/o dimerización de PKR, proporcionando un pseudoactivador de PKR o proporcionando un pseudosustrato de PKR. El inhibidor de PKR puede ser un agente que esté implicado en un mecanismo de defensa viral como se analizó anteriormente. Por ejemplo, el virus vacuna E3L codifica una proteína de unión a ARNbc que inhibe la PKR en células infectadas por virus, presumiblemente mediante el secuestro de activadores de ARNbc. K3, también codificada por el virus vacuna, funciona como un inhibidor de pseudosustrato al unirse a PKR. Por lo tanto, proporcionar el virus vacuna E3L puede dar como resultado la inhibición de la PKR. Proporcionar ARN de adenovirus VAI, Tat de VIH o ARN del virus EBER1 de Epstein-Barr puede dar como resultado una pseudoactivación de PKR. Así, por ejemplo, todos los factores virales, es decir, inhibidores derivados de virus, que bloquean la actividad de PKR, como los descritos en el presente documento, pueden usarse para reducir la actividad de PKR.

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

En una realización, el inhibidor de PKR es 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetil)-7H-pirrolol[2,3-g]benzotiazol-7-ona. En una realización, el inhibidor de PKR es 2-aminopurina.

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

En una realización, se prevé reducir la actividad de PKR en una célula tratando la célula con uno o más inhibidores derivados de virus tales como el virus vacuna E3 y/o K3, así como tratando la célula con uno o más inhibidores

químicos de PKR tales como 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetilen)-7H-pirrol[2,3-g]benzotiazol-7-ona y/o 2-aminopurina.

De acuerdo con la enseñanza, la vía dependiente de OAS puede inhibirse mediante un agente que inhibe o reduce la actividad o activación de OAS y/o RNasaL. Por ejemplo, el virus vacuna E3 es una proteína de unión a ARNbc de 25 kDa (codificada por el gen E3L) que se une y secuestra ARNbc para prevenir la activación de OAS.

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

En una realización, reducir la actividad de OAS y/o RNasaL en una célula comprende tratar la célula con un inhibidor de la expresión y/o actividad de OAS y/o RNasaL. De acuerdo con la enseñanza, la frase "inhibir la expresión y/o actividad" incluye una inhibición completa o esencialmente completa de la expresión y/o actividad y una reducción de la expresión y/o actividad.

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

En una realización, prevenir la participación del receptor de IFN por parte del IFN extracelular inhibe las funciones del IFN autocrino y/o paracrino. En una realización, prevenir la participación del receptor de IFN por parte del IFN extracelular comprende proporcionar un agente de unión para el IFN extracelular tal como un agente de unión viral para el IFN extracelular. En una realización, el agente de unión viral para IFN extracelular es un receptor de interferón viral. En una realización, el agente de unión viral para IFN extracelular es el virus vacuna B18R. En una realización, el agente de unión viral para IFN extracelular se proporciona a la célula en forma de un ácido nucleico que codifica el agente de unión, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN.

En una realización, la inhibición de la señalización de IFN intracelular comprende inhibir una o más proteínas efectoras antiviralmente activas inducibles por IFN. En una realización, la proteína efectora antiviralmente activa inducible por IFN se selecciona del grupo que consiste en proteína quinasa dependiente de ARN (PKR), 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) y RNasaL. En una realización, inhibir la señalización de IFN intracelular comprende inhibir la vía dependiente de PKR y/o la vía dependiente de OAS. En una realización, inhibir la vía dependiente de PKR comprende inhibir la fosforilación de eIF2-alfa. En una realización, inhibir la fosforilación de eIF2-alfa comprende inhibir la PKR y/o proporcionar un pseudosustrato que imita a eIF2-alfa. En una realización, el pseudosustrato que imita a eIF2-alfa es un pseudosustrato viral que imita a eIF2-alfa. En una realización, el pseudosustrato viral que imita a eIF2-alfa es el virus vacuna K3. En una realización, el pseudosustrato viral que imita a eIF2-alfa se proporciona a la célula en forma de un ácido nucleico que codifica el pseudosustrato viral, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN. En una realización, inhibir la PKR comprende tratar la célula con al menos un inhibidor de la PKR. En una realización, el inhibidor de PKR inhibe la autofosforilación de PKR inducida por ARN. En una realización, el inhibidor de PKR es un inhibidor de PKR dirigido al sitio de unión de ATP. En una realización, el inhibidor de PKR es un compuesto de imidazolo-oxindol. En una realización, el inhibidor de PKR es 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetilen)-7H-pirrol[2,3-g]benzotiazol-7-ona y/o 2-aminopurina. En una realización, el inhibidor de PKR es un inhibidor viral de PKR. En una realización, el inhibidor viral de PKR es el virus vacuna E3. En una realización, el inhibidor viral de PKR se proporciona a la célula en forma de un ácido nucleico que codifica el inhibidor, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN. En una realización, inhibir la PKR comprende silenciar la expresión del gen de PKR. En una realización, inhibir la vía dependiente de OAS comprende inhibir la activación de RNasaL. En una realización, inhibir la vía dependiente de OAS comprende inhibir OAS. En una realización, inhibir la OAS comprende tratar la célula con al menos un inhibidor de la OAS. En una realización, el inhibidor de OAS es un inhibidor viral de OAS. En una realización, el inhibidor viral de OAS es el virus vacuna E3. En una realización, el inhibidor viral de OAS se proporciona a la célula en forma de un ácido nucleico que codifica el inhibidor.

En una realización, las etapas de (i) prevenir la interacción del receptor de IFN por el IFN extracelular y/o (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular comprenden tratar la célula con (i) virus vacuna B18R y/o (ii) virus vacuna E3 o virus vacuna K3, o ambos. En una realización, el virus vacuna B18R y/o el virus vacuna E3 y/o el virus vacuna K3 se proporcionan a la célula en forma de ácido nucleico que codifica el virus vacuna B18R y/o el virus vacuna E3 y/o el virus vacuna K3, ya sea en la misma o en dos o más moléculas de ácido nucleico diferentes, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN que preferiblemente se introduce en la célula junto con el ARN que se va a expresar en la célula y opcionalmente el ARN que codifica un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana*.

La proteína de escape viral NSs (N) de virus *Toscana* puede sustituir EKB (E3, K3, B18R) para una inhibición exitosa de una respuesta de IFN. Por consiguiente, los métodos de la enseñanza, en una realización, no comprenden proporcionar a una célula (i) un agente que impida la interacción del receptor de IFN por el IFN extracelular y/o (ii) un agente que inhiba la señalización de IFN intracelular. Por consiguiente, los métodos de la enseñanza, en una realización, no comprenden proporcionar a una célula virus vacuna B18R y/o virus vacuna E3 y/o virus vacuna K3 y preferiblemente no comprenden proporcionar a una célula ninguno de los virus vacuna B18R, virus vacuna E3 y virus vacuna K3.

Debe entenderse que de acuerdo con la enseñanza en lugar del inhibidor de IFN mencionado anteriormente (incluido un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana*), se pueden proporcionar ácidos nucleicos que codifican las proteínas. La frase "proporcionado en forma de ácido nucleico", tal como se utiliza en el presente documento, tiene en cuenta esta posibilidad. Por ejemplo, las células pueden transfectarse con ácido nucleico, en particular ARN, que codifica la proteína y el ácido nucleico puede expresarse en las células para producir la proteína.

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

Como ácido nucleico, en particular ARN, para la expresión de más de un péptido o proteína, ya sea de un tipo de ácido nucleico en el que los diferentes péptidos o proteínas están codificados por marcos de lectura abiertos (ORF) presentes en diferentes moléculas de ácido nucleico o un tipo de ácido nucleico en el que los diferentes péptidos o proteínas están codificados por marcos de lectura abiertos (ORF) presentes en la misma molécula de ácido nucleico. Por consiguiente, el ARN que codifica más de un péptido o proteína tal como el ARN que codifica más de un factor de reprogramación puede relacionarse con una mezcla de diferentes moléculas de ARN que comprenden diferentes ORF que codifican diferentes péptidos o proteínas o con una única molécula de ARN que comprende diferentes ORF que codifican diferentes péptidos o proteínas.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "ARN" se refiere a una molécula que comprende residuos de ribonucleótidos y que preferiblemente está compuesta total o sustancialmente por residuos de ribonucleótidos. El término "ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β -D-ribofuranosilo. El término "ARN" comprende ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado tal como ARN parcial o completamente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético y ARN generado recombinantemente tal como ARN modificado que difiere del ARN natural por adición, eliminación, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como en el(los) extremo(s) de un ARN o internamente, por ejemplo, en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos no naturales o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden denominarse análogos, particularmente análogos de ARN naturales. De acuerdo con la enseñanza, el ARN incluye ARNm.

El término "ARNm" significa "ARN mensajero" y se refiere a un transcrito que se genera utilizando una plantilla de ADN y codifica un péptido o proteína. Normalmente, el ARNm comprende una UTR 5', una región codificante de proteína, una UTR 3' y una secuencia de poli(A). El ARNm puede ser generado por transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN. La metodología de transcripción *in vitro* es conocida por el experto. Por ejemplo, existe una variedad de kits de transcripción *in vitro* disponibles comercialmente.

De acuerdo con la enseñanza, el ARN que codifica un péptido o proteína (también denominado péptido o proteína de interés en el presente documento) tal como el ARN que codifica uno o más factores de reprogramación puede ser un ARNm que codifica un péptido o proteína o un ARN autorreplicante tal como un replicón de ARN que codifica un péptido o proteína. Además, el ARN que codifica un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* para su suministro a las células de acuerdo con la enseñanza puede ser un ARNm que codifica el factor derivado de virus o un ARN autorreplicante tal como un replicón de ARN que codifica el factor derivado de virus. En una realización de la enseñanza, el ARN que codifica un péptido o proteína de interés que es ARNm que codifica un péptido o proteína de interés se cotransfecta junto con ARN que codifica el factor derivado de virus que es ARNm que codifica el factor derivado de virus. En una realización de la enseñanza, el ARN que codifica un péptido o proteína de interés que es un replicón de ARN que codifica un péptido o proteína de interés se cotransfecta junto con el ARN que codifica el factor derivado de virus que es un ARNm que codifica el factor derivado de virus. Si el replicón de ARN es un trans-replicón de ARN, también se puede cotransfectar

ARN, por ejemplo, ARNm, que codifica la proteína no estructural de alfavirus (también denominada construcción de ARN para expresar la proteína no estructural de alfavirus funcional en el presente documento). "Cotransfección" se refiere a la transfección de diferentes ácidos nucleicos ya sea en el mismo momento o en diferentes momentos.

En una realización de la presente enseñanza, el ARN es ARN autorreplicante, tal como ARN autorreplicante monocatenario. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN monocatenario de sentido positivo. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN viral o ARN derivado de ARN viral. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN genómico de alfavirus o se deriva de ARN genómico de alfavirus. En una realización, el ARN autorreplicante es un vector de expresión génica viral. En una realización, el virus es el virus del bosque de Semliki. En una realización, el ARN autorreplicante contiene uno o más transgenes. En una realización, si el ARN es ARN viral o se deriva de ARN viral, los transgenes pueden reemplazar parcial o completamente secuencias virales tales como secuencias virales que codifican proteínas estructurales. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN transcrito *in vitro*.

Los alfavirus son representantes típicos de los virus de ARN de cadena positiva. El genoma de los alfavirus codifica proteínas no estructurales (implicadas en la transcripción, modificación y replicación del ARN viral y en la modificación de proteínas) y proteínas estructurales (que forman la partícula viral). Normalmente hay dos marcos de lectura abiertos (ORF) en el genoma. Las cuatro proteínas no estructurales (nsP1-nsP4) normalmente están codificadas juntas por un primer ORF que comienza cerca del extremo 5' del genoma, mientras que las proteínas estructurales del alfavirus están codificadas juntas por un segundo ORF que se encuentra secuencia abajo del primer ORF y se extiende cerca del extremo terminal 3' del genoma. Normalmente, el primer ORF es mayor que el segundo ORF, siendo la relación aproximadamente 2:1. En las células infectadas por un alfavirus, sólo la secuencia de ácido nucleico que codifica proteínas no estructurales se traduce a partir del ARN genómico, mientras que la información genética que codifica las proteínas estructurales se puede traducir a partir de un transcrito subgenómico, que es una molécula de ARN que se asemeja al ARN mensajero eucariota (ARNm); Gould et al., 2010, Antiviral Res., vol. 87 págs. 111-124). Después de la infección, es decir, en las primeras etapas del ciclo de vida viral, el ARN genómico de cadena (+) actúa directamente como un ARN mensajero para la traducción del marco de lectura abierto que codifica la poliproteína no estructural (nsP1234). En algunos alfavirus, existe un codón de terminación de ópalo entre las secuencias codificantes de nsP3 y nsP4: la poliproteína P123, que contiene nsP1, nsP2 y nsP3, se produce cuando la traducción termina en el codón de terminación ópalo, y la poliproteína P1234, que contiene además nsP4, se produce tras la lectura completa de este codón ópalo (Strauss & Strauss, Microbiol. Rev., 1994, vol. 58, pp. 491-562; Rupp et al., 2015, J. Gen. Virology, vol. 96, págs. 2483-2500). nsP1234 se escinde autoproteolíticamente en los fragmentos nsP123 y nsP4. Los polipéptidos nsP123 y nsP4 se asocian para formar el complejo replicasa de cadena (-) que transcribe el ARN de cadena (-), utilizando el ARN genómico de cadena (+) como plantilla. Normalmente, en etapas posteriores, el fragmento nsP123 se escinde completamente en las proteínas individuales nsP1, nsP2 y nsP3 (Shirako y Strauss, 1994, J. Virol., vol. 68, págs. 1874-1885). Las cuatro proteínas forman el complejo de replicasa de cadena (+) que sintetiza nuevos genomas de cadena (+), utilizando el complemento de cadena (-) del ARN genómico como plantilla (Kim et al., 2004, Virology, vol. 323, págs. 153-163, Vasiljeva et al., 2003, J. Biol. Chem. vol. 278, págs. 41636-41645).

Las proteínas estructurales del alfavirus (proteína C de la nucleocápside central, proteína E2 de la envoltura y proteína E1 de la envoltura, todos constituyentes de la partícula del virus) generalmente están codificadas por un único marco de lectura abierto bajo el control de un promotor subgenómico. Strauss & Strauss, Microbiol. Rev., 1994, vol. 58, págs. 491-562). El promotor subgenómico es reconocido por proteínas no estructurales alfavirales que actúan en *cis*. En particular, la alfavirus replicasa sintetiza un transcrito subgenómico de cadena (+) utilizando el complemento de cadena (-) del ARN genómico como plantilla. El transcrito subgenómico de cadena (+) codifica las proteínas estructurales del alfavirus (Kim et al., 2004, Virology, vol. 323, págs. 153-163, Vasiljeva et al., 2003, J. Biol. Chem. vol. 278, págs. 41636-41645). El transcrito de ARN subgenómico sirve como plantilla para la traducción del marco de lectura abierto que codifica las proteínas estructurales como una poliproteína, y la poliproteína se escinde para producir las proteínas estructurales. En una etapa tardía de la infección por alfavirus en una célula huésped, una señal de empaquetamiento que se encuentra dentro de la secuencia codificante de nsP2 asegura el empaquetamiento selectivo del ARN genómico en viriones en ciernes, empaquetados por proteínas estructurales. White et al., 1998, J. Virol., vol. 72, págs. 4320-4326).

En realizaciones de la enseñanza, el ARN autorreplicante puede ser un replicón de ARN que es un replicón *cis* o un replicón *trans*. Por ejemplo, el marco de lectura abierto que codifica proteínas estructurales alfavirales puede reemplazarse por un marco de lectura abierto que codifica una proteína de interés. Los sistemas de replicación *trans* basados en alfavirus se basan en elementos de secuencia de nucleótidos de alfavirus en dos moléculas de ácido nucleico separadas: una molécula de ácido nucleico codifica una replicasa viral (típicamente como poliproteína nsP1234), y la otra molécula de ácido nucleico es capaz de ser replicada por dicha replicasa en *trans* (por lo tanto, la designación del sistema de replicación *trans*). La replicación *trans* requiere la presencia de ambas moléculas de ácido nucleico en una célula huésped determinada. La molécula de ácido nucleico capaz de ser replicada por la replicasa en *trans* debe comprender ciertos elementos de la secuencia alfaviral para permitir el reconocimiento y la síntesis de ARN por parte de la replicasa alfaviral.

De acuerdo con la presente enseñanza, "replicación de ARN" se refiere generalmente a una molécula de ARN sintetizada basándose en la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARN determinada (molécula de ARN plantilla). La molécula de ARN que se sintetiza puede ser, por ejemplo, idéntica o complementaria a la molécula de

ARN plantilla. En general, la replicación del ARN puede ocurrir mediante la síntesis de un intermediario de ADN, o puede ocurrir directamente mediante la replicación de ARN dependiente de ARN mediada por una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP). En el caso de los alfavirus, la replicación del ARN no se produce a través de un intermediario de ADN, sino que está mediada por una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP): una cadena de ARN plantilla (primera cadena de ARN) - o una parte de ella - sirve como plantilla para la síntesis de una segunda cadena de ARN que es complementaria a la primera cadena de ARN o a una parte de la misma. La segunda cadena de ARN - o una parte de la misma - puede a su vez servir opcionalmente como plantilla para la síntesis de una tercera cadena de ARN que es complementaria a la segunda cadena de ARN o a una parte de la misma. De este modo, la tercera cadena de ARN es idéntica a la primera cadena de ARN o a una parte de la misma. Por lo tanto, la ARN polimerasa dependiente de ARN es capaz de sintetizar directamente una cadena de ARN complementaria de una plantilla y de sintetizar indirectamente una cadena de ARN idéntica (a través de una cadena intermedia complementaria).

Una construcción de ácido nucleico que es capaz de ser replicada por una replicasa, preferiblemente una replicasa alfaviral, se denomina replicón. De acuerdo con la enseñanza, el término "replicón" define una molécula de ARN que puede replicarse mediante una ARN polimerasa dependiente de ARN, produciendo - sin intermediario de ADN - una o múltiples copias idénticas o esencialmente idénticas del replicón de ARN. "Sin intermediario de ADN" significa que no se forma ninguna copia o complemento de ácido desoxirribonucleico (ADN) del replicón en el proceso de formación de las copias del replicón de ARN, y/o que no se utiliza ninguna molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) como plantilla en el proceso de formación de las copias del replicón de ARN, o complemento del mismo. La función replicasa normalmente la proporciona la proteína no estructural del alfavirus funcional.

El replicón de ARN de la enseñanza comprende preferiblemente una secuencia de reconocimiento de replicación 5' y una secuencia de reconocimiento de replicación 3'. Una secuencia de reconocimiento de replicación es una secuencia de ácido nucleico que puede ser reconocida por una proteína no estructural de alfavirus funcional.

En una realización, la secuencia de reconocimiento de replicación 5' y la secuencia de reconocimiento de replicación 3' son capaces de dirigir la replicación del replicón de ARN de acuerdo con la presente enseñanza en presencia de proteína no estructural de alfavirus funcional. Por lo tanto, cuando están presentes solas o preferiblemente juntas, estas secuencias de reconocimiento dirigen la replicación del replicón de ARN en presencia de proteína no estructural de alfavirus funcional.

Es preferible que se proporcione una proteína no estructural de alfavirus funcional en cis (codificada como proteína de interés mediante un marco de lectura abierto en el replicón) o en trans (codificada como proteína de interés mediante un marco de lectura abierto en una construcción de replicasa separada), que es capaz de reconocer tanto la secuencia de reconocimiento de replicación 5' como la secuencia de reconocimiento de replicación 3' del replicón.

El replicón de ARN de acuerdo con la presente enseñanza es preferiblemente una molécula de ARN monocatenario. El replicón de ARN de acuerdo con la presente enseñanza es típicamente una molécula de ARN de cadena (+). En una realización, el replicón de ARN de la presente enseñanza es una molécula de ácido nucleico aislada.

De acuerdo con la enseñanza, un replicón de ARN puede derivarse de un alfavirus seleccionado del grupo que consiste en lo siguiente: complejo del virus del bosque Barmah (que comprende el virus del bosque Barmah); complejo de encefalitis equina del este (que comprende siete tipos antigénicos del virus de la encefalitis equina del este); complejo de virus de Middelburg (que comprende el virus Middelburg); complejo de virus Ndumu (que comprende el virus Ndumu); complejo de virus del bosque Semliki (que comprende el virus Bebaru, el virus Chikungunya, el virus Mayaro y su subtipo virus Una, el virus O'Nyong Nyong y su subtipo virus Igbo-Ora, el virus Ross River y sus subtipos el virus Bebaru, el virus Getah, el virus Sagiyama, el virus del bosque Semliki y su subtipo el virus Me Tri); complejo de encefalitis equina venezolana (que comprende virus Cabassou, virus Everglades, virus Mosso das Pedras, virus Mucambo, virus Paramana, virus Pixuna, virus Río Negro, virus Trocara y su subtipo virus Bijou Bridge, virus de encefalitis equina venezolana); complejo de encefalitis equina occidental (que comprende virus Aura, virus Babanki, virus Kyzylgach, virus Sindbis, virus Ockelbo, virus Whataroa, virus Buggy Creek, virus Fort Morgan, virus Highlands J, virus de encefalitis equina occidental); y algunos virus no clasificados, incluido el virus de la enfermedad pancreática del salmón; virus de la enfermedad del sueño; virus del elefante marino del sur; virus Tonate. Más preferiblemente, el alfavirus se selecciona del grupo que consiste en complejo de virus del bosque Semliki (que comprende los tipos de virus indicados anteriormente, incluido el virus Sindbis), virus de encefalitis equina occidental (que comprende los tipos de virus indicados anteriormente), complejo de encefalitis equina venezolana (que comprende los tipos de virus indicados anteriormente, incluido el virus de la encefalitis equina venezolana). En otra realización preferida, el alfavirus es el virus del bosque Semliki. En una realización alternativa adicional preferida, el alfavirus es el virus Sindbis. En una realización alternativa adicional preferida, el alfavirus es el virus de la encefalitis equina venezolana.

Las moléculas de ARN de acuerdo con la enseñanza pueden caracterizarse opcionalmente por características adicionales, por ejemplo, por una protección de 5', una UTR 5', una UTR 3', una secuencia de poli(A) y/o una adaptación del uso de codones. Los detalles se describen a continuación.

En algunas realizaciones, el ARN (ARNm y/o replicón de ARN) de acuerdo con la presente enseñanza comprende una protección de 5'.

Los términos "protección de 5'", "protección", "estructura de protección de 5'", "estructura de protección" se utilizan como sinónimos para referirse a un dinucleótido que se encuentra en el extremo 5' de algunos transcritos primarios eucariotas como el ARN mensajero precursor. Una protección de 5' es una estructura en la que una guanosina (opcionalmente modificada) está unida al primer nucleótido de una molécula de ARNm mediante un enlace trifosfato 5' a 5' (o un enlace trifosfato modificado en el caso de ciertos análogos de protección). Los términos pueden referirse a una protección convencional o a un análogo de protección.

"ARN que comprende una protección de 5'" o "ARN que está provisto de una protección de 5'" o "ARN que está modificado con una protección de 5'" o "ARN protegido" se refiere a ARN que comprende una protección de 5'. Por ejemplo, proporcionar un ARN con una protección de 5' se puede lograr mediante transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN en presencia de dicha protección de 5', en la que dicha protección de 5' se incorpora cotranscripcionalmente en la cadena de ARN generada, o el ARN se puede generar, por ejemplo, mediante transcripción *in vitro*, y la protección de 5' se puede unir al ARN postranscripcionalmente usando enzimas de protección, por ejemplo, enzimas de protección del virus vacuna. En el ARN protegido, la posición 3' de la primera base de una molécula de ARN (protegida) está unida a la posición 5' de la base posterior de la molécula de ARN ("segunda base") mediante un enlace fosfodiéster.

Se prefiere fuertemente la presencia de una protección en una molécula de ARN si se desea la traducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína en etapas tempranas después de la introducción del ARN respectivo en células huésped o en un organismo huésped. Por ejemplo, la presencia de una protección permite que un gen de interés codificado por ARN se traduzca eficientemente en etapas tempranas después de la introducción del ARN respectivo en las células huésped. "Etapas tempranas" normalmente significa dentro de la primera hora, o dentro de las primeras dos horas, o dentro de las primeras tres horas después de la introducción del ARN.

También se prefiere la presencia de una protección en un replicón de ARN si se desea que la traducción se produzca en ausencia de replicasa funcional, o cuando sólo están presentes niveles menores de replicasa en una célula huésped. Por ejemplo, incluso si una molécula de ácido nucleico que codifica la replicasa se introduce en una célula huésped, en las primeras etapas después de la introducción los niveles de replicasa normalmente serán menores. De acuerdo con la enseñanza, se prefiere que la construcción de ARN para expresar la proteína no estructural de alfavirus funcional comprenda una protección de 5'.

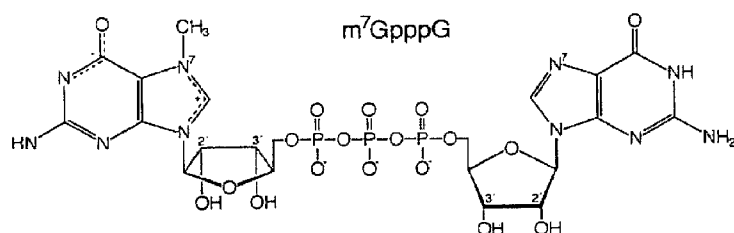
En particular, cuando el replicón de ARN de acuerdo con la presente enseñanza no se usa ni se proporciona junto con una segunda molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) que codifica la proteína no estructural de alfavirus funcional, se prefiere que el replicón de ARN comprenda una protección de 5'. Independientemente, el replicón de ARN también puede comprender una protección de 5' incluso cuando se usa o se proporciona junto con una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una proteína no estructural de alfavirus funcional.

El término "protección de 5' convencional" se refiere a una protección de 5' de origen natural, preferiblemente a la protección de 7-metilguanosina. En la protección de 7-metilguanosina, la guanosina de la protección es una guanosina modificada en la que la modificación consiste en una metilación en la posición 7.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "análogo de protección de 5'" se refiere a una estructura molecular que se asemeja a una protección de 5' convencional, pero está modificada para poseer la capacidad de estabilizar el ARN si se une a la misma, preferiblemente *in vivo* y/o en una célula. Un análogo de protección no es una protección de 5' convencional.

Para el caso del ARNm eucariota, se ha descrito generalmente que la protección de 5' está involucrada en la traducción eficiente del ARNm: en general, en eucariotas, la traducción se inicia sólo en el extremo 5' de una molécula de ARN mensajero (ARNm), a menos que esté presente un sitio de entrada ribosomal interno (IRES). Las células eucariotas son capaces de proporcionar un ARN con una protección de 5' durante la transcripción en el núcleo: los ARNm recién sintetizados generalmente se modifican con una estructura de protección de 5', por ejemplo, cuando el transcrito alcanza una longitud de 20 a 30 nucleótidos. Primero, el nucleótido del extremo terminal 5' pppN (ppp representa trifosfato; N representa cualquier nucleósido) se convierte en la célula con GpppN de 5' mediante una enzima de protección que tiene actividades de ARN 5'-trifosfatasa y guanililtransferasa. Posteriormente, la GpppN puede metilarse en la célula mediante una segunda enzima con actividad de (guanina-7)-metiltransferasa para formar la protección de m⁷GpppN monometilada. En una realización, la protección de 5' usada en la presente enseñanza es una protección de 5' natural.

En la presente enseñanza, un dinucleótido de protección de 5' natural se selecciona típicamente del grupo que consiste en un dinucleótido de protección no metilado (G(5')ppp(5')N; también denominado GpppN) y un dinucleótido de protección metilado ((m⁷G(5')ppp(5')N; también denominado m⁷GpppN). m⁷GpppN (donde N es G) se representa mediante la siguiente fórmula:

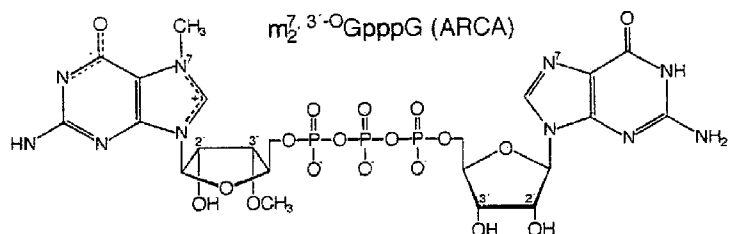


Se puede preparar el ARN protegido de la presente enseñanza *in vitro*, y, por lo tanto, no depende de una maquinaria de protección en una célula huésped. El método más utilizado para producir ARN protegidos *in vitro* consiste en transcribir una plantilla de ADN con una ARN polimerasa bacteriana o de bacteriófago en presencia de los cuatro trifosfatos de ribonucleósido y un dinucleótido de protección como m⁷G(5')ppp(5')G (también denominado m⁷GpppG). La ARN polimerasa inicia la transcripción con un ataque nucleofílico por el OH de 3' de la fracción de guanosina de m⁷GpppG en el α-fosfato del siguiente trifosfato de nucleósido de la plantilla (pppN), lo que da como resultado el intermedio m⁷GpppGpN (donde N es la segunda base de la molécula de ARN). La formación del producto competidor pppGpN iniciado por GTP se suprime estableciendo la relación molar de protección con respecto a GTP entre 5 y 10 durante la transcripción *in vitro*.

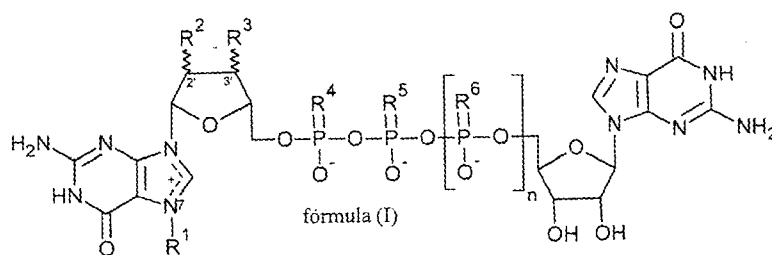
En realizaciones preferidas de la presente enseñanza, la protección de 5' (si está presente) es un análogo de la protección de 5'. Estas realizaciones son particularmente adecuadas si el ARN se obtiene mediante transcripción *in vitro*, por ejemplo, es un ARN transcrito *in vitro* (ARN IVT). Inicialmente se ha descrito que los análogos de protección facilitan la síntesis a gran escala de transcritos de ARN mediante transcripción *in vitro*.

Para el ARN mensajero, hasta la fecha se han descrito en general algunos análogos de protección (protecciones sintéticas), y todos ellos pueden usarse en el contexto de la presente enseñanza. Idealmente, se selecciona un análogo de protección que esté asociado con una mayor eficiencia de traducción y/o una mayor resistencia a degradación *in vivo* y/o mayor resistencia a degradación *in vitro*.

Preferiblemente, se usa un análogo de protección que sólo puede incorporarse a una cadena de ARN en una orientación. Pasquinelli et al. (1995, RNA J., vol. 1, págs. 957-967) demostraron que durante la transcripción *in vitro*, las ARN polimerasas de bacteriófagos utilizan la unidad 7-metilguanosina para el inicio de la transcripción, por lo que alrededor del 40-50 % de los transcritos con protección poseen el dinucleótido de protección en una orientación inversa (es decir, el producto de reacción inicial es Gpppm⁷GPN). En comparación con los ARN con una protección correcta, los ARN con una protección inversa no son funcionales con respecto a la traducción de una secuencia de ácido nucleico en proteína. Por lo tanto, es deseable incorporar la protección en la orientación correcta, es decir, dando como resultado un ARN con una estructura esencialmente correspondiente a m⁷GpppGpN, etc. Se ha demostrado que la integración inversa del dinucleótido de protección se inhibe mediante la sustitución del grupo OH de 2' o 3' de la unidad de guanosina metilada (Stepinski et al., 2001; RNA J., vol. 7, págs. 1486-1495; Peng et al., 2002; Org. Lett., vol. 24, págs. 161-164). Los ARN que se sintetizan en presencia de tales "análogos anti-protección inversa" se traducen más eficientemente que los ARN que se transcriben *in vitro* en presencia de la protección de 5' convencional m⁷GpppG. Con ese fin, se utiliza un análogo de protección en el que el grupo OH de 3' de la unidad de guanosina metilada se reemplaza por OCH₃ que describen, por ejemplo, Holtkamp et al., 2006, Blood, vol. 108, págs. 4009-4017 (7-metil(3'-O-metil)GpppG; análogo de protección anti-inversa (ARCA)). ARCA es un dinucleótido de protección adecuado de acuerdo con la presente enseñanza.



En una realización preferida de la presente enseñanza, el ARN de la presente enseñanza esencialmente no es susceptible de desprotección. Esto es importante porque, en general, la cantidad de proteína producida a partir de ARNm sintéticos introducidos en células de mamíferos cultivadas está limitada por la degradación natural del ARNm. Una vía *in vivo* para la degradación del ARNm comienza con la eliminación de la protección del ARNm. Esta eliminación está catalizada por una pirofosfatasa heterodimérica, que contiene una subunidad reguladora (Dcp1) y una subunidad catalítica (Dcp2). La subunidad catalítica escinde entre los grupos fosfato α y β del puente de trifosfato. En la presente enseñanza, puede seleccionarse o estar presente un análogo de protección que no sea susceptible, o menos susceptible, a ese tipo de escisión. Un análogo de protección adecuado para este fin puede seleccionarse entre un dinucleótido de protección de acuerdo con la fórmula (I):



donde R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo opcionalmente sustituido, alqueniilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido,

- 5 R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halo, OH y alcoxi opcionalmente sustituido, o R² y R³ juntos forman O-X-O, en el que X se selecciona del grupo que consiste en CH₂ opcionalmente sustituido, CH₂CH₂, CH₂CH₂CH₂, CH₂CH(CH₃), y C(CH₃)₂, o R² se combina con el átomo de hidrógeno en la posición 4' del anillo al que R² se une para formar -O-CH₂- o -CH₂-O-,

R⁵ se selecciona del grupo que consiste en S, Se y BH₃,

- 10 R⁴ y R⁶ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O, S, Se y BH₃.

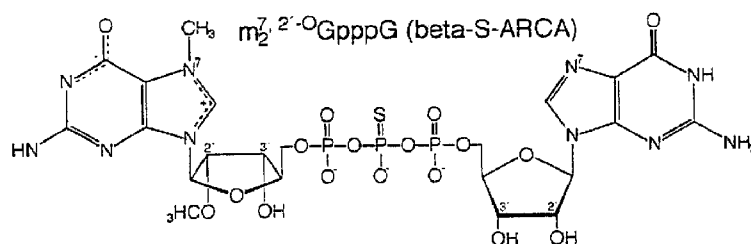
n es 1, 2 o 3.

Realizaciones preferidas para R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ se divulgan en el documento WO 2011/015347 A1 y puede seleccionarse en consecuencia en la presente enseñanza.

- 15 Por ejemplo, en una realización preferida de la presente enseñanza, el ARN de la presente enseñanza comprende un análogo de protección de fosforotioato. Los análogos de protección de fosforotioato son análogos de protección específicos en los que uno de los tres átomos de O que no forman puentes en la cadena de trifosfato se reemplaza por un átomo de S, es decir, uno de R⁴, R⁵ o R⁶ en la Fórmula (I) es S. Los análogos de protección de fosforotioato han sido descritos por J. Kowalska et al., 2008, RNA, vol. 14, págs. 1119-1131, como solución al proceso de desprotección no deseado y, por lo tanto, para aumentar la estabilidad del ARN *in vivo*. En particular, la sustitución de un átomo de oxígeno por un átomo de azufre en el grupo beta-fosfato de la protección de 5' da como resultado la estabilización frente a Dcp2. En esa realización, que se prefiere en la presente enseñanza, R⁵ en la Fórmula (I) es S; y R⁴ y R⁶ son O.

- 25 En una realización preferida adicional de la presente enseñanza, el ARN de la presente enseñanza comprende un análogo de protección de fosforotioato en el que la modificación con fosforotioato de la protección de 5' del ARN se combina con una modificación del "análogo de protección antiinversa" (ARCA). Los respectivos análogos de protección de fosforotioato de ARCA se describen en el documento WO 2008/157688 A2, y todos ellos pueden ser utilizados en el ARN de la presente enseñanza. En esa realización, al menos uno de R² o R³ en la Fórmula (I) no es OH, preferiblemente uno entre R² y R³ es metoxi (OCH₃), y el otro entre R² y R³ es preferiblemente OH. En una realización preferida, un átomo de oxígeno se sustituye por un átomo de azufre en el grupo beta-fosfato (de modo que R⁵ en la Fórmula (I) es S; y R⁴ y R⁶ son O). Se cree que la modificación con fosforotioato de ARCA garantiza que los grupos fosforotioato α, β y γ estén ubicados con precisión dentro de los sitios activos de las proteínas de unión de protección, tanto en la maquinaria de traducción como en la de desprotección. Al menos algunos de estos análogos son esencialmente resistentes a la pirofosfatasa Dcp1/Dcp2. Se describió que los ARCA modificados con fosforotioato tienen una afinidad mucho mayor por eIF4E que los ARCA correspondientes que carecen de un grupo fosforotioato.

- 35 Un análogo de protección respectivo que se prefiere particularmente en la presente enseñanza, es decir, m₂^{7,2'}-³HCO-GpppG, se denomina beta-S-ARCA (documento WO 2008/157688 A2; Kuhn et al., Gene Ther., 2010, vol. 17, págs. 961-971). Por lo tanto, en una realización de la presente enseñanza, el ARN de la presente enseñanza se modifica con beta-S-ARCA. beta-S-ARCA está representado por la siguiente estructura:



- 40 En general, la sustitución de un átomo de oxígeno por un átomo de azufre en un fosfato puente da como resultado diastereómeros de fosforotioato que se denominan D1 y D2, basándose en su patrón de elución en HPLC. Brevemente,

el diastereómero D1 de beta-S-ARCA" o "beta-S-ARCA(D1)" es el diastereómero de beta-S-ARCA que eluye primero en una columna de HPLC en comparación con el diastereómero D2 de beta-S-ARCA (beta-S-ARCA(D2)) y, por lo tanto, presenta un tiempo de retención más corto. La determinación de la configuración estereoquímica mediante HPLC se describe en el documento WO 2011/015347 A1.

- 5 En una primera realización particularmente preferida de la presente enseñanza, el ARN de la presente enseñanza se modifica con el diastereómero beta-S-ARCA(D2). Los dos diastereómeros de beta-S-ARCA difieren en su sensibilidad frente a las nucleasas. Se ha demostrado que el ARN que porta el diastereómero D2 de beta-S-ARCA es casi completamente resistente a la escisión de Dcp2 (sólo un 6 % de escisión en comparación con el ARN que se ha sintetizado en presencia de la protección de 5' de ARCA no modificada), mientras que el ARN con la protección de 5' de beta-S-ARCA(D1) muestra una sensibilidad intermedia a la escisión de Dcp2 (71 % de escisión). Además, se ha demostrado que la mayor estabilidad frente a la escisión de Dcp2 se correlaciona con una mayor expresión de proteínas en células de mamíferos. En particular, se ha demostrado que los ARN que portan la protección de beta-S-ARCA(D2) se traducen de manera más eficiente en células de mamíferos que los ARN que portan la protección de beta-S-ARCA(D1). Por lo tanto, en una realización de la presente enseñanza, el ARN de la presente enseñanza se modifica con un análogo de protección de acuerdo con la Fórmula (I), caracterizada por una configuración estereoquímica en el átomo de P que comprende el sustituyente R⁵ en la Fórmula (I) que corresponde a la del átomo de P_β del diastereómero D2 de beta-S-ARCA. En esa realización, R⁵ en la Fórmula (I) es S; y R⁴ y R⁶ son O. Además, al menos uno de R² o R³ en la Fórmula (I) preferiblemente no es OH, preferiblemente uno entre R² y R³ es metoxi (OCH₃), y el otro entre R² y R³ es preferiblemente OH.
- 20 En una segunda realización particularmente preferida, el ARN de la presente enseñanza se modifica con el diastereómero beta-S-ARCA(D1). Esta realización es particularmente adecuada para la transferencia de ARN protegido a células presentadoras de antígenos inmaduras como, por ejemplo, con fines de vacunación. Se ha demostrado que el diastereómero beta-S-ARCA(D1), tras la transferencia del ARN protegido respectivamente a células presentadoras de antígeno inmaduras, es particularmente adecuado para aumentar la estabilidad del ARN, aumentar la eficiencia de traducción del ARN, prolongando la traducción del ARN, aumentando la expresión proteica total del ARN, y/o aumentando la respuesta inmune contra un antígeno o péptido antigénico codificado por dicho ARN (Kuhn et al., 2010, Gene Ther., vol. 17, págs. 961-971). Por lo tanto, en una realización alternativa de la presente enseñanza, el ARN de la presente enseñanza se modifica con un análogo de protección de acuerdo con la Fórmula (I), caracterizado por una configuración estereoquímica en el átomo de P que comprende el sustituyente R⁵ en la Fórmula (I) que corresponde a la del átomo de P_β del diastereómero D1 de beta-S-ARCA. Los respectivos análogos de protección y realizaciones de los mismos se describen en el documento WO 2011/015347 A1 y Kuhn et al., 2010, Gene Ther., vol. 17, págs. 961-971. Cualquier análogo de protección descrito en el documento WO 2011/015347 A1, donde la configuración estereoquímica en el átomo de P que comprende el sustituyente R⁵ corresponde a la del átomo de P_β del diastereómero D1 de beta-S-ARCA, puede usarse en la presente enseñanza. Preferiblemente R⁵ en la Fórmula (I) es S; y R⁴ y R⁶ son O. Además, al menos uno de R² o R³ en la Fórmula (I) preferiblemente no es OH, preferiblemente uno entre R² y R³ es metoxi (OCH₃), y el otro entre R² y R³ es preferiblemente OH.

En una realización, el ARN de la presente enseñanza se modifica con una estructura de protección de 5' de acuerdo con la Fórmula (I) en la que cualquier grupo fosfato se reemplaza por un grupo boranofosfato o un grupo fosforoselenato. Estas protecciones tienen una mayor estabilidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Opcionalmente, el compuesto respectivo tiene un grupo 2'-O- o 3'-O-alquilo (en el que alquilo es preferiblemente metilo); los respectivos análogos de la protección se denominan BH₃-ARCA o Se-ARCA. Los compuestos que son particularmente adecuados para proteger el ARNm incluyen el β-BH₃-ARCA y β-Se-ARCA, como se describe en el documento WO 2009/149253 A2. Para estos compuestos, se prefiere una configuración estereoquímica en el átomo de P que comprende el sustituyente R⁵ en la Fórmula (I) que corresponde a la del átomo de P_β del diastereómero D1 de beta-S-ARCA.

45 El término "región no traducida" o "UTR" se refiere a una región en una molécula de ADN que se transcribe, pero no se traduce en una secuencia de aminoácidos, o a la región correspondiente en una molécula de ARN, tal como una molécula de ARNm. Una región no traducida (UTR) puede estar presente en 5' (secuencia arriba) de un marco de lectura abierto (UTR 5') y/o 3' (secuencia abajo) de un marco de lectura abierto (UTR 3').

Una UTR 3', si está presente, se localiza en el extremo 3' de un gen, secuencia abajo del codón de terminación de una región que codifica una proteína, pero el término "UTR 3'" preferiblemente no incluye la cola de poli(A). Por lo tanto, la UTR 3' está secuencia arriba de la cola de poli(A) (si está presente), por ejemplo, directamente adyacente a la cola de poli(A).

Una UTR 5', si está presente, se ubica en el extremo 5' de un gen, secuencia arriba del codón de inicio de una región que codifica una proteína. Una UTR 5' está secuencia abajo de la protección de 5' (si está presente), por ejemplo, directamente adyacente a la protección de 5'.

Las regiones no traducidas 5' y/o 3' pueden, de acuerdo con la enseñanza, estar funcionalmente unidas a un marco de lectura abierto, de modo que estas regiones se asocien con el marco de lectura abierto de tal manera que se incrementan la estabilidad y/o la eficiencia de traducción del ARN que comprende dicho marco de lectura abierto.

En algunas realizaciones, el ARNm de acuerdo con la presente enseñanza comprende una UTR 5' y/o una UTR 3'.

En una realización preferida, el ARNm de acuerdo con la presente enseñanza comprende

- (1) una UTR 5',
- (2) un marco de lectura abierto, y
- (3) una UTR 3'.

- 5 Las UTR están implicadas en la estabilidad y la eficiencia de la traducción del ARN. Ambos pueden mejorarse, además de las modificaciones estructurales relativas a la protección de 5' y/o la cola de poli(A) 3' como se describe en el presente documento, seleccionando regiones no traducidas (UTR) 5' y/o 3' específicas. Generalmente se entiende que los elementos de secuencia dentro de las UTR influyen en la eficiencia de la traducción (principalmente UTR 5') y la estabilidad del ARN (principalmente UTR 3'). Es preferible que esté presente una UTR 5' que esté activa para aumentar la eficiencia de la traducción y/o la estabilidad del ARN. Independiente o adicionalmente, es preferible que esté presente una UTR 3' que esté activa para aumentar la eficiencia de la traducción y/o la estabilidad del ARN.

- 10 Los términos "activo para aumentar la eficacia de la traducción" y/o "activo para aumentar la estabilidad", con referencia a una primera secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una UTR), significan que la primera secuencia de ácido nucleico es capaz de modificar, en un transcrito común con una segunda secuencia de ácido nucleico, la eficiencia y/o estabilidad de la traducción de dicha segunda secuencia de ácido nucleico de tal manera que dicha eficiencia y/o estabilidad de la traducción aumenta en comparación con la eficiencia y/o estabilidad de la traducción de dicha segunda secuencia de ácido nucleico en ausencia de dicha primera secuencia de ácido nucleico.

- 15 Una UTR 3' normalmente tiene una longitud de 200 a 2000 nucleótidos, por ejemplo, de 500 a 1500 nucleótidos. Las regiones no traducidas 3' de los ARNm de inmunoglobulinas son relativamente cortas (menos de aproximadamente 300 nucleótidos), mientras que las regiones no traducidas 3' de otros genes son relativamente largas. Por ejemplo, la región no traducida 3' de tPA tiene una longitud de aproximadamente 800 nucleótidos, la del factor VIII tiene una longitud de aproximadamente 1800 nucleótidos y la de la eritropoyetina tiene una longitud de aproximadamente 560 nucleótidos. Las regiones no traducidas 3' del ARNm de mamíferos suelen tener una región de homología conocida como secuencia de hexanucleótidos AAUAAA. Esta secuencia es presumiblemente la señal de unión de poli(A) y frecuentemente está ubicada de 10 a 30 bases secuencia arriba del sitio de unión de poli(A). Las regiones no traducidas 3' pueden contener una o más repeticiones invertidas que pueden plegarse para producir estructuras de tallo-bucle que actúan como barreras para exorribonucleasas o interactúan con proteínas que se sabe que aumentan la estabilidad del ARN (por ejemplo, proteínas de unión a ARN).

En algunas realizaciones, el ARN de acuerdo con la presente enseñanza comprende una secuencia de poli(A) 3'.

- 20 De acuerdo con la enseñanza, en una realización, una secuencia de poli(A) comprende o consiste esencialmente en o consiste en al menos 20, preferiblemente al menos 26, preferiblemente al menos 40, preferiblemente al menos 80, preferiblemente al menos 100 y preferiblemente hasta 500, preferiblemente hasta 400, preferiblemente hasta 300, preferiblemente hasta 200 y en particular hasta 150 nucleótidos A, y en particular aproximadamente 120 nucleótidos A. En este contexto "consiste esencialmente en" significa que la mayoría de los nucleótidos en la secuencia de poli(A), típicamente al menos el 50 %, y preferiblemente al menos el 75 % en número de nucleótidos en la "secuencia de poli(A)", son nucleótidos A (adenilato), pero permite que los nucleótidos restantes sean nucleótidos distintos de los nucleótidos A, tal como los nucleótidos U (uridilato), los nucleótidos G (guanilato), los nucleótidos C (citidilato). En este contexto, "consta de" significa que todos los nucleótidos de la secuencia de poli(A), es decir, el 100 % en número de nucleótidos de la secuencia de poli(A), son nucleótidos A. El término "nucleótido A" o "A" se refiere a adenilato.

- 40 De hecho, se ha demostrado que una secuencia de poli(A) 3' de aproximadamente 120 nucleótidos A tiene una influencia beneficiosa sobre los niveles de ARN en células eucariotas transfectadas, así como sobre los niveles de proteína que se traduce desde un marco de lectura abierto que está presente secuencia arriba (5') de la secuencia de poli(A) 3' (Holtkamp et al., 2006, Blood, vol. 108, págs. 4009-4017).

- 45 La presente enseñanza proporciona una secuencia de poli(A) 3' que se unirá durante la transcripción de ARN, es decir, durante la preparación de ARN transcrito *in vitro*, basado en una plantilla de ADN que comprende nucleótidos dT repetidos (desoxitimidilato) en la cadena complementaria a la cadena codificante. La secuencia de ADN que codifica una secuencia de poli(A) (cadena codificante) se denomina casete de poli(A).

- 50 En una realización preferida de la presente enseñanza, el casete de poli(A) 3' presente en la cadena codificante de ADN consiste esencialmente en nucleótidos dA, pero está interrumpido por una secuencia aleatoria que tiene una distribución igual de los cuatro nucleótidos (dA, dC, dG, dT). Dicha secuencia aleatoria puede tener una longitud de 5 a 50, preferiblemente de 10 a 30, más preferiblemente de 10 a 20 nucleótidos. Un casete de este tipo se divulga en el documento WO 2016/005004 A1. Cualquier casete de poli(A) divulgado en el documento WO 2016/005004 A1 puede ser utilizado en la presente enseñanza. Un casete de poli(A) que consiste esencialmente en nucleótidos dA, pero que está interrumpido por una secuencia aleatoria que tiene una distribución igual de los cuatro nucleótidos (dA, dC, dG, dT) y que tiene una longitud de, por ejemplo, 5 a 50 nucleótidos muestra, a nivel de ADN, propagación constante del ADN plasmídico en *E. coli* y todavía está asociado, a nivel de ARN, con propiedades beneficiosas con respecto al apoyo a la estabilidad del ARN y la eficiencia traduccional.

En consecuencia, en una realización preferida de la presente enseñanza, la secuencia de poli(A) 3' contenida en una molécula de ARN descrita en el presente documento consiste esencialmente en nucleótidos A, pero está interrumpida por una secuencia aleatoria que tiene una distribución igual de los cuatro nucleótidos (A, C, G, U). Dicha secuencia aleatoria puede tener una longitud de 5 a 50, preferiblemente de 10 a 30, más preferiblemente de 10 a 20 nucleótidos.

Las secuencias de ácido nucleico especificadas en el presente documento, en particular secuencias de ácido nucleico transcribibles y codificantes, pueden estar unidas funcionalmente con cualquier secuencia de control de expresión, que puede ser homóloga o heteróloga a dichas secuencias de ácido nucleico, refiriéndose el término "homólogo" al hecho de que una secuencia de ácido nucleico también está unida funcionalmente de forma natural a la secuencia de control de la expresión, y el término "heterólogo" se refiere al hecho de que una secuencia de ácido nucleico no está unida funcionalmente de forma natural a la secuencia de control de la expresión.

Una secuencia de ácido nucleico transcribible o una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido o proteína, y una secuencia de control de la expresión están unidas "funcionalmente" entre sí, si están unidas covalentemente entre sí de tal manera que la transcripción o expresión de la secuencia transcribible o la secuencia de ácido nucleico codificante está bajo el control o bajo la influencia de la secuencia de control de la expresión. Si la secuencia de ácido nucleico se va a traducir en un péptido o proteína funcional, la inducción de una secuencia de control de la expresión unida funcionalmente a la secuencia codificante da como resultado la transcripción de dicha secuencia codificante, sin provocar un cambio de marco en la secuencia codificante o que la secuencia codificante sea incapaz de traducirse al péptido o proteína deseado.

El término "secuencia de control de la expresión" comprende, de acuerdo con las enseñanzas, promotores, secuencias de unión a ribosomas y otros elementos de control que controlan la transcripción de un gen o la traducción de ARN. En realizaciones particulares de la enseñanza, las secuencias de control de la expresión pueden regularse. La estructura precisa de las secuencias de control de la expresión puede variar de acuerdo con la especie o el tipo de célula, pero normalmente incluye secuencias 5' no transcritas y 5' y 3' no traducidas implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, como la caja TATA, la secuencia de protección, secuencia CAAT y similares. Más específicamente, las secuencias de control de la expresión no transcritas en 5' incluyen una región promotora que abarca una secuencia promotora para el control de la transcripción del gen funcionalmente unido. Las secuencias de control de la expresión también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras secuencia arriba.

El término "promotor" o "región promotora" se refiere a una secuencia de ADN secuencia arriba (5') de la secuencia codificante de un gen, que controla la expresión de dicha secuencia codificante proporcionando un sitio de reconocimiento y unión para la ARN polimerasa. La región promotora puede incluir sitios de unión o reconocimiento adicionales para factores adicionales implicados en la regulación de la transcripción de dicho gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procariota o eucariota. Un promotor puede ser "inducible" e iniciar la transcripción en respuesta a un inductor, o puede ser "constitutivo" si la transcripción no está controlada por un inductor. Un promotor inducible se expresa sólo en una medida muy pequeña o no se expresa en absoluto, si está ausente un inductor. En presencia del inductor, el gen se "activa" o aumenta el nivel de transcripción. Esto suele estar mediado por la unión de un factor de transcripción específico.

Ejemplos de promotores preferidos de acuerdo con la enseñanza son promotores para la polimerasa SP6, T3 o T7.

De acuerdo con la enseñanza, el término "expresión" se utiliza en su significado más general y comprende la expresión de ARN y/o proteína. También comprende la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede ser transitoria o estable. Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se relaciona con el proceso en los ribosomas de una célula mediante el cual una cadena de ARN mensajero dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para formar un péptido o proteína.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "transcripción" se refiere a un proceso en el que el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en proteína. De acuerdo con la presente enseñanza, el término "transcripción" comprende "transcripción *in vitro*", donde el término "transcripción *in vitro*" se refiere a un proceso en el que el ARN, en particular el ARNm, se sintetiza *in vitro* en un sistema libre de células. Preferiblemente, se aplican vectores de clonación para la generación de transcritos. Estos vectores de clonación se denominan generalmente vectores de transcripción y, de acuerdo con la presente enseñanza, están abarcados por el término "vector". De acuerdo con la presente enseñanza, el ARN preferiblemente es ARN transcrito *in vitro* (ARN IVT) y puede obtenerse mediante transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN apropiada. El promotor para controlar la transcripción puede ser cualquier promotor de cualquier ARN polimerasa. Una plantilla de ADN para la transcripción *in vitro* se puede obtener clonando un ácido nucleico, en particular ADNc, e introduciéndolo en un vector apropiado para transcripción *in vitro*. El ADNc puede obtenerse mediante transcripción inversa de ARN.

Términos tales como "mejora de la expresión", "expresión mejorada" o "expresión aumentada" significan en el contexto de la presente enseñanza que la cantidad de péptido o proteína expresada por un número determinado de moléculas de ARN es mayor que la cantidad de péptido o proteína expresada por el mismo número de moléculas de ARN, en el que la expresión de las moléculas de ARN se realiza en las mismas condiciones excepto la condición que da como resultado la expresión mejorada o aumentada del ARN, tal como proporcionar un factor derivado de virus que

comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* a la célula versus no proporcionar un factor derivado de virus que comprenda proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* a la célula. En este contexto, "mismas condiciones" se refiere a una situación en la que las mismas secuencias de ARN que codifican el mismo péptido o proteína se introducen por los mismos medios en las mismas células, las células se cultivan en las mismas condiciones (excepto la condición que da como resultado la expresión mejorada o aumentada) y la cantidad de péptido o proteína se mide por los mismos medios. La cantidad de péptido o proteína se puede dar en moles o en peso, por ejemplo, en gramos, o en masa o por actividad polipeptídica, por ejemplo, si el péptido o proteína es una enzima, se puede proporcionar como actividad catalítica o si el péptido o proteína es un anticuerpo o antígeno o un receptor, se puede proporcionar como afinidad de unión. En una realización, términos tales como "mejora de la expresión", "expresión mejorada" o "expresión aumentada" significan en el contexto de la presente enseñanza que la cantidad de péptido o proteína expresada por un número determinado de moléculas de ARN y dentro de un período determinado de tiempo es mayor que la cantidad de péptido o proteína expresada por el mismo número de moléculas de ARN y en el mismo periodo de tiempo. Por ejemplo, el valor máximo de péptido o proteína expresado por un número determinado de moléculas de ARN en un momento particular puede ser mayor que el valor máximo de péptido o proteína expresado por el mismo número de moléculas de ARN. En otras realizaciones, no es necesario que el valor máximo de péptido o proteína expresado por un número determinado de moléculas de ARN sea mayor que el valor máximo de péptido o proteína expresado por el mismo número de moléculas de ARN; sin embargo, la cantidad promedio de péptido o proteína expresada por el número dado de moléculas de ARN dentro de un período de tiempo determinado puede ser mayor que la cantidad promedio de péptido o proteína expresada por el mismo número de moléculas de ARN. Los últimos casos se denominan en el presente documento "nivel de expresión superior" o "nivel de expresión aumentado" y se relacionan con valores máximos de expresión más altos y/o valores promedio de expresión más altos. Alternativa o adicionalmente, términos tales como "mejora de la expresión", "expresión mejorada" o "expresión aumentada" significan en el contexto de la presente enseñanza también que el tiempo en el que el péptido o la proteína se expresa mediante moléculas de ARN puede ser mayor que el tiempo en el que el péptido o proteína se expresa mediante las mismas moléculas de ARN. Por lo tanto, en una realización, términos tales como "mejora de la expresión", "expresión mejorada" o "expresión aumentada" significan en el contexto de la presente enseñanza también que la cantidad de péptido o proteína expresada por un número determinado de moléculas de ARN es mayor que la cantidad de péptido o proteína expresada por el mismo número de moléculas de ARN ya que el período de tiempo en el que el ARN está presente y expresado de manera estable es más largo que el período de tiempo en el que el mismo número de moléculas de ARN está presente y expresado de manera estable. Estos casos se denominan en el presente documento también "duración aumentada de la expresión". Preferiblemente, dichos períodos de tiempo más largos se refieren a la expresión durante al menos 48 h, preferiblemente durante al menos 72 h, más preferiblemente durante al menos 96 h, en particular durante al menos 120 h o incluso más después de la introducción de ARN o después de la primera introducción (por ejemplo, en caso de transfecciones repetidas) de ARN en una célula.

El nivel de expresión y/o la duración de la expresión de ARN se puede determinar midiendo la cantidad, tal como la cantidad total expresada y/o la cantidad expresada en un período de tiempo determinado, y/o el tiempo de expresión del péptido o proteína codificado por el ARN, por ejemplo, usando un procedimiento de ELISA, un procedimiento de inmunohistoquímica, un procedimiento de análisis de imágenes cuantitativo, una transferencia Western, espectrometría de masas, un procedimiento de inmunohistoquímica cuantitativa o un ensayo enzimático.

De acuerdo con la enseñanza, el término "ARN codificante" con respecto a un péptido o proteína particular significa que el ARN, si está presente en el entorno apropiado, preferiblemente dentro de una célula, puede expresarse para producir dicho péptido o proteína.

Preferiblemente, el ARN de acuerdo con la enseñanza es capaz de interactuar con la maquinaria de traducción celular para proporcionar el péptido o proteína que codifica.

En realizaciones particulares, el ARN de acuerdo con la enseñanza comprende un único tipo de molécula de ARN, una población de diferentes moléculas de ARN, por ejemplo, una mezcla de diferentes moléculas de ARN que codifican opcionalmente diferentes péptidos y/o proteínas, ARN de células completas, una biblioteca de ARN, o una porción de la misma, por ejemplo, una biblioteca de moléculas de ARN expresadas en un tipo de célula particular, tales como células indiferenciadas, en particular células madre tales como células madre embrionarias, o una fracción de la biblioteca de moléculas de ARN tales como ARN con expresión enriquecida en células indiferenciadas, en particular células madre tales como células madre embrionarias con respecto a células diferenciadas. Por lo tanto, de acuerdo con la enseñanza, el término "ARN" puede incluir una mezcla de moléculas de ARN, ARN de células enteras o una fracción del mismo, que puede obtenerse mediante un proceso que comprende el aislamiento de ARN de células y/o por medios recombinantes en particular por transcripción *in vitro*.

El ARN utilizado de acuerdo con la presente enseñanza puede tener una composición conocida (en esta realización, preferiblemente se sabe qué péptidos o proteínas se expresan mediante el ARN) o la composición del ARN puede ser parcial o totalmente desconocida. Alternativamente, el ARN utilizado de acuerdo con la presente enseñanza puede tener una función conocida o la función del ARN puede ser parcial o totalmente desconocida.

Preferiblemente, de acuerdo con la enseñanza, el ARN a expresar en una célula se introduce en dicha célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente *in vitro*. El ARN se puede introducir en una célula antes, después y/o simultáneamente

con proporcionar un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* a la célula. Preferiblemente, un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* se proporciona siempre que se desee la expresión del ARN en la célula. En una realización de los métodos de acuerdo con la enseñanza, el ARN que se va a introducir en una célula se obtiene mediante transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN apropiada.

De acuerdo con la enseñanza, el ARN se puede introducir en las células ya sea *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente *in vitro*. Las células en las que se introduce el ARN *in vitro* pueden, preferiblemente después de la expresión del ARN *in vitro* por los métodos de la enseñanza, ser administrado a un paciente.

El término "transfección" se refiere a la introducción de ácidos nucleicos, en particular ARN, en una célula. Para los fines de la presente enseñanza, el término "transfección" también incluye la introducción de un ácido nucleico en una célula o la absorción de un ácido nucleico por dicha célula, en donde la célula puede estar presente en un sujeto, por ejemplo, un paciente. Por lo tanto, de acuerdo con la presente enseñanza, una célula para la transfección de un ácido nucleico descrito en el presente documento puede estar presente *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, la célula puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo de un paciente. De acuerdo con la enseñanza, la transfección puede ser transitoria o estable. Para algunas aplicaciones de transfección, es suficiente que el material genético transfectado se exprese sólo de forma transitoria. Dado que el ácido nucleico introducido en el proceso de transfección normalmente no está integrado en el genoma nuclear, el ácido nucleico extraño se diluirá mediante mitosis o se degradará. Las células que permiten la amplificación episomal de ácidos nucleicos reducen en gran medida la tasa de dilución. Si se desea que el ácido nucleico transfectado permanezca realmente en el genoma de la célula y sus células hijas, debe producirse una transfección estable. El ARN se puede transfectar en células para expresar transitoriamente su proteína codificada.

De acuerdo con la presente enseñanza, se puede utilizar cualquier técnica útil para introducir, es decir, transferir o transfectar, ácidos nucleicos en células. Preferiblemente, el ARN se transfecta en células mediante técnicas estándar. Dichas técnicas incluyen electroporación, lipofección y microinyección. En una realización particularmente preferida de la presente enseñanza, el ARN se introduce en las células mediante electroporación. La electroporación o electroporación se refiere a un aumento significativo de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular causado por un campo eléctrico aplicado externamente. Suele utilizarse en biología molecular como una forma de introducir alguna sustancia en una célula. De acuerdo con la enseñanza, se prefiere que la introducción de un ácido nucleico que codifica una proteína o un péptido en las células dé como resultado la expresión de dicha proteína o péptido.

Una célula puede expresar el péptido o proteína codificado intracelularmente (por ejemplo, en el citoplasma y/o en el núcleo), puede secretar el péptido o proteína codificado, o puede expresarlo en la superficie.

De acuerdo con la presente enseñanza, una célula puede ser una célula aislada o puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo. De acuerdo con la presente enseñanza, la administración de un ácido nucleico se logra como ácido nucleico desnudo o en combinación con un reactivo de administración. Preferiblemente, la administración de ácidos nucleicos se realiza en forma de ácidos nucleicos desnudos. Preferiblemente, el ARN se administra en combinación con sustancias estabilizantes tales como inhibidores de RNasa. La presente enseñanza también prevé la introducción repetida de ácidos nucleicos en las células para permitir la expresión sostenida durante períodos de tiempo prolongados.

De acuerdo con la enseñanza, los ácidos nucleicos pueden dirigirse a células particulares. En tales realizaciones, un vehículo usado para administrar un ácido nucleico a una célula (por ejemplo, un retrovirus o un liposoma) puede tener una molécula diana unida. Por ejemplo, una molécula tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie de la célula diana, o un ligando para un receptor de la célula diana, puede incorporarse o unirse al portador de ácido nucleico. Si se desea la administración de un ácido nucleico mediante liposomas, se pueden incorporar a la formulación de liposomas proteínas que se unen a una proteína de membrana superficial asociada con la endocitosis para permitir el direccionamiento y/o la absorción. Dichas proteínas incluyen proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas que son específicas de un tipo de célula particular, anticuerpos contra proteínas que están internalizadas, proteínas dirigidas a un sitio intracelular y similares.

De acuerdo con la enseñanza, el término "introducir ARN en células" incluye y preferiblemente se refiere a realizaciones en las que el ARN sólo se introduce en una porción de las células y una porción de las células permanece sin transfectar. Si se va a introducir más de una molécula de ARN en las células, por ejemplo, más de una molécula de ARN que expresa un conjunto funcional de factores de reprogramación o ARN que codifica una proteína de interés y ARN que codifica un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana*, el término incluye y preferiblemente se relaciona con realizaciones en las que todas las moléculas de ARN solo se introducen en una porción de las células y una porción de las células permanece sin transfectar o permanece transfectada por no todas dichas moléculas de ARN. En cualquier caso, si de acuerdo con las enseñanzas se va a introducir más de una molécula de ARN en las células, por ejemplo, más de una molécula de ARN que expresa un conjunto funcional de factores de reprogramación, el objetivo es introducir todas las moléculas de ARN en una célula, por ejemplo, para expresar un conjunto funcional de factores de reprogramación dentro de una sola célula.

Términos tales como "mejora de la viabilidad celular", "viabilidad celular mejorada" o "viabilidad celular aumentada" significan en el contexto de la presente enseñanza que la cantidad de células viables o vivas bajo ciertas condiciones es mayor que la cantidad de células viables o vivas bajo otras condiciones, en donde el cultivo se realiza bajo las mismas condiciones excepto la condición que da como resultado una viabilidad celular mejorada o aumentada, tal como proporcionar un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* a una célula versus no proporcionar un factor derivado de virus que comprenda proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* a una célula. En este contexto, "mismas condiciones" se refiere a una situación en la que se usan las mismas células, las células se cultivan en las mismas condiciones (excepto la condición que da como resultado una viabilidad celular mejorada o aumentada) y la viabilidad celular se mide mediante los mismos medios. "Mismas condiciones" también abarca la introducción o introducción repetitiva de ARN en las células.

El término "célula" o "célula huésped" se refiere preferiblemente a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales tales como enzimas, orgánulos o material genético. Una célula intacta es preferentemente una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferiblemente dicho término se refiere de acuerdo con la enseñanza a cualquier célula que pueda transformarse o transfectarse con un ácido nucleico exógeno. El término "célula" incluye, de acuerdo con la enseñanza, células procariotas (por ejemplo, *E. coli*) o células eucariotas. Se prefieren especialmente células de mamíferos, como células de seres humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras y primates. Las células pueden derivarse de una multiplicidad de tipos de tejido y comprender células primarias y líneas celulares. Ejemplos específicos incluyen queratinocitos, leucocitos de sangre periférica, células madre de médula ósea y células madre embrionarias. En otras realizaciones, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago. En una realización, la célula es una célula somática como se describe en el presente documento. En una realización, la célula es una célula que tiene una función de barrera. Preferiblemente, la célula es un fibroblasto tal como un fibroblasto descrito en el presente documento, un queratinocito, una célula epitelial o una célula endotelial tal como una célula endotelial del corazón, una célula endotelial del pulmón o una célula endotelial de la vena umbilical. Preferiblemente, la célula es una célula humana.

Un fibroblasto es un tipo de célula que sintetiza la matriz extracelular y el colágeno y desempeña un papel fundamental en la cicatrización de heridas. La función principal de los fibroblastos es mantener la integridad estructural de los tejidos conectivos mediante la secreción continua de precursores de la matriz extracelular. Los fibroblastos son las células más comunes del tejido conectivo en los animales. Los fibroblastos son morfológicamente heterogéneos con diversas apariencias de acuerdo con su ubicación y actividad.

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

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

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

El término "recombinante" en el contexto de la presente enseñanza significa "elaborado mediante ingeniería genética". Preferiblemente, un "objeto recombinante", tal como una célula recombinante en el contexto de la presente enseñanza, no se produce de forma natural.

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

El ARN que se va a expresar en una célula codifica uno o más péptidos o proteínas de interés. En consecuencia, el ARN puede contener uno o más marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican uno o más péptidos o proteínas de interés. El ARN que se va a expresar en una célula puede codificar una variedad de péptidos o proteínas de interés, en particular péptidos o proteínas que son de interés cuando se expresan en un tipo de célula particular ya que pueden realizar una función particular cuando se expresan en dicho tipo de célula.

De acuerdo con la presente enseñanza, el término "péptido" comprende oligopéptidos y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferiblemente 3 o más, preferiblemente 4 o más, preferiblemente 6 o más, preferiblemente 8 o más, preferiblemente 10 o más, preferiblemente 13 o más, preferiblemente 16 o más,

preferiblemente 20 o más y hasta preferiblemente 50, preferiblemente 100 o preferiblemente 150 aminoácidos consecutivos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferiblemente péptidos que tienen al menos 151 aminoácidos, pero los términos "péptido" y "proteína" se usan en el presente documento normalmente como sinónimos.

- 5 Los términos "péptido" y "proteína" comprenden de acuerdo con las enseñanzas sustancias que contienen no sólo componentes de aminoácidos sino también componentes no aminoácidos tales como azúcares y estructuras de fosfato, y también comprenden sustancias que contienen enlaces tales como enlaces éster, tioéter o disulfuro.

- 10 El ARN de acuerdo con la presente enseñanza puede codificar un único péptido o proteína, o múltiples péptidos o proteínas. Se pueden codificar múltiples péptidos o proteínas como un único polipéptido (polipéptido de fusión) o como péptidos o proteínas separados. Una poliproteína o polipéptido de fusión puede comprender polipéptidos individuales separados por un sitio de escisión de proteasa opcionalmente autocatalítica (por ejemplo, proteína 2A del virus de la fiebre aftosa), o una inteína.

De acuerdo con la enseñanza, en una realización, el ARN comprende o consiste en ARN farmacéuticamente activo. Un "ARN farmacéuticamente activo" puede ser un ARN que codifica un péptido o proteína farmacéuticamente activo.

- 15 Un "péptido o proteína farmacéuticamente activo" tiene un efecto positivo o ventajoso sobre la condición o estado de enfermedad de un sujeto cuando se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Preferiblemente, un péptido o proteína farmacéuticamente activo tiene propiedades curativas o paliativas y puede administrarse para mejorar, aliviar, mitigar, revertir, retrasar la aparición o disminuir la gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno. Un péptido o proteína farmacéuticamente activo puede tener propiedades profilácticas y puede usarse para retrasar la aparición de una enfermedad o para disminuir la gravedad de dicha enfermedad o condición patológica.
- 20 El término "péptido o proteína farmacéuticamente activo" incluye proteínas o polipéptidos completos, y también puede referirse a fragmentos farmacéuticamente activos de los mismos. También puede incluir análogos farmacéuticamente activos de un péptido o proteína. El término "péptido o proteína farmacéuticamente activo" incluye péptidos y proteínas que son antígenos, es decir, el péptido o proteína provoca una respuesta inmune en un sujeto que puede ser
- 25 terapéutica o parcial o completamente protectora.

En una realización, el péptido o proteína farmacéuticamente activo es o comprende un compuesto inmunológicamente activo o un antígeno o un epítipo.

- De acuerdo con la enseñanza, el término "compuesto inmunológicamente activo" se refiere a cualquier compuesto que altere una respuesta inmune, preferiblemente induciendo y/o suprimiendo la maduración de células inmunes, induciendo y/o suprimiendo la biosíntesis de citocinas y/o alterando la inmunidad humoral estimulando la producción de anticuerpos por las células B. En una realización, la respuesta inmune implica la estimulación de una respuesta de anticuerpos (que generalmente incluye inmunoglobulina G (IgG)). Los compuestos inmunológicamente activos poseen una potente actividad inmunoestimulante que incluye, entre otras, actividad antiviral y antitumoral, y también pueden subregular otros aspectos de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, alejando la respuesta inmunitaria de una respuesta
- 30 inmunitaria TH2, que es útil para tratar una amplia gama de enfermedades mediadas por TH2.

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

- El término "patógeno" se refiere a material biológico patógeno capaz de causar enfermedades en un organismo, preferiblemente un organismo vertebrado. Los patógenos incluyen microorganismos como bacterias, organismos eucariotas unicelulares (protozoos), hongos, así como virus.
- 55

Los términos "epítipo", "péptido antigénico", "epítipo antigénico", "péptido inmunogénico" y "péptido de unión al MHC" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un determinante antigénico en una molécula tal

como un antígeno, es decir, a una parte en o fragmento de un compuesto inmunológicamente activo que es reconocido por el sistema inmunológico, por ejemplo, que es reconocido por una célula T, en particular cuando se presenta en el contexto de moléculas del MHC. Un epítipo de una proteína comprende preferiblemente una porción continua o discontinua de dicha proteína y tiene preferiblemente entre 5 y 100, preferiblemente entre 5 y 50, más preferiblemente entre 8 y 30, lo más preferiblemente entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítipo puede tener preferiblemente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud. De acuerdo con la enseñanza, un epítipo puede unirse a moléculas del MHC tales como moléculas del MHC en la superficie de una célula y, por lo tanto, puede ser un "péptido de unión al MHC" o un "péptido antigénico". El término "complejo principal de histocompatibilidad" y la abreviatura "MHC" incluyen moléculas del MHC de clase I y MHC de clase II y se refieren a un complejo de genes que está presente en todos los vertebrados. Las proteínas o moléculas del MHC son importantes para la señalización entre linfocitos y células presentadoras de antígenos o células enfermas en reacciones inmunes, en las que las proteínas o moléculas del MHC se unen a péptidos y los presentan para su reconocimiento por los receptores de células T. Las proteínas codificadas por el MHC se expresan en la superficie de las células y muestran tanto antígenos propios (fragmentos peptídicos de la propia célula) como antígenos no propios (por ejemplo, fragmentos de microorganismos invasores) en una célula T. Preferiblemente tales porciones inmunogénicas se unen a una molécula del MHC de clase I o clase II. Como se usa en el presente documento, se dice que una porción inmunogénica "se une" a una molécula del MHC de clase I o clase II si dicha unión es detectable usando cualquier ensayo conocido en la técnica. El término "péptido de unión al MHC" se refiere a un péptido que se une a una molécula del MHC de clase I y/o una molécula del MHC de clase II. En el caso de complejos del MHC de clase I/péptido, los péptidos de unión tienen típicamente una longitud de 8-10 aminoácidos, aunque pueden ser eficaces péptidos más largos o más cortos. En el caso de los complejos del MHC de clase II/péptido, los péptidos de unión tienen típicamente una longitud de 10-25 aminoácidos y, en particular, una longitud de 13-18 aminoácidos, mientras que los péptidos más largos y más cortos pueden ser eficaces.

En una realización, la proteína de interés de acuerdo con la presente enseñanza comprende un epítipo adecuado para la vacunación de un organismo diana. Un experto en la materia sabrá que uno de los principios de la inmunobiología y la vacunación se basa en el hecho de que una reacción inmunoprotectora frente a una enfermedad se produce inmunizando un organismo con un antígeno, que es inmunológicamente relevante con respecto a la enfermedad que se va a tratar. De acuerdo con la presente enseñanza, un antígeno se selecciona del grupo que comprende un antígeno propio y un antígeno no propio. Un antígeno no propio es preferiblemente un antígeno bacteriano, un antígeno viral, un antígeno de hongo, un alérgeno o un antígeno de parásito. Se prefiere que el antígeno comprenda un epítipo que sea capaz de provocar una respuesta inmune en un organismo diana. Por ejemplo, el epítipo puede provocar una respuesta inmune contra una bacteria, un virus, un hongo, un parásito, un alérgeno o un tumor.

En algunas realizaciones, el antígeno no propio es un antígeno bacteriano. En algunas realizaciones, el antígeno provoca una respuesta inmune contra una bacteria que infecta animales, incluidas aves, peces y mamíferos, incluidos animales domésticos. Preferiblemente, la bacteria contra la cual se provoca la respuesta inmune es una bacteria patógena.

En algunas realizaciones, el antígeno no propio es un antígeno viral. Un antígeno viral puede ser, por ejemplo, un péptido de una proteína de superficie de virus, por ejemplo, un polipéptido de cápside o un polipéptido de espiga. En algunas realizaciones, el antígeno provoca una respuesta inmune contra un virus que infecta animales, incluidas aves, peces y mamíferos, incluidos animales domésticos. Preferiblemente, el virus contra el cual se provoca la respuesta inmune es un virus patógeno.

En algunas realizaciones, el antígeno no propio es un polipéptido o una proteína de un hongo. En algunas realizaciones, el antígeno provoca una respuesta inmune contra un hongo que infecta animales, incluidas aves, peces y mamíferos, incluidos animales domesticados. Preferiblemente, el hongo contra el cual se provoca la respuesta inmune es un hongo patógeno.

En algunas realizaciones, el antígeno no propio es un polipéptido o proteína de un parásito eucariota unicelular. En algunas realizaciones, el antígeno provoca una respuesta inmune contra un parásito eucariota unicelular, preferiblemente un parásito eucariota unicelular patógeno. Los parásitos eucariotas unicelulares patógenos pueden ser, por ejemplo, del género *Plasmodium*, por ejemplo, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*, del género *Leishmania*, o del género *Trypanosoma*, por ejemplo, *T. cruzi* o *T. brucei*.

En algunas realizaciones, el antígeno no propio es un polipéptido alergénico o una proteína alergénica. Una proteína alergénica o un polipéptido alergénico es adecuado para la inmunoterapia con alérgenos, también conocida como hiposensibilización.

En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno propio, particularmente un antígeno tumoral. Los antígenos tumorales y su determinación son conocidos por el experto.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "antígeno tumoral" o "antígeno asociado a tumores" se refiere a proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en un número limitado de tejidos y/u órganos o en etapas de desarrollo específicas, por ejemplo, el antígeno tumoral puede expresarse en condiciones normales

específicamente en tejido del estómago, preferiblemente en la mucosa gástrica, en órganos reproductivos, por ejemplo, en testículos, en tejido trofoblástico, por ejemplo, en placenta, o en células de la línea germinal, y se expresan o se expresan de manera aberrante en uno o más tejidos tumorales o cancerosos. En este contexto, "un número limitado" significa preferiblemente no más de 3, más preferiblemente no más de 2. Los antígenos tumorales en el contexto de la presente enseñanza incluyen, por ejemplo, antígenos de diferenciación, preferiblemente antígenos de diferenciación específicos de tipo celular, es decir, proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en un determinado tipo de célula en una determinada etapa de diferenciación, antígenos de cáncer/testículo, es decir, proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en los testículos y, a veces, en la placenta, y antígenos específicos de la línea germinal. En el contexto de la presente enseñanza, el antígeno tumoral está asociado preferentemente a la superficie celular de una célula cancerosa y preferentemente no se expresa o sólo raramente se expresa en tejidos normales. Preferiblemente, el antígeno tumoral o la expresión aberrante del antígeno tumoral identifica células cancerosas. En el contexto de la presente enseñanza, el antígeno tumoral que expresa una célula cancerosa en un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad cancerosa, es preferiblemente una proteína propia en dicho sujeto. En realizaciones preferidas, el antígeno tumoral en el contexto de la presente enseñanza se expresa en condiciones normales específicamente en un tejido u órgano que no es esencial, es decir, tejidos u órganos que cuando son dañados por el sistema inmunológico no conducen a la muerte del sujeto, o en órganos o estructuras del cuerpo a los que el sistema inmunológico no puede acceder o que lo hace difícilmente. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del antígeno tumoral es idéntica entre el antígeno tumoral que se expresa en tejidos normales y el antígeno tumoral que se expresa en tejidos cancerosos.

Ejemplos de antígenos tumorales que pueden ser útiles en la presente enseñanza son p53, ART-4, BAGE, beta-catenina/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, las proteínas de la superficie celular de la familia de las claudinas, tales como CLAUDINA-6, CLAUDINA-18.2 y CLAUDINA-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (o hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, preferiblemente MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11 o MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, Miosina/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, BCR-abL menor de p190, Pm1/RARa, PRAME, proteinasa 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVINA, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE y WT. Los antígenos tumorales particularmente preferidos incluyen CLAUDINA-18.2 (CLDN18.2) y CLAUDINA-6 (CLDN6).

Si, de acuerdo con la presente enseñanza, se desea inducir o potenciar una respuesta inmune mediante el uso de ARN como se describe en el presente documento, los antígenos o epítomos codificados por el ARN o sus productos de procesamiento pueden presentarse mediante proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) expresadas en las células presentadoras de antígeno tales como las células dendríticas. El complejo peptídico del MHC puede luego ser reconocido por células inmunitarias, tales como las células T, lo que lleva a su activación. Por lo tanto, las células preferidas utilizadas en relación con el ARN que codifica proteínas o péptidos antigénicos son células presentadoras de antígenos tales como células dendríticas.

Por lo tanto, la presente enseñanza prevé realizaciones en las que el ARN que codifica un antígeno se introduce en células presentadoras de antígeno *ex vivo*, por ejemplo, células presentadoras de antígeno tomadas de un paciente, para expresar el antígeno, y las células presentadoras de antígeno, opcionalmente propagadas clonalmente *ex vivo*, se trasplantan a un paciente, por ejemplo, al mismo paciente. Las células transfectadas pueden introducirse en un paciente usando cualquier medio conocido en la técnica, preferiblemente en forma estéril mediante administración intravenosa, intracavitaria, intraperitoneal o intratumoral.

En una realización, el ARN que codifica un antígeno se puede administrar a un mamífero, en particular si se desea tratar un mamífero que tiene una enfermedad que involucra al antígeno. Se puede administrar adicionalmente el mismo ARN puede contener un marco de lectura abierto que codifica un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* o ARN que contiene un marco de lectura abierto que codifica un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana*. El ARN es absorbido por las células presentadoras de antígenos del mamífero (monocitos, macrófagos, células dendríticas u otras células). Se forma un producto de traducción antigénico del ARN y el producto se muestra en la superficie de las células para su reconocimiento por las células T.

Los métodos de la enseñanza pueden implicar una célula presentadora de antígeno para expresar el ARN que codifica el antígeno. Con este fin, los métodos de la enseñanza pueden implicar la introducción de antígenos que codifican ARN en células presentadoras de antígenos tales como células dendríticas. Para la transfección de células presentadoras de antígenos tales como células dendríticas, se puede utilizar una composición farmacéutica que comprende ARN que codifica el antígeno. Se puede administrar a un paciente un vehículo de administración que dirige el ARN a una célula dendrítica u otra célula presentadora de antígeno, lo que da como resultado una transfección que se produce *in vivo*.

En algunas realizaciones, no se requiere que el péptido o proteína farmacéuticamente activo sea un antígeno que provoque una respuesta inmune. Se pueden seleccionar proteínas o péptidos farmacéuticamente activos adecuados del grupo que consiste en citocinas y proteínas del sistema inmunológico tales como compuestos inmunológicamente activos (por ejemplo, interleucinas, factor estimulante de colonias (CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos

(G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina, factor de necrosis tumoral (TNF), interferones, integrinas, adesinas, selectinas, receptores de localización, receptores de células T, inmunoglobulinas), hormonas (insulina, hormona tiroidea, catecolaminas, gonadotropinas, hormonas tróficas, prolactina, oxitocina, dopamina, somatotropina bovina, leptinas y similares), hormonas de crecimiento (por ejemplo, hormona de crecimiento humana), factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento similar a la insulina y similares), receptores de factores de crecimiento, enzimas (activador del plasminógeno tisular, estreptoquinasa, colesterol biosintético o degradativo, enzimas esteroideogénicas, quinasas, fosfodiesterasas, metilasas, desmetilasas, deshidrogenasas, celulasas, proteasas, lipasas, fosfolipasas, aromatasas, citocromos, adenilato o guanilato ciclasas, neuramidasa y similares), receptores (receptores de hormonas esteroideas, receptores de péptidos), proteínas de unión (proteínas de unión a hormona de crecimiento o factores de crecimiento y similares), factores de transcripción y traducción, proteínas supresoras del crecimiento tumoral (por ejemplo, proteínas que inhiben la angiogénesis), proteínas estructurales (tales como colágeno, fibroína, fibrinógeno, elastina, tubulina, actina y miosina), proteínas sanguíneas (trombina, albúmina sérica, factor VII, factor VIII, insulina, factor IX, factor X, activador tisular del plasminógeno, proteína C, factor de von Willebrand, antitrombina III, glucocerebrosidasa, factor estimulante de colonias de granulocitos de eritropoyetina (G-CSF) o factor VIII modificado, anticoagulantes y similares. En una realización, la proteína farmacéuticamente activa de acuerdo con la enseñanza es una citocina que participa en la regulación de la homeostasis linfóide, preferiblemente una citocina que participa y preferiblemente induce o mejora el desarrollo, cebado, expansión, diferenciación y/o supervivencia de células T. En una realización, la citocina es una interleucina, por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 o IL-21.

Las células que expresan un péptido o proteína como se describe en el presente documento pueden usarse en el tratamiento terapéutico o profiláctico de diversas enfermedades, en particular enfermedades en las que el suministro de dicho péptido o proteína da como resultado un efecto terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, la expresión de un antígeno que se deriva de un virus puede ser útil en el tratamiento de una enfermedad viral causada por dicho virus. La expresión de un antígeno tumoral puede ser útil en el tratamiento de una enfermedad cancerosa en la que las células cancerosas expresan dicho antígeno tumoral.

El término "enfermedad" se refiere a una condición anormal que afecta el cuerpo de un individuo. Una enfermedad a menudo se interpreta como una condición médica asociada con síntomas y signos específicos. Una enfermedad puede ser causada por factores originalmente de una fuente externa, tal como una enfermedad infecciosa, o puede ser causada por disfunciones internas, tales como enfermedades autoinmunes.

De acuerdo con la enseñanza, el término "enfermedad" también se refiere a enfermedades cancerosas. Los términos "enfermedad cancerosa" o "cáncer" (término médico: neoplasia maligna) se refieren a una clase de enfermedades en las que un grupo de células muestran un crecimiento descontrolado (división más allá de los límites normales), invasión (intrusión y destrucción de tejidos adyacentes) y, a veces, metástasis (diseminación a otras partes del cuerpo a través de la linfa o la sangre). Estas tres propiedades malignas de los cánceres los diferencian de los tumores benignos, que son autolimitados y no invaden ni hacen metástasis. La mayoría de los cánceres forman un tumor, es decir, una hinchazón o lesión formada por un crecimiento anormal de células (llamadas células neoplásicas o células tumorales), pero algunos, como la leucemia, no lo hacen. Ejemplos de cánceres incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, glioma y leucemia. Más particularmente, ejemplos de tales cánceres incluyen cáncer de huesos, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de glándula tiroidea, cáncer de glándula paratiroidea, cáncer de glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma hipofisario. El término "cáncer" de acuerdo con la enseñanza también comprende metástasis de cáncer.

El término "enfermedad infecciosa" se refiere a cualquier enfermedad que puede transmitirse de un individuo a otro o de un organismo a otro y está causada por un agente microbiano (por ejemplo, un resfriado común). Ejemplos de enfermedades infecciosas incluyen enfermedades infecciosas virales, tales como el SIDA (VIH), hepatitis A, B o C, herpes, herpes zoster (varicela), sarampión alemán (virus de la rubéola), fiebre amarilla, dengue, etc., flavivirus, virus de la influenza, enfermedades infecciosas hemorrágicas (virus de Marburg o Ébola) y síndrome respiratorio agudo severo (SARS), enfermedades infecciosas bacterianas, como la enfermedad del legionario (*Legionella*), enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia o gonorrea), úlcera gástrica (*Helicobacter*), cólera (*Vibrio*), tuberculosis, difteria, infecciones por *E. coli*, *Staphylococci*, *Salmonella* o *Streptococci* (tétanos); infecciones por protozoos patógenos como malaria, enfermedad del sueño, leishmaniasis; toxoplasmosis, es decir infecciones por *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Toxoplasma*; o infecciones por hongos, que son causadas, por ejemplo, por *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* o *Candida albicans*.

El término "enfermedad autoinmune" se refiere a cualquier enfermedad en la que el cuerpo produce una respuesta inmunogénica (es decir, sistema inmunológico) a algún constituyente de su propio tejido. En otras palabras, el sistema inmunológico pierde su capacidad de reconocer algún tejido o sistema dentro del cuerpo como propio y lo ataca como si fuera extraño. Las enfermedades autoinmunes se pueden clasificar en aquellas en las que predominantemente un

órgano está afectado (por ejemplo, anemia hemolítica y tiroiditis antiinmune) y aquellas en las que el proceso de la enfermedad autoinmune se difunde a través de muchos tejidos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico). Por ejemplo, se cree que la esclerosis múltiple es causada por células T que atacan las fundas que rodean las fibras nerviosas del cerebro y la médula espinal. Esto resulta en pérdida de coordinación, debilidad y visión borrosa. Las enfermedades autoinmunitarias son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumática, anemia hemolítica, tiroiditis antiinmunitaria, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis, diabetes, esclerodermia, psoriasis y similares.

El ARN descrito en el presente documento también es útil para expresar un receptor de células T o un receptor de células T artificial en una célula, en particular una célula efectora inmune tal como una célula T *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, en una realización, el péptido o proteína codificado por el ARN descrito en el presente documento es una o más cadenas de un receptor de células T o de un receptor de células T artificial.

Las células modificadas para expresar dicho receptor de células T o receptor de células T artificial son útiles en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la expresión de antígenos tales como los antígenos descritos en el presente documento unidos por el receptor de células T o el receptor de células T artificial, en particular enfermedades como se describe en el presente documento. La terapia de transferencia celular adoptiva con células T modificadas que expresan receptores de células T o receptores de células T artificiales es una terapia prometedora. Por ejemplo, las células T del paciente pueden diseñarse genéticamente (modificarse genéticamente) para expresar receptores de células T o receptores de células T artificiales dirigidos específicamente hacia antígenos en las células enfermas del paciente, y luego infundirse nuevamente en el paciente.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente enseñanza proporciona un método para producir una célula inmunorreactiva que comprende la etapa de introducir en una célula T o un progenitor de la misma una o más moléculas de ARN que codifican las cadenas de un receptor de célula T o la(s) cadena(s) de un receptor de células T artificial, y proporcionar un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de proteína NSs del virus *Toscana* a la célula.

El término "célula inmunorreactiva" o "célula efectora inmune" en el contexto de la presente enseñanza se refiere a una célula que ejerce funciones efectoras durante una reacción inmune. Una "célula inmunorreactiva" preferiblemente es capaz de unirse a un antígeno tal como un antígeno expresado en la superficie de una célula o presentado en la superficie de una célula en el contexto de moléculas del MHC y mediar una respuesta inmune. Por ejemplo, dichas células secretan citocinas y/o quimiocinas, destruyen microbios, secretan anticuerpos, reconocen células infectadas o cancerosas y, opcionalmente, eliminan dichas células. Por ejemplo, las células inmunorreactivas comprenden células T (células T citotóxicas, células T cooperadoras, células T infiltrantes de tumores), células B, células asesinas naturales, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Preferiblemente, en el contexto de la presente enseñanza, las "células inmunorreactivas" son células T, preferiblemente células T CD4+ y/o CD8+. De acuerdo con la enseñanza, el término "célula inmunorreactiva" también incluye una célula que puede madurar hasta convertirse en una célula inmune (tal como una célula T, en particular una célula T colaboradora o una célula T citolítica) con una estimulación adecuada. Las células inmunorreactivas comprenden células madre hematopoyéticas CD34+, células T maduras e inmaduras y células B maduras e inmaduras. La diferenciación de los precursores de células T en células T citolíticas, cuando se exponen a un antígeno, es similar a la selección clonal del sistema inmunológico.

La mayoría de las células T tienen un receptor de células T (TCR) que existe como un complejo de varias proteínas. El receptor de células T real está compuesto por dos cadenas peptídicas separadas, que se producen a partir de los genes alfa y beta del receptor de células T independientes (TCR α y TCR β) y se denominan cadenas α y β -TCR. Las células T $\gamma\delta$ (células T gamma delta) representan un pequeño subconjunto de células T que poseen un receptor de células T (TCR) distinto en su superficie. Sin embargo, en las células T $\gamma\delta$, el TCR está formado por una cadena γ y una cadena δ . Este grupo de células T es mucho menos común (2 % del total de células T) que las células T $\alpha\beta$. En una realización preferida de la enseñanza, un receptor de células T comprende cadenas de TCR α y β . El ARN que codifica las cadenas α y β de un receptor de células T puede estar contenido en moléculas de ácido nucleico separadas, es decir, moléculas de ARN o, alternativamente, en una única molécula de ARN. En consecuencia, la expresión de un receptor de células T en una célula requiere la cotransfección de moléculas de ARN separadas que codifican las diferentes cadenas de receptores de células T o la transfección de sólo un tipo de molécula de ARN que codifica las diferentes cadenas de receptores de células T.

Se han producido receptores modificados, denominados en el presente documento "receptores de células T artificiales", "receptores de antígeno quimérico (CAR)" o "receptores de células T quiméricos", que confieren una especificidad arbitraria tal como la especificidad de un anticuerpo monoclonal sobre una célula efectora inmune tal como una célula T. Tales células T no requieren necesariamente el procesamiento y la presentación de un antígeno para el reconocimiento de la célula diana, sino que pueden reconocer cualquier antígeno presente en una célula diana. De acuerdo con la enseñanza, un receptor de células T artificial puede comprender un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, porciones de anticuerpos que se unen a antígeno y receptores de células T tales como fragmentos variables monocatenarios (scFv), un dominio de señalización de células T, por ejemplo, el endodominio de CD3-zeta, y opcionalmente uno o más dominios de coestimulación, por ejemplo, CD28, CD137 (4-1 BB), CD134 (OX40) y CD278 (ICOS).

El ARN descrito en el presente documento también es útil para reprogramar o desdiferenciar células somáticas en células similares a células madre, es decir, células que tienen características de células madre *in vitro* o *in vivo*. Esto puede implicar la expresión transitoria de factores de reprogramación *in vitro* o *in vivo* para iniciar procesos de reprogramación o desdiferenciación en las células. Por lo tanto, en una realización, el péptido o proteína codificado por el ARN descrito en el presente documento es un factor que permite la reprogramación de células somáticas en células que tienen características de células madre. Se pueden proporcionar células similares a células madre de acuerdo con la enseñanza sin generar embriones o fetos. La desdiferenciación de células somáticas a células que tienen características de células madre, en particular pluripotencia, se puede efectuar introduciendo factores codificantes de ARN que inducen la desdiferenciación de células somáticas en células somáticas (también denominados factores de transcripción de reprogramación (rTF) o factores de reprogramación) y cultivar las células somáticas permitiendo que las células se desdiferencien. Después de desdiferenciarse, se podría inducir a las células a volver a diferenciarse en el mismo tipo de célula somática o en uno diferente, como tipos de células neuronales, hematopoyéticas, musculares, epiteliales y de otro tipo. Por lo tanto, dichas células similares a células madre tienen aplicaciones médicas para el tratamiento de enfermedades degenerativas mediante "terapia celular" y pueden utilizarse en nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de trastornos cardíacos, neurológicos, endocrinológicos, vasculares, retinianos, dermatológicos, musculoesqueléticos y otras enfermedades.

Por consiguiente, la enseñanza también se refiere a un método para proporcionar células que tienen características de células madre que comprende las etapas de (i) proporcionar una población celular que comprende células somáticas, (ii) proporcionar un factor derivado de virus que comprende proteína NSs del virus *Toscana* o una variante funcional de virus de la proteína NSs del virus *Toscana* a las células somáticas, (iii) introducir ARN que codifica uno o más factores de reprogramación en las células somáticas, y (iv) permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre.

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

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

En una realización, la etapa de permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre comprende cultivar las células somáticas en condiciones de cultivo de células madre embrionarias.

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

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

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

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

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

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

En una realización, la introducción de ARN que codifica factores de reprogramación como se divulga en el presente documento en células somáticas da como resultado la expresión de dichos factores durante un período de tiempo prolongado, preferiblemente durante al menos 10 días, preferiblemente durante al menos 11 días y más preferiblemente durante al menos 12 días. Para lograr dicha expresión a largo plazo, preferiblemente se introduce ARN periódicamente (es decir, repetitivamente) en las células más de una vez, preferiblemente usando electroporación. Preferiblemente, el ARN se introduce en las células al menos dos veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, incluso más preferiblemente al menos 5 veces hasta preferiblemente 6 veces, más preferiblemente hasta 7 veces o incluso hasta 8, 9 o 10 veces, preferiblemente durante un período de tiempo de al menos 10 días, preferiblemente durante al menos 11 días y más preferiblemente durante al menos 12 días para asegurar la expresión de uno o más factores durante un período de tiempo prolongado. Preferiblemente, los períodos de tiempo que transcurren entre las introducciones repetidas del ARN son de 24 horas a 120 horas, preferiblemente de 48 horas a 96 horas. En una realización, los períodos de tiempo que transcurren entre las introducciones repetidas del ARN no superan las 72 horas, preferiblemente no superan las 48 horas o 36 horas.

En una realización, antes de la siguiente electroporación, se permite que las células se recuperen de la electroporación anterior. En cualquier caso, se deben seleccionar las condiciones para que los factores se expresen en las células en cantidades y durante periodos de tiempo que apoyen el proceso de reprogramación.

5 Una "célula madre" es una célula con la capacidad de autorrenovarse, permanecer indiferenciada y diferenciarse. Una célula madre puede dividirse sin límite, al menos durante toda la vida del animal en el que reside naturalmente. Una célula madre no está diferenciada terminalmente; no se encuentra en la etapa final de una vía de diferenciación. Cuando una célula madre se divide, cada célula hija puede seguir siendo una célula madre o emprender un curso que conduzca hacia la diferenciación terminal.

10 Las células madre totipotentes son células que tienen propiedades de diferenciación totipotencial y son capaces de desarrollarse hasta convertirse en un organismo completo. Esta propiedad la poseen las células hasta la etapa de 8 células después de la fertilización del ovocito por el espermatozoide. Cuando estas células se aíslan y se trasplantan al útero, pueden convertirse en un organismo completo.

15 Las células madre pluripotentes son células capaces de desarrollarse en diversas células y tejidos derivados de las capas ectodérmica, mesodérmica y endodérmica. Las células madre pluripotentes que se derivan de la masa celular interna ubicada dentro de los blastocistos, generadas entre 4-5 días después de la fertilización, se denominan "células madre embrionarias" y pueden diferenciarse en otras células de tejido, pero no pueden formar nuevos organismos vivos.

20 Las células madre multipotentes son células madre que normalmente se diferencian únicamente en tipos de células específicas de su tejido y órgano de origen. Las células madre multipotentes participan no sólo en el crecimiento y desarrollo de diversos tejidos y órganos durante los períodos fetal, neonatal y adulto, sino también en el mantenimiento de la homeostasis del tejido adulto y en la función de inducir la regeneración tras el daño tisular. Las células multipotentes específicas de tejido se denominan colectivamente "células madre adultas".

25 Una "célula madre embrionaria" o "ESC" es una célula madre que está presente en un embrión o está aislada de él. Puede ser pluripotente, con capacidad de diferenciarse en todas y cada una de las células presentes en el organismo, o multipotente, con capacidad de diferenciarse en más de un tipo celular.

Tal como se utiliza en el presente documento, "embrión" se refiere a un animal en las primeras etapas de su desarrollo. Estas etapas se caracterizan por la implantación y la gastrulación, donde se definen y establecen las tres capas germinales, y por la diferenciación de las capas germinales en los respectivos órganos y sistemas de órganos. Las tres capas germinales son el endodermo, ectodermo y mesodermo.

30 Un "blastocisto" es un embrión en una etapa temprana de desarrollo en el que el óvulo fertilizado se ha escindido y se está formando, o ya se ha formado, una capa esférica de células que rodea una cavidad llena de líquido. Esta capa esférica de células es el trofotodermo. Dentro del trofotodermo hay un grupo de células denominado masa celular interna (ICM). El trofotodermo es el precursor de la placenta y el ICM es el precursor del embrión.

35 Una célula madre adulta, también llamada célula madre somática, es una célula madre que se encuentra en un adulto. Una célula madre adulta se encuentra en un tejido diferenciado, puede renovarse y diferenciarse, con algunas limitaciones, para producir tipos de células especializadas de su tejido de origen. Los ejemplos incluyen células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas y células madre neurales.

40 Una "célula diferenciada" es una célula madura que ha experimentado cambios progresivos de desarrollo hacia una forma o función más especializada. La diferenciación celular es el proceso que experimenta una célula a medida que madura hasta convertirse en un tipo de célula abiertamente especializada. Las células diferenciadas tienen características distintas, realizan funciones específicas y es menos probable que se dividan que sus contrapartes menos diferenciadas.

45 Una célula "indiferenciada", por ejemplo, una célula inmadura, embrionaria o primitiva, normalmente tiene una apariencia no específica, puede realizar múltiples actividades no específicas y puede desempeñarse deficientemente, si es que realiza alguna, en funciones que normalmente realizan las células diferenciadas.

"Célula somática" se refiere a todas y cada una de las células diferenciadas y no incluye células madre, células germinales ni gametos. Preferiblemente, "célula somática" como se usa en el presente documento se refiere a una célula terminalmente diferenciada. En una realización, las células somáticas son fibroblastos tales como fibroblastos de pulmón, fibroblastos de prepucio o fibroblastos dérmicos, o queratinocitos.

50 En una realización, las células somáticas son células somáticas derivadas de células madre embrionarias con un fenotipo mesenquimatoso. En una realización preferida, las células somáticas son fibroblastos tales como fibroblastos fetales o fibroblastos posnatales o queratinocitos, preferiblemente queratinocitos derivados de folículos pilosos. En realizaciones adicionales, los fibroblastos son fibroblastos de pulmón, fibroblastos de prepucio o fibroblastos dérmicos. En realizaciones particulares, los fibroblastos son fibroblastos depositados en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de catálogo CCL-186, como se depositan en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de catálogo CRL-2097 o como se depositan en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número

de catálogo CRL-2522, distribuido por SBI System Biosciences con el número de catálogo PC501A-HFF, o distribuido por Innoprot bajo el catálogo no. P10857. En una realización, los fibroblastos son fibroblastos dérmicos humanos adultos. Preferiblemente, las células somáticas son células humanas. De acuerdo con la presente enseñanza, las células somáticas pueden modificarse genéticamente.

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

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

- 10 Tal como se utiliza en el presente documento, "desdiferenciación" se refiere a la pérdida de especialización en forma o función. En las células, la desdiferenciación conduce a una célula menos comprometida.

Como se utiliza en el presente documento, "reprogramación" se refiere al restablecimiento del programa genético de una célula. Una célula reprogramada preferentemente presenta pluripotencia.

- 15 Los términos "desdiferenciadas" y "reprogramadas" o términos similares se usan indistintamente en el presente documento para indicar células derivadas de células somáticas que tienen características de células madre. Sin embargo, dichos términos no pretenden limitar el tema divulgado en el presente documento por consideraciones mecanicistas o funcionales.

Como se usa en el presente documento, "célula germinal" se refiere a una célula reproductiva tal como un espermatozoido o un ovocito, o una célula que se desarrollará hasta convertirse en una célula reproductiva.

- 20 Como se usa en el presente documento, "pluripotente" se refiere a células que pueden dar lugar a cualquier tipo de célula excepto las células de la placenta u otras células de soporte del útero.

- El término "células que tienen características de células madre" se utiliza en el presente documento para designar células que, aunque se derivan de células somáticas no madre diferenciadas, exhiben una o más características típicas de las células madre, en particular de las células madre embrionarias. Tales características incluyen una morfología de células madre embrionarias, tales como colonias compactas, una proporción elevada de núcleo a citoplasma y núcleolos prominentes, cariotipos normales, expresión de actividad telomerasa, expresión de marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias y/o expresión de genes que son característicos de las células madre embrionarias. Los marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias se seleccionan, por ejemplo, del grupo que consiste en antígeno embrionario 3 específico de etapa (SSEA-3), SSEA-4, antígeno 1-60 relacionado con tumores (TRA-1-60), TRA-1-81 y TRA-2-49/6E. Los genes característicos de las células madre embrionarias se seleccionan, por ejemplo, del grupo formado por OCT4 endógeno, NANOG endógeno, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), gen específico de células embrionarias 1 (ESG1), asociado a la pluripotencia del desarrollo 2 (DPPA2), DPPA4 y transcriptasa inversa de telomerasa (TERT). En una realización, la una o más características típicas de las células madre incluyen la pluripotencia. En una realización, las células que tienen características de células madre exhiben un estado pluripotente. En una realización, las células que tienen características de células madre tienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en derivados avanzados de las tres capas germinales primarias. En una realización, la capa germinal primaria es endodermo y el derivado avanzado es tejido epitelial similar al intestino. En una realización adicional, la capa germinal primaria es mesodermo y el derivado avanzado es músculo estriado y/o cartílago. Incluso en una realización adicional, la capa germinal primaria es ectodermo y el derivado avanzado es tejido neural y/o tejido epidérmico. En una realización preferida, las células que tienen características de células madre tienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en células neuronales y/o células cardíacas. De acuerdo con la enseñanza, generalmente los términos "células que tienen características de células madre", "células que tienen propiedades de células madre", "células similares a células madre", "células reprogramadas" y "células desdiferenciadas" o términos similares tienen significados similares y se usan indistintamente en el presente documento.

- El término "factor de reprogramación" de acuerdo con la enseñanza incluye proteínas y péptidos, así como derivados y variantes de los mismos que inducen opcionalmente junto con agentes adicionales tales como factores de reprogramación adicionales la reprogramación de células somáticas en células que tienen características de células madre. Por ejemplo, el término "factor de reprogramación" comprende OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 y c-MYC.

Los factores de reprogramación pueden ser de cualquier especie animal; por ejemplo, mamíferos y roedores. Los ejemplos de mamíferos incluyen, entre otros, primates humanos y no humanos. Los primates incluyen, entre otros, humanos, chimpancés, babuinos, monos cynomolgus y cualquier otro mono del Nuevo o Viejo Mundo. Los roedores incluyen, entre otros, ratones, ratas, cobayas, hamsters y jerbos.

- 55 En una realización de la presente enseñanza, los factores de reprogramación capaces de permitir la reprogramación de células somáticas en células que tienen características de células madre comprenden un conjunto de factores seleccionados del grupo que consiste en (i) OCT4 y SOX2, (ii) OCT4, SOX2 y uno o ambos de NANOG y LIN28, (iii)

OCT4, SOX2 y uno o ambos de KLF4 y c-MYC. En una realización, dichos factores de reprogramación comprenden OCT4, SOX2, NANOG y LIN28, OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC, u OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG y LIN28.

OCT4 es un factor de transcripción de los factores de transcripción POU eucariotas y un indicador de pluripotencia de las células madre embrionarias. Es una proteína de unión a Octámero expresada por la madre. Se ha observado que está presente en los ovocitos, la masa celular interna de los blastocitos y también en la célula germinal primordial. El gen *POU5F1* codifica la proteína OCT4. Los sinónimos del nombre del gen incluyen *OCT3*, *OCT4*, *OTF3* y *MGC22487*. La presencia de OCT4 en concentraciones específicas es necesaria para que las células madre embrionarias permanezcan indiferenciadas. Preferiblemente, "proteína OCT4" o simplemente "OCT4" se refiere a OCT4 humana.

Sox2 es un miembro de la familia de genes Sox (caja HMG relacionada con SRY) que codifica factores de transcripción con un único dominio de unión al ADN de HMG. Se ha descubierto que SOX2 controla las células progenitoras neurales al inhibir su capacidad de diferenciarse. La represión del factor da como resultado la delaminación de la zona ventricular, seguida de una salida del ciclo celular. Estas células también comienzan a perder su carácter progenitor a través de la pérdida de marcadores progenitores y de diferenciación neuronal temprana. Preferiblemente, "proteína SOX2" o simplemente "SOX2" se refiere a la SOX2 humana.

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

LIN28 es una proteína citoplásmica conservada con un par inusual de motivos de unión a ARN: un dominio de choque frío y un par de dedos de zinc CCHC de tipo retroviral. En los mamíferos abunda en diversos tipos de células indiferenciadas. En células de mamíferos pluripotentes, LIN28 se observa en complejos sensibles a RNasa con proteína de unión a poli(A) y en fracciones polisomales de gradientes de sacarosa, lo que sugiere que está asociado con la traducción de ARNm. Preferiblemente, "proteína LIN28" o simplemente "LIN28" se relaciona con LIN28 humana.

El factor tipo Krueppel (KLF4) es un factor de transcripción con dedos de zinc que se expresa fuertemente en células epiteliales posmitóticas de diferentes tejidos, por ejemplo, el colon, el estómago y la piel. KLF4 es esencial para la diferenciación terminal de estas células e interviene en la regulación del ciclo celular. Preferiblemente, "proteína KLF4" o simplemente "KLF4" se relaciona con KLF4 humano.

MYC (cMYC) es un protooncogén que se sobreexpresa en una amplia gama de cánceres humanos. Cuando está específicamente mutado o sobreexpresado, aumenta la proliferación celular y funciona como un oncogén. El gen MYC codifica un factor de transcripción que regula la expresión del 15 % de todos los genes mediante la unión a secuencias de Caja mejoradora (cajas E) y el reclutamiento de histonas acetiltransferasas (HAT). MYC pertenece a la familia de factores de transcripción MYC, que también incluye los genes N-MYC y L-MYC. Los factores de transcripción de la familia MYC contienen el dominio bHLH/LZ (cierro de leucina básico de hélice-bucle-hélice). Preferiblemente, "proteína cMYC" o simplemente "cMYC" se refiere a cMYC humana.

Una referencia en el presente documento a factores específicos tales como OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 o c-MYC debe entenderse de manera que incluya también todas las variantes de estos factores. En particular, debe entenderse que incluye también todas las variantes de corte y empalme, variantes modificadas postraduccionalmente, conformaciones, isoformas y especies homólogas de estos factores que se expresan naturalmente en las células.

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

"Un conjunto funcional de factores de reprogramación" es un conjunto de factores de reprogramación útiles para reprogramar células somáticas en células que tienen características de células madre, es decir, el conjunto de factores de reprogramación cuando se expresan en una célula somática es suficiente para efectuar la reprogramación de la célula somática en una célula que tiene características de célula madre.

En una realización de la enseñanza, un conjunto funcional de factores de reprogramación puede comprender más que factores de reprogramación que tienen que estar todos presentes dentro de una célula para lograr la reprogramación. Por consiguiente, la presente enseñanza implica realizaciones en las que un conjunto de moléculas de ARN, tal como un conjunto de replicones de ARN, codifica los diferentes factores de reprogramación. Por ejemplo, diferentes moléculas de ARN pueden comprender diferentes marcos de lectura abiertos que codifican diferentes factores de reprogramación. Estas diferentes moléculas de ARN, es decir, un conjunto de moléculas de ARN, pueden inocularse conjuntamente en una célula para proporcionar un conjunto funcional de factores de reprogramación.

El término "miARN" (microARN) se refiere a ARN no codificantes de 21-23 nucleótidos de longitud que se encuentran en células eucariotas que, al inducir la degradación y/o prevenir la traducción de los ARNm diana, modulan una gran cantidad de funciones celulares, incluidas aquellas relacionadas con la renovación/diferenciación propia de ESC y la progresión del ciclo celular. Los miARN son reguladores postranscripcionales que se unen a secuencias complementarias en transcritos de ARN mensajero (ARNm) diana, lo que generalmente resulta en represión traduccional o degradación de la diana y silenciamiento de genes. Se ha descubierto que los miARN en la combinación correcta son capaces de inducir la reprogramación celular directa de células somáticas en células que tienen características de células madre *in vitro*. Por ejemplo, se ha observado que el grupo de miARN 302-367 mejora la reprogramación de las células somáticas.

Preferiblemente, la etapa de permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre comprende cultivar las células somáticas en condiciones de cultivo de células madre embrionarias, preferiblemente condiciones adecuadas para mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado.

Preferiblemente, para permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre, las células se cultivan en presencia de uno o más inhibidores de ADN metiltransferasa y/o uno o más inhibidores de histona desacetilasa. Los compuestos preferidos se seleccionan del grupo que consiste en 5'-azacitidina (5'-azaC), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), dexametasona, tricostatina A (TSA), butirato de sodio (NaBu), Scriptaid y ácido valproico (VPA). Preferiblemente, las células se cultivan en presencia de ácido valproico (VPA), preferiblemente en una concentración de entre 0.5 y 10 mM, más preferiblemente entre 1 y 5 mM, lo más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 2 mM.

Los métodos de la presente enseñanza se pueden utilizar para efectuar la desdiferenciación de cualquier tipo de célula somática. Las células que pueden usarse incluyen células que pueden desdiferenciarse o reprogramarse mediante los métodos de la presente enseñanza, en particular células que están total o parcialmente diferenciadas, más preferiblemente diferenciadas terminalmente. Preferiblemente, la célula somática es una célula diploide derivada de organismos multicelulares preembrionarios, embrionarios, fetales y posnatales. Los ejemplos de células que pueden usarse incluyen, entre otros, fibroblastos, tales como fibroblastos fetales y neonatales o fibroblastos adultos, queratinocitos, en particular queratinocitos primarios, más preferiblemente queratinocitos derivados del cabello, células adiposas, células epiteliales, células epidérmicas, condrocitos, células del cúmulo, células neurales, células gliales, astrocitos, células cardíacas, células esofágicas, células musculares, melanocitos, células hematopoyéticas, osteocitos, macrófagos, monocitos y células mononucleares. Ejemplos de células que pueden usarse incluyen células endoteliales derivadas de la sangre y células progenitoras endoteliales, y células epiteliales derivadas de la orina.

Las células con las que se pueden utilizar los métodos de la enseñanza pueden ser de cualquier especie animal; por ejemplo, mamíferos y roedores. Los ejemplos de células de mamíferos que pueden desdiferenciarse y volverse a diferenciar mediante la presente enseñanza incluyen, entre otros, células humanas y de primates no humanos. Las células de primates con las que se puede realizar la enseñanza incluyen, entre otras, células de humanos, chimpancés, babuinos, monos cynomolgus y cualquier otro mono del Nuevo o Viejo Mundo. Las células de roedor con las que se puede realizar la enseñanza incluyen, entre otras, células de ratón, rata, cobaya, hámster y jerbo.

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

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

En determinadas realizaciones, las condiciones del cultivo celular pueden incluir poner en contacto las células con factores que pueden inhibir la diferenciación o potenciar de otro modo la desdiferenciación de las células, por ejemplo, prevenir la diferenciación de las células en células no ES, trofectodermo u otros tipos de células.

Las células desdiferenciadas preparadas de acuerdo con la presente enseñanza pueden evaluarse mediante métodos que incluyen el seguimiento de cambios en el fenotipo de las células y la caracterización de su expresión génica y proteica. La expresión génica se puede determinar mediante RT-PCR y los productos de traducción se pueden determinar mediante inmunocitoquímica y transferencia Western. En particular, las células desdiferenciadas se pueden caracterizar para determinar el patrón de expresión génica y si las células reprogramadas muestran un patrón de expresión génica similar al patrón de expresión esperado de células de control pluripotentes, indiferenciadas tales como células madre embrionarias usando técnicas bien conocidas en el arte incluyendo la transcriptómica.

A este respecto se puede evaluar la expresión de los siguientes genes de células desdiferenciadas: OCT4, NANOG, LIN28, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), gen específico de células embrionarias 1 (ESG1), desarrollo asociado a pluripotencia 2 (DPPA2), DPPA4, telomerasa transcriptasa inversa (TERT), antígeno embrionario 3 (SSEA-3), SSEA-4, antígeno relacionado con tumores 1-60 (TRA-1-60), TRA-1-81 y TRA-2-49/6E.

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

En algunas realizaciones, existe una similitud en el patrón de expresión génica entre una célula reprogramada y una célula indiferenciada, por ejemplo, una célula madre embrionaria, si ciertos genes expresados específicamente en una célula indiferenciada también se expresan en la célula reprogramada. Por ejemplo, se pueden usar ciertos genes, por ejemplo, telomerasa, que normalmente son indetectables en células somáticas diferenciadas para controlar el grado de reprogramación. Asimismo, para ciertos genes, la ausencia de expresión puede usarse para evaluar el alcance de la reprogramación.

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

El análisis cariotípico se puede realizar mediante diseminaciones cromosómicas de células mitóticas, cariotipo espectral, ensayos de longitud de telómeros, hibridación genómica total u otras técnicas bien conocidas en el arte.

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

Preferiblemente, las células desdiferenciadas obtenidas de acuerdo con la presente enseñanza pueden dar lugar a células de cualquiera de las tres capas germinales embrionarias, es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo. Por ejemplo, las células desdiferenciadas pueden diferenciarse en músculo esquelético, esqueleto, dermis de la piel, tejido conectivo, sistema urogenital, corazón, sangre (células linfáticas) y bazo (mesodermo); estómago, colon, hígado, páncreas, vejiga urinaria; revestimiento de la uretra, partes epiteliales de la tráquea, pulmones, faringe, tiroides, paratiroides, intestino (endodermo); o sistema nervioso central, retina y cristalino, craneal y sensorial, ganglios y nervios, células pigmentarias, tejido conectivo de la cabeza, epidermis, cabello, glándulas mamarias (ectodermo). Las células desdiferenciadas obtenidas de acuerdo con la presente enseñanza se pueden volver a diferenciar *in vitro* o *in vivo* usando técnicas conocidas en el arte.

En una realización de la presente enseñanza, las células reprogramadas resultantes de los métodos de esta enseñanza se usan para producir progenie diferenciada. Así, en un aspecto, la presente enseñanza proporciona un método para producir células diferenciadas, que comprende: (i) obtener células reprogramadas usando los métodos de esta enseñanza; y (ii) inducir la diferenciación de las células reprogramadas para producir células diferenciadas. La etapa (ii) se puede realizar *in vivo* o *in vitro*. Además, la diferenciación puede inducirse mediante la presencia de factores de diferenciación apropiados que pueden agregarse o estar presentes *in situ*, por ejemplo, en un cuerpo, órgano o tejido en el que se han introducido las células reprogramadas. Las células diferenciadas se pueden usar para derivar células, tejidos y/u órganos que se usan ventajosamente en el área del trasplante de células, tejidos y/u órganos. Si se desea, se pueden introducir modificaciones genéticas, por ejemplo, en células somáticas antes de la reprogramación. Las células diferenciadas de la presente enseñanza preferiblemente no poseen la pluripotencia de una célula madre embrionaria, o una célula germinal embrionaria, y son, en esencia, células parcial o totalmente diferenciadas específicas de tejido.

Una ventaja de los métodos de la presente enseñanza es que las células reprogramadas obtenidas mediante la presente enseñanza pueden diferenciarse sin selección o purificación previa o establecimiento de una línea celular. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, una población heterogénea de células que comprende células reprogramadas se diferencia en un tipo de célula deseado. En una realización, una mezcla de células obtenidas a partir de los métodos de la presente enseñanza se expone a uno o más factores de diferenciación y se cultiva *in vitro*.

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

Por ejemplo, se pueden obtener células diferenciadas cultivando células reprogramadas indiferenciadas en presencia de al menos un factor de diferenciación y seleccionando células diferenciadas del cultivo. La selección de células diferenciadas puede basarse en el fenotipo, tal como la expresión de ciertos marcadores celulares presentes en células diferenciadas, o mediante ensayos funcionales (por ejemplo, la capacidad de realizar una o más funciones de un tipo de célula diferenciada particular).

En otra realización, las células reprogramadas de acuerdo con la presente enseñanza se modifican genéticamente mediante la adición, eliminación o modificación de su(s) secuencia(s) de ADN.

Las células reprogramadas o desdiferenciadas preparadas de acuerdo con la presente enseñanza o las células derivadas de las células reprogramadas o desdiferenciadas son útiles en investigación y terapia. Las células pluripotentes reprogramadas pueden diferenciarse en cualquiera de las células del cuerpo incluyendo, sin limitación, piel, cartílago, músculo esquelético óseo, músculo cardíaco, renal, hepático, sanguíneo y formadora de sangre, precursor vascular y endotelial vascular, beta pancreático, neuronas, células de la glía, de la retina, de las neuronas, del intestino, del pulmón y del hígado.

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

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

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

Los agentes descritos en el presente documento, tales como ácidos nucleicos, en particular ARN, y células, en particular cuando se usan para los tratamientos descritos en el presente documento, pueden estar presentes en forma de una composición farmacéutica o kit que comprende el agente y opcionalmente uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas son preferentemente estériles y contienen una cantidad eficaz del ácido nucleico.

Las composiciones farmacéuticas normalmente se proporcionan en una forma de dosificación uniforme y pueden prepararse de una manera conocida en la técnica. La composición farmacéutica puede estar, por ejemplo, en forma de una solución o suspensión.

La composición farmacéutica puede comprender sales, sustancias tampón, conservantes, vehículos, diluyentes y/o excipientes, todos los cuales son preferiblemente farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a la no toxicidad de un material que no interfiere con la acción del componente o componentes activos de la composición farmacéutica.

Se pueden usar sales que no son farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables y están incluidas en la enseñanza. Las sales farmacéuticamente aceptables de este tipo comprenden, de forma no limitativa, aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. También se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.

Las sustancias tampón adecuadas para usar en la composición farmacéutica incluyen ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

Los conservantes adecuados para usar en la composición farmacéutica incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o no natural (sintético), con el que se combina el componente activo para facilitar, mejorar o permitir la aplicación. De acuerdo con la

enseñanza, el término "portador" también incluye uno o más rellenos, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles, que son adecuados para la administración a un paciente.

Posibles sustancias portadoras para la administración parenteral son, por ejemplo, agua esterilizada, soluciones de glucosa, Ringer, lactato de Ringer, solución estéril de cloruro de sodio, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de lactida biocompatibles, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.

El término "excipiente", cuando se usa en el presente documento, pretende indicar todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica y que no son ingredientes activos tales como, por ejemplo, vehículos, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservantes, emulsionantes, tampones, saborizantes o colorantes.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse mediante cualquier vía convencional, tal como mediante administración parenteral, incluso mediante inyección o infusión. La administración es preferiblemente parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, en el ganglio linfático, intradérmica o intramuscular.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral normalmente comprenden una preparación acuosa o no acuosa estéril del compuesto activo, que es preferiblemente isotónica para la sangre del receptor. Ejemplos de vehículos y disolventes compatibles son la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, como medio de solución o suspensión se utilizan aceites fijos, normalmente estériles.

Los agentes y composiciones descritos en el presente documento se administran preferiblemente en cantidades eficaces. Una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado sola o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una condición particular, la reacción deseada se refiere preferiblemente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende frenar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o invertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una afección también puede ser un retraso de la aparición o una prevención de la aparición de dicha enfermedad o dicha afección.

Una cantidad eficaz de un agente o composición descrita en el presente documento dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluyendo la edad, la condición fisiológica, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de una terapia de acompañamiento (si está presente), la vía de administración específica y factores similares. Por consiguiente, las dosis administradas de los agentes descritos en el presente documento pueden depender de varios de estos parámetros. En el caso de que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden usar dosis más altas (o dosis efectivamente más altas logradas mediante una vía de administración diferente y más localizada).

La presente invención se describe en detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Figuras

Figura 1: NSs puede reemplazar a EKB para la inhibición de la respuesta de IFN al ARNm sintético en fibroblastos humanos

Figura 2: NSs permite la reprogramación basada en ARN

Figura 3: NSs inhibe la respuesta de IFN al ARN autorreplicante de SFV y previene la activación de la proteína quinasa R

Figura 4: NSs aumenta las tasas de transfección con ARN autorreplicante de VEEV, aumenta la traducción y bloquea la respuesta de IFN

Figura 5: NSs mejora la expresión de los transreplicones de VEEV e inhibe la respuesta de IFN

Figura 6: NSs mejora la expresión del transreplicón en células inmunes

Figura 7: NSs mejora la expresión del ARN transreplicante y autorreplicante de VEEV en células inmunes y previene la muerte celular

Ejemplos

Ejemplo 1: NSs puede reemplazar a EKB para la inhibición de la respuesta de IFN al ARNm sintético en fibroblastos humanos

La generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS) encierra grandes promesas para liberar la investigación sobre células madre de las preocupaciones éticas asociadas con el uso de células madre embrionarias humanas (hES). La expresión continua de factores de transcripción (TF) asociados a la pluripotencia exógena hasta que la red

de pluripotencia endógena mantiene la pluripotencia es, por lo tanto, la clave para lograr la reprogramación de las células somáticas. En lo que respecta a la traducción clínica de la tecnología iPS, es crucial evitar cualquier riesgo de integración genómica en el genoma de las células diana. Por lo tanto, el ARNm sintético es probablemente el vector más adecuado, ya que el ARNm sintético es estrictamente transitorio y las mezclas complejas de ARN pueden transfectarse fácilmente en células somáticas. Sin embargo, el ARNm sintético es reconocido por receptores celulares que pueden distinguir entre patrones moleculares específicos distintos de los ARN celulares. Esto conduce a mecanismos de defensa de la célula que resultan en apoptosis, reordenamientos citoesqueléticos, degradación del ARN y una interrupción de la traducción que dificulta la reprogramación exitosa de las células. Pudimos establecer un enfoque de reprogramación basado en ARN no modificado en el que las proteínas de escape viral E3, K3 y B18R (EKB) se utilizan para contrarrestar la respuesta de IFN de la célula, lo que permite una reprogramación exitosa de fibroblastos humanos y células progenitoras endoteliales de crecimiento de sangre (EPC) (Hum Gene Ther. 2015 noviembre; 26(11): 751-66). Se demostró que la proteína de escape viral NSs del virus *Toscana* es un potente inhibidor de la respuesta de IFN. En el presente documento investigamos el efecto de NSs sobre la respuesta al IFN de los fibroblastos humanos. En una primera etapa, se analizó el efecto de NSs sobre la expresión informadora (GFP), la reducción de los genes de respuesta a IFN (OAS1/IFN β) y la supervivencia celular después de lipofecciones diarias en comparación con el estándar de oro EKB.

Se sembraron fibroblastos primarios de prepucio humano (HFF, System Bioscience) en 6 pocillos (100,000 células/pocillo) y se lipofectaron al día siguiente utilizando 6 μ l de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 μ g de ARNm sintético no modificado (transcrito *in vitro*). Las mezclas de ARNm sintético estaban compuestas por 0.8 μ g de proteína fluorescente verde (GFP) junto con diferentes mezclas de proteínas de escape de IFN E3 (E), K3 (K), B18R (B) y/o NSs (N) como se indica en la Figura 1A. Se usaron 0.2 μ g de ARNm sintético de cada proteína de escape de IFN y se utilizó ARNm sintético que codifica la luciferasa (Luc) para sumar las mezclas a 1.4 μ g. Las lipofecciones se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se recolectaron 24 h después de la transfección y la mitad de las células se usaron para el análisis de la expresión de GFP mediante FACS. Resultó obvio que todas las muestras fueron lipofectadas por igual con una eficiencia de transfección del 91-96 % (Figura 1A, panel izquierdo). Observamos un aumento de aproximadamente 3 veces en la traducción del ARNm de GFP cuando se cotransfectó con EKB. Este aumento fue ligeramente menor cuando se usó N solo y ligeramente mayor cuando se cotransfectó con EN. Las proteínas de escape de IFN adicionales (K y B) no aumentaron aún más la traducción del ARNm de GFP.

Se sedimentaron el resto de las células del experimento anterior, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm de IFN β y OAS1 mediante qRT-PCR (Figura 1B). Como se esperaba, EKB es capaz de subregular la inducción de la expresión de IFN β y OAS1 mediante ARNm sintético cuando se cotransfecta. Esto también podría lograrse con N solo, incluso mejor en el caso de la inducción de IFN β . N en combinación con otras proteínas de escape viral (EKB) redujo al mínimo la respuesta del IFN de la célula al ARNm sintético.

Los HFF se sembraron en Swells (100,000 células/pocillo) y se lipofectaron durante los siguientes tres días consecutivos utilizando 6 μ l de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 μ g de ARNm sintético. Las mezclas de ARNm sintético estaban compuestas por 0.8 μ g de GFP junto con diferentes mezclas de proteínas de escape de IFN E3 (E), K3 (K), B18R (B) y/o NSs (N) como se indica en la Figura 1C. Se usaron 0.2 μ g de ARNm sintético de cada proteína de escape de IFN y se utilizó ARNm sintético que codifica la luciferasa (Luc) para sumar las mezclas a 1.4 μ g. Las lipofecciones se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 24 h después de la última lipofección, se analizó la viabilidad celular utilizando el kit de proliferación celular II (Roche) con normalización para simular células transfectadas. Como era de esperar, las células mueren cuando se transfectan repetidamente con ARNm sintético. Esto se puede rescatar mediante la cotransfección con EKB. Inesperadamente, el N solo también pudo mejorar la supervivencia de las células y, por lo tanto, podría reemplazar a EKB. Si se combina con E3 también se observó un ligero efecto proliferativo.

Las células del experimento anterior se sedimentaron 24 h después de la última transfección, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm de IFN β y OAS1 mediante qRT-PCR (Figura 1D). De acuerdo con el análisis de supervivencia en la Figura 1C, EKB reduce significativamente la inducción de IFN β y OAS1 mediante ARNm sintético. Esto también podría lograrse cuando se reemplaza EKB por N solo. Si N se combina con otras proteínas de escape viral, la respuesta de las células al IFN casi se extingue.

Los datos muestran que NSs puede reemplazar a EKB en la inhibición de la respuesta de IFN al ARNm sintético en fibroblastos humanos. NSs por sí sola puede contrarrestar una subregulación de la traducción, inhibe la sobreexpresión de los genes de respuesta a IFN y previene la pérdida de viabilidad celular.

Ejemplo 2: NSs permite la reprogramación basada en ARN

Como se muestra en el Ejemplo 1, NSs puede reemplazar a EKB en la inhibición de la respuesta de IFN al ARNm sintético en fibroblastos humanos. Como se indicó anteriormente, previamente desarrollamos un enfoque de reprogramación basado en ARN en el que las proteínas de escape viral E3, K3 y B18R (EKB) se utilizan para contrarrestar la respuesta de IFN de la célula, lo que permite una reprogramación exitosa de fibroblastos humanos y progenitores endoteliales de crecimiento sanguíneo (EPC) en células madre pluripotentes inducidas (iPS) humanas (Hum Gene Ther. 2015 noviembre; 26(11):751-66). En el presente documento investigamos si NSs por sí sola también puede facilitar la reprogramación de fibroblastos humanos basada en ARN.

La Figura 2A muestra la línea de tiempo para la reprogramación de fibroblastos dérmicos humanos primarios (HDF, Innoprot). Se sembraron 40,000 células en una placa de 12 pocillos y, después de 4 horas de cultivo, se lipofectaron durante cuatro días consecutivos con mezclas de ARNm sintético que estaban compuestas por 0.33 µg de ARNm sintético no modificado que codificaba los factores de transcripción de reprogramación (TF) OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, NANOG y LIN28 (OsSKMNL) (3:1:1:1:1:1) con 0.08 µg de cada B18R, E3 y K3 (EKB) o 0.24 µg de NSs (N) sola y en ambos casos con 0.17 µg de una mezcla de miARN compuesta por los miARN 302a-d y 367 (1:1:1:1:1). Las células se cultivaron en medio de células madre embrionarias humanas (hES) (medio NutriStem, Stemgent) y se realizaron lipofecciones utilizando 2.5 µL de RNAiMAX (Life Technologies) por 12 pocillos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A partir del día 9 se observó la formación de colonias y el análisis de las colonias se realizó el día 10.

Las colonias establecidas se tiñeron para fosfatasa alcalina (AP) el día 10 utilizando un kit de tinción AP (SBI) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener una descripción general, se muestran tinciones representativas en la Figura 2B. Se hizo evidente que la formación de colonias positivas para AP (rojas/oscuras) es bastante similar cuando se utiliza EKB o N solo.

Se contaron las colonias positivas para AP de dos experimentos independientes y se muestran en la Figura 2C como recuento medio de colonias ± DE (n = 2). Los datos confirman los resultados del resumen: la reprogramación basada en ARN de fibroblastos humanos en células iPS se puede realizar con EKB o NSs solo con eficiencias de reprogramación similares.

La morfología de colonias de las colonias de células iPS resultantes cuando se usó NSs solamente en lugar de EKB fue similar a la de las células hES con células pequeñas muy empaquetadas en colonias distintas y bordes bien definidos (Figura 2D). Estas colonias también podrían teñirse positivamente para AP (Figura 2E) (rojas/oscuras) y el marcador de superficie celular hES TRA-1-81 (Figura 2F) (verdes/blancas). La tinción viva TRA-1-81 se realizó con el anticuerpo Stain-Alive TRA-1-81 (Stemgent) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se muestran fotografías representativas de colonias.

Para evaluar más a fondo la pluripotencia de las colonias, se sedimentaron las células, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión del ARNm de los marcadores hES OCT4 (endógeno), NANOG (endógeno), LIN28 (endógeno), TERT y REX1 mediante qRT-PCR. La expresión de ARNm se normalizó con respecto a la de HPRT y se muestra como inducción media ± SD (n = 2) en comparación con los niveles de transcripción de las células de entrada. Todos los marcadores analizados se expresaron altamente en comparación con las células de entrada, lo que indica la pluripotencia de las células reprogramadas. Nuevamente, no se observó ninguna diferencia significativa cuando se usó NSs sola en lugar de EKB para facilitar la reprogramación de fibroblastos humanos basada en ARN (Figura 2G).

NSs es capaz de reducir la respuesta de IFN de los fibroblastos humanos al ARNm sintético en un grado similar al uso de las tres proteínas de escape viral E3, K3 y B18R. Esto permite múltiples transfecciones de un cóctel de reprogramación basado en ARN que conduce a la reprogramación exitosa de fibroblastos humanos en células iPS humanas. La reprogramación exitosa de células usando NSs solamente en lugar de EKB se confirmó mediante la morfología similar a las células hES, la actividad de AP y la expresión de la superficie de las células hES y los marcadores endógenos de las colonias de células iPS resultantes. Se demostró que la eficiencia y la calidad de la reprogramación utilizando NSs son tan buenas como la reprogramación basada en ARN habilitada por EKB.

Ejemplo 3: NSs inhibe la respuesta de IFN al ARN autorreplicante de SFV y previenen la activación de la proteína quinasa R

Se sembraron fibroblastos de prepucio humano en placas de 6 pocillos y se transfectaron al día siguiente. Para este objetivo, se formaron complejos de 2.5 µg de ARN autorreplicante que codifica GFP (virus del bosque Semliki de origen viral), o 1.25 µg de ARN autorreplicante junto con 1.25 µg de ARNm que codifica el virus Vacuna E3 o NSs del virus *Toscana* con MessengerMax y se agregaron a las células. Las células se recolectaron 17 h después de la transfección y se usaron para determinar la respuesta al interferón mediante qPCR (sobreexpresión de IFNβ y OAS1) y degradación y activación de PKR mediante inmunotransferencia contra PKR total y PKR autofosforilada (p-PKR). NSs dio como resultado una reducción más pronunciada de la respuesta de IFN que E3 (Figura 3A). La sobreexpresión de NSs redujo la expresión de PKR en comparación con las células no transfectadas (untr.), las células transfectadas con replicón solo o el replicón+E3. Sin embargo, no previene la activación de PKR residual (Figura 3B). La Figura 3C muestra una cuantificación densitométrica de las intensidades de las bandas de la transferencia PKR.

Ejemplo 4: NSs aumenta las tasas de transfección con ARN autorreplicante de VEEV, aumenta la traducción y bloquea la respuesta de IFN

Se sembraron fibroblastos de prepucio humano en placas de 6 pocillos y se transfectaron al día siguiente. Para este objetivo, se formaron complejos con 1.11 Jg de ARN autorreplicante que codifica GFP (virus de la encefalitis equina venezolana de origen viral) y 1.4 µg de ARNm que codifica la proteína fluorescente infrarroja (iRFP) o el virus Vacuna E3 o NSs del virus *Toscana* con MessengerMax y se agregaron a las células. Veinticuatro horas después, se recolectaron células para determinar las tasas de transfección mediante citometría de flujo y la respuesta al interferón mediante qPCR (sobreexpresión de IFNβ y OAS1). El análisis de citometría de flujo muestra una mayor tasa de

transfección tras la cotransfección de E3 y NSs (untr. = células no transfectadas) (Figura 4A,B). La cotransferencia de NSs resultó en una reducción más pronunciada de la respuesta de IFN que la cotransferencia de E3 (Figura 4C).

Ejemplo 5: NSs mejora la expresión de los transreplicones de VEEV e inhibe la respuesta de IFN

- 5 Se electroporaron fibroblastos de prepucio humano con 1.4 µg de ARNm que codifica la replicasa de VEEV, 0.3 µg de ARN transreplicante que codifica GFP y 0.3 µg de ARN transreplicante que codifica la luciferasa. Para inhibir la respuesta al interferón, las muestras se complementaron con 2 µg de ARNm de NSs, ARNm de E3 o ARNm de E3 y B18 (1 µg cada uno). Veinticuatro horas después, se recolectaron células para analizar la expresión de GFP mediante citometría de flujo (Figura 5A) y la respuesta al interferón mediante qPCR (sobreexpresión de IFNβ y OAS1) (Figura 5B). Además, se midió la expresión de luciferasa durante 5 días en los momentos indicados en la Figura 5C.
- 10 NSs mejora la expresión tan bien como la combinación de E3 y B18 e inhibe la respuesta de IFN de manera comparable.

Ejemplo 6: NSs mejora la expresión de transreplicación en células inmunes

- 15 Se electroporaron las células T humanas positivas para CD8 periféricas en reposo con 5 µg de ARNm que codifica la replicasa de VEEV y 5 µg de ARN transreplicante que codifica la luciferasa. Para inhibir la respuesta al interferón, las muestras se complementaron con 5 µg de ARNm de NSs o ARNm de E3. La expresión de luciferasa se evaluó en los momentos indicados en la Figura 6A.

- 20 Se electroporaron células dendríticas inmaduras periféricas humanas con 1.4 µg de ARNm que codifica la replicasa de VEEV, 0.3 µg de ARN transreplicante que codifica la luciferasa y 0.3 µg de ARN transreplicante que codifica GFP. Para inhibir la respuesta al interferón, las muestras se complementaron con 2 µg de ARNm de NSs o ARNm de E3. La expresión de luciferasa se evaluó en los momentos indicados en la Figura 6B.

Ejemplo 7: NSs mejora la expresión del ARN transreplicante y autorreplicante de VEEV en células inmunes y previene la muerte celular

- 25 (A) Se lipofectaron células dendríticas inmaduras periféricas humanas con MessengerMax (Invitrogen) en placas de 96 pocillos con 25 ng de ARN total por pocillo. Se cotransfectaron o no 3 ng de ARN transreplicante que codifica la luciferasa con 12 ng de ARNm que codifica la replicasa de VEEV (+Rep), y 10 ng de ARNm que codifica GFP (+GFP) o la NSs inhibidora (+NS) como se indica. La expresión de luciferasa se evaluó en los momentos indicados (ensayo BrightGlo; Promega). (B) También se evaluó la viabilidad de las células transfectadas (ensayo CellTiterGlo; Promega) y se representó gráficamente frente a la viabilidad de las células no transfectadas. (C, D) En paralelo, las células también se transfectaron con 10 ng de replicón de VEEV que codifica luciferasa y GFP o NS. La expresión de luciferasa (C) y la viabilidad (D) se siguieron durante 72 h después de la lipofección.
- 30

En las células dendríticas, NSs prolonga la expresión del ARN autorreplicante y transreplicante e inhibe la muerte celular.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para expresar una o más cadenas de un receptor de células T o de un receptor de células T artificial en una célula T o en una célula presentadora de antígeno, comprendiendo el método las etapas de (i) introducir ARN que codifica una o más cadenas de un receptor de células T o de un receptor de células T artificial en la célula y
5 (ii) proporcionar proteína NSs del *virus Toscana* a la célula, en la que se proporciona proteína NSs del *virus Toscana* a la célula comprende introducir ARN que codifica la proteína NSs del *virus Toscana* en la célula.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el ARN se introduce en la célula de forma repetitiva.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el ARN se introduce en la célula mediante electroporación o lipofección.
- 10 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ARN es ARN transcrito *in vitro*.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además proporcionar virus vacuna B18R y/o virus vacuna E3 a la célula, en el que proporcionar virus vacuna B18R y/o virus vacuna E3 a la célula comprende introducir ARN que codifica el virus vacuna B18R y/o o ARN que codifica el virus vacuna E3 en la célula.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la célula es una célula humana.
- 15 7. Un método *in vitro* para producir células inmunorreactivas que comprende la etapa de (i) introducir en una célula T o un progenitor de la misma una o más moléculas de ARN que codifican las cadenas de un receptor de células T o la(s) cadena(s) de un receptor de células T artificial, y (ii) proporcionar proteína NSs del virus Toscana a la célula, en el que proporcionar proteína NSs del *virus Toscana* a la célula comprende introducir ARN que codifica la proteína NSs del virus *Toscana* en la célula.
- 20 8. El método de la reivindicación 7, en el que las células inmunorreactivas comprenden células T tales como células T citotóxicas, células T cooperadoras o células T infiltrantes de tumores.
9. El método de la reivindicación 8, en el que las células inmunorreactivas comprenden células T CD4+ y/o CD8+.
10. El método de la reivindicación 7, en el que las células inmunorreactivas comprenden células que pueden madurar hasta convertirse en células inmunitarias, tales como células T, en particular células T cooperadoras, o células T
25 citolíticas, con una estimulación adecuada.
11. El método de la reivindicación 7, en el que las células inmunorreactivas comprenden células madre hematopoyéticas CD34+, células T maduras e inmaduras.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el receptor de células T comprende cadenas de TCR α y β .
- 30 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que el receptor de células T artificial comprende un dominio de unión a antígeno tal como porciones de anticuerpos de unión a antígeno y receptores de células T tales como fragmentos variables monocatenarios (scFv), un dominio de señalización de células T, tal como el endodominio de CD3-zeta, y opcionalmente uno o más dominios de coestimulación, tales como CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), y CD278 (ICOS).

Figura 1

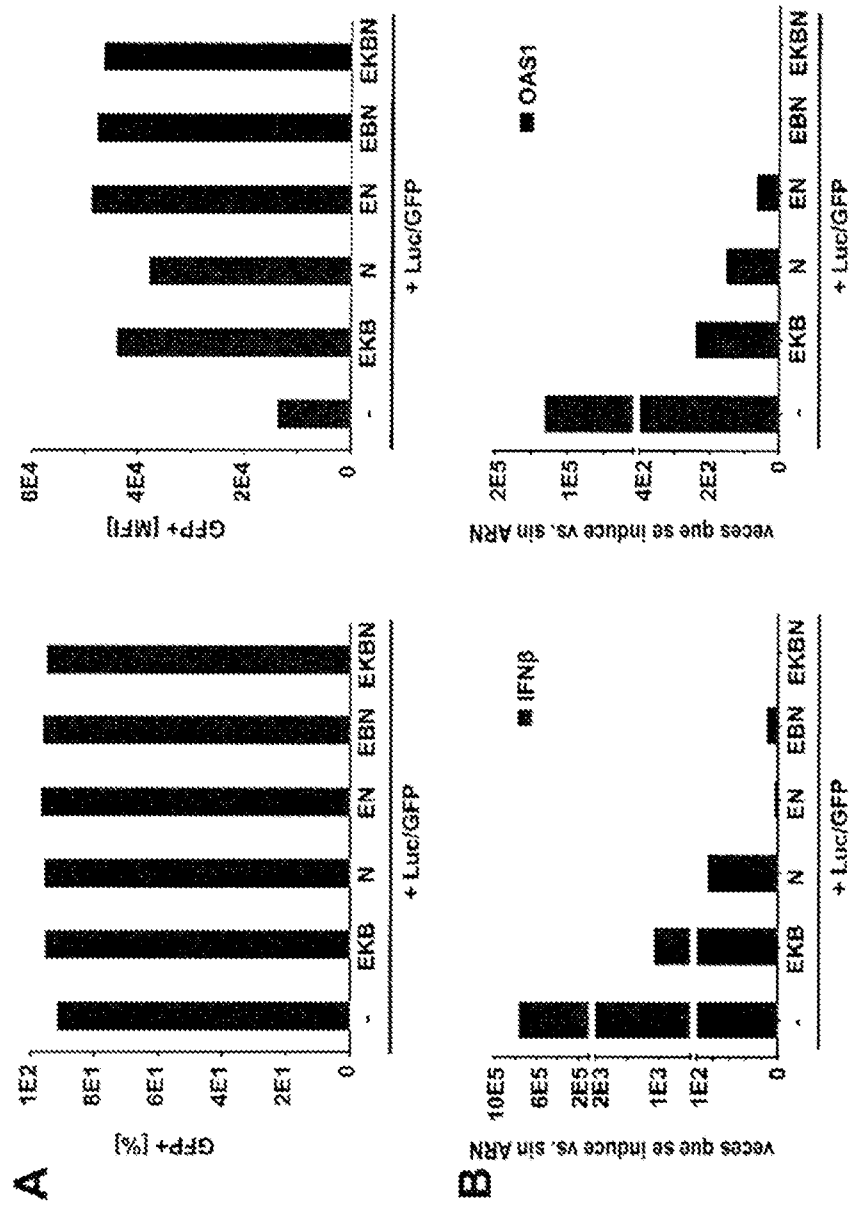


Figura 1

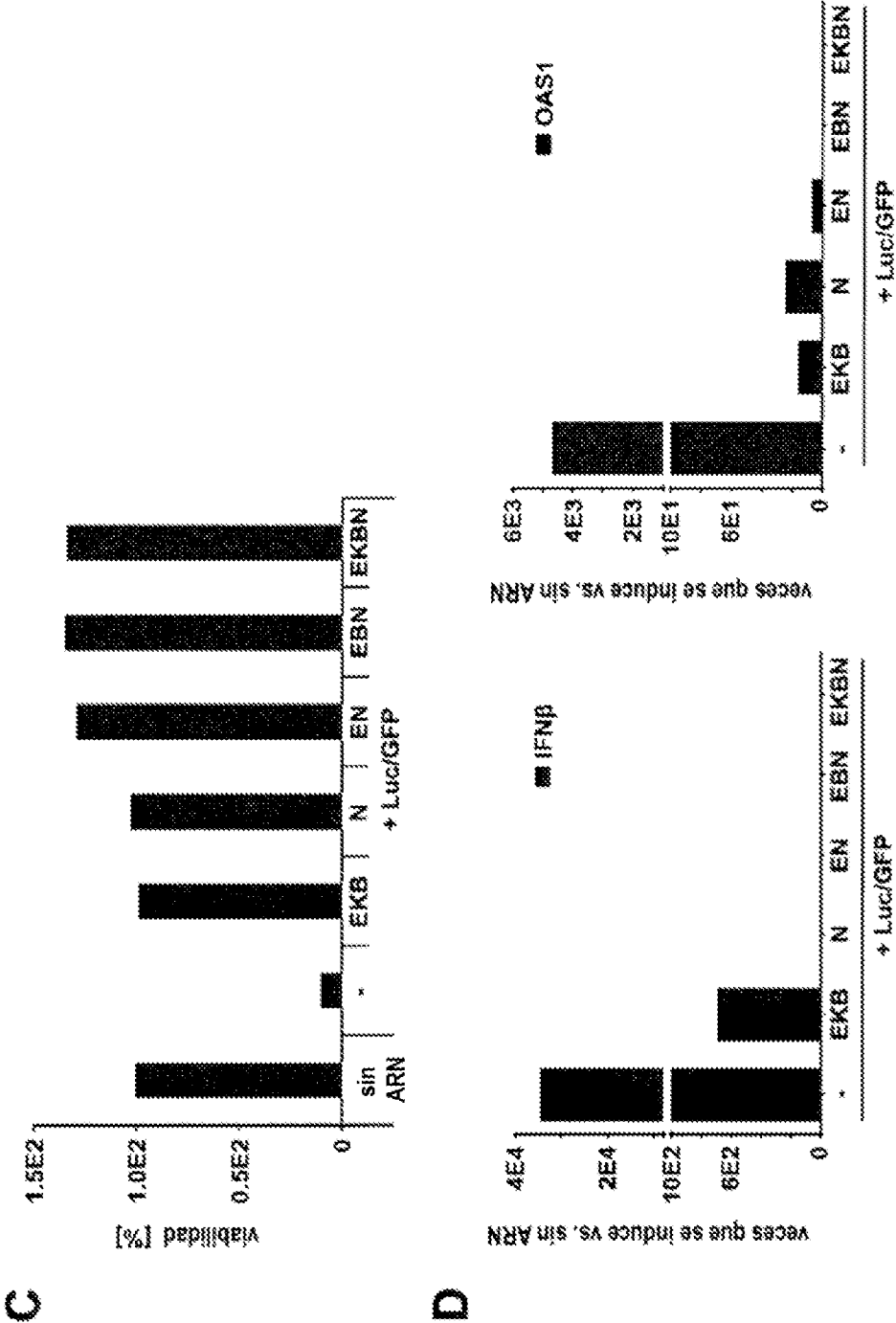
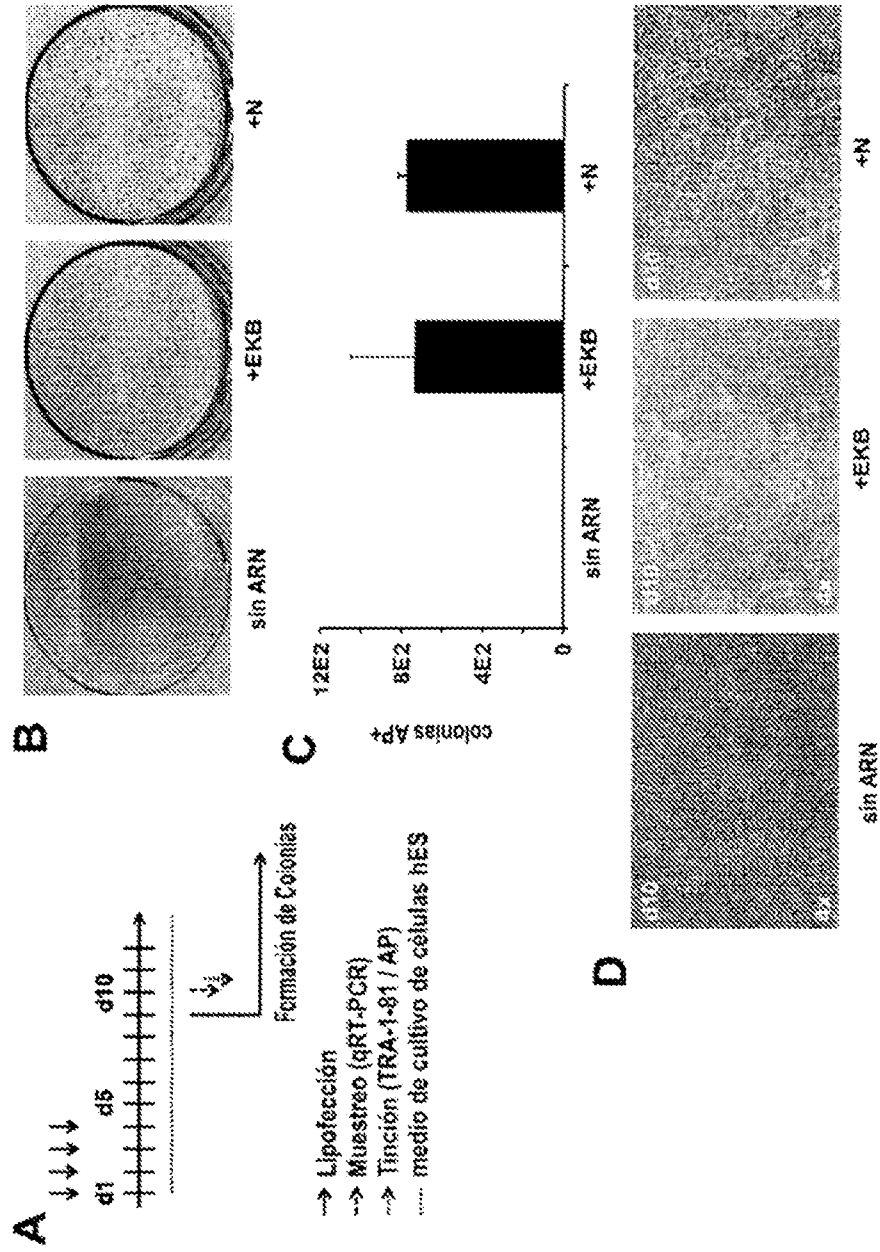


Figura 2



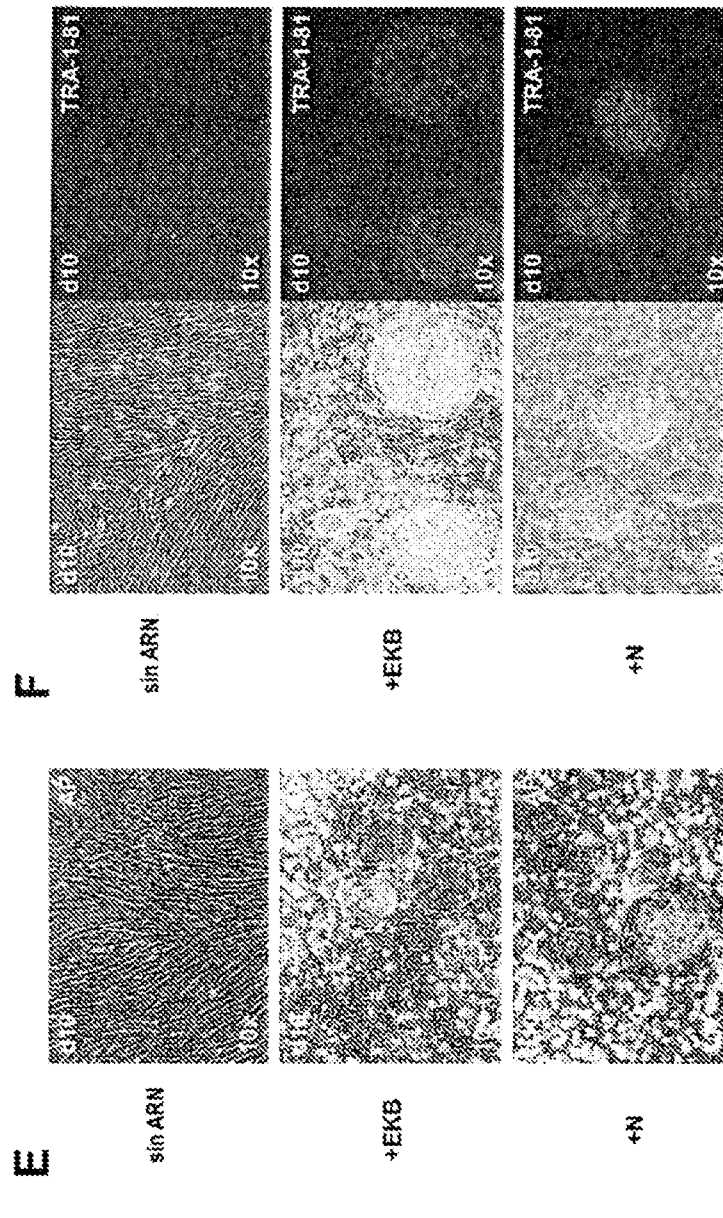


Figura 2

Figura 2

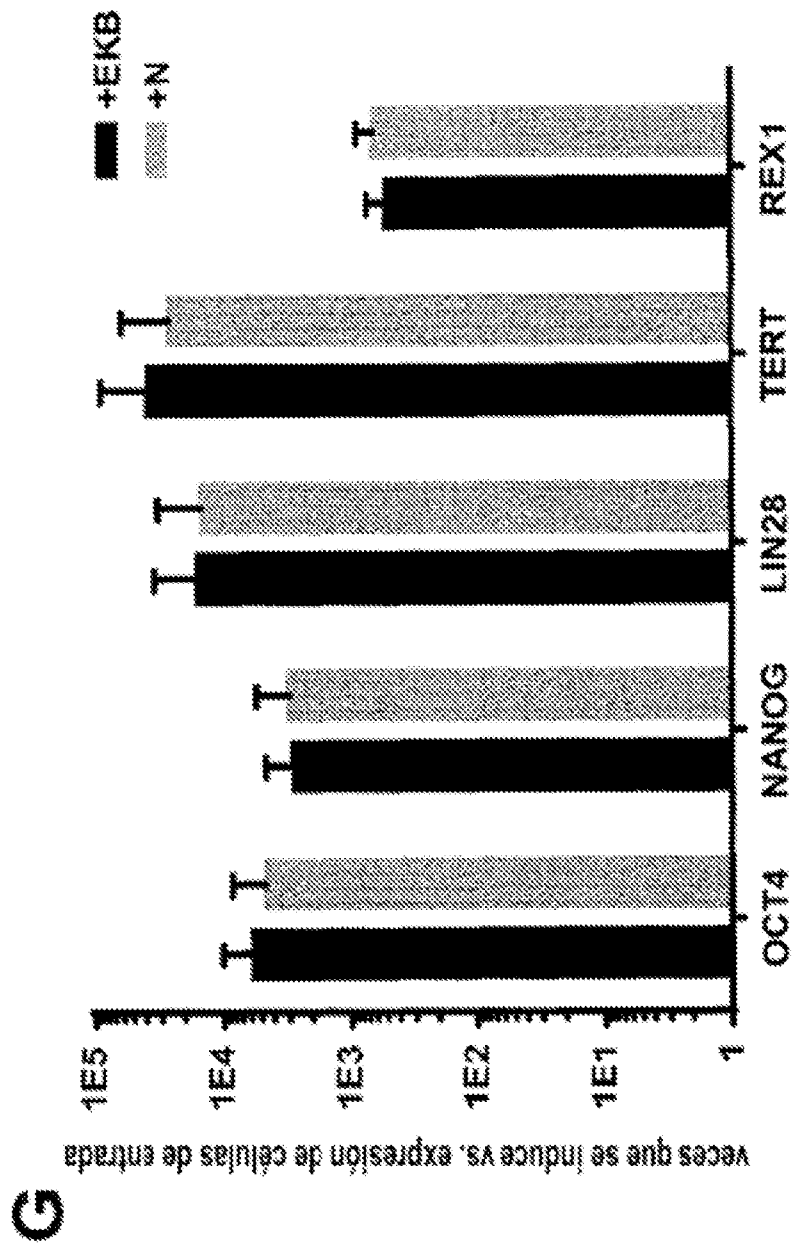


Figura 3

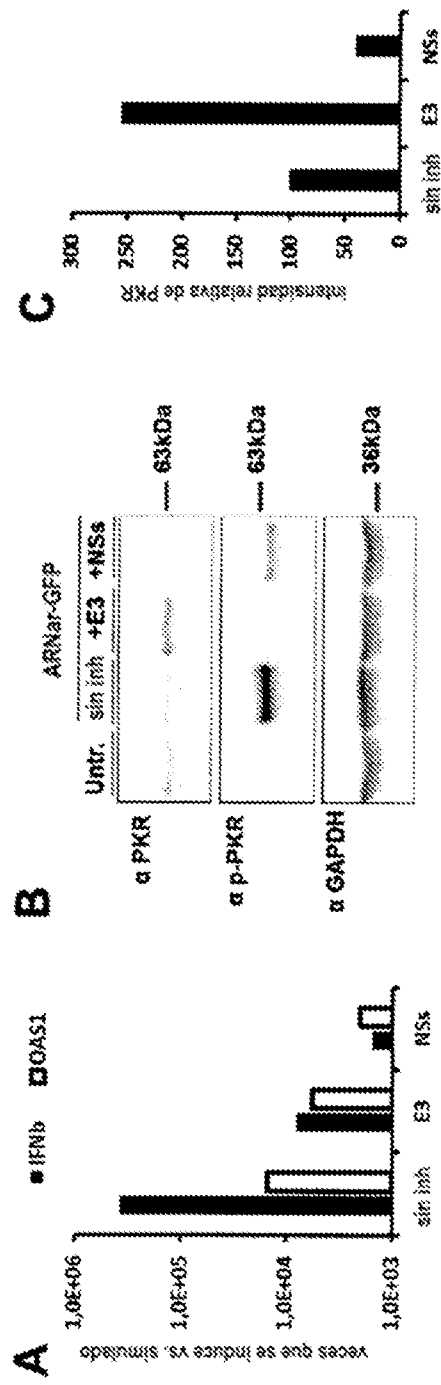


Figura 4

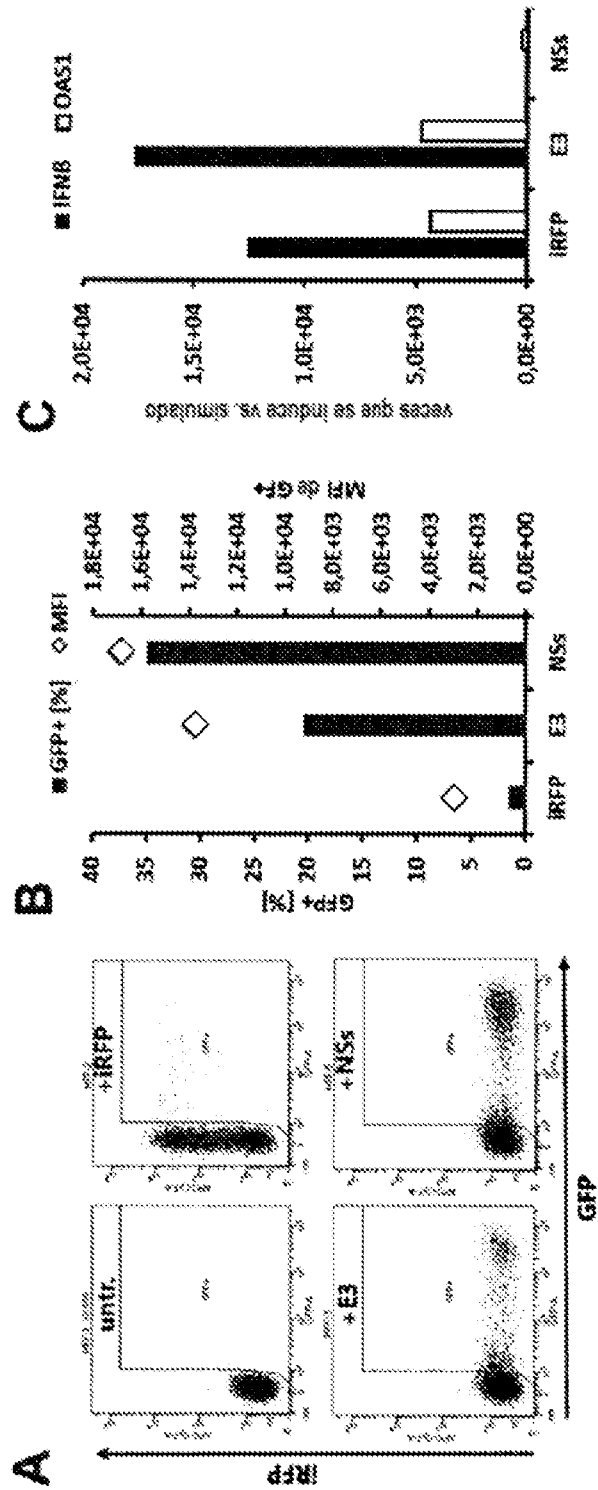


Figura 5

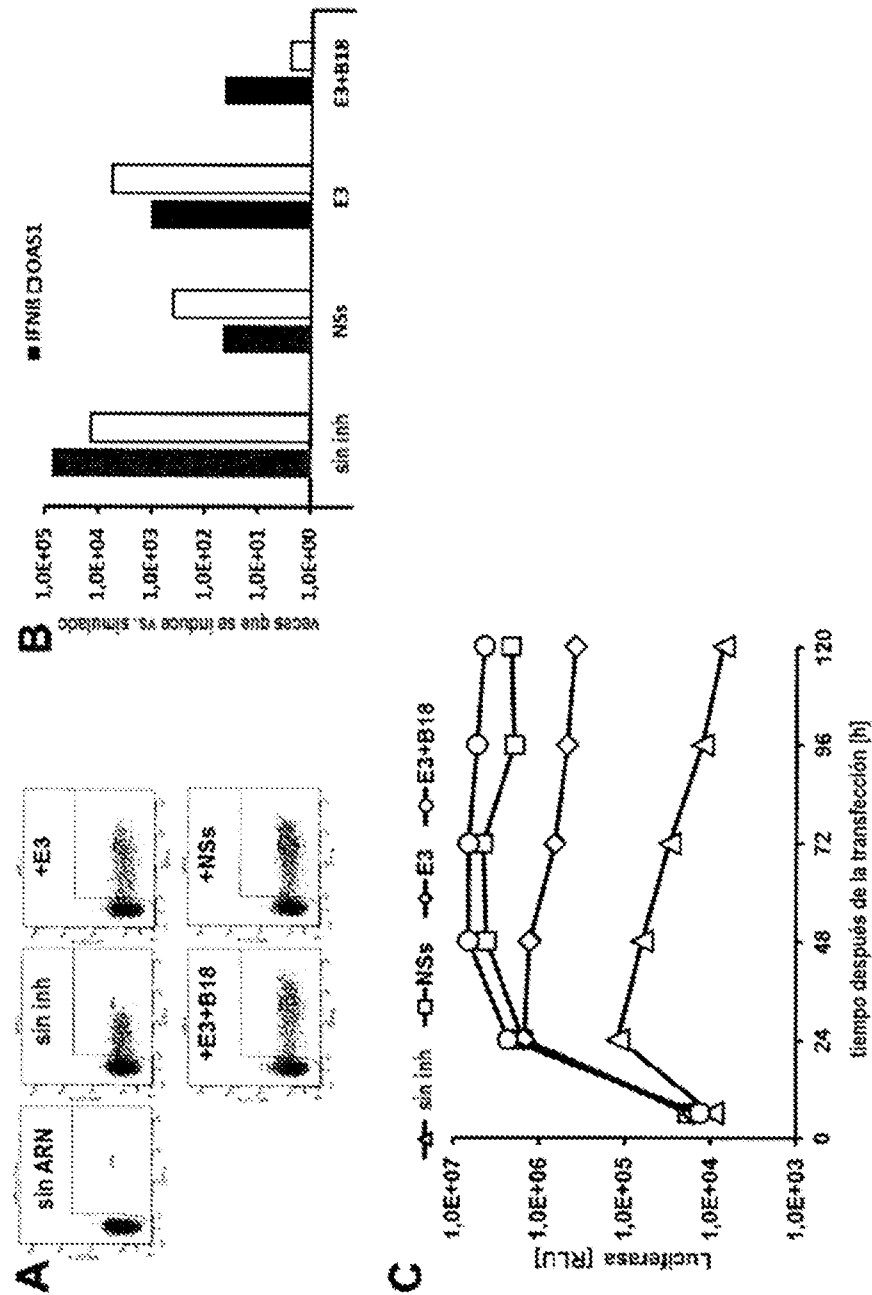


Figura 6

