

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 368**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
C12Q 1/6883 (2008.01)
C12N 15/67 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2020** **PCT/EP2020/053774**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2020** **WO20165352**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2020** **E 20704031 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023** **EP 3923971**

54 Título: **Análisis del efecto de un polirribonucleótido sobre la ciliogénesis**

30 Prioridad:

14.02.2019 EP 19157210

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

27.06.2024

73 Titular/es:

ETHRIS GMBH (100.0%)
Semmelweisstrasse 3
82152 Planegg, DE

72 Inventor/es:

RUDOLPH, CARSTEN;
MUMMERT, VERENA;
KUBISCH-DOHMEN, REBEKKA;
DOHMEN, CHRISTIAN;
GEIGER, JOHANNES;
ANEJA, MANISH;
WEISS, LUDWIG;
OMRAN, HEYMUT;
PENNEKAMP, PETRA;
WOHLGEMUTH, KAI;
CINDRIC, SANDRA;
LOGES, NIKI TOMAS;
RAIDT, JOHANNA y
TER STEEGE, ADRIAN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 974 368 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

Análisis del efecto de un polirribonucleótido sobre la ciliogénesis

La presente invención se refiere a un procedimiento para analizar el efecto de un polirribonucleótido sobre la ciliogénesis, en el que dicho polirribonucleótido codifica una proteína implicada y/o necesaria para la ciliogénesis.

5 El oxígeno es vital para muchos organismos multicelulares, ya que es crucial para el suministro de energía de las células. En los mamíferos, el oxígeno contenido en el aire puede ingresar al organismo a través del sistema respiratorio, que se refiere a los órganos implicados en la respiración. Estos incluyen, por ejemplo, nariz, garganta, laringe, tráquea, bronquios y pulmones. En estos últimos, el gas del ambiente se intercambia con el gas contenido en el sistema circulatorio sanguíneo interno, que transporta el oxígeno desde los pulmones a las células en diferentes partes del organismo. Sin embargo, además del oxígeno requerido, también otros componentes pueden ingresar al organismo a través del sistema respiratorio, tales como agentes irritantes contenidos en el aire, incluidos contaminantes, agentes causantes de enfermedades y patógenos tales como virus y bacterias. Por lo tanto, existen mecanismos de defensa tales como los reflejos de la tos y los estornudos para expulsar el agente irritante del sistema respiratorio. Para la expulsión, el agente irritante se incrusta en un moco viscoso que es secretado por células epiteliales en el sistema respiratorio y luego transportado a través de la superficie epitelial por células ciliadas.

Las células ciliadas pueden transportar moco y agentes irritantes a través de la superficie epitelial mediante un latido sincronizado de múltiples cilios móviles. Los cilios son estructuras tubulares rodeadas de membranas que se extienden desde la superficie epitelial hacia el espacio del sistema respiratorio que está en contacto con el medio ambiente. Dentro de las células, el axonema de un cilio está anclado a un cuerpo basal mediante estructuras de anclaje. Un axonema es un haz central de microtúbulos en el que nueve microtúbulos dobles externos rodean un par central de microtúbulos singletes (es decir, en los cilios respiratorios). Los microtúbulos externos dobles y el par central de microtúbulos están conectados por rayos radiales. Cada uno de los nueve microtúbulos externos dobles consiste en un tubo A y uno B, estando los dobles interconectados circunferencialmente por un complejo regulador nexina-dineína. El brazo de la dineína interior y el brazo de dineína exterior están conectados a cada tubo A. Estos brazos de dineína contienen proteínas motoras que pueden desplazarse a lo largo de los microtúbulos, lo que da como resultado la flexión y, por lo tanto, el latido del cilio (véase, por ejemplo, Lodish *et al.*, 2000, Molecular Cell Biology, cuarta edición, Nueva York: W.H. Freeman, sección 19.4). Las investigaciones de las estructuras ciliares utilizando el modelo de *Trypanosoma brucei* indicaron que algunos de estos componentes estructurales exhiben un rápido recambio, mientras que los componentes esqueléticos de los rayos radiales, el par central y los brazos de dineína externos se incorporan principalmente en el extremo distal de la estructura ciliar durante el desarrollo (Vincensini *et al.*, Biol Cell, 2018, 110: 1-15).

Dado que el latido sincronizado de las células ciliadas es crucial para el transporte de fluidos a través de las superficies epiteliales, las perturbaciones de las estructuras ciliares pueden provocar trastornos graves. Los defectos de motilidad, incluida una amplitud reducida y/o frecuencia de latidos y/o asincronicidad, pueden ocurrir como resultado de una reducción o pérdida de los brazos de dineína, una desorganización de la disposición de los microtúbulos, incluida la mala localización y cambios en el número total de microtúbulos por axonema y combinaciones del mismo, por ejemplo. Hasta donde se sabe, los cambios en estos elementos axonémicos funcionales son causados por defectos genéticos subyacentes. Estos se deben principalmente a cambios en la secuencia de un gen que codifica un componente axonémico, incluidos los mencionados anteriormente. Como los genes se pueden transcribir en polirribonucleótidos tales como los ARNm, que a su vez se pueden traducir en proteínas, la secuencia de ADN de un gen afecta la síntesis de la proteína respectiva en vista de la cantidad y funcionalidad. Como los trastornos ciliares, es decir, las ciliopatías, causadas por cambios de secuencia, se heredan y, por lo tanto, se asocian con defectos de motilidad de los cilios en todas las etapas del desarrollo, incluido el embrión o los recién nacidos, las ciliopatías pueden tener consecuencias graves para el organismo.

Un ejemplo bien conocido de trastorno ciliar es la discinesia ciliar primaria (DCP), un trastorno progresivo que a menudo se asocia con una función pulmonar en declive. Por lo tanto, se requieren tratamientos a largo plazo que incluyen, por ejemplo, percusiones torácicas y drenaje postural para mejorar la eliminación de moco con una frecuencia creciente y, en casos graves, incluso el trasplante de pulmón. Además, los pacientes con DCP sufren infecciones recurrentes en los pulmones y/o los oídos, a menudo también de baja fertilidad, hidrocefalia y lateralidad corporal, es decir, defectos del eje izquierdo-derecho, así como problemas retinianos y/o neurológicos. Pero a pesar de la gravedad de la mayoría de las ciliopatías, hasta ahora no existen estrategias efectivas estandarizadas para tratar ciliopatías tales como la DCP. Las terapias actuales se extrapolan, por ejemplo, de la fibrosis quística y en la mayoría de los casos ni siquiera se han validado para la ciliopatía específica a tratar, como por ejemplo la DCP. Por lo tanto, existe la necesidad de tener a mano soluciones para poder tratar de forma eficaz a los sujetos que padecen una ciliopatía como la DCP.

La presente solicitud aborda la necesidad de restaurar la función ciliar en sujetos que padecen una ciliopatía, tal como DCP, proporcionando las realizaciones enumeradas en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para analizar el efecto de un polirribonucleótido sobre

la ciliogénesis, en el que dicho polirribonucleótido codifica una proteína implicada y/o requerida para la ciliogénesis, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (a) obtener un frotis de nariz de un sujeto que tiene una ciliopatía, comprendiendo dicho frotis de nariz células basales no diferenciadas y células ciliadas diferenciadas,
- 5 (b) cultivar las células obtenidas en la etapa (a) como un cultivo celular sumergido para obtener células basales no diferenciadas y células ciliadas desdiferenciadas,
- (c) cultivar células basales no diferenciadas y células ciliadas desdiferenciadas obtenidas en la etapa (b) como un cultivo celular de interfaz aire-líquido y realizar un levantamiento por aire,
- 10 (d) transfectar células obtenidas en la etapa (c) con un polirribonucleótido que codifica una proteína implicada y/o necesaria para la ciliogénesis,
- (e) cultivar las células transfectadas obtenidas en la etapa (d) para obtener células ciliadas diferenciadas, y
- (f) determinar el efecto de dicho polirribonucleótido sobre la ciliogénesis usando una medición de lactato deshidrogenasa, un ensayo NucGreen, una microscopía de video de alta velocidad, una medición de frecuencia de latido ciliar, un ensayo de eliminación mucociliar y/o tinción por inmunofluorescencia.
- 15 Para obtener células del epitelio respiratorio de un paciente, es ventajoso un frotis nasal, ya que es fácil de manejar y el procedimiento es rápido e indoloro para el paciente. Las células obtenidas de un frotis nasal comprenden células basales no diferenciadas y células ciliadas diferenciadas que pueden cultivarse como un cultivo celular sumergido. Cultivando las células como cultivo celular sumergido, se pueden obtener células basales no diferenciadas y células ciliadas desdiferenciadas ya que las condiciones sumergidas inducen una desdiferenciación de las células
- 20 epiteliales. Las células ciliadas desdiferenciadas así obtenidas, así como las células basales no diferenciadas del frotis nasal, se cultivan luego como un cultivo celular de interfaz aire-líquido (ALI).
- Un cultivo celular de interfaz aire-líquido de la etapa (c) se refiere a un cultivo celular que se caracteriza porque la superficie basal de las células está en contacto con un medio de cultivo líquido, mientras que la superficie apical está expuesta al aire. Las células se pueden sembrar, por ejemplo, en una membrana permeable de un inserto de cultivo
- 25 celular, que inicialmente se suministra con medio de cultivo a los compartimentos apical y basal. Esto también puede denominarse "cultivo celular sumergido". Una vez que se alcanza la confluencia, las células se someten a una etapa de "levantamiento por aire", en la que el medio se suministra solo a la cámara basal. Esto imita las condiciones que se encuentran, por ejemplo, en el sistema respiratorio e induce la diferenciación celular, incluida la ciliogénesis en células ciliares no diferenciadas.
- 30 Por lo tanto, se pueden obtener células que imitan el epitelio del sistema respiratorio que incluyen, por ejemplo, células basales y ciliadas para una investigación adicional *in vitro*.
- Las células que imitan el epitelio obtenidas pueden luego transfectarse con un polirribonucleótido que codifica una proteína implicada en y/o requerida para la ciliogénesis. Por lo tanto, dicho polirribonucleótido se introduce en las células, lo que se puede hacer artificialmente mediante infección viral o por medios distintos a la infección viral para
- 35 expresar el polirribonucleótido exógeno en las células. Las células transfectadas se cultivan luego para obtener células ciliadas diferenciadas a partir de células ciliadas basales y no diferenciadas. Por lo tanto, el efecto de un polirribonucleótido tal como un ARNm sobre la ciliogénesis puede determinarse *in vitro* mientras se conserva un entorno de las células que imita el epitelio del sistema respiratorio como se puede encontrar, por ejemplo, en un sujeto.
- 40 El efecto de un polirribonucleótido sobre la ciliogénesis puede determinarse mediante diversos procedimientos conocidos por un experto en la técnica. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, una medición de lactato deshidrogenasa, un ensayo NucGreen, una microscopía de video de alta velocidad, una medición de la frecuencia del latido ciliar, un ensayo de eliminación mucociliar y/o tinción por inmunofluorescencia. Por lo tanto, se puede realizar una medición de lactato deshidrogenasa (LDH) para determinar la cantidad de LDH liberada en el entorno
- 45 que rodea las células. El ensayo respectivo puede ser un ensayo colorimétrico, en el que la cantidad de LDH liberada se mide con una reacción enzimática que convierte, por ejemplo, yodonitrotetrazolio o una sal de tetrazolio en un formazano de color rojo. Por lo tanto, el ensayo se puede leer fácilmente mediante espectroscopia.
- Alternativa o adicionalmente, se puede realizar un ensayo NucGreen. NucGreen es una tinción de ácido nucleico fluorescente verde permanente al unirse a ácidos nucleicos y puede usarse para investigar los efectos de la transfección relacionados con la toxicidad, por ejemplo. Alternativa o adicionalmente, se puede realizar la tinción por
- 50 inmunofluorescencia de la proteína codificada por el polirribonucleótido transfectado para determinar su cantidad y localización celular, incluida la colocalización con otras proteínas. Para determinar la cantidad de proteína expresada, también es posible utilizar la tecnología de inmunotransferencia de tipo Western.
- Además, los defectos de la estructura ciliar o la falta de cilios pueden detectarse, por ejemplo, mediante microscopía
- 55 especializada. Las pruebas de detección incluyen la medición de la tasa de producción de óxido nítrico nasal, la

motilidad ciliar mediante microscopía de video de alta velocidad de células nasales o pruebas *in vivo* que incluyen una prueba de sacarina, por ejemplo. Un diagnóstico más específico requiere, por ejemplo, el examen de los cilios mediante inmunofluorescencia y microscopía electrónica de transmisión.

- 5 Alternativa o adicionalmente, la medición de la frecuencia del latido ciliar se puede aplicar para investigar la frecuencia del latido, el número de cilios y células ciliadas que late y la sincronización del latido usando microscopía de video de alta velocidad. Lo mismo se aplica a los ensayos de eliminación mucociliar que se pueden realizar para determinar la tasa de eliminación del moco que se ve afectada por la función ciliar.

- 10 Con respecto al polirribonucleótido a emplear en el procedimiento descrito, se aplica lo mismo que se describió anteriormente en relación con la composición farmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento de una ciliopatía. Además, también las otras características de dicho polirribonucleótido pueden ser las descritas anteriormente.

- 15 Además, el polirribonucleótido podría contener una secuencia que codifica un marcador. Los ejemplos incluyen tdTomato (como está comprendido, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 3), proteína verde fluorescente (GFP) y GFP mejorada (eGFP) como se describe en los ejemplos adjuntos junto con los procedimientos de detección respectivos. Esto es especialmente ventajoso para validar una transfección exitosa de una célula con el polirribonucleótido.

- 20 En algunas realizaciones del procedimiento para analizar el efecto de un polirribonucleótido sobre la ciliogénesis, las células se transfectan dentro de 0 a 12 días, preferiblemente dentro de 0 a 11 días, más preferiblemente dentro de 0 a 6 días, incluso más preferiblemente 0 a 4 días y más preferiblemente de 0 a 48 horas después de que se realiza el levantamiento por aire en la etapa (c). Esto es ventajoso ya que la etapa de levantamiento por aire induce la ciliogénesis de células ciliares basales y no diferenciadas.

- En algunas realizaciones del procedimiento para analizar el efecto de un polirribonucleótido sobre la ciliogénesis, las células se transfectan con un polirribonucleótido, preferiblemente un ARNm, que codifica una proteína implicada y/o requerida para la ciliogénesis usando un lipidoide que tiene la estructura que se muestra en las fórmulas (V), (VI) y/o (VII).

- 25 En algunas realizaciones del procedimiento para analizar el efecto de un polirribonucleótido sobre la ciliogénesis, las células se cultivan en las etapas (b) a (e) usando Medio G. La composición del Medio G es típicamente como se muestra en la tabla 2).

Tabla 2

Sustancia	Volumen	Concentración final
DMEM/F12 de Ham	100 ml	
Ultrosor G	2 ml	2%
Clon fetal II	2 ml	2%
Insulina	100 µl	2,5 µg/ml
Extracto de cerebro bovino	250 µl	22,5 µg/ml
Transferrina	100 µl	2,5 µg/ml
Hidrocortisona	20 µl	20 nM
3,3',5-Triyodo-L-tironina	3,33 µl	500 nM
Epinefrina	10 µl	1,5 µM
Ácido retinoico	10 µl	10 nM
Fosforiletanolamina	5 µl	250 nM
Etanolamina	100 µl	250 nM
DAPT	10 µl	1 µM

- 30 En algunas realizaciones del procedimiento para analizar el efecto de un polirribonucleótido sobre la ciliogénesis, las células se cultivan en las etapas (b) a (e) utilizando uno de los medios que se muestran en la tabla 3. Los medios que se muestran en la tabla 3 son algunos medios disponibles comercialmente en el mercado que se puede utilizar para el desarrollo del cultivo de ALI.

Tabla 3

Proveedor	Fase de crecimiento	Fase de diferenciación
LONZA	ALI-G	ALI-D
StemCell	ALI-Ex	ALI-M
Epithelix	MucilAir	MucilAir
PELOBiotech	Pelo	Pelo

- 35 En algunas realizaciones del procedimiento para analizar el efecto de un polirribonucleótido sobre la ciliogénesis, el frotis nasal comprende además fibroblastos y en el que el crecimiento de dichos fibroblastos se inhibe en las etapas

(b) a (e). Esto es ventajoso ya que los fibroblastos crecen más rápidamente en comparación con las células ciliares basales y no diferenciadas y, por lo tanto, puede obstaculizar la investigación del efecto de un polirribonucleótido sobre la ciliogénesis como se describió anteriormente.

5 Antes de transferir las células al matraz de la fase estacionaria, los fibroblastos se pueden separar del resto de las células debido a un breve tiempo de incubación de 1-2 h. Durante este tiempo, los fibroblastos pueden asentarse y adherirse al matraz celular. Todas las demás células permanecen en el medio como células en suspensión y pueden transferirse fácilmente después al "matraz de fase estacionaria".

10 El procedimiento según la presente invención preferiblemente da como resultado la identificación de un polirribonucleótido que tiene un efecto positivo sobre la ciliogénesis y que puede usarse para restaurar la estructura de la célula ciliar en función y, por lo tanto, en una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una ciliopatía en un sujeto que padece una ciliopatía. Con respecto a las características del polirribonucleótido cuya función se analiza en el procedimiento según la presente invención, estas se describirán además a continuación.

15 La presente invención se basa en el hallazgo de que de hecho es posible restaurar la función ciliar adecuada mediante la transfección de células (que muestran un defecto en una determinada proteína de un complejo proteico de los cilios y cuyo defecto conduce a una pérdida de la función ciliar adecuada) con polirribonucleótidos que codifican una versión funcional de dicha proteína. Sin embargo, también se encontró que las células ciliadas deben transfectarse en una etapa temprana durante la diferenciación para lograr este efecto. Esto conduce a problemas prácticos, ya que las células precursoras de las células epiteliales que portan los cilios, es decir, las células basales, no son accesibles para la transfección a través del sistema de las vías respiratorias, ya que están ubicadas más profundamente en el epitelio y no están expuestas en la superficie. Se efectúa una transfección de las células epiteliales mediante la administración de un polirribonucleótido cuando el sujeto que padece una ciliopatía presenta una inflamación del sistema respiratorio. Durante una inflamación del sistema respiratorio, el epitelio de las vías respiratorias muestra lesiones y heridas que hacen accesibles las células precursoras de las células ciliadas, es decir, las células basales que aún no han iniciado la ciliogénesis. La transfección de estas células con un polirribonucleótido identificado en el procedimiento según la presente invención que expresa una versión funcional de la proteína respectiva permite convertir estas células en células que forman cilios funcionales o cilios al menos parcialmente funcionales que pueden conducir a un alivio sustancial de los síntomas respectivos.

30 En el contexto de la presente invención, el término "ciliopatía" se refiere a enfermedades asociadas y/o caracterizadas por defectos de células ciliadas. Por lo tanto, las ciliopatías comprenden trastornos de las estructuras ciliares, incluidas las estructuras de anclaje ciliares, los cuerpos basales a los que están ancladas las estructuras ciliares dentro de una célula y/o la función ciliar. Ejemplos de ciliopatías incluyen DCP, síndrome de Bardet-Biedl, síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (tipo 2), amaurosis congénita de Leber, nefronofitosis, displasia craneoectodérmica (Sensenbrenner) (véase, por ejemplo, Mitchison *et al.*, 2017, *Ultrastructural Pathology*, 41 (6): 415-427).

35 El término "ciliopatía" como se usa en este documento se refiere a una ciliopatía que es causada por un defecto genético en el ADN de un sujeto, por ejemplo, el ADN cromosómico o mitocondrial. Tal defecto genético puede estar causado por una mutación y puede comprender la pérdida, adición o intercambio de una parte de la secuencia. Los ejemplos son variación del número de copias, variación de presencia/ausencia, eliminación (total o parcial), inserción, mutación equivocada, mutación sin sentido, variación del sitio de empalme o una combinación de las mismas. Tales cambios en el ADN pueden conducir a cambios en la disponibilidad de la proteína codificada, tal como una pérdida o reducción de la cantidad de proteína, o una proteína con función alterada.

45 En una realización preferida, el término "ciliopatía" se refiere a una enfermedad relacionada con un defecto en los cilios móviles. Un ejemplo de tal ciliopatía es la discinesia ciliar primaria (DCP). La DCP es una enfermedad rara causada por la disfunción de los cilios móviles. La DCP es heterogénea a nivel genético, funcional y ultraestructural. La DCP se asocia con una alteración del transporte y la eliminación de moco. Los sujetos que padecen DCP muestran congestiones nasales recurrentes, infecciones de los senos nasales, infecciones de los oídos, infertilidad, anomalías del situs tales como situs inversus totalis y heterotaxia, también denominada "situs ambiguous" y/o hidrocefalia. A nivel molecular, la DCP se asocia en la mayoría de los casos con anomalías en la estructura, función y biogénesis de los cilios del sistema respiratorio. Ejemplos de tales anomalías son brazos de dineína ausentes o acortados, complejo de par central defectuoso, rayos radiales o enlaces de nexina. Tales anomalías y, por lo tanto, los defectos de motilidad ciliar asociados con la DCP son causados por mutaciones en genes que codifican los componentes respectivos, en particular por mutaciones en genes enumerados en la tabla 1, en la que los grupos "A" y "B" se refieren a genes con mutaciones patogénicas que representan al menos el 1% y menos del 1% de los casos de DCP, respectivamente (véase, Zariwala *et al.*, *GeneReviews*®, 2007, actualizado 2015, *Primary Ciliary Dyskinesia*, editores Adam *et al.*, Seattle (WA): Universidad de Washington, Seattle; 1993-2018).

Por lo tanto, el polirribonucleótido analizado en el procedimiento según la presente invención es preferiblemente un polirribonucleótido que puede traducirse en una versión funcional de una proteína enumerada en la tabla 1.

Más preferiblemente, el polirribonucleótido analizado en el procedimiento según la presente invención es un ARNm que puede traducirse en una versión funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en DNAH5,

DNAH11, CCDC39, DNAI1, CCDC40, CCDC103, SPAG1, ZMYND10, ARMC4, CCDC151, DNAI2, RSPH1, CCDC114, RSPH4A, DNAAF1 (LRRC50), DNAAF2 (KTU) y LRRC6.

Tabla 1

Gen	Locus	Proteína	Grupo
<i>DNAH5</i>	CILD3	DNAH5	A
<i>DNAH11</i>	CILD7	DNAH11	A
<i>CCDC39</i>	CILD14	CCDC39	A
<i>DNAI1</i>	CILD1	DNAI1	A
<i>CCDC40</i>	CILD15	CCDC40	A
<i>CCDC103</i>	CILD17	CCDC103	A
<i>SPAG1</i>	CILD28	SPAG1	A
<i>ZMYND10</i>	CILD22	ZMYND10	A
<i>ARMC4</i>	CILD23	ARMC4	A
<i>CCDC151</i>	CILD30	CCDC151	A
<i>DNAI2</i>	CILD9	DNAI2	A
<i>RSPH1</i>	CILD24	RSPH1	A
<i>CCDC114</i>	CILD20	CCDC114	A
<i>RSPH4A</i>	CILD11	RSPH4A	A
<i>DNAAF1 (LRRC50)</i>	CILD13	DNAAF1 (LRRC50)	A
<i>DNAAF2 (KTU)</i>	CILD10	DNAAF2 (KTU)	A
<i>LRRC6</i>	CILD19	LRRC6	A
<i>C21orf59</i>	CILD26	C21orf59	B
<i>CCDC65 (DRC2)</i>	CILD27	CCDC65 (DRC2)	B
<i>CCNO</i>	CILD29	CCNO	B
<i>DNAAF3</i>	CILD2	DNAAF3	B
<i>DNAH1</i>		DNAH1	B
<i>DNAH8</i>		DNAH8	B
<i>DNAL1</i>	CILD16	DNAL1	B
<i>DRC1 (CCDC164)</i>	CILD21	DRC1 (CCDC164)	B
<i>DYX1C1</i>	CILD25	DYX1C1	B
<i>DNAAF5 (HEATR2)</i>	CILD18	DNAAF5 (HEATR2)	B
<i>HYDIN</i>	CILD5	HYDIN	B
<i>MCIDAS</i>		MCIDAS	B
<i>NME8 (TXNDC3)</i>	CILD6	NME8 (TXNDC3)	B
<i>RSPH3</i>		RSPH3	B
<i>RSPH9</i>	CILD12	RSPH9	B

- 5 En algunas realizaciones de cualquiera de las anteriores u otros aspectos y realizaciones de la divulgación, el polirribonucleótido o polirribonucleótido modificado comprende una secuencia primaria que es al menos 85%, al menos 90%, al menos 92% o al menos 95% idéntica (por ejemplo, al menos 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntica) a una o más de la SEQ ID NO: 1 o 5 a 11 (por ejemplo, a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 o 5 a 11). En algunas realizaciones, el polirribonucleótido es un polirribonucleótido modificado que tiene un nivel y/o tipo de modificación seleccionado de cualquiera de dichos niveles y/o tipo establecidos en el presente documento.
- 10 En determinadas realizaciones, el porcentaje de identidad de un polirribonucleótido se mide solo con respecto a la porción de secuencia codificante de CCDC40 de la SEQ ID NO: 1 o 5 a 11 (por ejemplo, UTR, otras secuencias no codificantes y GFP o etiquetas de epítipo no se consideran al calcular el porcentaje de identidad). En determinadas realizaciones de cualquiera de los anteriores, tal polirribonucleótido (o polirribonucleótido modificado) codifica una proteína CCDC40 funcional.
- 15 En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores u otros y realizaciones de la divulgación, el polirribonucleótido o polirribonucleótido modificado comprende una secuencia primaria que es al menos 85%, al menos 90%, al menos 92% o al menos 95% idéntica (por ejemplo, al menos 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntica) a una o más de la SEQ ID NO: 2 o 12 a 14 (por ejemplo, a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2 o 12 a 14). En algunas realizaciones, el polirribonucleótido es un polirribonucleótido modificado que tiene un nivel y/o tipo de modificación seleccionado de cualquiera de dichos niveles y/o tipo establecidos en el presente documento.
- 20 En determinadas realizaciones, el porcentaje de identidad de un polirribonucleótido se mide solo con respecto a la porción de secuencia codificante de CCDC39 de la SEQ ID NO: 2 o 12 a 14 (por ejemplo, las UTR, otras secuencias no codificantes y etiquetas de GFP o etiquetas de epítipo no son consideradas al calcular el porcentaje de identidad). En determinadas realizaciones de cualquiera de los anteriores, tal polirribonucleótido (o polirribonucleótido modificado) codifica una proteína CCDC39 funcional.
- 25 En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores u otros y realizaciones de la divulgación, el polirribonucleótido o polirribonucleótido modificado comprende una secuencia primaria que es al menos 85%, al

menos 90%, al menos 92% o al menos 95% idéntica (por ejemplo, al menos 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntica) a la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, el polirribonucleótido es un polirribonucleótido modificado que tiene un nivel y/o tipo de modificación seleccionada de cualquiera de dicho nivel y/o tipo establecidos en el presente documento. En determinadas realizaciones, el porcentaje de identidad de un polirribonucleótido se mide solo con respecto a la porción de secuencia codificante de MCIDAS de la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, las UTR, otras secuencias no codificantes y etiquetas de epítipo o GFP no se consideran al calcular el porcentaje de identidad). En determinadas realizaciones de cualquiera de los anteriores, tal polirribonucleótido (o polirribonucleótido modificado) codifica una proteína MCIDAS funcional.

En una realización del procedimiento según la presente invención, la ciliopatía mencionada en la etapa (a) está asociada con un defecto en un dominio en espiral que contiene la proteína 40 (CCDC40; véase, por ejemplo, las secuencias de referencia del NCBI NM_017950.4 y NP_060420.2 para la secuencia de ARNm humano y proteína CCDC40, respectivamente) o con un defecto en un dominio en espiral que contiene la proteína 39 (CCDC39; véase, por ejemplo, las secuencias de referencia del NCBI NM_181426.2 y NP_852091.1 para la secuencia de ARNm humano y de la proteína CCDC39, respectivamente).

CCDC40 y CCDC39 construyen un complejo que se encuentra entre los rayos radiales y los túbulos A. Las versiones defectuosas de la proteína CCDC40 o CCDC39 pueden ser causadas por mutaciones en el gen *CCDC40* o en el gen *CCDC39*, tal como inserciones, eliminaciones, mutaciones sin sentido y en el sitio de empalme. En particular, una eliminación de la posición 248 y una inserción de TGT entre las posiciones 2.824 y 2.825 en la secuencia de ADN que codifica la proteína CCDC40 parecen ser bastante frecuentes. Las versiones defectuosas de CCDC40 o CCDC39 dan lugar a defectos en las estructuras del axonema, como pares centrales ausentes o excéntricos, rayos radiales anormales y enlaces de nexina, un ensamblaje anormal del complejo regulador de dineína y/o una reducción de los brazos de dineína internos. Por lo tanto, el polirribonucleótido comprendido en la composición farmacéutica según la presente invención es preferiblemente un ARNm que puede traducirse en una versión funcional de CCDC40 y/o de CCDC39. Se puede encontrar más información sobre las proteínas implicadas en la ciliogénesis, así como sobre los genes y las vías moleculares asociadas con las ciliopatías, por ejemplo, en el artículo de revisión de Reiter y Leroux (Reiter y Leroux, 2017, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18 (9): 533-547).

En este documento, un sujeto que padece una ciliopatía también puede denominarse paciente. Los pacientes pueden mostrar una estructura y/o función ciliar anormal y/o defectos de biogénesis que dan como resultado la retención de moco y bacterias en el tracto respiratorio. El diagnóstico de una ciliopatía para un sujeto dado puede basarse, por ejemplo, en hallazgos clínicos, análisis moleculares y/o análisis ultraestructurales ciliares de una biopsia de dicho sujeto como por ejemplo también se revisa en Goutaki *et al.*, (Goutaki *et al.*, 2016, *Eur Respir J*, 48 (4): 1081-1095).

En el contexto de la presente invención, el término “polirribonucleótido” se refiere a una secuencia monocatenaria constituida por residuos de adenosina, guanosina, citidina y/o uridina (en forma modificada o sin modificar, véase más adelante). En este documento, el término “polirribonucleótido que codifica una proteína” se refiere a un polirribonucleótido que contiene una región codificante que codifica una proteína, es decir, que puede traducirse en una secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el término “polirribonucleótido que codifica una proteína” se refiere preferiblemente a un ARNm, en el que un ARNm debe entenderse como cualquier molécula de polirribonucleótido que, si entra en la célula, es adecuada para la expresión de una proteína o se puede traducir en una proteína.

En este documento, el término “proteína” abarca cualquier tipo de secuencia de aminoácidos, es decir, cadenas de dos o más aminoácidos, cada uno de las cuales están unidas mediante enlaces peptídicos. El término “proteína” utilizado en este contexto se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos de interés. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos codificada tiene al menos 5 aminoácidos de longitud, más preferiblemente al menos 10 aminoácidos, incluso más preferiblemente al menos 50, 100, 200 o 500 aminoácidos. Por lo tanto, el término “proteína” cubre péptidos cortos, así como polipéptidos. En cuanto a la función de la proteína codificada, no existe ninguna limitación, excepto que una variante defectuosa de la proteína está asociada con una ciliopatía. En este documento, el término “asociado con” pretende abarcar los términos “causar”, “estar implicado en” y/o “mejorar”.

En este documento, el término “una proteína cuyo defecto” se refiere a una “proteína defectuosa” o “versión defectuosa de una proteína” y, por lo tanto, a una versión de una proteína con función alterada en comparación con una versión funcional de dicha proteína. Sin embargo, el término también puede abarcar una versión de dicha proteína con una falta total o parcial de síntesis y, por lo tanto, de disponibilidad en la célula. En cualquier caso, el defecto de la versión de la proteína da como resultado una versión de dicha proteína que no puede cumplir con la función nativa de la proteína.

Una versión de una proteína que cumple su función nativa se denomina “proteína funcional” o “versión funcional de una proteína” en el presente documento, y está codificada por la misma secuencia de ADN que la proteína defectuosa respectiva, pero sin que el defecto cause un cambio en la secuencia de ADN y, por lo tanto, sin una mutación en la secuencia de ADN.

Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, la “proteína funcional” es preferiblemente un bloque de

construcción de un túbulo A, un túbulo B o un complejo regulador de nexina-dineína, o un rayo radial, un brazo de dineína interno y/o un brazo de dineína externo.

Por lo tanto, el término “el polirribonucleótido codifica una versión funcional de una proteína cuyo defecto está asociado con dicha ciliopatía” se refiere preferiblemente a un ARNm que codifica una proteína funcional, que está implicada en la organización estructural de un axonema ciliar, una estructura de anclaje de axonema o un cuerpo basal y cumple su función nativa. Por lo tanto, el polirribonucleótido analizado en el procedimiento según la presente invención se refiere preferiblemente a un ARNm que codifica una proteína funcional, cuya presencia en la célula de un sujeto que padece una ciliopatía es necesaria o beneficiosa para moderar o prevenir una manifestación de dicha ciliopatía que está asociada con un defecto de dicha proteína codificada por la secuencia de ADN de la célula o para aliviar los síntomas asociados.

Además, el polirribonucleótido analizado en el procedimiento según la presente invención también puede comprender otras regiones funcionales y/o regiones no codificantes 3' o 5'. Las regiones no codificantes 3' y/o 5' pueden ser secuencias que flanquean naturalmente la proteína codificada o secuencias artificiales que contribuyen a la estabilización y/o regulación de dicho polirribonucleótido. Las secuencias adecuadas pueden identificarse e investigarse mediante experimentos de rutina. Además, dicho polirribonucleótido también puede tener otras regiones funcionales y puede combinarse con elementos reguladores y secuencias diana de los microARN, por ejemplo, para el control espacial y temporal de la actividad del polirribonucleótido deseado que comprende una secuencia que codifica una proteína, es decir, por ejemplo con respecto a células específicas o tipos de células y/o etapas de desarrollo o marcos de tiempo específicos.

El polirribonucleótido empleado en el procedimiento según la presente invención puede comprender una secuencia optimizada de codones parcial o totalmente derivada de la secuencia natural que se va a utilizar. La optimización de codones se refiere a una técnica que se aplica para maximizar la expresión de proteínas aumentando la eficiencia de traducción del polirribonucleótido respectivo, ya que en algunos casos existen codones que son usados preferentemente por algunas especies para un aminoácido dado. Además, dicho polirribonucleótido podría comprender modificaciones adicionales para ajustar y/o extender la duración de la acción. Dicho polirribonucleótido también podría contener un protector de m7GpppG, un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y/o una cola de poliA en el extremo 3' y/o secuencias adicionales para promover la traducción.

En algunas realizaciones de la presente invención, el polirribonucleótido empleado en el procedimiento según la presente invención puede contener nucleótidos modificados y no modificados. El término “nucleótido no modificado” utilizado en el presente documento se refiere a nucleótidos A, C, G y U. El término “nucleótido modificado” utilizado en el presente documento se refiere a cualquier isómero natural o no natural de nucleótidos A, C, G y U, así como a cualquier análogo natural o análogos naturales, nucleótido alternativo o modificado o isómero del mismo que tenga, por ejemplo, modificaciones químicas o residuos sustituidos. Los nucleótidos modificados pueden tener una modificación de base y/o una modificación de azúcar. Los nucleótidos modificados también pueden tener modificaciones del grupo fosfato, por ejemplo, con respecto al protector 5' de una molécula de ARNm. Los nucleótidos modificados también incluyen nucleótidos que se sintetizan postranscripcionalmente mediante modificación covalente de los nucleótidos. Además, es posible cualquier mezcla adecuada de nucleótidos modificados y no modificados. Se puede encontrar un número no limitante de ejemplos de nucleótidos modificados en la literatura (por ejemplo, Cantara *et al.*, Nucleic Acids Res, 2011, 39 (suplemento 1 de la publicación): D195-D201; Helm y Alfonzo, Chem Biol, 2014, 21 (2): 174-185; Carell *et al.*, Angew Chem Int Ed Engl, 2012, 51 (29): 7110-31) y algunos nucleótidos modificados preferibles se mencionan a modo de ejemplo a continuación en función de sus respectivos residuos de nucleósidos:

1-metiladenosina, 2-metiltio-N6-hidroxinorvalil carbamoiladenosina, 2-metiladenosina, 2'-O-ribosilfosfato adenosina, N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6-acetiladenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-metiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N6-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina, 1,2'-O-dimetiladenosina, N6,2'-O-dimetiladenosina, 2'-O-metiladenosina, N6,N6,2'-O-trimetiladenosina, 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-metiladenosina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenosina, 2-metiltio-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6-2-metiltio-N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 7-metiladenosina, 2-metiltioadenosina, 2-metoxi-adenosina, 2'-amino-2'-desoxiadenosina, 2'-azido-2'-desoxiadenosina, 2'-fluoro-2'-desoxiadenosina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-deaza-adenosina, 7-deaza-8-aza-adenosina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina; 2-tiocitidina, 3-metilcitidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-hidroxicitidina, lisidina, N4-acetil-2'-O-metilcitidina, 5-formil-2'-O-metilcitidina, 5,2'-O-dimetilcitidina, 2-O-metilcitidina, N4,2'-O-dimetilcitidina, N4,N4,2'-O-trimetilcitidina, isocitidina, pseudocitidina, pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2'-metil-2'-desoxicitidina, 2'-amino-2'-desoxicitidina, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, 5-iodocitidina, 5-bromocitidina, 2'-azido-2'-desoxicitidina, 2'-amino-2'-desoxicitidina, 2'-fluor-2'-desoxicitidina, 5-aza-citidina, 3-metil-citidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina, 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina; 1-metilguanosina, N2,7-dimetilguanosina, N2-metilguanosina, 2'-O-ribosilfosfato guanosina, 7-metilguanosina, hidroxiwibutosina, 7-aminometil-7-deazaguanosina,

7-ciano-7-deazaguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, N2,7,2'-O-trimetilguanosina, N2,2'-O-dimetilguanosina, 1,2'-O-dimetilguanosina, 2'-O-metilguanosina, N2,N2,2'-O-trimetilguanosina, N2,N2-J-trimetilguanosina, Isoguanosina, 4-demetilwiosina, epoxiqueuosina, hidroxibutosa poco modificada, hidroxibutosa metilada poco modificada, isowiosina, peroxibutosa, galactosil-queuosina, manosil-queuosina, queuosina, arqueosina, wibutosa, metilwiosina, wiosina, 7-aminocarboxipropildemetilwiosina, 7-aminocarboxipropilwiosina, éster metílico de 7-aminocarboxi propilwiosina, 7-deaza-guanosina, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxilguanosina, 1-metilguanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina, N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina, N1-metilguanosina, 2'-amino-3'-desoxiguanosina, 2'-azido-2'-desoxiguanosina, 2'-fluoro-2'-desoxiguanosina, 2-tiouridina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, 3-metiluridina, 4-tiouridina, 5-metil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-carboximetiluridina, 5-carboximetilaminometiluridina, 5-hidroxi uridina, 5-metiluridina, 5-taurinometiluridina, 5-carbamometiluridina, éster metílico de 5-(carboxihidroxi metil)uridina, dihidrouridina, 5-metildihidrouridina, 5-metilaminometil-2-tiouridina, 5-(carboxihidroxi metil)uridina, éster metílico de 5-(carboxihidroxi metil)-2'-O-metiluridina, 5-(isopentenilaminometil)uridina, 5-(isopentenil aminometil)-2-tiouridina, 3,2'-O-dimetiluridina, 5-carboximetilaminometil-2'-O-metiluridina, 5-carbamohidroxi metiluridina, 5-carbamometil-2'-O-metiluridina, 5-carbamometil-2-tiouridina, 5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metiluridina, 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metiluridina, 5,2'-O-dimetiluridina, 2'-O-metiluridina, 2'-O-metil-2-tiouridina, 2-tio-2'-O-metiluridina, ácido 5-oxiacético uridina, 5-metoxycarbonilmetiluridina, éster metílico del ácido 5-oxiacético uridina, 5-metoxiuridina, 5-aminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometil-2-selenouridina, 5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina, 5-taurinometil-2-tiouridina, pseudouridina, 1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudouridina, 1-metilpseudouridina, 3-metilpseudouridina, 2'-O-metilpseudouridina, 5-formil uridina, 5-aminometil-2-geraniluridina, 5-taurinometiluridina, 5-yodouridina, 5-bromouridina, 2'-metil-2'-desoxiuridina, 2'-amino-2'-desoxiuridina, 2'-azido-2'-desoxiuridina, 2'-fluoro-2'-desoxiuridina, inosina, 1-metilinosina, 1,2'-O-dimetilinosina, 2'-O-metilinosina, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudo uridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina, 1-taurinometil-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 1,2'-O-dimetil adenosina, 1,2'-O-dimetilguanosina, 1,2'-O-dimetilinosina, 2,8-dimetiladenosina, 2-metilmetilientio-N6-iso pentenil-adenosina, 2-geraniltiouridina, 2-lisidina, 2-metil N6-treonilcarbamoiladenosina cíclica, 2-metil N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metil N6-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina, 2-metil N6-treonil carbamoiladenosina, 2-selenouridina, 2-tio-2'-O-metiluridina, 2'-O-metiladenosina, 2'-O-metilcitidina, 2'-O-metilguanosina, 2'-O-metilinosina, 2'-O-metilpseudouridina, 2'-O-metiluridina, éster metílico del ácido 2'-O-metiluridin-5-oxiacético, fosfato de 2'-O-ribosiladenosina, fosfato de 2'-O-ribosilguanosina, 3,2'-O-dimetiluridina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)-5,6-dihidrouridina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudouridina, 5,2'-O-dimetilcitidina, 5,2'-O-dimetiluridina, éster metílico de 5-(carboxihidroxi metil)-2'-O-metiluridina, 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metiluridina, 5-aminometil-2-geraniltiouridina, 5-aminometil-2-selenouridina, 5-aminometiluridina, 5-carbamoi metil-2'-O-metiluridina, 5-carboxihidroxi metiluridina, 5-carboximetil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometil-2-geraniltiouridina, 5-carboximetilaminometil-2-selenouridina, 5-carboximetilaminometil-2'-O-metiluridina, 5-ciano metiluridina, 5-formil-2'-O-metilcitidina, 5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metiluridina, 5-metilaminometil-2-geraniltio uridina, 7-aminocarboxipropildemetilwiosina, 7-metilguanosina, 8-metiladenosina, N2,2'-O-dimetilguanosina, N2,7,2'-O-trimetilguanosina, N2,7-dimetilguanosina, N2,N2,2'-O-trimetilguanosina, N2,N2,7-trimetilguanosina, N2,N2,7-trimetilguanosina , N4,2'-O-dimetilcitidina, N4,N4,2'-O-trimetilcitidina, N4,N4-dimetilcitidina, N4-acetil-2'-O-metilcitidina, N6,2'-O-dimetiladenosina, N6,N6,2'-O-trimetiladenosina, N6-formiladenosina, N6-hidroxi metiladenosina, agmatidina, 2-metil N6-treonilcarbamoiladenosina cíclica, glutamil-queuosina, guanosina añadida a cualquier nucleótido, extremo 5' guanilado , hidroxil-N6-treonilcarbamoiladenosina; lo más preferiblemente pseudo-uridina, N1-metil-pseudo-uridina, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, 5-yodocitidina, 5-metil citidina, 2-tiouridina, 5-yodouridina y/o 5-metil-uridina.

Además, el término “nucleótido modificado” comprende nucleótidos que contienen isótopos tal como deuterio. El término “isótopo” se refiere a un elemento que tiene el mismo número de protones, pero diferente número de neutrones, lo que da como resultado diferentes números de masa. Por lo tanto, los isótopos de hidrógeno, por ejemplo, no se limitan al deuterio, sino que también incluyen tritio. Además, el polirribonucleótido también puede contener isótopos de otros elementos que incluyen, por ejemplo, carbono, oxígeno, nitrógeno y fósforo. También es posible que los nucleótidos modificados estén deuterados o contengan otro isótopo de hidrógeno o de oxígeno, carbono, nitrógeno o fósforo.

El número total de tipos de nucleótidos modificados en el polirribonucleótido puede ser 0, 1, 2, 3 o 4. Por lo tanto, en algunas realizaciones, al menos un nucleótido de un tipo de nucleótido, por ejemplo, al menos un nucleótido U puede ser un nucleótido modificado. En algunas realizaciones, al menos un nucleótido de un total de dos tipos de nucleótidos, por ejemplo, al menos un nucleótido U y al menos un nucleótido C, puede ser un nucleótido modificado. En algunas realizaciones, al menos un nucleótido de un total de tres tipos de nucleótidos, por ejemplo, al menos un nucleótido G, al menos un nucleótido U y al menos un nucleótido C, puede ser un nucleótido modificado. En algunas realizaciones, al menos un nucleótido de los cuatro tipos de nucleótidos puede ser un nucleótido modificado. En todas estas realizaciones se pueden modificar uno o más nucleótidos por tipo de nucleótido, siendo el porcentaje de dichos nucleótidos modificados por tipo de nucleótido 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 100%.

En algunas realizaciones, el porcentaje total de nucleótidos modificados comprendidos en las moléculas de ARNm a purificar es 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 100%.

5 Por lo tanto, el polirribonucleótido se puede caracterizar, por ejemplo, porque se modifican del 0,5 al 50%, preferiblemente del 5 al 50% de los nucleótidos U y del 5 al 50% de los nucleótidos C. Dichos nucleótidos U modificados son preferiblemente 5-yodouridina y dichos nucleótidos C modificados son preferiblemente 5-yodocitidina.

10 En algunas realizaciones, el polirribonucleótido se puede caracterizar porque del 15 al 25% de los nucleótidos U y del 3 al 15%, preferiblemente del 5 al 15% de los nucleótidos C están modificados, en el que dichos nucleótidos U modificados son preferiblemente 5-metiluridina y dichos nucleótidos C modificados son preferiblemente 5-yodocitidina.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido se puede caracterizar porque del 30 al 50% de los nucleótidos U y del 10 al 20% de los nucleótidos C están modificados, en el que dichos nucleótidos U modificados son preferiblemente 5-yoduridina y dichos nucleótidos C modificados son preferiblemente 5-yodocitidina.

15 En algunas realizaciones, el polirribonucleótido se puede caracterizar porque del 30 al 50% de los nucleótidos U y del 5 al 15% de los nucleótidos C están modificados, en el que dichos nucleótidos U modificados son preferiblemente 5-yoduridina y dichos nucleótidos C modificados son preferiblemente 5-yodocitidina.

20 En algunas realizaciones, el polirribonucleótido se puede caracterizar porque del 0,5 al 5% de los nucleótidos U y del 25 al 35% de los nucleótidos C están modificados, en el que dichos nucleótidos U modificados son preferiblemente 2-tiouridina y dichos nucleótidos C modificados son preferiblemente 5-metilcitidina.

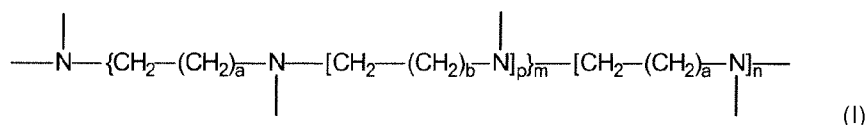
El polirribonucleótido también se puede caracterizar, por ejemplo, porque del 50 al 100%, preferiblemente el 100%, de los nucleótidos U están modificados. Dichos nucleótidos U modificados son preferiblemente N1-metil-pseudo-uridina.

25 El polinucleótido puede transfectarse en las células usando compuestos que faciliten la transfección de células con polirribonucleótidos. Ejemplos de tales compuestos son los dados a conocer en el documento WO 2014/20723.

En particular, se prevé que este/estos agentes) o reactivos apoyen el suministro y/o la introducción del ARN en la célula o tejido. El ARN que se va a administrar/introducir también puede estar acoplado (por ejemplo, unido covalentemente o complejoado con) o desacoplado (por ejemplo, solo mezclado con) este/estos agentes o reactivos. Se conocen los agentes o reactivos respectivos en la técnica (por ejemplo, Tavernier, J Control Release 150 (3) 30 (2011), 238-47) y se seleccionan, por ejemplo, del grupo que consiste en lípidos y liposomas, micelas, polímeros y dendrímeros, entre otros. Ejemplos particulares de agentes o reactivos respectivos son GL67, EDMPC, DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano), XTC (2,2-dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano) y MC3 (4-(dimetilamino)butanoato de ((6Z,9Z,28Z,31Z)-hepta-triaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo, ALNY-100 ((3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil) tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina)), NC98-5 (4,7,13-tris(3-oxo-3-(undecilamino) propil)-N1,N16-di undecil-4,7,10,13-tetraazahexadecano-1,16-diamida), C12-200, DLin-KC2-DMA, DODAP, 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DSDMA", 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DODMA", 1,2-dilinoil oxo-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoilenoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLenDMA", cloruro de N-dioleil-N,N- de dimetilamonio o "DODAC", bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio o "DDAB", bromuro de N-(1,2-dimistiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxi etilamonio o "DMRIE", 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadeca-di enoxi)propano o "CLinDMA", 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi)-3-dimetil-1-(cis,cis-9',1'-2'-octadecadienoxi)propano o "CpLinDMA", N,N-dimetil-3,4-dioleiloxi bencilamina o "DMOBA", 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DOcarbDAP", 2,3-dilinoileoiloxi-N,N-dimetilpropilamina o "DLinDAP", 1,2-N,N'-dilinoileilcarbamil-3-dimetil-amino propano o "DLincarbDAP", 1,2-dilinoileoilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLinCDAP", 2,2-dilinoil-4-dimetilamino metil[1,3]-dioxolano o "DLin-K-DMA", 2,2-dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-XTC2-DMA", o mezclas de los mismos (Heyes, J Controlled Release 107 (2005), 276-287; Morrissey, Nat. Biotechnol. 23 (8) (2005), 1003-1007; documento WO2005/121348). Otros ejemplos son DC-Col (N,N-dimetil-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis(3-N-oleilaminopropil) piperazina (Gao, Biochem. Biophys. Res. Comm. 179 (1991), 280; Wolf *et al.*, BioTechniques 23 (1997), 139; patente de los Estados Unidos No. 5.744.335). Otros ejemplos son LIPOFECTIN (DOTMA: DOPE) (Invitrogen, Carlsbad, CA), LIPOFECTAMINE (DOSPA: DOPE) (Invitrogen), LIPOFECTAMINE 2000. (Invitrogen), FUGENE, TRANSFECTAM (DOGS) y EFFECTENE. Otros ejemplos son poliacrilatos modificados y no modificados, cianoacrilatos de polialquilo, polilactida, copolímeros de polilactida-poliglicólido, policaprolactonas, dextrano, albúmina, gelatina, alginato, colágeno, quitosano, ciclodextrinas, polilisina, poliarginina, oligo/poliaminas y polietilenimina.

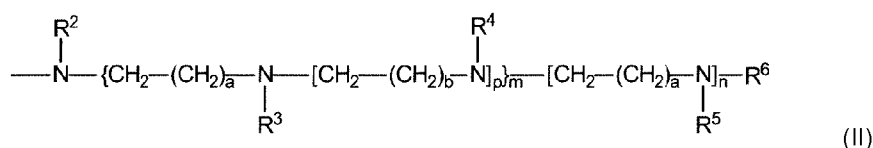
55 Los agentes o reactivos pueden ser oligómeros, polímeros o lipidoides. Pueden comprender fracciones de oligo (alquilenamina) como, por ejemplo, las fracciones oligo(alquilenamina) características como se describe en el documento PCT/EP2014/063756. En particular, los agentes o reactivos pueden ser oligómeros, polímeros o lipidoides como se describe en el documento PCT/EP2014/063756. Una característica principal de estos agentes o

reactivos particulares es que contienen la siguiente entidad estructural común de fórmula (I):



Dichos agentes o reactivos pueden ser (un componente que comprende) una oligo(alquilenamina) seleccionada entre:

- 5 a) un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (II) como cadena lateral y/o como grupo terminal:



en la que las variables a, b, p, m, n y R² a R⁶ se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (II) en una pluralidad de tales grupos:

- 10 a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,

p es 1 o 2,

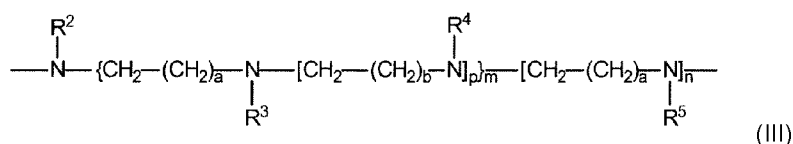
m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

- 15 R² a R⁵ se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ o -CH₂-R⁷ en el que R⁷ se selecciona de alquilo C3-C18 o alquenilo C3-C18 que tiene un doble enlace C=C; un grupo protector para un grupo amino; y una cadena de poli(etilenglicol);

R⁶ se selecciona de hidrógeno; un grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ o -CH₂-R⁷ en el que R⁷ se selecciona de alquilo C3-C18 o alquenilo C3-C18 que tiene un doble enlace C=C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH₂; una cadena de poli(etilenglicol); y un ligando receptor,

- 20 y en el que uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (II) pueden protonarse para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (II);

b) un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (III) como unidades de repetición:



en la que las variables a, b, p, m, n y R² a R⁵ se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (III) en una pluralidad de tales grupos:

- 25 a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,

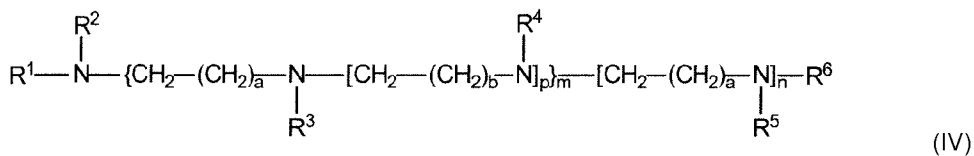
p es 1 o 2,

m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

- 30 R² a R⁵ se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷ o -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ o -CH₂-R⁷ en el que R⁷ se selecciona de alquilo C3-C18 o alquenilo C3-C18 que tiene un doble enlace C=C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH₂; y una cadena de poli(etilenglicol);

y en la que uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (III) pueden protonarse para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (III); y

c) un lipidoide que tiene la estructura de fórmula (IV):



en la que las variables a , b , p , m , n y R^1 a R^6 se definen como sigue:

a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1.

p es 1 o 2,

5 $m \leq 1$ o 2 ; $n \leq 0$ o 1 y $m + n \leq 2$; y

10 R¹ a R⁶ se seleccionan independientemente entre sí de hidrógeno; un grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ o -CH₂-R⁷ en el que R⁷ se selecciona de alquilo C3-C18 o alquénilo C3-C18 que tiene un doble enlace C=C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH₂; una cadena de poli(etilenglicol); y un ligando receptor; siempre que al menos dos residuos entre R¹ a R⁶ sean un grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ o -CH₂-R⁷ en el que R⁷ se selecciona de alquilo C3-C18 o alquénilo C3-C18 que tiene un doble enlace C=C;

y en la que uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IV) pueden protonarse para proporcionar un lipidoide catiónico de fórmula (IV).

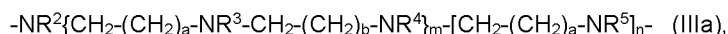
15 Preferiblemente, tales agentes o reactivos pueden ser (un componente que comprende) una oligo (alquilenamina) seleccionada entre a) y b), en la que

a) es un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (IIa) como cadena lateral y/o como grupo terminal:



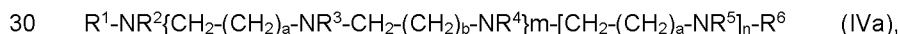
20 en el que a, b, m, n, y R^2 a R^6 se definen como se describe anteriormente, y en la que uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIa) pueden protonarse para proporcionar un oligómero catiónico o una estructura polimérica; y

b) es un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (IIIa) como unidades de repetición:



25 en la que a, b, m, n y R² a R⁵ se definen como se describió anteriormente, y en la que uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIIa) pueden protonarse para proporcionar una estructura polimérica u oligomérica catiónica.

Además, tales agentes o reactivos pueden ser (un componente que comprende) una oligo(alquilenamina) seleccionada de un lipidoide que tiene la estructura de fórmula (IVa):



en la que a, b, m, n, y R^1 a R^6 se definen como se describió anteriormente, y en la que uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IVa) pueden protonarse para proporcionar un lipidoide catiónico.

En cuanto a tales agentes o reactivos, en la fórmula (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV) o (IVa) n puede ser 1; o m puede ser 1 y n puede ser 1.

35 Además, en cuanto a tales agentes o reactivos, en la fórmula (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV) o (IVa) a puede ser 1 y b puede ser 2; o a puede ser 2 y b puede ser 1.

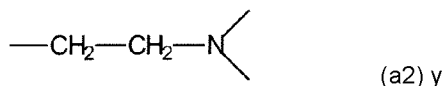
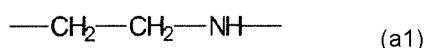
En algunas realizaciones, el oligómero, polímero o lipidoide puede ser un oligómero, polímero o lipidoide catiónico (por ejemplo, protonado).

Un ejemplo no limitante de tal oligómero, polímero o lipidoide a emplear es un lípido catiónico que se preparó mezclando 100 mg de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (0,623 mmol) con 575,07 mg de 1,2-epoxidodecano (3,12 mmol, (N-1) equivalentes, en el que N es 2x la cantidad de amina primaria más 1x la cantidad de amina secundaria por oligo(alquilen amina)) y se mezcla durante 96 ha 80 °C con agitación constante. Dicho oligómero, polímero o lipidoide también se denomina lipidoide "C12-(2-3-2)".

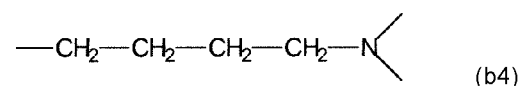
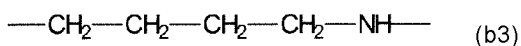
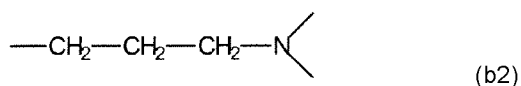
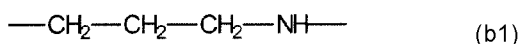
Un agente o reactivo, en particular un polímero, a emplear puede ser un copolímero, en particular un copolímero

estadístico. Tal copolímero puede ser un copolímero que contiene una disposición estadística/aleatoria de unidades de repetición de alquilenamina de longitud alterna (por ejemplo, en contraste con un polímero menos preferido que contiene disposiciones análogas de unidades de repetición de alquilenamina de longitud no alterna). El copolímero puede ser un copolímero catiónico (por ejemplo, protonado). Los copolímeros a emplear son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en los documentos EP 14 19 9439.2, WO 01/00708, EP-A1 1 198 489 y CA-A1 2.377.207.

En particular, el copolímero puede ser un copolímero estadístico que comprende una pluralidad de unidades de repetición (a) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes Fórmulas (a1) y (a2):



una pluralidad de unidades de repetición (b) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes Fórmulas (b1) a (b4):



en las que la relación molar de la suma de las unidades de repetición (a) con respecto a la suma de las unidades de repetición (b) se encuentra dentro del intervalo de 0,7/1,0 a 1,0/0,7, y

en las que uno o más de los átomos de nitrógeno de las unidades de repetición (a) y/o (b) contenidas en el copolímero pueden protonarse para proporcionar un copolímero catiónico.

El copolímero puede ser un copolímero estadístico, en el que cualquier unidad repetida (a) y cualquier unidad repetida (b) se distribuyen estadísticamente en la macromolécula del copolímero. Se obtiene típicamente de la copolimerización de una mezcla de monómeros que produce, durante la reacción de polimerización, las unidades de repetición (a) con monómeros que producen, durante la reacción de polimerización, las unidades de repetición (b). Preferiblemente, el copolímero es un copolímero aleatorio en el que cualquier unidad repetida (a) y cualquier unidad repetida (b) se distribuyen aleatoriamente en la macromolécula polimérica.

Tal copolímero puede ser un copolímero lineal, ramificado o dendrítico. Como entenderá el lector experto, una unidad repetida de fórmula (a1), (b1) o (b3) con dos valencias (es decir, enlaces abiertos a unidades vecinas) conduce a una propagación de la estructura del copolímero de manera lineal. Por lo tanto, un copolímero lineal puede comprender unidades de repetición de fórmula (a1) y uno o más tipos de unidades de repetición de fórmulas (b1) y (b3), pero no unidades de repetición de fórmula (a2), (b2) o (b4). Como se entenderá, además, la presencia de una unidad repetida de fórmula (a2), (b2) o (b4) con tres valencias proporciona un punto de ramificación en la estructura del copolímero. Por lo tanto, un copolímero ramificado comprende uno o más tipos de unidades de repetición de fórmulas (a2), (b2) y (b4), y puede comprender además uno o más tipos de unidades de repetición de fórmulas (a1), (b1) y (b3).

Dicho copolímero puede comprender una pluralidad de unidades de repetición (a) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de fórmulas (a1) y (a2) definidas anteriormente, y una pluralidad de unidades de repetición (b) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de fórmulas (b1) a (b4) definidas anteriormente. Se prefieren los copolímeros que comprenden una pluralidad de unidades de repetición (a) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de fórmulas (a1) y (a2) definidas anteriormente, y una pluralidad de unidades de repetición (b) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de fórmulas (b1) y (b2) definidas anteriormente.

Preferiblemente, tal copolímero es un copolímero ramificado que comprende uno o más tipos de unidades de repetición seleccionadas entre las unidades de repetición (a2), (b2) y (b4), y que opcionalmente comprende además uno o más tipos de unidades de repetición de fórmulas (a1), (b1) y (b3), y en particular un copolímero que comprende unidades de repetición de fórmula (a2) y uno o más tipos de unidades de repetición de fórmulas (b2) y (b4), y que opcionalmente comprende además una o más tipos de unidades de repetición de fórmulas (a1), (b1) y

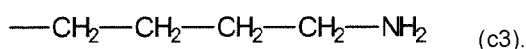
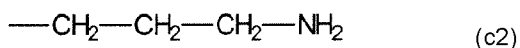
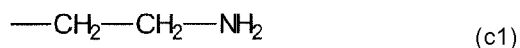
(b3). Según lo anterior, un copolímero más preferido es, por lo tanto, un copolímero ramificado que comprende unidades de repetición de fórmula (a2) y unidades de repetición de fórmula (b2), y que opcionalmente comprende además uno o más tipos de unidades de repetición de fórmulas (a1) y (b1).

En los copolímeros, el número total de unidades de repetición (a) y unidades de repetición (b) es típicamente 20 o más, preferiblemente 50 o más y más preferiblemente 100 o más. Normalmente, el número total de unidades de repetición (a) y unidades de repetición (b) es 10.000 o menos, preferiblemente 5.000 o menos, más preferiblemente 1.000 o menos.

Además, se prefiere para los copolímeros que las unidades de repetición (a) y (b) representen el 80% en moles o más, más preferiblemente el 90% en moles o más de todas las unidades de repetición en el copolímero. También se prefieren los copolímeros en los que las unidades de repetición (a) seleccionadas entre (a1) y (a2) y las unidades de repetición (b) seleccionadas entre (b1) y (b2) representan 80% en moles o más, más preferiblemente 90% en moles o más de todas las unidades de repetición en el copolímero. Es más preferido que todas las unidades de repetición en el copolímero sean unidades de repetición (a) o (b), en particular que todas las unidades de repetición en el copolímero sean unidades de repetición (a) seleccionadas de (a1) y (a2) o unidades de repetición (b) seleccionadas de (b1) y (b2).

El peso molecular promedio ponderado del copolímero, medido por ejemplo por cromatografía de exclusión por tamaño con respecto a patrones lineales de poli(óxido de etileno), generalmente varía de 1.000 a 500.000 Da, preferiblemente de 2.500 a 250.000 Da y más preferiblemente de 5.000 a 50.000 o menos.

Los grupos terminales de tal copolímero típicamente comprenden uno o más tipos de grupos (c) seleccionados independientemente de los grupos de las Fórmulas (c1) a (c3) a continuación, preferiblemente de los grupos de las Fórmulas (c1) y (c2) a continuación:



Preferiblemente, los grupos terminales en el copolímero consisten en uno o más tipos de grupos (c) seleccionados independientemente de los grupos de las Fórmulas (c1) a (c3) siguientes, preferiblemente de los grupos de las Fórmulas (c1) y (c2). Como entenderá el experto en la materia, el número de grupos terminales depende de la estructura del copolímero. Mientras que un copolímero lineal tiene solo dos terminales, un mayor número de grupos terminales están contenidos en un copolímero ramificado, en particular en un copolímero dendrítico. Como se entenderá, además, también uno o más de los átomos de nitrógeno de los grupos terminales (c) contenidos en el copolímero pueden protonarse para proporcionar un copolímero catiónico.

En el copolímero, la relación molar de la suma de las unidades de repetición (a) con respecto a la suma de las unidades de repetición (b) se encuentra dentro del intervalo de 0,7/1,0 a 1,0/0,7, y preferiblemente dentro del intervalo de 0,8/1,0 a 1,0/0,8. Esta relación molar se puede determinar, por ejemplo, mediante RMN. Por lo tanto, se entenderá que la relación se determina habitualmente para una pluralidad de macromoléculas del copolímero, y típicamente indica la relación global de la suma de unidades de repetición (a) con respecto a la suma de unidades de repetición (b) en la pluralidad de macromoléculas.

Como se indicó anteriormente, uno o más de los átomos de nitrógeno del copolímero pueden protonarse para dar como resultado un copolímero en forma catiónica, típicamente una forma oligocatiónica o policatiónica. Se entenderá que los grupos amino primarios, secundarios o terciarios en las unidades de repetición (a) o (b) o en los grupos terminales (c) pueden actuar como aceptores de protones, especialmente en agua y soluciones acuosas, incluyendo fluidos fisiológicos. Por lo tanto, tales copolímeros tienen típicamente una carga positiva global en una solución acuosa a un pH por debajo de 7,5. Una solución acuosa, como se denomina en este documento, es una solución en la que el disolvente comprende 50% (v/v) o más, preferiblemente 80 o 90% o más, y lo más preferiblemente 100% de agua. Además, si las composiciones están en contacto con un fluido fisiológico que tiene un pH por debajo de 7,5, incluyendo por ejemplo sangre y líquido pulmonar, normalmente contienen unidades de repetición (a) y (b) en las que los átomos de nitrógeno están protonados. Los valores de pK_a de los copolímeros utilizados en las composiciones se pueden determinar mediante valoración ácido-base utilizando un titulador de pK_a automatizado. A continuación, se puede calcular la carga neta a un valor de pH dado, por ejemplo, a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach. Cualquier carga puede ser compartida entre varios de los centros básicos y no necesariamente puede atribuirse a un solo punto. Normalmente, en soluciones a pH fisiológico, los copolímeros usados en las composiciones comprenden unidades de repetición con grupos amino en estado protonado y unidades de repetición con grupos amino en estado no protonado.

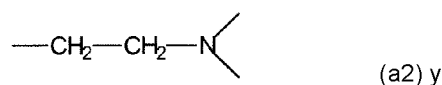
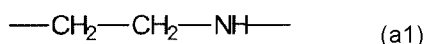
Sin embargo, como entenderá el lector experto, los copolímeros, así como las composiciones, también se pueden proporcionar como una forma de sal seca que contiene el copolímero en forma catiónica.

Como se entenderá mejor, los contraiones (aniones) para las cargas positivas de los grupos amino protonados en las composiciones que comprenden el copolímero y el ácido nucleico, en particular el ARN, preferiblemente el ARN monocatenario tal como el ARNm, son típicamente proporcionados por fracciones aniónicas contenidas en el ácido nucleico. Si los grupos cargados positivamente están presentes en exceso en comparación con las fracciones aniónicas en el ácido nucleico, las cargas positivas pueden equilibrarse con otros aniones, en particular los que se encuentran típicamente en fluidos fisiológicos, tales como Cl^- o HCO_3^- .

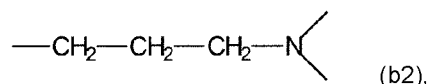
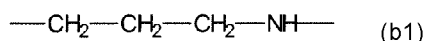
En línea con lo anterior, un copolímero preferido es un copolímero aleatorio, en el que

80% en moles o más de todas las unidades de repetición, más preferiblemente todas las unidades de repetición, están formadas por

- 10 una pluralidad de unidades de repetición (a) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes Fórmulas (a1) y (a2):



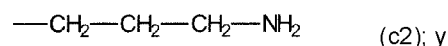
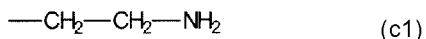
- 15 una pluralidad de unidades de repetición (b) seleccionadas independientemente de unidades de repetición de las siguientes Fórmulas (b1) y (b2):



- 20 en las que la relación molar de la suma de las unidades de repetición (a) con respecto a la suma de las unidades de repetición (b) se encuentra dentro del intervalo de 0,7/1,0 a 1,0/0,7, más preferiblemente dentro del intervalo de 0,8/1,0 a 1,0/0,8;

en las que los grupos terminales del copolímero están formados por

grupos (c) seleccionados independientemente de los grupos de las Fórmulas (c1) y (c2):



- 25 en las que uno o más de los átomos de nitrógeno de las unidades de repetición (a) y/o (b) y/o de los grupos terminales (c) contenidos en el copolímero pueden protonarse para proporcionar un copolímero catiónico. Se prefiere además que el copolímero sea un copolímero ramificado, que comprende las unidades (a2) y (b2), opcionalmente junto con las unidades (a1) y/o (b1).

- 30 Los copolímeros se pueden preparar convenientemente con procedimientos análogos a los conocidos para la preparación de polialquileniminas, tales como polietilenimina lineal o ramificada (PEI). Se entenderá que los monómeros utilizados para la producción de los copolímeros deberán ajustarse en consecuencia. En este documento, se ha encontrado que los monómeros se pueden hacer reaccionar convenientemente de una manera cuantitativa, de modo que la relación de las unidades (a) y (b) en el copolímero se puede ajustar ajustando la relación de monómeros en consecuencia en la mezcla de monómeros sometida a polimerización. Aunque se puede
- 35 preparar polietilenimina, por ejemplo, mediante polimerización con apertura de anillo de aziridina, los copolímeros se pueden preparar mediante polimerización con apertura de anillo de una mezcla de monómeros que comprende o consiste en aziridina, azetidina y, cuando sea aplicable, pirrolidina, o, en realizaciones preferidas, aziridina y azetidina. Se entenderá que la expresión "cuando sea aplicable" se refiere a la presencia o ausencia de unidades de repetición (b3) y (b4) o grupos terminales (c3) que estarían formados por la pirrolidina. La polimerización por
- 40 apertura de anillo de las aminas cíclicas no sustituidas conduce habitualmente a copolímeros ramificados. Se pueden preparar copolímeros lineales, por ejemplo, mediante polimerización de aziridinas sustituidas en el N, azetidinas sustituidas en el N y pirrolidinas sustituidas en el N, o aziridinas sustituidas en el N y azetidinas sustituidas en el N adecuadas, que puede ser seguida por ejemplo, mediante una escisión hidrolítica de los sustituyentes en el N unidos a la cadena de polialquilenimina resultante, por ejemplo, en analogía con el procedimiento publicado en
- 45 Katrien F. Weyts, Eric J. Goethals, New synthesis of linear polyethylenimine, Polymer Bulletin, 1988, 19 (1): 13-19. Los dendrímeros se pueden sintetizar, por ejemplo, según el procedimiento descrito en Yemul *et al.*, Colloid and Polymer Science, 2008, 286 (6-7): 747-752, Synthesis and characterization of poly(ethylenimine) dendrimers.

Para la preparación de un dendrímero (o copolímero dendrítico), se pueden aplicar de manera análoga estrategias de síntesis conocidas para la producción de dendrímeros de polietilenimina o polipropilenamina. Los dendrímeros de polipropilenimina se pueden sintetizar a partir de bloques de construcción de acrilonitrilo usando una secuencia repetitiva de una adición de Michael a una amina primaria, seguida de una hidrogenación catalizada heterogéneamente (Newkome y Shreiner Poly(amidoamine), polypropylenimine, and related dendrimers and dendrons possessing different 1→2 branching motifs: An overview of the divergent procedures. *Polymer* 49 (2008) 1-173; De Brabander-Van Den Berg *et al.* Large-scale production of polypropylenimine dendrimers, *Macromolecular Symposia* (1994) 77 (1) 51-62). Los dendrímeros de polietilenimina se pueden producir usando una secuencia repetitiva de una adición de Michael de un bloque de construcción de bromuro de vinilo a una amina primaria seguida de una conversión de bromuro de alquilo en amina usando un procedimiento de síntesis de amina de Gabriel (Yemul & Imae, Synthesis and characterization of poly(ethyleneimine) dendrimers, *Colloid Polym Sci* (2008) 286: 747-752). Por lo tanto, la persona experta en la técnica podrá producir no sólo dendrímeros con capas estrictamente alternas, por ejemplo, de propilenimina y etilenimina. De manera similar, se pueden generar generaciones de dendrímeros con capas que comprenden o consisten en composiciones aleatorias de unidades de repetición de fórmula (a2), (b2) y (b4) y preferiblemente unidades de repetición (a2) y (b2).

La polimerización por apertura de anillo de aziridina y azetidina, o de aziridina, azetidina y pirrolidina, se puede llevar a cabo en solución, por ejemplo, en agua. La concentración total de monómero no está particularmente limitada, las concentraciones típicas oscilan entre el 10% p/p y el 80% p/p, preferiblemente entre el 30% p/p y el 60% p/p. Normalmente, la polimerización se inicia mediante protones, de modo que se prefiere añadir un ácido de Brønsted, en particular un ácido mineral tal como el ácido sulfúrico al sistema de reacción. Generalmente son suficientes pequeñas cantidades de ácido, tales como 0,001 a 0,01 equivalentes, con base en la concentración total de monómeros. La reacción procede a velocidades convenientes, por ejemplo, en el intervalo de temperatura de 50 a 150 °C, en particular de 90 a 140 °C. En estos intervalos, los copolímeros de peso molecular más alto se encuentran normalmente a temperaturas más altas y los copolímeros de peso molecular más bajo a temperaturas más bajas.

En principio, un lipidoide es un agente o reactivo preferido a emplear, en particular en comparación con un oligómero y, más particularmente, con un polímero.

Otros ejemplos de uno o más agentes o uno o más reactivos para administrar y/o introducir el ARN en una célula diana o un tejido diana son los reactivos de transfección liposomal (LTR) y partículas magnéticas (MP) como se describe en otra parte en el presente documento.

Un modo particular para administrar y/o introducir el ARN en células diana o tejido diana es la transfección. Por lo tanto, se puede considerar que el ARN que se va a emplear se transfecte (en células o tejido (diana)), que se suministre/administre mediante transfección y/o que se prepare para la transfección. Los medios y procedimientos para transfectar ARN son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Tavernier (citado anteriormente), Yamamoto (*Eur J Pharm Biopharm.* 71 (3) (2009), 484-9) y Kormann (*Nat Biotechnol.* 29 (2) (2011), 154-7). Modos particulares de transfección son lipofección, magnetofección o magnetolipofección.

Por lo tanto, el ARN que se va a emplear puede prepararse para lipofección, prepararse para ser transfectado mediante lipofección, administrado/introducido mediante lipofección y/o administrado mediante lipofección.

Por lo tanto, para la transfección, el procedimiento según la invención puede (además) usar además al menos un reactivo o potenciador de transfección lipídica o liposomal (LTR; reactivo de transfección liposomal). El ARN que se va a emplear puede estar comprendido, complejoado con y/o administrado por el LTR. En particular, el ARN a emplear puede estar comprendido y/o administrado por complejos de lipofección (respectivos) que comprenden el ARN y la LTR. La composición farmacéutica puede comprender (además) los complejos de lipofección.

Los LTR son conocidos en la técnica y son, por ejemplo, distribuidos por OzBiosciences, Marsella, Francia. Los LTR a emplear pueden seleccionarse del grupo que consiste en los agentes o reactivos descritos anteriormente para administrar y/o introducir el ARN en una célula diana o un tejido diana. Por ejemplo, tales LTR pueden ser lípidos o lipidoide, preferiblemente lípidos catiónicos o lipidoide catiónicos, tales como los lipidoide dados a conocer en el documento PCT/EP2014/063756 (por ejemplo, C12-(2-3-2), los lípidos como se da a conocer en el documento EP2285772 (por ejemplo, Dogtor) y las lipopoliaminas como se da a conocer en el documento EP1003711 (por ejemplo, DreamFect^{MR} y DreamFect Gold^{MR}). Se puede seleccionar un LTR particular del grupo que consiste en

(i) C12-(2-3-2);

(ii) DreamFect^{MR}, preferiblemente DreamFect Gold^{MR} (DF^{MR}/DF-Gold^{MR}; OzBiosciences, Marsella, Francia);

(iii) Dogtor (OzBiosciences, Marsella, Francia); y

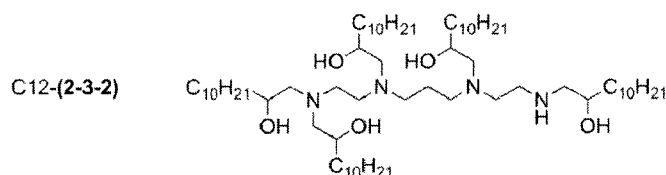
(iv) Lipofectamine tal como, por ejemplo, Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, EE.UU.).

En principio, se prefiere Dogtor, DreamFect^{MR} es más preferido y DF-Gold^{MR} y C12-(2-3-2) son los LTR aún más preferidos.

Los LTR tales como Dogtor se describen, por ejemplo, en el documento EP2285772. Los LTR tales como DF^{MR} o DF-Gold^{MR} se describen, por ejemplo, en el documento EP1003711. En principio, los oligómeros, polímeros o lipídicos que se dan a conocer en el documento PCT/EP2014/063756, los lípidos catiónicos particulares como se dan a conocer en el documento EP2285772 y las lipopoliaminas particulares que se dan a conocer en el documento EP1003711 son LTR preferidos. Los LTR como C12-(2-3-2) y DF-Gold^{MR} son los más preferidos.

Ejemplos no limitantes de complejos de lipofección son los lipoplejos DF-Gold^{MR}/ARN y los lipoplejos C12-(2-3-2)/ARN.

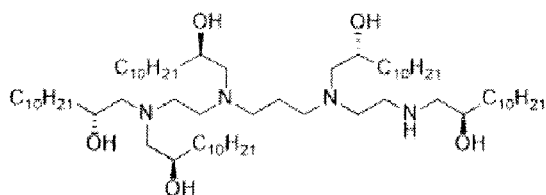
C12-(2-3-2) es un LTR particularmente preferido que tiene la estructura que se muestra en la fórmula (V) (véase, Jarzębińska *et al.*, Angew Chem Int Ed Engl., 2016; 55 (33): 9591-5):



Fórmula (V)

C12-(2-3-2) se prepara preferiblemente como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 2016/075154 A1, EP 3013964 y Jarzębińska *et al.* (Angew Chem Int Ed Engl., 2016; 55 (33): 9591-5). El lipidoide catiónico se puede preparar mezclando N1-(2-aminoetil)-N3-(2-((3,4-dimetoxibencil)amino)etil)propano-1,3-diamina (8,9 g, 1 eq., 28,67 mmol) con 1,2-epoxidodecano (42,27, 8 eq., 229,4 mmol) y se mezcló durante 24 h a 80 °C con agitación constante seguido de purificación y eliminación del grupo de protección 3,4-dimetoxibencilo.

Se pueden usar diferentes isómeros de C12-(2-3-2) tales como un racemato, un isómero S y/o un isómero R. Preferiblemente, se usa C12-(2-3-2) como isómero R puro y tiene la estructura que se muestra en la fórmula (VI). Para obtener isómeros R puros de C12-(2-3-2), se puede preparar como se describió anteriormente para C12-(2-3-2) usando el isómero R de 1,2-epoxidodecano para la síntesis.

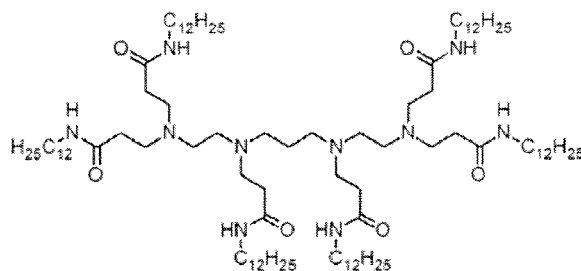


Fórmula (VI)

Por lo tanto, en realizaciones preferidas, el polirribonucleótido se transfecta en las células usando un lipidoide que tiene la estructura mostrada en la fórmula (V), preferiblemente como se muestra en la fórmula (VI).

Otra LTR particularmente preferida es un lipidoide catiónico que tiene la fórmula (VII), también denominado en el presente documento "dL_P", que se puede sintetizar mediante la reacción de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina con N-dodecilacrilamida utilizando ácido bórico como catalizador. Para la reacción, la mezcla se puede agitar a 100 °C bajo irradiaciones de microondas.

Por lo tanto, en realizaciones preferidas adicionales, las células se transfectan con un polirribonucleótido usando un lipidoide que tiene la estructura mostrada en la fórmula (VII).



Fórmula (VII)

Además, se prefiere el uso de un lipidoide catiónico que tiene la fórmula (V), (VI) y/o (VII), preferiblemente dL_P y/o C12-(2-3-2), más preferiblemente dL_P y/o el isómero R de C12-(2-3-2), comprendido en una formulación como se describe a continuación. En particular, los agentes y reactivos descritos en el presente documento para administrar y/o introducir el ARN en una célula diana o un tejido diana y los LTR descritos en el presente documento pueden combinarse con uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) lípidos adicionales (como, por ejemplo, colesterol,

DPPC, DOPE y/o lípidos de PEG (por ejemplo, DMPE-PEG, DMG-PEG2000)). Estos lípidos adicionales pueden respaldar la función deseada de los agentes/reactivos y LTR (respaldan y/o aumentan la liberación y/o introducción de ARN en la célula o tejido y mejoran la eficiencia de transfección, respectivamente) y funcionan como respectivos "lípidos auxiliares". Ejemplos particulares de tales "lípidos auxiliares" son colesterol, DPPC, DOPE y/o lípidos de PEG (por ejemplo, DMPE-PEG, DMG-PEG (por ejemplo, DMG-PEG2000)). Los lípidos adicionales (por ejemplo, "lípidos auxiliares") también pueden ser parte de los complejos/partículas dados a conocer en este documento. El experto en la materia está en condiciones de preparar complejos/partículas según la invención. También se conocen en la técnica ejemplos de lípidos adicionales (por ejemplo, "lípidos auxiliares"). El experto en la materia está en condiciones de elegir lípidos adicionales adecuados (por ejemplo, "lípidos auxiliares") y proporciones de los agentes/reactivos/LTR y los lípidos adicionales (por ejemplo, "lípidos auxiliares"). Tales relaciones pueden ser relaciones molares de 1-4: 1-5, 3-4: 4-6, aproximadamente 4: aproximadamente 5, aproximadamente 4: aproximadamente 5,3 de agentes/reactivos/LTR: lípido o lípidos adicionales (se prefieren los intervalos más estrechos). Por ejemplo, los agentes/reactivos/LTR pueden combinarse con tres lípidos más, tales como DPPC, colesterol y DMG-PEG2000, en una relación molar de 8: 5,29: 4,41: 0,9, respectivamente, o, más concretamente, 8: 5,29: 4,41: 0,88, respectivamente.

Preferiblemente, dL_P y/o C12-(2-3-2), más preferiblemente dL_P y/o el isómero R de C12-(2-3-2), se generan como se describió anteriormente y se usan con lípidos auxiliares DPPC y colesterol y lípido PEG DMG-PEG2000 en las relaciones molares 8: 5,29: 4,41: 0,88 para formular partículas lipídicas.

También se formula una composición en la que el isómero R de C12-(2-3-2) (fórmula VI) con los lípidos DPPC y colesterol y lípido PEG DMG-PEG2000 en las proporciones molares 8: 5,29: 4,41: 0,88 referido en el presente documento como "LF92". Una composición en la que el dL_P (fórmula VII) se formula con los lípidos DPPC y colesterol y lípido PEG DMG-PEG2000 en las proporciones molares 8: 5,29: 4,41: 0,88 también se denomina en el presente documento "LF111".

Como también se describen a modo de ejemplo, en los documentos WO 2016/075154 A1, EP 3013964 y Zhang *et al.*, (TERMIS, 2019, Tissue Engineering: parte A, vol. 25, números 1 y 2), dL_P y/o C12-(2-3-2) se pueden usar como un vector no viral, para hacer un lipoplejo estable con moléculas de ARNm, basadas en la interacción electrostática entre los grupos amino positivos del lipidoide y los grupos fosfato negativos de las moléculas de ARNm (Anderson, Human Gene Therapy 14, 2003, 191-202). Para estabilizar la estructura lipoplejo y reducir las fugas, dL_P y/o C12-(2-3-2), más preferiblemente dL_P y/o el isómero R de C12-(2-3-2), se pueden suministrar con dos lípidos auxiliares titulados 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) y colesterol (Anderson, Drug Delivery 11, 2004, 33-39; Liang, Journal of Colloid and Interface Science 278, 2004, 53-62). Al final, se añadirá 1,2-dimiristoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol (DMG-PEG) 2kD (DMG-PEG2000) a la mezcla de lípidos para proporcionar un liposoma PEGilado. Ya es bien sabido que la PEGilación mejora las características fisicoquímicas de la formulación de liposomas aumentando la solubilidad en agua, protegiendo de la degradación enzimática y limitando las reacciones inmunogénicas y antigénicas (Milla, Current Drug Metabolism 13, 2012, 105-119). Las proporciones finales de N/P para la mezcla de lípidos etanoicos completa deben ser 8: 5,29: 4,41: 0,88 representando las proporciones molares del grupo amino de dL_P y/o C12-(2-3-2)/DPPC/colesterol/DMG-PEG2000, respectivamente, con respecto a un grupo fosfato de la molécula de ARNm.

Por lo tanto, en realizaciones preferidas, dL_P y/o C12-(2-3-2), preferiblemente dL_P y/o el isómero R de C12-(2-3-2), formulado con DPPC, colesterol y DMG-PEG2000, se usa para transfectar células con el polirribonucleótido.

Además, en realizaciones particularmente preferidas, dL_P y/o C12-(2-3-2), preferiblemente dL_P y/o el isómero R de C12-(2-3-2), formulado con DPPC, colesterol y DMG-PEG2000 con relaciones de N/P finales para la mezcla de lípidos etanoicos completa de 8: 5,29: 4,41: 0,88 para las relaciones molares del grupo amino de dL_P y/o C12-(2-3-2)/DPPC/colesterol/DMG-PEG2000, respectivamente, con respecto a un grupo fosfato de la molécula de ARNm, se usa para transfectar células con el polirribonucleótido.

Los isómeros R de C12-(2-3-2) formulados con DPPC, colesterol y DMG-PEG2000 como se indicó anteriormente también se denominan formulación LF92.

Por lo tanto, en realizaciones particularmente preferidas, una formulación LF92 se usa para transfectar células con el polirribonucleótido.

El dL_P formulado con DPPC, colesterol y DMG-PEG2000 como se indicó anteriormente también se denomina formulación LF111.

Por lo tanto, en realizaciones particularmente preferidas, una formulación LF111 se usa para transfectar células con el polirribonucleótido.

En una realización preferida, una formulación LF92 y/o LF111 se usa(n) para transfectar células con el polirribonucleótido. LF92 y/o LF111 se refieren a una formulación de vehículo que se usa para la transfección celular. Esto es ventajoso ya que el uso de LF92 y/o LF111 está asociado con altas eficiencias de transfección y, por lo tanto, asegura que el polirribonucleótido que codifica una versión funcional de una proteína, un defecto el cual está asociado con la ciliopatía, pueda ingresar de manera eficiente a una célula, preferiblemente célula ciliar no

diferenciada o célula basal, y así restaurar la función de la célula ciliada en el sujeto que padece DCP.

En lo siguiente, se describen polinucleótidos que pueden emplearse en el procedimiento según la invención:

Se muestran polirribonucleótidos que codifican CCDC40 humana en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 o 5 a 11.

- 5 En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores u otros y realizaciones de la divulgación, el polirribonucleótido o polirribonucleótido modificado codifica CCDC40 humana (por ejemplo, CCDC40 humana funcional) y comprende una secuencia primaria que es al menos 85%, al menos 90%, en al menos 92%, o al menos 95% idéntica (por ejemplo, al menos 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntica) a una o más de la SEQ ID NO: 1 o 5 a 11 (por ejemplo, a la secuencias establecida en la SEQ ID NO: 1 o 5 a 11).
- 10 En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, la región no traducida (UTR) 5' mínima de Ethris, una UTR 5' CYBA, un elemento de Kozak seguido de una secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana, una UTR 3' CYBA y una cola de poli(A) (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1).
- 15 En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, la región no traducida (UTR) 5' mínima de Ethris, un elemento de Kozak seguido de una secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana, y una cola de poli(A) (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 5).
- 20 En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, la región no traducida (UTR) 5' mínima de Ethris, un nucleótido U adicional, un elemento TISU seguido de una secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana y una cola de poli(A) (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 6).
- 25 En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, la región no traducida (UTR) 5' mínima de Ethris, una UTR 5' de hAg, un elemento de Kozak seguido de una secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana y una cola de poli(A) (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 7).
- 30 En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, la región no traducida (UTR) 5' mínima de Ethris, una UTR 5' de IE9 del CMV humano, un elemento de Kozak seguido de una secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana, una UTR 3' de hormona de crecimiento humano y una cola de poli(A) (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 8).
- 35 En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, la región no traducida (UTR) 5' mínima de Ethris, un elemento de Kozak seguido de una secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana, un espaciador G4S, una secuencia que codifica EGFP y una cola de poli(A) (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 9).
- 40 En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, la región no traducida (UTR) 5' mínima de Ethris, una UTR 5' de CYBA, un elemento de Kozak seguido de una etiqueta HA, un espaciador G4S, una secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana, un péptido T2A, una secuencia que codifica tdTomato, una UTR 3' de CYBA y una cola de poli(A) (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 11).
- 45 En algunas realizaciones, el polirribonucleótido es un polirribonucleótido modificado que tiene un nivel y/o tipo de modificación seleccionado de cualquiera de dicho nivel y/o tipo establecidos en el presente documento.
- 50 En determinadas realizaciones, el porcentaje de identidad de un polirribonucleótido se mide solo con respecto a la porción de secuencia codificante de CCDC40 de la SEQ ID NO: 1 o 5 a 11 (por ejemplo, las UTR, otra secuencia no codificante y GFP o etiquetas de epitopo no se consideran cuando se calcula el porcentaje de identidad, y el polirribonucleótido puede contener o no tales regiones).
- En determinadas realizaciones de cualquiera de los anteriores, tal polirribonucleótido (o polirribonucleótido modificado) codifica una proteína CCDC40 funcional.
- 50 Los polirribonucleótidos que codifica CCDC39 humana como se muestran en cualquiera de la SEQ ID NO: 2 o 12 a 14.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anteriores u otros aspectos y realizaciones de la divulgación, el polirribonucleótido o polirribonucleótido modificado codifica CCDC39 humana y comprende una secuencia primaria

que es al menos 85%, al menos 90%, al menos 92% o al menos 95% idéntica (por ejemplo, al menos 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntica) a una o más de la SEQ ID NO: 2 o 12 a 14 (por ejemplo, a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2 o 12 a 14).

5 En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris, un 5' UTR de CYBA, un elemento de Kozak seguido de una secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC39 humana, una UTR 3' de CYBA y una cola de poli(A) (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2).

10 En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, una UTR 5' mínima de Ethris, un elemento de Kozak seguido de una secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC39 humana, y una cola de poli(A) (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 12).

En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris, un nucleótido U adicional, un elemento TISU seguido de una secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC39 humana, y una cola de poli(A) (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 13).

15 En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, una UTR 5' mínima de Ethris, un SP30 como UTR 5' (es decir, una secuencia aleatoria de 30 nucleótidos), un elemento de Kozak seguido de una secuencia de codones optimizados que codifica una versión funcional de una proteína CCDC39 humana y una cola poli(A) (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 14).

20 En algunas realizaciones, el polirribonucleótido es un polirribonucleótido modificado que tiene un nivel y/o tipo de modificación seleccionado de cualquiera de dicho nivel y/o tipo establecidos en el presente documento.

En determinadas realizaciones, el porcentaje de identidad de un polirribonucleótido se mide solo con respecto a la porción de secuencia que codifica la CCDC39 de la SEQ ID NO: 2 o 12 a 14 (por ejemplo, las UTR, otras secuencias no codificantes y GFP o etiquetas de epítipo no se consideran cuando se calcula el porcentaje de identidad, y el polirribonucleótido puede o no contener tales regiones).

25 En determinadas realizaciones de cualquiera de los anteriores, tal polirribonucleótido (o polirribonucleótido modificado) codifica una proteína CCDC39 funcional.

30 Los polirribonucleótidos que codifica MCIDAS humana como se muestran en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones de cualquiera de los anteriores u otros aspectos y realizaciones de la divulgación, el polirribonucleótido o polirribonucleótido modificado codifica MCIDAS humana y comprende una secuencia primaria que es al menos 85%, al menos 90%, al menos 92% o al menos 95% idéntica (por ejemplo, al menos 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntica) a la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4). En determinadas realizaciones, dicho polirribonucleótido contiene en su extremo 5' una parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris, un elemento de Kozak seguido de una secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína de MCIDAS humana, una UTR 3' opcional que también funciona como sitio de unión del cebador inverso para la producción de moldes basados en PCR, así como una cola de poli(A). En algunas realizaciones, el polirribonucleótido es un polirribonucleótido modificado que tiene un nivel y/o tipo de modificación seleccionado de cualquiera de dicho nivel y/o tipo establecidos en el presente documento. En determinadas realizaciones, el porcentaje de identidad de un polirribonucleótido se mide solo con respecto a la porción de secuencia codificante de MCIDAS de la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, las UTR, otras secuencias no codificantes y GFP o etiquetas de epítipo no se consideran al calcular el porcentaje de identidad, y el polirribonucleótido puede o no contener tales regiones). En determinadas realizaciones de cualquiera de los anteriores, tal polirribonucleótido (o polirribonucleótido modificado) codifica una proteína MCIDAS funcional.

45 Con el fin de determinar el porcentaje de identidad de una primera secuencia con respecto a una segunda secuencia, un análogo (por ejemplo, metilcitidina) coincide con citidina, etc. En determinadas realizaciones, el término "secuencia primaria" puede usarse para referirse a una secuencia de polinucleótidos sin tener en cuenta el nivel de modificación, de modo que una secuencia primaria idéntica a CUCUCUA incluiría esa secuencia independientemente de si alguno o todos los nucleótidos enumerados están modificados (por ejemplo, pueden estar presentes análogos de uno cualquiera o más de C, U y A y se consideraría la misma secuencia primaria). En determinadas realizaciones, el porcentaje de identidad sólo se determina por referencia a la parte de una secuencia dada en la lista correspondiente a la secuencia codificante para, por ejemplo, CCDC40 o CCDC39. Mientras que en otras realizaciones, el porcentaje de identidad se determina por referencia tanto a la secuencia codificante como a una o más secuencias no codificantes. En determinadas realizaciones, el porcentaje de identidad se determina en toda la longitud de una secuencia enumerada (por ejemplo, por referencia a la longitud completa de una secuencia enumerada en el listado de secuencias de este documento).

55 Figura 1: Eficiencia de traducción del ARNm de CCDC40. Se sembraron 2/1,4/0,3/0,2/0,05 x 10⁶ células HEK293 en placas de 6 pocillos. 24 h después de la siembra, las células se transfectaron con diferentes constructos de CCDC40 (ETH031T06-T10, 2,5 µg/9,5 cm²) usando Lipofectamine 2000. La lisis celular se realizó 6, 24, 48, 72 y 144 horas después de la transfección. Se analizaron 50 µg de lisado de proteína total con SDS-PAGE e inmunotransferencia

de tipo Western. Se detectó CCDC40 usando anticuerpo anti-CCDC40 (HPA022974) de Atlas Antibodies (1:2000). GAPDH sirvió como control de carga. GFP sirvió como control de transfección.

Figura 2: Eficiencia de traducción de los constructos de ARNm de CCDC40 en células BEAS-2B, RPMI2650 y HEK293: se sembraron 2×10^6 células HEK293, $7,5 \times 10^5$ BEAS-2B y 5×10^5 RPMI 2650 en placas de 6 pocillos. 24 horas después de la siembra, las células se transfectaron con diferentes constructos de CCDC40 (2,5 µg/9,5 cm²) usando Lipofectamine 2000. La lisis de las células se realizó 6 horas después de la transfección. Los lisados de proteínas se analizaron con SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western (HEK293: 50 µg, RPMI 2650: 20 µg, BEAS-2B: 30 µg de lisado total). Se detectó CCDC40 usando anticuerpo anti-CCDC40 (HPA022974) de Atlas Antibodies (1: 2000).

Figura 3: Resultados de microscopía de video de alta velocidad (HSVM) después de la transfección de LF92/CCDC40. Los cultivos de ALI derivados de pacientes se transfectaron en días alternos con 3 µg de LF92/CCDC40. Antes de la transfección y cada 24 horas después de la transfección, se tomaron videos (20 por inserto) y se calculó la CFB (frecuencia de latido ciliar) usando el software SAVA (análisis de video de Sisson-Ammons). Se realizaron 16 transfecciones (una por mes). La medición se realizó a 37 °C usando el aumento 40x. Se calculan los valores medios de las mediciones de frecuencia de latido ciliar (Análisis de Campo Completo, WFA).

Figura 4: Eliminación mucociliar (MCC) mostrada como proyección Z y Polargraph. El cultivo de ALI del paciente con CCDC40 se transfectó con ARNm/LF92 de CCDC40 a una concentración de 3 µg/inserto, 18 días después del levantamiento por aire. Los cultivos de ALI se mantuvieron en Medio G durante el experimento. Las transfecciones (TF) se realizaron una vez a la semana durante 4 semanas (= TF 4x). Se midió la eliminación mucociliar (MCC) usando perlas fluorescentes de 0,5 µm con un aumento de 20x. Se tomaron videos de 30 s de diferentes áreas y se analizaron con el software Polargraph de Nikon una semana después del último TF. Se muestra un ejemplo de imagen.

Figura 5: Eliminación mucociliar (MCC) mostrada como Proyección Z (arriba a la izquierda) y Polargraph (arriba a la derecha) para un tdTomato y Polargraph de un control sano (abajo a la derecha). Fila superior: las células del paciente con la mutación de CCDC40 en cultivo de ALI se transfectaron con ARNm/LF111 de tdTomato a una concentración de 3 µg/inserto, 18 días después del levantamiento por aire. Los cultivos de ALI se mantuvieron en Medio G durante el experimento. Las transfecciones (TF) se realizaron una vez a la semana durante 4 semanas (= TF 4x). Se midió la eliminación mucociliar (MCC) usando perlas fluorescentes de 0,5 µm con un aumento de 30x. Se tomaron videos de 20 s de diferentes áreas y se analizaron con el software Polargraph de Nikon una semana después del último TF. Se mostró un ejemplo de video. Abajo a la derecha: seguimiento de partículas de cultivo de ALI WT sano. El MCC se midió usando perlas fluorescentes de 0,5 µm con un aumento de 20x. Se tomaron videos de 20 s de diferentes áreas y se analizaron con el software Polargraph de Nikon una semana después del último TF. Se muestran un ejemplo de imagen y dos ROI analizadas.

Figura 6: Se transfectaron células de un paciente con mutación de CCDC40 en cultivo de ALI con ARNm/LF111 de tdTomato o con ARNm/LF92 de CCDC40 a una dosis de 3 µg/inserto, 18 días después del levantamiento por aire. Los cultivos de ALI se mantuvieron en Medio G durante el experimento. Las transfecciones (TF) se realizaron una vez a la semana durante 4 semanas (= TF 4x). Como control, se utilizaron ALI WT de frotis nasales sanos. Las muestras para crioincrustación se prepararon una semana después del último TF. Se cortaron membranas de ALI tratadas con ARNm de CCDC40 y ARNm de tdTomato de 20 µm y se tiñeron con anti-GAS8 (rojo), tubulina anti-acetilada (verde) y DAPI (azul). Se tomaron fotografías con el microscopio confocal. Se muestra un ejemplo de una imagen. La barra de escala representa 10 µm.

Figura 7: Se transfectaron células de un paciente con mutación de CCDC40 en cultivo de ALI con ARNm/LF111 de tdTomato o con ARNm/LF92 de CCDC40 a una dosis de 3 µg/inserto, 18 días después del levantamiento por aire. Los cultivos de ALI se mantuvieron en Medio G durante el experimento. Las transfecciones (TF) se realizaron una vez a la semana durante 4 semanas (= TF 4x). Como control, se utilizó ALI de controles sanos. Las muestras para crioincrustación se prepararon una semana después del último TF. Se cortaron membranas de ALI tratadas con ARNm de CCDC40 y ARNm de tdTomato de 20 µm y se tiñeron con anti-DNAL1 (rojo), tubulina anti-acetilada (verde) y DAPI (azul). Se tomaron fotografías con el microscopio confocal. Se muestra un ejemplo de una imagen. La barra de escala representa 10 µm.

Figura 8: Se transfectaron células de un paciente con mutación de CCDC40 en cultivo de ALI con ARNm/LF111 de tdTomato o con ARNm/LF92 de CCDC40 a una dosis de 3 µg/inserto, 18 días después del levantamiento por aire. Los cultivos de ALI se mantuvieron en Medio G durante el experimento. Las transfecciones (TF) se realizaron una vez a la semana durante 4 semanas (= TF 4x). Como control, se utilizó ALI de controles sanos. Las muestras para crioincrustación se prepararon una semana después del último TF. Se cortaron membranas de ALI tratadas con ARNm de CCDC40 y ARNm de tdTomato de 20 µm y se tiñeron con anti-CCDC39 (1:200, rojo), tubulina anti-acetilada (1:10.000, verde) y DAPI (azul). Se tomaron fotografías con el microscopio confocal. Se muestra un ejemplo de una imagen. Ampliación 40x.

Figura 9: Expresión de la proteína CCDC39 (110 kDa) en HEK-293 y BEAS-2B, 6 horas y 24 horas después de la

transfección. Se sembraron $1,4 \times 10^5$ células HEK-293 y $3,5 \times 10^5$ células BEAS-2B en placas de 6 pocillos y se transfectaron con ARN de CCDC39 (ETH047T02, UTR 5' mínima, Lipofectamine MessengerMax; relación 1:1,5). Después de 6 horas y 24 horas, las células se lisaron con M-PER y con tampón Triton X-100. Se utilizaron 50 µg de lisado de proteína para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Como control, se usaron lisado de células no transfectadas (UT) y transfectadas con EGFP. Dosis alta = $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, dosis baja = $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Figura 10: Expresión de la proteína CCDC39 (110 kDa) en cultivos de ALI no tratados. Se extrajeron dos insertos mediante el protocolo de extracción axonemal. Se usaron 30, 10 y 5 µl de lisado de proteína para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Área activa: inserto 39,9 = 71,25%, inserto 41,2 = 59,88%

Figura 11: Expresión de la proteína CCDC39 (110 kDa) en 16HBE14o- después del tratamiento con inhibidor del proteasoma. Se sembraron $6,0 \times 10^5$ células 16HBE14o- en placas de 6 pocillos y se transfectaron con ARN de CCDC39 (Lipofectamine MessengerMax; Ratio 1:1,5). Después de 6 horas, las células se lisaron con tampón M-PER. Se utilizaron 20 µg de lisado de proteína para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Como control, se usaron lisado de células no transfectadas (UT) y transfectadas con EGFP. Dosis alta = $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, dosis baja = $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. ARN: ETH047T02: UTR 5' mínima, ETH047T03: TISU, ETH047T04: CYBA, ETH047T05: SP30.

Figura 12: Expresión de la proteína CCDC39 (110 kDa) en 16HBE14o- después del tratamiento con inhibidor del proteasoma. Se sembraron $6,0 \times 10^5$ células 16HBE14o- en placas de 6 pocillos y se transfectaron con ARN de CCDC39 (ETH047T03, UTR 5' de TISU, Lipofectamine MessengerMax; relación 1:1,5). Después de 24 horas, las células se lisaron con tampón M-PER. Se utilizaron 20 µg de lisado de proteína para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Como control, se usaron lisado de células no transfectadas (UT) y transfectadas con EGFP. Dosis alta = $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, dosis baja = $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en los siguientes ejemplos, que se presentan con fines ilustrativos y no a modo de limitación. Cada publicación, patente, solicitud de patente u otro documento citado en esta solicitud se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

Ejemplos

Los procedimientos y materiales se describen en el presente documento para su uso en la presente divulgación; También se pueden usar otros procedimientos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

I. Material y procedimientos

Materiales, dispositivos, software y sistema de prueba utilizados

Los materiales se enumeran en la tabla 4.

Tabla 4

Sustancia/Consumible/Compuesto químico	Proveedor	N.º de cat.
DPBS (sin $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$)	Thermo Fisher Scientific	14190-169
Medio LHC-9	Thermo Fisher Scientific	12677019
Suplemento DMEM (1x)-GlutaMAX ^{MR}	Thermo Fisher Scientific	21885
BEAS-2B	ATCC	CRL 9609
HEK 293	DSMZ	ACC305
Inhibidor de tripsina	Thermo Fisher Scientific	R007100
RPMI 2650	DSMZ	ACC207)
Fibronectina	Merck Millipore	FC010
Colágeno	Corning Incorporated	354236
Albúmina de suero bovino Pierce ^{MR}	Thermo Fisher Scientific	23209
DPBS (con $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$), para frotis	Thermo Fisher Scientific	14040133
Lipofectamine® 2000	Thermo Fisher Scientific	11668027
Raspadores de células Corning®	Corning Incorporated	CORN3010
Inhibidor de proteasa cOmplete	Sigma Aldrich	11873580001
Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce ^{MR}	Thermo Fisher Scientific	23225
Tampón de muestra Bolt LDS (4x)	Thermo Fisher Scientific	B0007
Agente reductor de muestra Bolt (10x)	Thermo Fisher Scientific	B0009
Estándares de color dual Precision Plus Protein ^{MR}	BIO-RAD	161-0374
Mini empaque de transferencia Trans-Blot Turbo PVDF de 0,2 µm	BIO-RAD	1704156
Sustrato HRP Luminata Crescendo Western	Merck Millipore	WBLUR0500
mAb de conejo GAPDH (D16H11)XP®	Cell Signaling	5174
Anticuerpo anti-CCDC40	Sigma Aldrich	HPA022974

IgG de Cabra anti-conejo-HRP	Santa Cruz	sc-2004
Recolector de células frotis Celletta ^{MR}	Engelbrecht Medizin-und Labortechnik	9100060
Ultroser G	Pall Life Sciences	15950
Gelatina	Caelo	01704140
NaCl	Carl Roth	0601.1
TRIS	Carl Roth	AE15.3
TRIS/HCl	Carl Roth	A9090.3
EDTA	Carl Roth	X986.1
NaOH (32%)	Carl Roth	T196.1
FBS (cultivo sumergido)	Thermo Fisher Scientific	10500-064
Penicilina-Estreptomicina	Thermo Fisher Scientific	15140-122
Colágeno I, cola de rata	Gibco	A1048301
Ácido acético al 100%	Carl Roth	3738.1
Corning Transwell	Costar	3470
Tripsina/EDTA 1x	Sigma Aldrich	T3924
Colagenasa tipo 4	Worthington Biochemical Company	LS004188
Antibióticos/Antimicóticos 100 x	Thermo Scientific	15240
Medio de ALI PneumaCult	STEMCELL Technologies	5001
Sacarosa (CAS# 57-50-1)	Sigma Aldrich	S1888
Kit de ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa	Pierce Biotechnology	88954
Reactivo NucGreen ^{MR} Dead 488 ReadyProbes®	Life Technologies	R37109
Conector Mini-Plasco® con 0,9% de NaCl (Solución salina Isotónica)	BBraun	9511711
FBS (Cultivo de ALI)	Thermo Fisher Scientific	A3160801
Medio de incrustación congelado Shandon Cryomatrix ^{MR}	Thermo Fisher Scientific	6769006
Portaobjetos Superfrost Ultra Plus	Thermo Fisher Scientific	J1800AMNZ
Paraformaldehído	Sigma Aldrich	P6148
Suero de cabra	Abcam	Ab7481
IgG de BSA sin proteasas	Jackson Immunoresearch	001-000-161
Leche descremada (grado transferencia)	Carl Roth	T145.2
Hoechst33342	Thermo Fisher Scientific	H3570
anticuerpo monoclonal anti-tubulina alfa acetilada	Sigma Aldrich	T6793
Anticuerpo policlonal anti-CCDC40	Proteintech	25049-1-AP
Anticuerpo policlonal anti-CCDC39	Atlas antibodies	HPA035364
Anticuerpo Alexa Fluor 546	Thermo Fisher Scientific	A11035
Anticuerpo Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A11029
Insulina	Sigma Aldrich	I9278
Extracto de cerebro bovino	Lonza	CC-4098
Transferrina	Sigma Aldrich	T8158
Hidrocortisona	Sigma Aldrich	H4001
Sal sódica de 3,3',5-triyodo-1-tironina	Sigma Aldrich	T6397
Epinefrina	Sigma Aldrich	E4642
Ácido retinoico	Sigma Aldrich	R2625
Fosforiletanolamina	Sigma Aldrich	P0503
Etanolamina	Sigma Aldrich	E0135
DAPT	Tocris	2634
PBS (sin Mg ²⁺ /Ca ²⁺)	Thermo Fisher Scientific	14190-94
10x PBS (con Mg ²⁺ /Ca ²⁺)	Thermo Fisher Scientific	AM9625
Triton-X 100 (Cultivo de ALI)	Sigma Aldrich	T8787
Triton X-100 (cultivo sumergido)	Sigma Aldrich	T9284
DMEM/F-12 de Ham 1:1	Invitrogen	11039
Ultroser G	Pall Life Sciences	15950-017
Plásmido circular	Ethris	
BstBI	New England BioLabs	
Cloroformo	Sigma Aldrich	288306
Etanol	Sigma Aldrich	34852-M
Análogo protector de ARCA	Jena Biosciences	
Citidina-5'-trifosfato	Jena Biosciences	
5-yodocitidina-5'-trifosfato	Jena Biosciences	
Uridina-5'-trifosfato	Jena Biosciences	

5-yodo uridina-5'-trifosfato	Jena Biosciences	
Citidina-5'-trifosfato	Jena Biosciences	
5-yodocitidina-5'-trifosfato	Jena Biosciences	
Uridina-5'-trifosfato	Jena Biosciences	
5-metiluridina-5'-trifosfato	Jena Biosciences	
DNasa I	Thermo Fisher Scientific	
Acetato de amonio	Sigma	
Kit de desfosforilación rápida	New England BioLabs	
Polimerasa poli(A)	New England BioLabs	
β-Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	M3148
Placa de 6 pocillos	Omnilab	CORN3506
Kit de ensayo de proteínas de BCA	Thermo Fisher Scientific	23225
Antioxidante Bolt	Thermo Fisher Scientific	BT0005
Gel SDS-PAGE al 4-12% Bolt ^{MR}	Thermo Fisher Scientific	NW04120BOX
Tampón de procesamiento MES SDS Bolt ^{MR} (20x)	Thermo Fisher Scientific	B0002
cOmplete, Cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA	Sigma-Aldrich	11873580001
Solución de DNasa I (2.500 U/ml)	Thermo Fisher Scientific	90083
DPBS	Life Technologies	14040133
DTT	Sigma Aldrich	646563
EDTA	Carl Roth	8040.3
FBS inactivado por calor	Thermo Fisher Scientific	10500064
HEPES	Carl Roth	HN78.2
Medio LHC-9	Thermo Fisher Scientific	12680013
Sustrato de HRP Luminata Classico Western	Merck Millipore	WBLUC0500
MEM GlutaMax	Thermo Fisher Scientific	41090028
Tampón M-PER ^{MR}	Thermo Fisher Scientific	78501
MgSO ₄	Carl Roth	T888.1
Penicilina/Estreptomicina	Thermo Fisher Scientific	15140122
SDS al 10%	Thermo Fisher Scientific	24730020
Desoxicolato de sodio	Sigma-Aldrich	D6750-10G
SuperSignal ^{MR} West Festo	Thermo Fisher Scientific	34095
Matraces T175	Corning/Omnilab	CORN431080
Matraces T75	Corning/Omnilab	CORN430641
Paquetes de transferencia de PVDF Turbo ^{MR} Mini Trans-Blot®	Bio-Rad	1704156
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T9284-100ML
TRIPSINA-EDTA (0,05%)	Thermo Fisher Scientific	25300054
Reactivo de transfección MessengerMAX ^{MR} Lipofectamine®	Thermo Fisher Scientific	LMRNA003
Agua bidestilada.	Kerndl	22501
Membranas de ALI	Sigma-Aldrich	CLS3470
Sustrato de HRP Luminata Forte Western	Merck Millipore	WBLUF0500
MMRB (véase, la tabla 18)		
Nitrógeno líquido		
WFI	B Braun	3703444
ARN polimerasa T7	Thermo Fisher Scientific	
Pirofosfatasa inorgánica	Thermo Fisher Scientific	
Inhibidor de RNasa	Thermo Fisher Scientific	
HCL	Roth	4625.2
Matraces T175 (CORN431080)	Corning/Omnilab	
Matraces T75 (CORN430641)	Corning/Omnilab	

Los dispositivos están enlistados en la tabla 5.

Tabla 5

Dispositivo	Proveedor
Lector de placas Tecan Infinite® 200 PRO	Tecan
Thermomixer® C	Eppendorf
Power PAC 300	BIO-RAD
Sistema de transferencia Turbo ^{MR} Trans-Blot®	BIO-RAD
Sistema XRS ChemiDoc ^{MR}	BIO-RAD
Lector Multimodal LB 942TriStar2	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania

Dispositivo	Proveedor
Microscopía de video de alta velocidad	Ammons Engineering, Mt Morris, MI, EE.UU.
Nikon Eclipse Ti-S	Nikon MEA53300
ELWD 40x S Plan Fluor o	Nikon, MEA48430
Sistema calefactor Minitube SC300	Minitube International AG
Platinas Superfrost Ultra Plus	Thermo Fisher Scientific
Corte de filtro de corte de peso molecular 100	Sartorius
Criostato Microm HM560	Microm
ChemiDoc	Bio-Rad
Dispositivo de conteo de células Countess (C10281)	Thermo Fisher Scientific
Microscopio de Fluorescencia (DMI8)	Leica
Mini tanque de Gel	Thermo Fisher Scientific
Sistema de transferencia Turbo ^{MR} Trans-Blot®	Bio-Rad
Tubos de matriz de lisis A	MP Biomedicals
MP FastPrep-24 (HOM-1)	MP Biomedicals
Microplacas negras de 96 pocillos (655090)	Greiner

El software está enlistado en la tabla 6.

Tabla 6

Software	Proveedor
Magellan ^{MR} - Software de análisis de datos	Tecan
Image Lab ^{MR}	BIO-RAD
Análisis de video Sisson-Ammons (software SAVA)	Ammons Engineering, Mt Morris, MI, EE.UU.
Cámara Megaplug modelo ES 310 turbo	Redlake Inc., EE.UU.
NIS-Elements Basic Research	Nikon
Software Nikon NIS Elements AR	Nikon

El sistema de prueba está enlistado en la tabla 7.

Tabla 7

Sistema de prueba	Especie	Cepa
HEK 293	riñón embrionario primario humano	n.º de DSMZ: ACC305
RPMI 2650	carcinoma anaplásico de células escamosas	n.º de DSMZ: ACC207
BEAS-2B	epitelio bronquial	n.º de ATCC: CRL 9609

5 I. Cultivo celular sumergido

1. Cultivo

Las líneas celulares se cultivaron en una incubadora de células bajo atmósfera humidificada a 37 °C y un contenido de CO₂ del 5%. Todos los reactivos y soluciones se calentaron a 37 °C en un baño de agua antes de su uso.

- 10 Las células confluentes (aproximadamente 90%) se lavaron primero con 20 ml de DPBS (sin Mg²⁺/Ca²⁺) para eliminar las células muertas. Para separar las células, se añadieron 2 ml de solución de tripsina/EDTA (0,05%) por matraz. A continuación, las células se incubaron a 37 °C hasta que se produjo el desprendimiento de las células. Se utilizaron 8 ml del medio respectivo para detener la tripsina. Debido a que el medio LHC-9 estaba casi exento de suero, se añadió al menos un volumen igual de inhibidor de tripsina a las células BEAS-2B desprendidas para inactivar la tripsinización. La solución celular tuvo que centrifugarse posteriormente durante 5 minutos (min) a 1100
- 15 revoluciones por minuto (rpm) para eliminar nuevamente el inhibidor de tripsina. A continuación, el sedimento se redisolvió en el medio. Para el pase, las células se dividieron en diferentes proporciones según el siguiente uso.

HEK 293 (n.º de DSMZ: ACC305)

- 20 Esta línea celular establecida era de un riñón embrionario primario humano transformado por adenovirus tipo 5 (AD 5). Se cultivó en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)-GlutaMAX^{MR} suplementado con suero de ternero fetal (FBS) al 10% inactivado por calor (h.i.) y penicilina/estreptomicina (P/S) al 1%. Esta línea celular se dividió dos veces por semana.

RPMI 2650 (n.º de DSMZ: ACC207)

- 25 Esta línea celular tuvo su origen en el derrame pleural de un hombre de 52 años con carcinoma anaplásico de células escamosas de tabique nasal. Se eligió por la morfología epitelioide ciliada y la similitud con el epitelio bronquiolar. También se cultivó en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)-GlutaMAX^{MR} suplementado con suero de ternero fetal (FBS) al 10% inactivado por calor (h.i.) + penicilina/estreptomicina (P/S) al 1% + una solución

1x de aminoácidos no esenciales (NEAA). Esta línea celular se dividió 1-2 veces por semana.

BEAS-2B (n.º de ATCC: CRL 9609)

Las células BEAS-2B se derivaron de un epitelio bronquial normal obtenido de la autopsia de individuos no cancerosos. A continuación, las células se infectaron con un híbrido de SV40/adenovirus 12 de replicación defectuosa y se clonaron. El medio de cultivo utilizado fue LHC-9 con modificación sin aditivos. También se dividieron 1-2 veces por semana dependiendo de la confluencia.

Los matraces utilizados para las células BEAS-2B se recubrieron con una mezcla de 0,01 mg/ml de fibronectina, 0,03 mg/ml de colágeno y 0,01 mg/ml de albúmina de suero bovino disuelta en LHC-9. La mezcla se añadió en una proporción de 0,2 ml por cm² de área superficial. Posteriormente, fue necesaria la incubación a 37 °C durante al menos 6 horas. Antes de la adición de células, los matraces se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) sin Mg²⁺/Ca²⁺.

2. Transcripción *in vitro*

Para generar moldes para la transcripción *in vitro*, se linealizaron plásmidos circulares mediante digestión de restricción con *BstBI* y se purificaron adicionalmente mediante precipitación con cloroformo etanol.

El ARNm se produjo usando una mezcla de transcripción *in vitro* estándar (incluidos los nucleótidos indicados modificados con trifosfato) que contenía ARN polimerasa T7, pirofosfatasa inorgánica e inhibidor de RNasa. La protección taponamiento cotranscripcional se logró mediante la adición de un análogo protector de ARCA. Para la transcripción *in vitro* de ARN químicamente modificado, el 7,5% de citidina-5'-trifosfato se sustituyó por 5-yodocitidina-5'-trifosfato y el 30% de uridina-5'-trifosfato se sustituyó por 5-yodouridina-5'-trifosfato (Jena Biosciences), respectivamente (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1). En otra configuración de producción de ARN químicamente modificado, el 3% de citidina-5'-trifosfato se reemplazó por 5-yodocitidina-5'-trifosfato y el 15% de uridina-5'-trifosfato se reemplazó por 5-metil-uridina-5'-trifosfato (Jena Biosciences), respectivamente (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2). El ADN molde residual se digirió usando DNasa I. Posteriormente, el ARNm se purificó mediante precipitación con acetato de amonio seguido de una etapa de lavado usando etanol al 70%.

La desfosforilación del ARNm residual no protegido se llevó a cabo usando un kit de desfosforilación Quick seguido de purificación mediante precipitación con acetato de amonio seguido de una etapa de lavado usando etanol al 70% y ultrafiltración usando un corte de filtro de corte de peso molecular 100.

El ARNm se poliadeniló adicionalmente usando una poli(A) polimerasa. De nuevo, el ARNm se purificó mediante precipitación con acetato de amonio seguido de una etapa de lavado usando etanol al 70% y ultrafiltración usando un corte de filtro de corte de peso molecular 100. La longitud de poli(A) se determinó mediante electroforesis en gel capilar entre 100 y 250 nucleótidos.

En particular, los constructos de ARNm de CCDC40 investigados en este experimento comprendían un protector de ARCA 5' y PPA y eran las siguientes: con UTR mínima de Ethris (ETH031T06; T06; SEQ ID NO: 5), con UTR 5' de TISU pero sin UTR 3' (ETH031T07; T07; SEQ ID NO: 6), con UTR 5' de hAg pero sin UTR 3' (ETH031T08; T08; SEQ ID NO: 7), con UTR 5' y 3' de CYBA (ETH031T0; T09; SEQ ID NO: 1), y con UTR 5' de CMV IE9 humano y UTR 3' de la hormona de crecimiento humano (ETH031T0; T10; SEQ ID NO: 8).

3. Transfección

Para proporcionar al menos un 90% de confluencia, las células se sembraron en placas de 6 pocillos 24 horas antes de la transfección. Los recuentos de células difirieron según el momento de la lectura y el tipo de célula (comparar tabla 8).

Tabla 8

Tiempo	células/pocillo x10 ⁶		
	HEK 293	RPMI 2650	BEAS-2B
6 h	2	0,6	0,75
24 h	1,4	0,4	0,5
48 h	1	0,3	-
72 h	0,75	0,2	-
144 h	0,125	0,05	-

La transfección se realizó utilizando diferentes constructos de ARNm de CCDC40, así como ARNm que codifica la proteína fluorescente verde mejorada (eGFP) como control de la transfección. La transfección se realizó usando Lipofectamine® 2000. Antes de la transfección, se intercambió el medio de cultivo para proporcionar condiciones óptimas para las células. La reacción de lipoplejo requirió una mezcla de ARNm/WFI así como una mezcla de Lipofectamine® 2000/medio. Se usaron 125 µl de cada mezcla con una relación de volumen de 1: 2 de ARNm a Lipofectamine® 2000 ya que los ARNm mostraban una concentración del patrón de 1 µg/µl. Se usaron diferentes

concentraciones de ARNm y la mezcla se ajustó en consecuencia (véase la tabla 9 para un ejemplo de esquema de pipeteo).

Tabla 9

µg de ARN/ pocillo	ARN en µl	+WFI en µl	Lipofectamine® 2000 en µl	+ medio libre de suero en µl
5	5	120	10	115
2,5	2,5	122,5	5	120
1	1	124	2	123

- Después de preparar ambas mezclas, la mezcla de ARNm/WFI se agregó a la mezcla de Lipofectamine®2000/medio y la solución se incubó durante ≥ 5 min antes de agregarla gota a gota a las células sembradas. Para obtener una mejor viabilidad de las células, se realizó un cambio de medio adicional 4 horas después de la transfección.

4. Inmunotransferencia de tipo Western de CCDC40

a. Muestreo para inmunotransferencia de tipo Western

- Para la lisis celular, se eliminó el medio de cultivo de la transfección y las células se lavaron con DPBS (sin Mg^{2+}/Ca^{2+}) y luego se rasparon usando raspadores de células Corning®. Las células se lisaron con 100 µl de una solución tampón de lisis [tampón de lisis TritonX-100 10x (Tris-HCl 250 mM, TritonX-100 al 1%, pH: 7,8) se ajustó a 1x en WFI y se complementó con un inhibidor de proteasa cOmplete] antes de que las muestras se congelaran a -20 °C.
- La concentración de proteína total se determinó usando el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce^{MR} (ensayo BCA). El ensayo se realizó según el protocolo de los fabricantes. Brevemente, se preparó una dilución 1:50 de reactivo de trabajo (WR) de BCA. Se transfirieron 5 µl de cada muestra a una placa de 96 pocillos (fondo plano, transparente) y se agregaron 200 µl de WR por pocillo. La última etapa fue una incubación a 37 °C durante 30 min. Los resultados se midieron en un lector de placas Tecan Infinite® 200 PRO usando el Software de análisis de datos Magellan^{MR}.

b. Preparación de gelatina NET

Tabla 10

Sustancia	Concentración final
TRIS/HCl, pH 7,5	0,2 M
EDTA, pH 8,0	0,05 M
Triton-X100	0,5% (v/v)
NaCl	1,16 M
Gelatina	25 g/l

c. SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western

- Para realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), los lisados se mezclaron con 5 µl de tampón de muestra LDS de Bolt (4x) y 2 µl de agente reductor de muestras Bolt (10x) y luego se calentaron a 70 °C durante 10 min y 350 rpm en el Thermomixer® C. Para permitir la comparación entre las muestras en un gel, se cargó la misma cantidad de proteína total. Se llenaron 7 µl del marcador (Estándares de color dual Precision Plus Protein^{MR}) en el primer bolsillo de cada gel, para permitir después la estimación precisa del tamaño de la proteína. A continuación, se conectó el tanque de gel a la fuente de alimentación (Power PAC 300) durante 30 min a 1 A. Posteriormente se abrió el casete con una espátula y luego se trasladó el gel a la estación de transferencia.

- El sistema de transferencia (Sistema de transferencia Turbo^{MR} Trans-Blot®, 30 min, 25 V, 1 A) y membranas adecuadas (PVDF de 0,2 µm Trans-Blot Turbo Transfer Pack Mini) se utilizaron para la transferencia según las instrucciones del fabricante. Al desplazar un rodillo sobre el "sándwich", se eliminaron las burbujas que pudieran interferir en la transferencia de proteínas. Para bloquear los sitios de unión libres, la membrana se colocó en una gelatina NET y se agitó durante 60 minutos en un agitador de placas. El gel se cortó en la banda de 75 kD para detectar CCDC40 y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) al mismo tiempo. Los anticuerpos se diluyeron con gelatina NET (anti-CCDC40 1: 2.000 en 6 ml, GAPDH 1: 10.000 en 10 ml de gelatina NET) y las membranas se incubaron con su correspondiente anticuerpo en un agitador de placas durante la noche a 4 °C. GAPDH funciona como control de carga. En la tabla 11 se muestra una lista de los anticuerpos empleados. Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces con gelatina NET durante 10 minutos para eliminar los anticuerpos que estaban unidos de forma no específica o residuales. El anticuerpo secundario IgG de cabra anti-conejo-HRP se diluyó 1:10.000 con gelatina NET. Después de 60 min de incubación en un agitador de placas a temperatura ambiente (TA), las membranas se lavaron de nuevo tres veces durante 10 min con gelatina NET. El anticuerpo

secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante HRP se pudo detectar mediante un generador de imágenes molecular (Sistema XRS ChemiDoc^{MR}). Por lo tanto, se añadieron al gel 5 ml de sustrato de HRP de Luminata Crescendo Western y se incubó durante 5 min. La última imagen que aún no estaba sobreexpuesta y la imagen colorimétrica se fusionaron e ilustraron con el software Image Lab^{MR}. Además, las intensidades de las bandas se

5

Tabla 11

Nombre	Fabricante	Uso
mAb de conejo GAPDH (D16H11)XP®	Cell Signalling	Anticuerpo primario
Anti-CCDC40	SIGMA-ALDRICH	Anticuerpo primario
IgG-de cabra anti-conejo-HRP	SCBT	Anticuerpo secundario

II. Cultivo de ALI

1. Muestreo de células epiteliales respiratorias humanas (hREC)

a. Frotis nasal

- 10 El medio RPMI se calentó a temperatura ambiente y el frotis se humedeció con solución salina isotónica estéril. Se aplicó un colector de células de frotis Celletta^{MR} con punta protectora. Después de pedirle al paciente que se limpiara la nariz, tuvo que sentarse en una silla con la cabeza contra una pared para sostener la cabeza. El cepillo para el frotis se frotó varias veces rápidamente contra el lado medial y superior del meato nasal inferior mediante movimientos lineales y rotatorios. Al retirar el cepillo para el frotis se colocó inmediatamente en un tubo colector
- 15 (Cornicle de 15 ml) con 5 ml de medio RPMI precalentado. El cepillo para frotis se agitó vigorosamente dentro del tubo durante al menos 40 veces para separar las células del cepillo.

b. Cultivo estacionario

- El tubo se centrifugó a 900 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Después de descartar el sobrenadante, el sedimento se redisolvió en medio UG [DMEM/F-12 de Ham 1:1 con 5 ml de antibióticos/antimicóticos 100x estériles y 10 ml de Ultrosor G estéril]. Se utilizaron 5 ml de medio para un matraz T25 y 25 ml para un matraz T75.
- 20

Tras transferir las células al matraz de cultivo celular, las células se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% durante la noche. Las células deben adherirse después de 20-24 horas. El medio UG se reemplazó 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes).

2. Generación y transfección del cultivo de ALI

- 25 a. Recubrimiento de insertos Transwell (0,33 cm²)

- Se emplearon las siguientes placas para el cultivo de ALI: Corning Transwell con membrana de poliéster transparente (poros de 0,4 µm, insertos de 6,5 mm de diámetro, placas de 24 pocillos). El colágeno de cola de rata se diluyó 1: 5 en ácido acético y se cargaron 250 µl en el lado apical de cada inserto. Después de incubar las placas durante la noche a temperatura ambiente, el líquido restante se aspiró con una pipeta Pasteur y luego la placa se dejó secar con la tapa abierta durante al menos 5 min (estéril). Finalmente, los insertos se lavaron dos veces con DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺) y luego se secaron durante la noche a temperatura ambiente (estéril). Los insertos se almacenaron a 4 °C durante hasta un mes.
- 30

b. Expansión celular de hREC como cultivo sumergido (cultivo estacionario)

- Las células se alimentaron cada 2 a 3 días (lunes, miércoles y viernes) con 15 ml de medio UG precalentado. Se debió tener cuidado de no agregar nuevo medio directamente sobre la capa de colágeno para evitar daños en la capa de colágeno y el desprendimiento de las células. Tan pronto como las células fueron confluentes al 80% o la capa de colágeno comenzó a desprenderse, las células se transfirieron a filtros de ALI (aproximadamente después de 3 semanas en cultivo sumergido).
- 35

c. Preparación del Medio G

- 40 Se probaron diferentes medios de ALI, pero se prefirió el Medio G de fabricación propia.

Este medio se preparó durante una semana, pero fue necesario almacenarlo a 4 °C. Los lotes se congelaron en alícuotas según el tamaño del próximo experimento. La tabla 2 muestra la composición del Medio G.

d. Siembra y levantamiento por aire de hREC (cultivo de ALI)

1. Aspirar medio UG, lavar una vez con medio de lavado [DMEM/ F-12 de Ham 1:1 con antibióticos/antimicóticos (AA) estériles 1x] o DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺)
- 45

2. En el caso de matraces recubiertos con colágeno de cola de rata de fabricación propia:

- a. Disolver la capa de colágeno agregando 9 ml de collagenasa (1x) e incubar de 45 a 60 min a 37 °C
- b. Transferir las células a un tubo cónico de 15 ml y centrifugar a 1.000 rpm, a temperatura ambiente durante 5 min.
- c. Lavar las células con tampón de lavado (1.000 rpm, temperatura ambiente, durante 5 min)

- 5 d. Agregar 2 ml de tripsina EDTA (1x) y pipetear suavemente hacia arriba y hacia abajo para separar las células, incubar las células a 37 °C y agitar el tubo cónico hasta que los grupos de células se desintegren (aproximadamente 5 minutos)

En el caso de matraces recubiertos con colágeno adquiridos a través de Gibco:

- 10 a. Agregar 3 ml de tripsina EDTA (1x) al matraz de cultivo celular hasta que las células se desprendan (aproximadamente 5 min)

3. Detener la tripsina agregando 0,5 ml de FBS y 5 ml de medio de lavado.

4. Transferir las células a un tubo Falcon de 15 ml y lavar las células dos veces con medio de lavado (1.000 rpm, temperatura ambiente, durante 5 min).

- 15 5. Resuspender el precipitado en una cantidad adecuada de medio ALI (1-2 ml, dependiendo del tamaño del precipitado) y contar las células con el contador de células.

6. Añadir 250 µl de la suspensión celular (400.000 células/ml) en cada placa Transwell recubierta de colágeno con 500 µl del medio ALI en el lado basolateral.

7. Incubar las células a 37 °C en una incubadora humidificada de CO₂ al 5% durante la noche.

Día 3-5: Crecimiento de ALI

- 20 8. Verificar los insertos bajo el microscopio de manera consistente

9. Alimentar las células con medio de ALI todos los días hasta una confluencia del 80 - 100% (3 - 4 días)

Diferenciación de ALI

10. Levantar por aire las células cuando se alcance una confluencia del 80 al 100%

a. Aspirar el medio de ALI de ambos lados, el apical y el basolateral

- 25 b. Añadir 500 µl de medio de ALI fresco al compartimento basolateral.

c. Incubar las células a 37 °C en una incubadora humidificada de CO₂ al 5%

11. Lavar las células con medio de lavado precalentado (apical) una vez a la semana y alimentar las células con medio de ALI cada 2-3 días (o el lunes - miércoles - viernes).

e. Transfección de hREC

- 30 Las formulaciones (LF111-ARNm) se diluyeron en sacarosa al 2% hasta una concentración final de 3 µg/inserto (= 9 µg/cm²). Para eliminar la mucosidad, los insertos se lavaron con 200 µl de DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺) en el lado apical y se incubaron durante 20 min a 37 °C (Epithelix ALI) o 200 µl de DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺) en el lado apical y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (hREC, UKM) antes de la transfección. Posteriormente, se eliminó el DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺) de la superficie apical mediante aspiración suave sin dañar el epitelio. Inmediatamente después del lavado de moco, las células se lavaron de nuevo con WFI (100 µl) para eliminar las trazas de DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺).
- 35 Se añadieron 25 µl de la formulación en el lado apical del inserto para permitir la absorción celular. La eliminación del portador se realizó después de 6 h de incubación, las células se lavaron una vez con 200 µl de DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺) y el cultivo se mantuvo como ALI sin líquido en el lado apical.

3. Ensayos de lectura

- 40 Se emplean varios ensayos de lectura. La medición de LDH y el ensayo NucGreen se utilizaron para investigar los efectos de la transfección relacionados con la toxicidad. Se necesitaron mediciones de frecuencia de latido ciliar (CBF) para examinar la forma de latido ciliar con respecto a la frecuencia de latido y el porcentaje de área ciliada. Si el latido ciliar conduce a un flujo dirigido, se puede estudiar mediante el ensayo de eliminación mucociliar (MCC). Se utilizaron tinciones de inmunofluorescencia (IF) para CCDC40, su compañero heterodímero CCDC39 y el marcador de cilios alfa-tubulina acetilada para detectar si, después del tratamiento, se puede detectar la proteína CCDC40 o su compañera CCDC39 en los cilios. Además, se tiñeron proteínas del complejo regulador de dineína (DRC) como
- 45

GAS8 y DNALI1. El DRC está anclado por CCDC40/CCDC39 y solo está presente si CCDC40/CCDC39 están integrados correctamente en el axonema de los cilios.

a. Medición de LDH

5 La concentración de LDH se mide utilizando el kit de ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa Pierce^{MR}. El procedimiento se realiza como se describe en el protocolo del fabricante. Los cultivos de ALI se incubaron en el lado apical con 100 µl de DPBS (con Mg^{2+}/Ca^{2+}) durante 30 min a 37 °C y CO₂ al 5%. Se mezclaron 50 µl de la mezcla de reacción de LDH y 50 µl del medio de incubación utilizando un formato de 96 pocillos y se incubaron protegidos de la luz a temperatura ambiente durante 30 min añadiendo 50 µl de solución de parada. La absorbancia del formazano se midió a 490 nm y 680 nm usando un lector de microplacas (Lector Multimodal TriStar2 LB 942). El valor de 680 nm se restó de 490 nm para la normalización de fondo. Se realizó una doble determinación para cada inserto.

b. Medición de la frecuencia de latido ciliar (CBF)

15 Los análisis de frecuencia de latido ciliar (CBF) de hREC se realizaron mediante microscopía de video de alta velocidad y análisis de video de Sisson-Ammons. Los videos (125 fps, resolución de 640 × 480 píxeles) se grabaron utilizando una cámara Megaplug modelo ES 310 turbo conectada a un microscopio invertido de contraste de fases equipado con un objetivo ELWD 40x S Plan Fluor en condiciones fisiológicas, manteniendo la temperatura a 36 °C por un sistema de calefacción Minitube SC300.

c. Ensayo de eliminación mucociliar (MCC, perlas de fluorescencia)

20 El medio de ALI y DPBS (sin Ca^{2+}/Mg^{2+}) se precalentaron a temperatura ambiente y la placa del microscopio se calentó a 37 °C. Los insertos de ALI se transfirieron a una nueva placa y se lavaron apicalmente dos veces con medio de ALI precalentado (DPBS alternativo sin Ca^{2+}/Mg^{2+}). Se agregaron 100 µl de medio ALI al compartimento apical antes de grabar 20 videos por inserto (aumento de 40x, Ph2) para obtener una impresión general del inserto (software SAVA). Las partículas fluorescentes rojas con un diámetro de 0,5 µm se diluyeron 1: 1.000 en DPBS (sin Ca^{2+}/Mg^{2+}) y se agitaron con vórtice durante al menos 1 min. Se añadieron 10 µl de la dilución de partículas a 100 µl de medio de ALI, se agitaron con vórtice y se añadieron 110 µl al compartimento apical. Al manipular las perlas, era importante agitar con vórtice antes de cada etapa para evitar la aglutinación. Además, era necesario trabajar con luz tenue para evitar el blanqueamiento.

30 El flujo de las partículas fluorescentes se registró con el software NIS-Elements Basic Research. El movimiento se registró durante 20-30 s usando un aumento de 20x (Ph1) mientras se excitaban las partículas con un láser de 488 nm. El tiempo de exposición tuvo que ajustarse al número de fotogramas grabados por segundo (fps). Para 7,5 fps, el tiempo de exposición se estableció en 100 ms y para 15 fps en 50 ms. El área de observación exacta se analizó con SAVA (aumento de 20x, Ph1) para visualizar el movimiento ciliar y las estructuras tridimensionales de la capa celular.

35 Para la evaluación y el análisis de datos, se emplea el software Nikon NIS Elements AR, NIS PLUG-IN <ADVANCED 2D TRACKING> <AR> (véase el módulo de seguimiento NIS Elements AR más arriba).

d. IF del cultivo de ALI

Inclusión del cultivo de ALI

40 Antes de la preparación de la membrana, el inserto de ALI se lavó dos veces con DPBS (sin Mg^{2+}/Ca^{2+} , 200 µl, 1 min, temperatura ambiente) para eliminar el moco. La siguiente preparación de la membrana se llevó a cabo según el siguiente protocolo (véase más abajo).

45 La membrana del filtro Transwell se cortó usando un bisturí o una jeringa antes de transferir la membrana a una placa de Petri con 3 ml de DPBS (Ca^{2+}/Mg^{2+}). La membrana se cortó en trozos iguales (4-6) y se prepararon criomoldes con medio de inclusión congelado Shandon Cryomatrix^{MR} (tamaño intermedio). Se colocaron trozos de membrana en la criomatriz y se dispusieron en paralelo entre sí antes de incubar los criomoldes en hielo seco hasta que la criomatriz se endureciera. Los criomoldes se almacenaron a -80 °C durante al menos 2 h antes de cortarlos en un criostato.

Corte de las membranas de ALI

50 Las membranas de ALI incluidas en Shandon Cryomatrix^{MR} se cortaron usando el criostato Microm HM560. Por lo tanto, el criostato se enfrió previamente (2-3 h antes del corte) a -20 °C (mesa a -21 °C y cámara a -25 °C). La membrana de ALI que contenía criomoldes se pasó de -80 °C a -20 °C durante al menos 1 h. El corte de la membrana se realizó a 20 µm, dependiendo de las condiciones de manipulación de la membrana. Las rodajas de membrana se transfirieron a portaobjetos Superfrost Ultra Plus, se secaron durante al menos 1 h a temperatura ambiente y se almacenaron a -80 °C durante la noche o hasta su uso a -80 °C.

Procedimiento de tinción

Para los anticuerpos aplicados, véase la tabla 12.

Día 1:

1. Lavar con DPBS 1x ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) durante 5 min a temperatura ambiente
- 5 2. Fijación: PFA al 4%/DPBS 1x ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) durante 15 min a temperatura ambiente
3. Lavar con DPBS 3x ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (Quick 2x, 5 min 1x)
4. Permeabilización:
 - a. Triton X-100 al 0,5% durante 5 min o
 - b. Triton X-100 al 0,2% durante 10 min (depende del anticuerpo utilizado)
- 10 5. Lavar con DPBS 3x ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (Quick 2x, 5 min 1x) a temperatura ambiente
6. Bloqueo: suero normal de cabra al 5% + BSA al 2% en DPBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) o leche desnatada al 5% en DPBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) → 2 h a temperatura ambiente
7. Primer anticuerpo: 200 μl durante la noche a 4 °C

Día 2:

- 15 8. Lavar durante 45 min con DPBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (15 min 3x)
9. Segundo anticuerpo: 200 μl durante 1 h a temperatura ambiente
10. Hoechst33342 1: 1.000 en DPBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad
11. Lavar 5 min 6x con DPBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)
12. Montar los cubreobjetos con antidecolorante Dako

20 Tabla 12

Nombre	Especie	Dilución	Reactividad	N.º d cat.
anti-tubulina alfa monoclonal acetilada	IgG2b de ratón, clon 6-11B-1	1:10.000	humana	T6793
anti-CCDC40 policlonal	IgG de conejo	1:200	humana	25049-1-AP
anti-CCDC39 policlonal	De conejo, purificado por afinidad	1:300	humana	HPA035364
anti-GAS8 policlonal	IgG de conejo	1:200	humana	HPA041311
anti-DNAL1 policlonal	conejo, aislado por afinidad	1:200	humana	HPA028305
Alexa Fluor 546	IgG de cabra anti-conejo (H+L)	1:1.000	humana	A11035
Alexa Fluor 488	IgG de cabra anti-ratón (H+L)	1:1.000	humana	A11029
DAPI	-	1:000	-	62249

e. Aerógrafo en cultivo de ALI

Se empleó un modelo de aerógrafo para generar un cultivo de ALI diferenciador. El protocolo se estableció después de Crespin *et al.*, 2011 (Approaches to Study Differentiation and Repair of Human Airway Epithelial Cells).

- 25 Las células se lavaron brevemente en el lado apical con DPBS precalentado ($\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$). El compresor conectado al aerógrafo se ajustó a 1 kg/cm^2 haciendo funcionar el aerógrafo y girando la rueda pequeña. Es posible que el aerógrafo deba funcionar durante algún tiempo para mantener un valor constante. Luego, el pequeño depósito en la parte superior del aerógrafo se llenó con DPBS ($\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) y el inserto se colocó en una nueva placa sin medio basal. El aerógrafo se puso en marcha presionando hasta el primer punto de presión y esperando hasta que la presión en el compresor se mantenga constante. Luego, el aerógrafo se colocó verticalmente sobre el inserto y la palanca del aerógrafo se presionó muy poco más allá del primer punto de presión [dispersa el DPBS ($\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) del depósito] durante 2 s. A continuación, el lado apical del inserto se lavó brevemente con DPBS precalentado ($\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) y el inserto se puso en un medio fresco aplicable para la diferenciación de ALI. La lesión se comprobó mediante observación microscópica. Si era demasiado pequeña (menos de 1/3 del área del inserto) o las células de la lesión se desprendían solo ligeramente, se repitió el procedimiento. Los cultivos se incubaron en una atmósfera
- 30 humidificada a 37 °C, CO_2 al 5% y se cultivaron como ALI.
- 35

III. ARNm de CCDC40 etiquetados

Los ARNm en estudio se muestran en la tabla 13.

Tabla 13

ID del ARN	ORF	UTR 5'	UTR 3'	NTPI modificado [%]	NTPI modificado [Nombre]	NTPII modificado [%]	NTPII modificado [Nombre]
ETH 031T28 (SEQ ID NO: 9)	eGFP-hCCDC40	mínimo	no	15	5-Metil-UTP	3	5-Yodo-CTP
ETH 031T30 (SEQ ID NO: 10)	hCCDC40-eGFP	mínimo	no	15	5-Metil-UTP	3	5-Yodo-CTP
ETH 031T26 (SEQ ID NO: 11)	HA-CCDC40-T2A-tdTomato	CYBA	CYBA	15	5-Metil-UTP	3	5-Yodo-CTP

a. Cultivo de células

Las células HEK-293 se cultivan en MEM GlutaMAX^{MR}, FBS al 10%, 100 U/ml de P/S (= medio de cultivo) a 37 °C, el 5% de CO₂.

Antes de la siembra, las células se lavan con DPBS y se separan con tripsina. Después de la tripsinización, la tripsina se desactiva utilizando un medio de cultivo que contiene FBS. Por lo tanto, se utiliza un volumen igual o mayor de medio de cultivo. Después de centrifugación durante 5 min a 1.100x g y resuspensión en medio de crecimiento normal, las células se cuentan usando un dispositivo de recuento de células Countess.

b. Transcripción *in vitro*

Para generar moldes para la transcripción *in vitro*, se linealizaron plásmidos circulares mediante digestión de restricción con BstBI y se purificaron adicionalmente mediante precipitación con cloroformo etanol.

El ARNm se produjo usando una mezcla de transcripción *in vitro* estándar que contenía ARN polimerasa T7, pirofosfatasa inorgánica e inhibidor de RNasa. La protección cotranscripcional se logró mediante la adición de un análogo de protección de ARCA. Para la transcripción *in vitro* de ARN químicamente modificado, se sustituyó el 7,5% de citidina-5'-trifosfato por 5-yodocitidina-5'-trifosfato y se sustituyó el 30% de uridina-5'-trifosfato por 5-yodouridina-5'-trifosfato, respectivamente. En otra configuración de producción de SNIM®RNA, el 3% de citidina-5'-trifosfato fue reemplazado por 5-yodocitidina-5'-trifosfato y el 15% de uridina-5'-trifosfato fue reemplazado por 5-metil-uridina-5'-trifosfato, respectivamente. El ADN molde residual se digirió usando DNasa I. Posteriormente, el ARNm se purificó mediante precipitación con acetato de amonio seguido de una etapa de lavado usando etanol al 70%.

La desfosforilación del ARNm residual sin protección se llevó a cabo usando un kit de desfosforilación Quick seguido de purificación mediante precipitación con acetato de amonio seguido de una etapa de lavado usando etanol al 70% y ultrafiltración usando un corte de filtro de corte de peso molecular 100.

El ARNm se poliadeniló adicionalmente usando una polimerasa de poli(A). De nuevo, el ARNm se purificó mediante precipitación con acetato de amonio seguido de una etapa de lavado usando etanol al 70% y ultrafiltración usando un corte de filtro de corte de peso molecular 100. La longitud de poli(A) se determinó mediante electroforesis en gel capilar entre 100 y 250 nucleótidos.

c. Siembra, transfección y lectura

Las células se sembraron en microplacas negras de 96 pocillos (25.000 células por pocillo) 24 h antes del tratamiento. 24 h después de la siembra, se añadió medio fresco a cada pocillo (100 µl). El ARNm se transfectó usando MessengerMAX^{MR} Lipofectamine® en una relación de ARN a Lipofectamine de 1:1,5 (p/v). Se empleó ARNm a razón de 250 ng/placa de 96 pocillos (≈ 758 ng/cm²) de eGFP-CCDC40 (ETH031T28 o ETH031T30) o HA-CCDC40-T2A tdTomato (ETH031T26). Todos los ARN tenían una concentración patrón de 1 mg/ml. Para la formación de lipoplejo, el ARNm se diluyó en agua bidestilada. Se diluyó MessengerMAX^{MR} Lipofectamine® en SFM (medio sin suero) y se mezcló pipeteando. Después de una incubación de 10 min a TA, se añadió la solución de ARN a la solución de MessengerMAX^{MR} Lipofectamine®, se mezcló y se incubó durante otros 5 min a TA. Posteriormente, la mezcla se diluyó dos veces en SFM antes de agregar la solución de lipoplejo a los pocillos. En la tabla 14 se calculó un ejemplo para un ARN.

Tabla 14

ng de ARN/pocillo	ARN [μ l]	H ₂ O [μ l]	MM [μ l]	SFM [μ l]	Volumen total agregado a las células [μ l]
250	4,5	108	6,76	105,76	25

6 h y 24 h después de la transfección, se examinó la eficacia de la transfección mediante microscopía de fluorescencia, se tomaron fotografías con un aumento de 10x.

IV. CCDC39

- 5 El ARNm (ETH047T02; SEQ ID NO: 12) en estudio codificaba hCCDC39 y comprendía la UTR mínima de Ethris. En total, el 15% de uridina-5'-trifosfatos fueron reemplazados por 5-metil-uridina-5'-trifosfatos y, en total, el 3% de citidina-5'-trifosfatos por 5-yodo-citidina-5'-trifosfatos. Los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15

Tipo de anticuerpo	Número del anticuerpo	Nombre	Proveedor	N.º de cat.
Primario	207	CCDC39	Atlas Antibodies	HPA035364
Primario	219	Actina	Abcam	ab8227
Secundario	IgG de cabra anti-conejo H&L (HRP)	Abcam	ab205718	IgG de cabra anti-conejo H&L (HRP)

1. Transfección de CCDC39 e inmunotransferencia de tipo Western en cultivo celular sumergido

a. Cultivo de células

- 10 Las células BEAS-2B se cultivaron en medio LHC-9 en matraces recubiertos. Para obtener más detalles, véase I más arriba. Los experimentos se realizaron en placas sin recubrimiento.

Se cultivaron células HEK-293 en medio MEM GlutaMax, suplementado con FBS inactivado por calor y penicilina/estreptomina (P/S).

- 15 Antes de la siembra, las células se lavaron con DPBS y se separaron con tripsina. Después de la tripsinización, la tripsina se desactivó usando un inhibidor de tripsina para BEAS-2B o un medio de cultivo que contenía FBS para HEK-293. Por lo tanto, se utilizó un volumen igual o mayor de inhibidor de tripsina/medio de cultivo. Después de centrifugación durante 5 min a $1.100 \times g$ y resuspensión en medio de crecimiento normal, las células se contaron usando un dispositivo de recuento de células Countess. Considerando un volumen de siembra de 2 ml y un formato de placa de 6 pocillos, se obtuvieron $5,0 \times 10^5$ células BEAS-2B sembradas y $1,4 \times 10^6$ células HEK-293 sembradas.

20 b. Transfección

- 25 Las células se sembraron en su densidad respectiva 24 h antes del tratamiento. 24 h después de la siembra, se agregaron 2 ml de medio fresco a cada pocillo. El ARNm se transfectó usando MessengerMAX^{MR} Lipofectamine® en una relación de ARN a Lipofectamine de 1:1,5 (p/v). Todos los ARN tenían una concentración patrón de 1 mg/ml. Para la formación de lipoplejo, se diluyó ARNm en agua bidestilada. Se diluyó MessengerMAX^{MR} Lipofectamine® en SFM y se mezcló pipeteando. Después de una incubación de 10 min a TA, se añadió la solución de ARN a la solución de MessengerMAX^{MR} Lipofectamine®, se mezcló y se incubó durante otros 5 min a TA. Posteriormente, se añadió la solución de lipoplejo a los pocillos. En la tabla 16 se calcula un ejemplo de transfección para una placa de 6 pocillos.

Tabla 16

	ng/pocillo	ARN [μ l]	H ₂ O [μ l]	MM [μ l]	SFM [μ l]	Volumen total agregado a las células [μ l]
Dosis alta	5.000	5,0	120	7,5	117,5	250
Dosis baja	2.500	2,5	122,5	3,75	121,25	250

30 c. Lisis celular

- 35 Para obtener una lisis celular óptima, se compararon dos tampones de lisis diferentes, un tampón Triton X-100 y el tampón de lisis disponible comercialmente M-PER^{MR}, ambos complementados con un inhibidor de proteasa cOmplete, libre de EDTA y 40 μ l/ml de solución de DNasa I (en una mezcla de 23: 1: 1). Por lo tanto, las células se sembraron en una placa de 6 pocillos y se trataron durante 6 h y 24 h. Después del tratamiento, se recolectaron las células. Por lo tanto, las placas se lavaron una vez usando 1 ml de DPBS. Para eliminar las células de la placa, se añadió otro ml de DPBS y las células se rasparon de las placas y se trasladaron a tubos Eppendorf. Para eliminar el DPBS, las células se centrifugaron a $6.250 \times g$ durante 2 min a 4 °C. La lisis celular se realizó añadiendo 200 μ l del

tampón respectivo. Para asegurar la lisis completa, las células se incubaron en hielo durante 30 min. Después de la lisis, se realizó el ensayo de BCA para determinar la concentración de proteína total utilizando un kit de ensayo de proteína de BCA según las instrucciones del fabricante con los siguientes cambios:

- Se agregaron 200 µl de reactivo de trabajo a 5 µl de lisado celular

5 • Las muestras y el estándar se midieron por triplicado

- Antes de la incubación de las muestras a 37 °C durante 30 minutos, la placa se agitó durante 30 segundos a 450 rpm.

d. Preparación de la muestra

10 Las muestras se mezclan con 5 µl de tampón de muestra de LDS Bolt® y 2 µl de agente reductor de muestras Bolt® y luego se calientan durante 10 min a 70 °C antes de realizar SDS-PAGE. Se utilizaron 30 µg de proteína total para SDS-PAGE y gel para SDS-PAGE 4-12%, Bolt^{MR}, se emplearon 10 pocillos.

e. SDS-PAGE y procedimiento de transferencia

Se utilizó un sistema de transferencia Turbo^{MR} Trans-Blot®. Se realizó SDS-PAGE aplicando 200 V durante 40 min. La transferencia se realizó utilizando el sistema de transferencia Turbo^{MR} TransBlot® durante 30 minutos.

15 f. Anticuerpo y procedimiento de bloqueo

20 Después de la transferencia, las membranas se bloquearon a TA durante 1 h. Se utilizó gelatina NET como reactivo de bloqueo. Se utilizó el anticuerpo HPA035364 de Atlas Antibodies para la detección de CCDC39 y el anticuerpo ab8227 de Abcam para la detección de actina. Las membranas se cortaron a aproximadamente 60 kDa antes de que se añadieran los anticuerpos. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios. Después de tres lavados (10 min cada vez) con solución de bloqueo a TA, se añadió anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante a TA durante 1 h (diluido 1:20.000). Las membranas se lavaron de nuevo tres veces con solución de bloqueo 10 min cada vez a TA.

g. Desarrollo de señal quimioluminiscente

25 Las señales se visualizaron con un kit de sustrato quimioluminiscente (sustrato Luminata Crescendo, Classico o Forte Western HRP, según la intensidad de la señal) y el sistema MP ChemiDoc^{MR}.

2. Inmunotransferencia de tipo Western de CCDC39 endógena en cultivo de ALI diferenciado

a. Lisis celular

30 Se añadieron 250 µl de tampón de lisis de ALI (para obtener detalles de la composición, véase la tabla 17) por inserto y se incubaron en hielo durante 15 min. Antes, durante (cada 5 min) y al final de la incubación, se pipeteó el tampón de lisis de ALI hacia adelante y hacia atrás. Después de la transferencia a tubos Eppendorf y el enjuague de cada inserto con 150 µl de tampón de lisis de ALI, las muestras se agitaron en vórtice completamente. En esta etapa, las muestras se pueden almacenar opcionalmente a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

Tabla 17

Sustancia	Patrón	Final	Para 10 ml
TritonX-100	10%	1%	1 ml
NaCl	1,5 M	150 mM	1 ml
SDS	1%	0,1%	1 ml
Tris	250 mM	50 mM	2 ml
Inhibidor de protease cOmplete	25 x	1x	0,4 ml
WFI			4,5 ml

b. Separación de lisado axonemal del lisado de células enteras

35 Las muestras se agregaron a tubos de matriz de lisis A (los tubos se lavaron antes con EtOH al 70% y se eliminó el granate). Los tubos se sujetaron y congelaron en nitrógeno líquido durante 20 segundos mientras se movía el tubo. Los tubos se insertaron rápidamente en MP FastPrep-24 (HOM-1), ajustes: 6,5 m/s, 1 min. 3x. Posteriormente, los tubos se dejaron condensar en hielo durante 15 minutos antes de transferir el líquido a tubos Eppendorf nuevos y centrifugar a 1.100 rpm, 4 °C, durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf nuevos y el sedimento y el sobrenadante se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

c. Preparación de lisado de extracto axonemal: extracción con alto contenido de sal de proteína axonemal ciliar

Cada sedimento se resuspendió en 50 µl de MMRB + Triton X-100 al 0,1% (para obtener detalles de la composición

de MMRB + TritonX-100 al 0,1%, véase la tabla 18) y se incubó en hielo durante 30 minutos (con agitación tipo vórtice suave ocasional). Después de centrifugar a 14.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf nuevos y se almacenó a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

Tabla 18

Sustancia	Patrón	Final	Volumen para 1 ml
HMEN (véase la tabla 19)	1x	-	982 µl
DTT (por ejemplo, Sigma 646563)	1 M	2 mM	2 µl
β-Mercaptoetanol (por ejemplo, Sigma M3148)	100%	70 mM	5 µl
TritonX-100	10%	0,1%	10 µl
Inhibidor de proteasa cOmplete (Roche/Sigma 11873580001)	25x	1x	40 µl

5 Tabla 19

Sustancia	Final
HEPES, pH 7,4	30 mM
MgSO ₄	5 mM
EDTA	0,1 mM
NaCl	625 mM

d. Preparación de lisados para inmunotransferencia de tipo Western

Las muestras se descongelaron en hielo y se transfirieron 30 µl de muestra a tubos Eppendorf nuevos. Se añadieron 12 µl de tampón de muestra LDS y 5 µl de agente reductor 10x antes de calentar las muestras a 70 °C, 350 rpm durante 10 minutos. Se aplicaron 5, 10 y 30 µl por pocillo a un gel SDS-PAGE 4-12%, Bolt^{MR} 10 pocillos.

10 e. SDS PAGE y procedimiento de transferencia: véase IV 1 e

f. Anticuerpo y procedimiento de bloqueo: véase IV 1 f

g. Desarrollo de señales quimioluminiscentes: véase IV 1 g

II. Resultados

15 La expresión de CCDC40 se determinó en células HEK293 después de 6 h, 24 h, 48 h, 72 h y 144 h después de la transfección. En particular, se sembraron 2/1,4/0,3/0,2/0,05 x 10⁶ células en placas de 6 pocillos y las células se transfectaron 24 h después de la siembra con diferentes constructos de CCDC40 (2,5 µg/9,5 cm²) utilizando Lipofectamine® 2000. Los constructos de ARNm de CCDC40 utilizadas en este experimento fueron T06 a T10 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8). La lisis celular se realizó 6, 24, 48, 72 y 144 h después de la transfección y se analizaron 50 µg de lisado de proteína total con SDS-PAGE y inmunotransferencia de tipo Western.

20 Como puede verse en la figura 1, se detectó un pico de eficiencia de traducción 6 h después de la transfección de los ARNm de CCDC40 en células HEK.

25 El siguiente experimento se realizó como se describió anteriormente, excepto que, en este caso, se sembraron 2 x 10⁶ células HEK293, 7,5 x 10⁵ células BEAS-2B y 5 x 10⁵ células RPMI 2650 en placas de 6 pocillos y los lisados de proteínas se analizaron con SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western (HEK293: 50 µg, RPMI 2650: 20 µg, BEAS-2B: 30 µg de lisado total). Se detectó CCDC40 usando anticuerpo anti-CCDC40 (HPA022974) de Atlas Antibodies (1: 2.000).

Aquí, se pudo observar que las UTR de T09 (CYBA; SEQ ID NO: 1) y T10 (IE9 de CMV humano y UTR 3' de la hormona de crecimiento humano, SEQ ID NO: 8) condujeron a la mayor eficiencia de traducción 6 h después de la transfección en células BEAS-2B, RPMI 2650 y HEK293 (figura 2).

30 A continuación, se realizaron dos experimentos para investigar la restauración de la motilidad de los cilios en cultivos de ALI derivados de pacientes. En particular, en el primer experimento se utilizó un cultivo de ALI no diferenciado (datos no mostrados) (las células ciliares tenían una eliminación del exón 1 y 2 resultando en cilios muy cortos y menos móviles), mientras que se utilizó en el segundo experimento un cultivo de ALI diferenciado. En ambos casos, el cultivo de ALI se transfectó con 3 µg de LF92/CCDC40 (ETH031T09; SEQ ID NO: 1) cada dos días durante 1 mes para un total de 16 transfecciones. Como lectura se realizó una microscopía de video de alta velocidad (HSVM) cada 24 h y una inmunocitoquímica de inmunofluorescencia (IF-ICC). Antes de la transfección y cada 24 h después de la

transfección, se tomaron videos (20 por inserto) y se calculó la CFB (frecuencia de latido ciliar) utilizando el software SAVA. Se realizaron 16 transfecciones (1 mes). La medición se realizó a 37 °C usando el aumento de 40x. Se calculan los valores medios de la frecuencia de latido de los cilios (CBF).

5 La transfección repetida de LF92/CCDC40 fue bien tolerada en cultivos de ALI totalmente diferenciados derivados de pacientes. La proteína CCDC40 podría detectarse en la región subcelular de origen natural, es decir, los cilios de las células epiteliales de las vías respiratorias después de 22 días mediante IF-ICC y la motilidad de los cilios aumentó después de la transfección de LF92/CCDC40 hasta el día 18 a ~ 50% de la frecuencia normal de latido de los cilios, como puede observarse en la figura 3 para el experimento con el cultivo de ALI diferenciado.

10 Como se describe en la sección de Material y procedimientos, se obtuvo un cultivo de ALI no diferenciado usando Medio G y las transfecciones (TF) comenzaron 18 días después del levantamiento por aire. Se realizaron transfecciones (TF) del cultivo de ALI del paciente con CCDC40 con ARNm de CCDC40/LF92 una vez a la semana durante 4 semanas (= TF 4x). La eliminación mucociliar (MCC) se midió utilizando perlas fluorescentes de 0,5 µm con un aumento de 20x. Se toman y analizan videos de 30 s de diferentes áreas con el software Polargraph de Nikon una semana después del último TF.

15 Es importante destacar que se pudo detectar la restauración de los cilios latiendo en ALI del paciente con CCDC40 después de cuatro transfecciones semanales de ARNm de CCDC40/LF92. Además, el latido de los cilios fue sincronizado, lo que permitió un transporte de partículas dirigido como se puede observar en la figura 4. A modo de comparación, el transporte de partículas se muestra en la figura 5 en el caso de un control, es decir, una transfección cuádruple de ARNm tdTomato/LF111, y un control sano.

20 Por lo tanto, TF exitoso de ARNm/LF92 de CCDC40 del cultivo de ALI del paciente con LF92, como lo indica una comparación con el control tdTomato, durante la fase de diferenciación de las células ciliares dio como resultado un crecimiento exitoso de los cilios, un latido exitoso de los cilios, un transporte exitoso de partículas dirigido y una detección exitosa de proteína (CCDC39 como compañero de unión de CCDC40 + GAS8/DNALI1 como parte del complejo DRC). Además, los insertos de control de tdTomato no mostraron ninguno de los efectos mencionados anteriormente.

25 La figura 6 demuestra la incorporación exitosa de la proteína GAS8 dentro de los axonemas después del tratamiento repetido de ALI del paciente con ARNm de CCDC40 como en controles sanos que está ausente en las ALI del paciente tratado con control (ARNm de tdTomato). La figura 7 demuestra la incorporación exitosa de la proteína DNALI-1 dentro de los axonemas después del tratamiento repetido con ALI del paciente con ARNm de CCDC40 como en los controles sanos que está ausente en las ALI de pacientes tratados con control (ARNm de tdTomato). La figura 8 demuestra la incorporación exitosa de la proteína CCDC39 dentro de los axonemas después del tratamiento repetido de ALI del paciente con ARNm de CCDC40 como en controles sanos que está ausente en las ALI de pacientes tratados con control (ARNm de tdTomato).

30 En resumen, la motilidad de los cilios no se pudo restaurar a un nivel significativo cuando se utilizó el cultivo de ALI diferenciado, pero se restauró parcialmente cuando se utilizó el cultivo de ALI diferenciado.

35 Con respecto a los experimentos con CCDC39, las proteínas CCDC39 podrían detectarse mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western 6 h y 24 h después de la transfección en células HEK-293 y BEAS-2B como se puede observar en la figura 9. Como se muestra en la figura 11, la expresión de CCDC39 (ETH047T03; SEQ ID NO: 13) se pudo detectar después de 6 h en 16HBE14o- usando el inhibidor del proteasoma. También se realizó el mismo experimento para ETH047T02 (SEQ ID NO: 12), ETH047T04 (SEQ ID NO: 2) y ETH047T05 (SEQ ID NO: 14) con resultados comparables. Como se muestra en la figura 12, la expresión de CCDC39 (ETH047T03; SEQ ID NO: 13) también se pudo detectar después de 24 h en 16HBE14o- usando el inhibidor del proteasoma.

40 A continuación se proporcionan ejemplos de secuencias descritas en la solicitud. La divulgación proporciona, en algunas realizaciones, polirribonucleótidos que comprenden, por ejemplo, las secuencias de UTR establecidas en la SEQ ID NO: 1 o 2, o una secuencia al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a tales secuencias, o una secuencia de polirribonucleótidos, tal como un ARNm, correspondiente o codificada por cualquiera de los anteriores. En determinadas realizaciones de cualquiera de los anteriores, el polinucleótido o polirribonucleótido se modifica (por ejemplo, comprende análogos de nucleótidos, como se describe en el presente documento).

SEQ ID NO: 1

50 **Secuencia de CCDC40 con UTR 5' y 3' de CYBA (ETH031T09):**

Parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris, UTR 5' de CYBA, elemento de Kozak, codón de inicio (AUG), secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana, codón de parada (UGA), UTR 3' de CYBA, parte del sitio de restricción para BstBI, ^{poliA}: **cola de "A" producida mediante poliadenilación posterior de ARNm**

GGGAGA CCGCGCCUAGCAGUGUCCCAGCCGGGUUcGUGUcGcc **GCCACCAUGGCUGAAC**
 CUGGCGGAGCCGCGGAAGAUCCCACCCUGAAGAUGGCUCUGCCAGCGAGG
 GCGAGAAAGAGGGCAACAACGAGAGCCACAUGGUGUCCCCCCCAGAGAAGGA
 CGACGGCCAGAAAGGCGAAGAGGCCGUGGGCUCUACCGAGCACCCUGAGGA
 AGUGACCACACAGGCCGAGGCCGCCAUUGAAGAGGGCGAGGUGGAAACAGAG
 GGCGAAGCCGCUGUGGAAGGCGAAGAGGAAGCCGUGUCUUACGGCGACGCC
 GAGAGCGAGGAAGAGUACUACUACACCGAGACAAGCAGCCCCGAGGGCCAGA
 UCUCUGCCGCCGAUACCACCUACCCCUACUUCAGCCCCCCUCAGGAACUGCC
 UGGGGAAGAGGCCUACGAUAGCGUGUCCGGCGAAGCUGGCCUGCAGGGCUU
 UCAGCAGGAAGCCACAGGCCCUCCCGAGAGCCGGGAAAGAAGAGUGACAAGC
 CCCGAGCCUAGCCACGGCGUGCUGGGACCAUCUGAGCAGAUGGGCCAAGUG
 ACCUCUGGCCCUUGCUGUGGGCAGACUGACAGGCAGCACAGAGGAACCUAG
 GGCCAGGUGCUGCCUAUGGGAGUGCAGCACCGGUUCAGACUGAGCCACGGC
 AGCGACAUCGAGAGCAGCGACCUGGAAGAGUUCGUCAGCCAGGAACCCGUGA
 UCCCUCCUGGCGUGCCAGAUGCCCAUCCAGGGAAGGCGAUCUGCCCGUGU
 UCCAGGACCAGAUCCAGCAGCCCUCUACCGAAGAGGGGGCUAUGGCCGAGAG
 AGUGGAAAGCGAGGGCUCCGACGAAGAAGCCGAGGACGAGGGAUCUCAGCU
 GGUGGUGCUGGACCCCGACCACCCUCUGAUGGUGCGGUUUCAGGCCGCCCU
 GAAGAACUACCUGAACCGGCAGAUUCGAGAAGCUGAAACUGGACCUGCAGGAA
 CUGGUGGUGGCCACAAAGCAGAGCAGAGCCCAGAGACAGGAACUGGGCGUG
 AACCUGUACGAGGUGCAGCAGCAUCUGGUGCAUCUGCAGAAGCUGCUGGAAA
 AGAGCCACGACCGGCACGCCAUGGCCAGCUCUGAGCGCAGACAGAAAGAGGA
 AGAACUGCAGGCCGCCAGAGCCCUGUACACCAAGACAUGCGCCGCUGCCAAC

GAGGAACGGAAGAAGCUGGCUGCCCUGCAGACCGAGAUGGAAAACCUGGCUC
 UGCACCUUGUUCUACAUGCAGAAUAUCGACCAGGACAUGCGGGACGACAUCAG
 AGUGAUGACCCAGGUCGUGAAGAAGGCCGAGACAGAGAGAAUCCGGGCCGAG
 AUUGAGAAGAAAAAGCAGGACCUGUACGUGGACCAGCUGACCACCAGGGCCC
 AGCAGCUGGAAGAGGAUAUCGCCCUGUUCGAGGCCCAGUACCUGGCCCAGG
 CCGAAGAUACCCGGAUCCUGAGAAAGGCCGUGUCCGAGGCCUGCACCGAGAU
 CGAUGCCAUCAGCGUGGAAAAGCGGCGGAUCAUGCAGCAGUGGGCCAGCAG
 CCUCGUGGGCAUGAAGCACAGAGAUGAGGCCACCGGGCCGUGCUGGAAGC
 UCUGAGAGGCUGUCAGCACCAGGCCAAGAGCACCGACGGCGAGAUCGAGGC
 CUACAAGAAUCCAUCAUGAAGGAAGAGGAAAAGAACGAGAAACUGGCCAGCA
 UCCUGAACAGAACCGAAACCGAGGCCACCCUGCUGCAGAAACUGACCACCCA
 GUGCCUGACCAAACAGGUGGCCCUGCAGUCCAGUUAACACCUACAGACUG
 ACCCUGCAGGACACCGAGGACGCCCUGAGUCAGGAUCAGCUGGAACAGAUGA
 UUCUGACCGAGGAACUGCAGGCUAUCCGGCAGGCCAUUCAGGGGGAGCUGG
 AACUGCGGAGAAAGACCGACGCCGCCAUCAGAGAGAAGCUGCAGGAACACAU
 GACCAGCAACAAGACCACCAAGUACUUAACCAGCUGAUUCUGCGCCUGCAG
 AAAGAAAAGACCAACAUGAUGACACACCUGAGCAAGAUAACGGCGACAUUGC
 CCAGACCACCCUGGACAUCACCCACACCAGCAGCAGACUGGACGCCACCCAG
 AAAACCCUGGUGGAACUGGACCAGGAUGUGAAGAAAGUGAACGAGCUGAUCA
 CCAACAGCCAGAGCGAGAUCAGCCGGCGGACCAUCCUGAUCGAGAGAAAGCA
 GGGCCUGAUAACUUCUGAACAACAGCUGGAAAGAAUGGUGUCCGAGCUG
 GGCGGCGAGGAAGUGGGACCUCUGGAACUGGAAAUCAAGCGGCUGAGCAAG
 CUGAUCGACGAGCACGACGGCAAGGCCGUGCAGGCUCAAGUGACAUGGCUG
 CGGCUGCAGCAGGAAAUGGUCAAAGUGACCCAGGAACAGGAAGAACAGCUGG
 CCUCCCUGGACGCCAGCAAGAAAGAACUGCACAUAUGGAACAGAAAAAGCU
 GCGGGUGGAAAGCAAGAUCGAGCAGGAAAAAAAAGAACAGAAAGAAAUCGAGC
 ACCACAUGAAGGACCUGGACAACGACCUGAAGAAACUGAAUAUGCUGAUGAAC
 AAGAACCGCUGCUCCAGCGAAGAACUGGAACAGAACACAGAGUGACCGAGA
 ACGAGUUCGUGCGGAGCCUGAAGGCCAGCGAGCGGGAAACCAUCAAGAUGCA
 GGACAAGCUGAACCAGCUGUCCGAGGAAAAAGCCACACUGCUGAACCAGCUG
 GUGGAAGCCGAGCACCAGAUAUCGUGUGGGAGAAGAAGAUCCAGCUGGCCA
 AAGAAAUGCGGAGCAGCGUGGACAGCGAGAUCGGCCAGACCGAAAUAGAGC
 CAUGAAGGGCGAGAUAUCCACCGGAUGAAAGUGCGGCUGGGACAGCUGCUGAAA
 CAGCAGGAAAAGAUGAUCCGGGCCAUUGGAACUGGCCGUGGCCAGACGGGAAA
 CCGUGACAACCCAGGCUGAGGGCCAGCGGAAGAUGGACAGAAAGGCCCCUGAC
 CCGGACCGACUUCACCACAAGCAGCUGGAACUGAGGCGGAAGAUCGGGGAC
 GUGCGGAAGGCCACCGAUGAGUGCACAAGACAGUGCUGGAACUGGAAGAGA
 CACAGCGGAACGUGUCCUCCAGCCUGCUGGAAAAACAGGAAAAGCUGAGCGU
 GAUCCAGGCCGACUUCGACACCCUGGAAGCUGACCUGACAAGACUGGGAGCC
 CUGAAAAGACAGAACCUGUCCGAGAUCGUGGCACUGCAGACCCGGCUGAAAC
 AUCUGCAGGCUGUGAAAGAGGGACGCUACGUGUCCUGUUCAGAUCCAAGCA
 GUCUCUGGUGCUGGAAAGACAGCGGCUGGACAAGCGGCUGGCACUGAUUGC
 CACCAUCCUGGAUAGAGUGCGCGACGAGUACCCACAGUUCAGGAAGCACUG
 CACAAGGUGUCCCAGAUGAUCGCCAACAAGCUGGAAUCCCCUGGCCCCAGCU

GAccUcgccccGGAccUgcccUcccGCCAGGUGcACCCAccUGCAAUAAAUGcAGCGAAGCC

GGGAUUCCG-poli A

SEQ ID NO: 2

Secuencia de CCDC39 con las UTR de CYBA (ETH047T04):

- 5 Parte del promotor T7, **UTR 5' mínima de Ethris**, UTR 5' de CYBA, **elemento de Kozak**, codón de inicio (AUG), secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC39 humana, codón de parada (UGA), **UTR 3'** de CYBA, parte del sitio de restricción para BstBI, cola de poli(A)

GGGAGA**C**CGCGCCUAGCAGUGUCCCAGCCGGG**UU**cGUGUcGcc**GCCACCA**UGAGCAGCG
 AGUUUCUGGCCGAACUGCACUGGGAGGACGGCUUCGCUAUUCCCGUGGCCA
 ACGAGGAAAACAAGCUGCUGGAAGAUCAGCUGAGCAAGCUGAAGGACGAGAG
 AGCCUCUCUGCAGGACGAGCUGAGAGAGUACGAGGAACGGAUCAACAGCAUG
 ACCAGCCACUUCAAGAACGUGAAGCAAGAGCUGAGCAUACCCAGAGCCUGU
 GCAAGGCCAGAGAGAGAGAAACCGAGAGCGAGGAACACUUCAAGGCUAUCGC
 CCAGCGCGAGCUGGGAAGAGUGAAGGAUGAGAUCAGCGGCUGGAAAACGA
 GAUGGCCAGCAUCCUGGAAAAGAAGUCCGACAAAGAGAACGGCAUCUUCAAG
 GCCACACAGAAGCUGGACGGCCUGAAGUGCCAGAUGAACUGGGAUCAGCAGG
 CCCUGGAAGCCUGGCUGGAAGAGUCUGCCCACAAGGAUUCUGACGCCCUAGC
 ACUGCAGAAGUACGCCCAGCAGGACGACAACAAGAUCCGGGCUCUGACCCUG
 CAGCUGGAAAGACUGACCCUGGAAUGCAACCAGAAGCGGAAGAUCUGGACA
 ACGAGCUGACCCGAGACAAUCAGCGCCAGCUGGAACUGGAUAAGGCCGCUCA
 GGACUUCAGAAAGAUAUCCACAACGAGCGGCAAGAACUGAUCAAGCAGUGGGAG
 AACACCAUCGAGCAGAUGCAGAAACGCGACGGCGACAUCGACAACUGCGCCC
 UGGAACUCGCCCGGAUCAAGCAAGAGACACGCGAGAAAGAGAACCUGGUCAA
 AGAGAAGAUCAAGUUCUCGAGUCCGAGAUCCGCAACAACACCGAGUUCGAG
 AAGCGGAUCAGCGUGGCCGACAGAAAGCUGCUGAAGUGCAGAACCGCCUACC
 AGGACCACGAGACAAGCCGGAUUCAGCUCUAGGGCGAGCUGGAUUCUCUGAA
 GGCCACCGUGAACAGAACCAGCAGCGAUCUGGAAGCCCUGCGGAAGAACAUC
 AGCAAGAUCAAGAAGGACAUCCACGAGGAAACCGCCAGGCUGCAGAAAACAAA
 GAACCACAAUGAGAUAUCCAGACCAAGCUGAAAGAGAUAUCCGAAAAGACCA
 UGAGCGUGGAAGAGAAGGCCACAAACCUGGAAGAUUAUGCUCAAAGAGGAAGA
 GAAAGACGUCAAAGAGGUGGACGUUCAACUGAACCUGAUUAAGGGCGUGCUG
 UUCAAGAAGGCCCAAGAGCUGCAGACCGAAACCAUGAAGGAAAAGGCCGUCC
 UGUCUGAGAUCGAGGGCACCAGAUCUAGCCUGAAGCACCUGAACCAUCAGCU
 GCAGAAGCUCGACUUCGAGACACUGAAGCAGCAAGAGAUAUGUACAGCCAG
 GAUUUCCACAUCAGCAGGUCGAGCGGCGGAUGUCUAGACUGAAGGGCGAG
 AUCAACUCCGAGGAAAAACAGGCCCUAGGCGCAAGAUCGUGGAACUGAGAA
 AGAGCCUCGAAGAGAAGAAGUCUACCUGCGGCCUGCUGGAAACCCAGAUUAA
 GAAGCUGCACAACGACCUGUACUUCAUCAAGAAAGCCACAGCAAGAACAGCG
 ACGAGAAGCAGAGCCUGAUGACCAAGAUCAAUGAGCUGAACCUGUUCAUCGA

UCGGAGCGAAAAAGAGCUGGACAAGGCCAAGGGCUUCAAGCAGGACCUGAUG
AUCGAGGACAACCUUGCUGAAGCUGGAAGUGAAGCGGACCAGAGAGAUGCUGC
ACAGCAAGGCCGAGGAAGUGCUGUCUCUGGAAAAGCGGAAGCAGCAGCUGUA
CACCGCCAUGGAAGAGAGAACC GAAGAGAUCAAGGUGCACAAGACCAUGCUG
GCUUCCCAGAUCAGAUACGUGGACCAAGAGCGCGAGAACAUCUCCACCGAGU
UUAGAGAGAGACUGUCCAAGAUCGAGAAGCUGAAGAACCGCUACGAGAUCU
GACCGUCGUGAUGCUGCCUCCUGAGGGCGAAGAGGAAAAGACCCAGGCCUAC
UACGUGAUCAAGGCAGCCCAAGAAAAAGAGGAACUCCAGAGAGAAGGCGACU
GCCUGGACGCCAAGAUUAACAAGGCCGAAAAAGAAAUCUACGCCCUCCGAGAA
CACCCUGCAGGUCCUGAACAGCUGCAACAACAACUACAAGCAGAGCUUCAAGA
AAGUCACCCCUAGCUCCGACGAGUACGAGCUGAAGAUUCAGCUGGAAGAACA
GAAAAGAGCCGUGGACGAGAAGUACAGAUACAAGCAGCGGCAGAUCAAGAG
CUGCAAGAGGAUAUCCAGAGCAUGGAAAACACCCUGGACGUGAUCGAGCACC
UGGCCAACAAACGUGAAAGAGAAGCUGUCCGAGAAACAGGCCUACAGCUUUA
GCUGUCCAAAGAGACAGAGGAACAGAAGCCCAAACUGGAACGCGUGACCAAG
CAGUGCGCCAAGCUGACAAAAGAGAUCGCGCUGCUGAAAGACACCAAGGACG
AAACCAUGGAAGAACAAGACAUCAAGCUGCGCGAGAUGAAGCAGUUCCACAAA
GUGAUCGACGAGAUGCUGGUGGACAUCAUUGAAGAGAACACAGAGAUCCGCA
UCAUCCUGCAGACCUAUUUUCAGCAGAGCGGCCUGGAACUGCCUACCGCCUC
UACAAAGGGCAGCAGACAGAGCAGCAGAUCCCCUAGCCACACAAGCCUGAGC
GCCAGAAGCUCUAGAAGCACAGCACCUCUACCAGCCAGUCCAGCAUUAAGG
UGCUGGAACUCAAGUUCGCCGAGCUCUAGCCUCGUGGGAAGCCCUUCUAG
ACCUAGCAGCGCCUCUAGCAGCUCCAGCAACGUGAAGUCCAAGAAAAGCUCC
AAGUGAaccUgcCCCCGgAccUgcccUcccgccAggUgcACCCaccUgCAAUAAAUgcAGCG
AAGCCGGGAUUUG.AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 3

tdTomato:

5 Parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris, secuencia de la cadena principal del vector (pVAX Vektor: Life Technologies), elemento de Kozak, codón de inicio (AUG), secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína tdTomato, codón de parada (UAG), parte del sitio de restricción para NotI, parte de la secuencia principal del vector (pVAX Vektor: Life Technologies)

GGGAGACCAAGCUGGCUAGCGUUUAAACUUAAGCUUGGUACCGCGGGCCCGGGAUCCACCGGUCGCCACCAU
GGUGAGCAAGGGCGAGGAGGUCAUCAAGAGUUCAUGCGCUUCAAGGUGCG
CAUGGAGGGCUCCAUGAACGGCCACGAGUUCGAGAUCGAGGGCGAGGGCGA
GGGCCGCCCUACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCUGAAGGUGACCAAGGG
CGGCCCCUGCCCUUCGCCUGGGACAUCUCCUGUCCCCCAGUUAUGUACGG
CUCCAAGGCGUACGUGAAGCACCCCGCCGACAUCCCCGAUUACAAGAAGCUG
UCCUUCCCCGAGGGCUUCAAGUGGGAGCGCGUGAUGAACUUCGAGGACGGC
GGUCUGGUGACCGUGACCCAGGACUCCUCCUGCAGGACGGCACGCUGAUC

UACAAGGUGAAGAUGCGCGGCACCAACUCCCCCCCCGACGGCCCCGUAUUGC
 AGAAGAAGACCAUGGGCUGGGAGGCCUCCACCGAGCGCCUGUACCCCCGCG
 ACGGCGUGCUGAAGGGGCGAGAUCCACCAGGCCCUGAAGCUGAAGGACGGCG
 GCCACUACCUGGUGGAGUUAAGACCAUCUACAUGGCCAAGAAGCCCGUGCA
 ACUGCCCCGGCUACUACUACGUGGACACCAAGCUGGACAUCACCUCCCACAAC
 GAGGACUACACCAUCGUGGAACAGUACGAGCGCUCCGAGGGCCGCCACCACC
 UGUUCCUGGGGCAUGGCACCGGCAGCACCGGCAGCGGCAGCUCCGGCACC
 CCUCCUCCGAGGACAACAACUUGGCCGUAUCAAAGAGUUAUGCGCUUCAA
 GGUGCGCAUGGAGGGCUCCAUGAACGGCCACGAGUUCGAGAUCGAGGGCGA
 GGGCGAGGGCCGCCCCUACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCUGAAGGUGAC
 CAAGGGCGGCCCCUGCCCUUCGCCUGGGACAUCUCCUGUCCCCCAGUUCAU
 GUACGGCUCCAAGGCGUACGUGAAGCACCCCGCCGACAUCCCCGAUUACAAG
 AAGCUGUCCUCCCCGAGGGCUUCAAGUGGGAGCGCGUGAUGAACUUCGAG
 GACGGCGGUCUGGUGACCGUGACCCAGGACUCCUCCUGCAGGACGGCACG
 CUGAUCUACAAGGUGAAGAUGCGCGGCACCAACUCCCCCCCCGACGGCCCCG
 UAAUGCAGAAGAAGACCAUGGGCUGGGAGGCCUCCACCGAGCGCCUGUACCC
 CCGCGACGGCGUGCUGAAGGGCGGAGAUCCACCAGGCCUGAAGCUGAAGGA
 CGGCGGCCACUACCUGGUGGAGUUAAGACCAUCUACAUGGCCAAGAAGCCC
 GUGCAACUGCCCGGCUACUACUACGUGGACACCAAGCUGGACAUCACCUCCC
 ACAACGAGGACUACACCAUCGUGGAACAGUACGAGCGCUCCGAGGGCCGCCA
 CCACCUGUUCUGUACGGCAUGGACGAGCUGUACAAGUAG^{GCGGCCAAUUCUGCAGAA}
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGGCC

SEQ ID NO: 4

Secuencia de MCIDAS con UTR 5' mínima de Ethris y UTR 3' opcional:

- 5 Parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris, elemento de Kozak, codón de inicio (AUG), secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína MCIDAS humana, codón de parada (UGA), UTR 3' opcional (también funciona como sitio de unión del cebador inverso para la producción de moldes basados en PCR), sitio de restricción para NheI, ^{cola poli (A)}

GGGAGAGGCCACCAUGCAAGCUUGUGGGCGGCGGAGCUGCUGGAAGAAGGGCCU
 UCGAUAGCAUCUGCCCCAACCGGAUGCUUGCCCUUCCUGGUAGAGCCCUGCU
 GUGCAAGCCUGGCAAGCCCGAGAGAAAGUUCGCCCCUCCAAGAAAGUUCUUC
 CCCGGCUGUACUGGCGGCAGCCCUGUGUCUGUGUAUGAGGACCCUCCUGAU
 GCCGAGCCUACAGCUCUGCCUGCUCUGACCACAAUCGACCUGCAGGAUCUGG
 CCGAUUGCAGCUCUCUGCUGGGAUCUGAUGCUCUCCUCCUGGCGGAGAUCUGG
 CUGCCUCUCAGAAUCACAGCCACCAGACAGAGGCCGACUUCAACCUGCAAGA
 CUUCCGGGACACCGUGGACGACCUGAUCAGCGAUAGCAGCAGCAUGAUGAGC
 CCCACUCUGGCCAGCGGCGAUUUCUCCAUUCAGCCCCUGUGACAUCAGCCCUU
 UCGGCCCUGUGUCUGAGCCCUCCACUGGAUCCUAGAGCACUGCAGAGCCCACC
 UCUGAGGCCUCCAGAUGUUCUCCACCUGAGCAGUACUGGAAAGAGGUGGCC

GACCAGAACCAGAGAGCACUGGGCGACGCUCUGGUGGAAAACAACCAGCUGC
 ACGUGACCCUGACACAGAAGCAAGAAGAGAUCCGAGCCUGAAAGAACGGAA
 UGUGCAGCUGAAAGAGCUGGCCUCCAGGACAAGACACCUGGCCAGUGUGCU
 GGACAAGCUGAUGAUCACCCAGAGCAGAGAUUGCGGAGCCGCCGCUGAACCU
 UUUCUGCUGAAGGCCAAGGCCAAGAGAAGCCUGGAAGAACUGGUGUCUGCCG
 CCGGACAGGAUUGCGCUGAAGUGGAUGCCAUCCUGCGCGAGAUACAGCGAGA
 GAUGUGAUGAGGCCUGCAGAGCAGGGACCCCAAAGACCUAGACUGCUGCC
 CGAGCCUGCCAACACCGAUACCAGACCUGGAAAUCUGCACGGCGCCUUCAGA
 GGCCUGAGAACC GAUUGCUCUAGAAGCGCCUGAACCUAGGCCACAGCGAAC
 UCGAAGAAGGCGGCAGCUUCAGCACCCGGAUCAGAAGCCACAGCACCAUCAG
 AACCUGGCCUUUCCACAGGGCAACGCCUUCACAAUCAGAACCGCCAACGGC
 GGCUACAAGUUCAGAUGGGUGCCAAGCUGAGCUAGC**CACCGGGCAAUACGA**
GCUCAAGCCAGUCUCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 5

Secuencia con UTR 5' mínima de Ethris (ETH031T06):

5 Parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris, elemento de Kozak, codón de inicio (AUG), secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana, codón de parada (UGA), parte del sitio de restricción para BstBI, ^{poliA}: cola de "A" producida mediante poliadenilación posterior de ARNm

GGGAGA**CGCCACCAU**GGCUGAACCUGGCGGAGCCGCCGGAAGAUAUCCACCCUG
 AAGAUGGCUCUGCCAGCGAGGGCGAGAAAGAGGGCAACAACGAGAGCCACAU
 GGUGUCCCCCCCAGAGAAGGACGACGGCCAGAAAGGCGAAGAGGCCGUGGG
 CUCUACCGAGCACCCUGAGGAAGUGACCACACAGGCCGAGGCCGCCAUUGAA
 GAGGGCGAGGUGGAAACAGAGGGCGAAGCCGCUGUGGAAGGCGAAGAGGAA
 GCCGUGUCUUACGGCGACGCCGAGAGCGAGGAAGAGUACUACUACACCGAGA
 CAAGCAGCCCCGAGGGCCAGAUUCUGCCGCCGAUACCACCUACCCCUACUU
 CAGCCCCCUCAGGAACUGCCUGGGGAAGAGGCCUACGAUAGCGUGUCCGG
 CGAAGCUGGCCUGCAGGGCUUUCAGCAGGAAGCCACAGGCCCUCCCGAGAG
 CCGGGAAAGAAGAGUGACAAGCCCCGAGCCUAGCCACGGCGUGCUGGGACCA
 UCUGAGCAGAUGGGCCAAGUGACCUCUGGCCUGCUGUGGGCAGACUGACA
 GGCAGCACAGAGGAACCUAGGGCCAGGUGCUGCCUAUGGGAGUGCAGCAC
 CGGUUCAGACUGAGCCACGGCAGCGACAUCGAGAGCAGCGACCUGGAAGAGU
 UCGUCAGCCAGGAACCCGUGAUCCCUCCUGGCGUGCCAGAUGCCCAUCCAG
 GGAAGGCGAUCUGCCCGUGUUCAGGACCAGAUCCAGCAGCCCUACCGAA
 GAGGGGGCUAUGGCCGAGAGAGUGGAAAGCGAGGGCUCCGACGAAGAAGCC
 GAGGACGAGGGAUCUCAGCUGGUGGUGCUGGACCCCGACCACCCUCUGAUG
 GUGCGGUUUCAGGCCGCCUGAAGAACUACCUGAACCGGCAGAUCGAGAAGC
 UGAAACUGGACCUGCAGGAACUGGUGGUGGCCACAAAGCAGAGCAGAGCCCA
 GAGACAGGAACUGGGCGUGAACCUGUACGAGGUGCAGCAGCAUCUGGUGCA

UCUGCAGAAGCUGCUGGAAAAGAGCCACGACCGGCACGCCAUGGCCAGCUCU
 GAGCGCAGACAGAAAGAGGAAGAACUGCAGGCCGCCAGAGCCCUGUACACCA
 AGACAUGC GCCG CUGCCAACGAGGAACGGAAGAAGCUGGCUGCCCUGCAGAC
 CGAGAUGGAAAACCUGGCUCUGCACCUGUUCUACAUGCAGAAUAUCGACCAG
 GACAUGC GGGACGACAUCAGAGUGAUGACCCAGGUCGUGAAGAAGGCCGAGA
 CAGAGAGAAUCCGGGCCGAGAUUGAGAAGAAAAAGCAGGACCUGUACGUGGA
 CCAGCUGACCACCAGGGCCCAGCAGCUGGAAGAGGGAUAUCGCCCUGUUCGAG
 GCCCAGUACCUGGCCCAGGCCGAAGAUACCCGGAUCCUGAGAAAGGCCGUGU
 CCGAGGCCUGCACCAGAUUCGAUGCCAUCAGCGUGGAAAAGCGGCCGGAUCAU
 GCAGCAGUGGGCCAGCAGCCUCGUGGGCAUGAAGCACAGAGAUAGGGCCCA
 CCGGGCCGUGCUGGAAGCUCUGAGAGGCUGUCAGCACCAGGCCAAGAGCAC
 CGACGGCGAGAU CGAGGCCUACAAGAAUCCAUCAUGAAGGAAGAGGAAAAG
 AACGAGAAACUGGCCAGCAUCCUGAACAGAACCGAAACCGAGGCCACCCUGC
 UGCAGAAACUGACCACCCAGUGCCUGACCAAACAGGUGGCCCUGCAGUCCCA
 GUUCAACACCUACAGACUGACCUCGAGGACACCGAGGACGCCCUGAGUCAG
 GAUCAGCUGGAACAGAU GAUUCUGACCGAGGAACUGCAGGCUAUCCGGCAGG
 CCAUUCAGGGGGAGCUGGAACUGCGGAGAAAAGACCGACGCCGCCAU CAGAGA
 GAAGCUGCAGGAACACAUGACCAGCAACAAGACCACCAAGUACUUCAACCAGC
 UGAUUCUGCGCCUGCAGAAAGAAAAGACCAACAUGAUGACACACCUGAGCAA
 GAUCAACGGCGACA UUGCCCAGACCACCCUGGACAUCACCCACACCAGCAGC
 AGACUGGACGCCACCAGAAAACCCUGGUGGAACUGGACCAGGAUGUGAAGA
 AAGUGAACGAGCUGAU CACCAACAGCCAGAGCGAGAU CAGCCGGCGGACCAU
 CCUGAU CAGAGAGAAAGCAGGGCCUGAUCAACUUCUGAACAAACAGCUGGAA
 AGAAUGGUGUCCGAGCUGGGCGGCGAGGAAGUGGGACCUCUGGAACUGGAA
 AUCAAGCGGCUGAGCAAGCUGAU CGACGAGCACGACGGCAAGGCCGUGCAG
 GCUCAAGUGACA UGGCUGCGGCUGCAGCAGGAAAUGGUCAAAGUGACCCAGG
 AACAGGAAGAACAGCUGGCCUCCUGGACGCCAGCAAGAAAGAACUGCACA U
 CAUGGAACAGAAAAAGCUGCGGGUGGAAAGCAAGAU CAGCAGGAAAAAAA
 GAACAGAAAGAAU CGAGCACCACAUGAAGGACCUGGACAACGACCUGAAGAA
 ACUGAAUAUGCUGAUGAACAAGAACCGCUGCUCCAGCGAAGAACUGGAACAG
 AACAA CAGAGUGACCGAGAACGAGUUCGUGCGGAGCCUGAAGGCCAGCGAGC
 GGGAAACCAUCAAGAU CAGGACAAGCUGAAC CAGCUGUCCGAGGAAAAAGC
 CACACUGCUGAAC CAGCUGGUGGAAGCCGAGCACCAGAUCAUGCUGUGGGAG
 AAGAAGAUCCAGCUGGCCAAAGAAAUGCGGAGCAGCGUGGACAGCGAGAU CG
 GCCAGACCGAAAUCAGAGCCAUGAAGGGCGAGAUCCACCGGAUGAAAGUGCG
 GCUGGGACAGCUGCUGAAACAGCAGGAAAAGAU GAUCCGGGCCAUGGAACUG
 GCCGUGGCCAGACGGGAAACCGUGACAACCCAGGCUGAGGGGCCAGCGGAAG
 AUGGACAGAAAGGCCCUGACCCGGACCGACUUC CACCACAAGCAGCUGGAAC
 UGAGGCGGAAGAUCCGGGACGUGCGGAAGGCCACCGAUGAGUGCACAAAGA
 CAGUGCUGGAACUGGAAGAGACACAGCGGAACGUGUCCUCCAGCCUGCUGGA
 AAAACAGGAAAAGCUGAGCGUGAUCCAGGCCGACUUCGACACCCUGGAAGCU
 GACCUGACAAGACUGGGAGCCCUGAAAAGACAGAACCUUGUCCGAGAU CGUGG
 CACUGCAGACCCGGCUGAAACAUCUGCAGGCUGUGAAAGAGGGGACGCUACGU
 GUUCCUGUUCAGAUCCAAGCAGUCUCUGGUGCUGGAAAGACAGCGGCUGGA
 CAAGCGGCUGGCACUGAUUGCCACCAUCCUGGAUAGAGUGCGCGACGAGUAC

CCACAGUUCCAGGAAGCACUGCACAAGGUGUCCCAGAUGAUCGCCAACAAGC
 UGGAUCCCCUGGCCCCAGCUGAUUCCG^{-poli A}

SEQ ID NO: 6

Secuencia con UTR 5' de TISU (ETH031T07):

5 Parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris con nucleótido U adicional, elemento TISU, codón de inicio (AUG), secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana, codón de parada (UGA), parte del sitio de restricción para BstBI, poliA: cola de "A" producida mediante poliadenilación posterior de ARNm

GGGAGA**CUGCCAAGA**UUGGCUGAACCUUGGCGGAGCCGCCGGAAGAUGCCACCCU
 GAAGAUGGCUCUGCCAGCGAGGGCGAGAAAGAGGGCAACAACGAGAGCCACA
 UGGUGUCCCCCCCAGAGAAGGACGACGGCCAGAAAGGCCGAAGAGGCCGUGG
 GCUCUACCGAGCACCCUGAGGAAGUGACCACACAGGCCGAGGCCGCCAUUGA
 AGAGGGCGAGGUGGAAACAGAGGGCGAAGCCGCUGUGGAAGGCCGAAGAGGA
 AGCCGUGUCUUACGGCGACGCCGAGAGCGAGGAAGAGUACUACUACACCGAG
 ACAAGCAGCCCCGAGGGCCAGAUUCUCUGCCGCCGAUACCACCUACCCCUACU
 UCAGCCCCCCCUCAGGAACUGCCUGGGGAAGAGGCCUACGAUAGCGUGUCCG
 GCGAAGCUGGCCUGCAGGGCUUUCAGCAGGAAGCCACAGGCCCUCCCGAGA
 GCCGGGAAAGAAGAGUGACAAGCCCCGAGCCUAGCCACGGCGUGCUGGGAC
 CAUCUGAGCAGAUGGGCCAAGUGACCUCUGGCCCUUGCUGUGGGCAGACUGA
 CAGGCAGCACAGAGGAACCUAGGGCCAGGUGCUGCCUAUGGGAGUGCAGC
 ACCGGUUCAGACUGAGCCACGGCAGCGACAUCGAGAGCAGCGACCUGGAAGA
 GUUCGUCAGCCAGGAACCCGUGAUCCCUCCUGGCGUGCCAGAUGCCCAUCC
 CAGGGAAGGCGAUCUGCCCGUGUUCAGGACCAGAUCAGCAGCCCUUACC
 GAAGAGGGGGCUAUGGCCGAGAGAGUGGAAAGCGAGGGCUCCGACGAAGAA
 GCCGAGGACGAGGGAUCUCAGCUGGUGGUGCUGGACCCCGACCACCCUCUG
 AUGGUGCGGUUUCAGGCCGCCUGAAGAACUACCUGAACCGGCAGAUCCGAGA
 AGCUGAAACUGGACCUGCAGGAACUGGUGGUGGCCACAAAGCAGAGCAGAGC
 CCAGAGACAGGAACUGGGCGUGAACCUUGUACGAGGUGCAGCAGCAUCUGGU
 GCAUCUGCAGAAGCUGCUGGAAAAGAGCCACGACCGGCACGCCAUGGCCAGC
 UCUGAGCGCAGACAGAAAGAGGAAGAACUGCAGGCCGCCAGAGCCCUGUACA
 CCAAGACAUGCGCCGUGCCAACGAGGAACGGAAGAAGCUGGCUGCCCUGCA
 GACCGAGAUGGAAAACCUGGCUCUGCACCUGUUCUACAUGCAGAAUAUCGAC
 CAGGACAUGCGGGACGACAUCAGAGUGAUGACCCAGGUCGUGAAGAAGGCCG
 AGACAGAGAGAAUCCGGGCCGAGAUUGAGAAGAAAAAGCAGGACCUGUACGU
 GGACCAGCUGACCACCAGGGCCCAGCAGCUGGAAGAGGAUAUCGCCCUUGUUC
 GAGGCCCAGUACCUGGCCCAGGCCGAAGAUACCCGGAUCCUGAGAAAGGCCG
 UGUCCGAGGCCUGCACCGAGAUCGAUGCCAUCAGCGUGGAAAAGCGGCGGA
 UCAUGCAGCAGUGGGCCAGCAGCCUCUGGGCAUGAAGCACAGAGAUGAGG
 CCCACCGGGCCGUGCUGGAAGCUCUGAGAGGCUGUCAGCACCAGGCCAAGA
 GCACCGACGGCGAGAUCGAGGCCUACAAGAAUCCAUCAUGAAGGAAGAGGA

AAAGAACGAGAAACUGGCCAGCAUCCUGAACAGAACCGAAACCGAGGCCACCC
 UGCUGCAGAAACUGACCACCCAGUGCCUGACCAAACAGGUGGCCCCUGCAGUC
 CCAGUUCAACACCUACAGACUGACCCUGCAGGACACCGAGGACGCCCUGAGU
 CAGGAUCAGCUGGAACAGAUGAUUCUGACCGAGGAACUGCAGGCCUAUCCGGC
 AGGCCAUUCAGGGGGAGCUGGAACUGCGGAGAAAGACCGACGCCGCCAUCA
 GAGAGAAGCUGCAGGAACACAUGACCAGCAACAAGACCACCAAGUACUUAAC
 CAGCUGAUUCUGCGCCUGCAGAAAGAAAAGACCAACAUGAUGACACACCUGA
 GCAAGAUAACGGCGACAUUGCCCAGACCACCCUGGACAUCACCCACACCAG
 CAGCAGACUGGACGCCCACCAGAAAACCCUGGUGGAACUGGACCAGGAUGUG
 AAGAAAGUGAACGAGCUGAUCACCAACAGCCAGAGCGAGAUCAGCCGGCGGA
 CCAUCCUGAUCGAGAGAAAGCAGGGCCUGAUCAACUUCUGAACAACAGCU
 GGAAAGAAUGGUGUCCGAGCUGGGCGGCGAGGAAGUGGGACCUCUGGAACU
 GGAAAUCAAGCGGCUGAGCAAGCUGAUCGACGAGCACGACGGCAAGGCCGUG
 CAGGCUCAAGUGACAUGGCUGCGGCUGCAGCAGGAAAUGGUCAAAGUGACCC
 AGGAACAGGAAGAACAGCUGGCCUCCUGGACGCCAGCAAGAAAGAACUGCA
 CAUCAUGGAACAGAAAAAGCUGCGGGUGGAAAGCAAGAUCGAGCAGGAAAAA
 AAAGAACAGAAAGAAAUCGAGCACCAUAUGAAGGACCUGGACAACGACCUGAA
 GAAACUGAAUAUGCUGAUGAACAAGAACCGCUGCUCCAGCGAAGAACUGGAA
 CAGAACAACAGAGUGACCGAGAACGAGUUCGUGCGGAGCCUGAAGGCCAGCG
 AGCGGGAAACCAUCAAGAUGCAGGACAAGCUGAACCCAGCUGUCCGAGGAAAA
 AGCCACACUGCUGAACCCAGCUGGUGGAAGCCGAGCACCAUAUGCUGUGG
 GAGAAGAAGAUCCAGCUGGCCAAAGAAAUGCGGAGCAGCGUGGACAGCGAGA
 UCGGCCAGACCGAAAUCAGAGCCAUGAAGGGCGAGAUCACCGGAUGAAAGU
 GCGGCUGGGACAGCUGCUGAAACAGCAGGAAAAGAUGAUCGGGGCCAUGGAA
 CUGGCCGUGGCCAGACGGGAAACCGUGACAACCCAGGCUGAGGGCCAGCGG
 AAGAUGGACAGAAAGGCCUUGACCCGGACCGACUUCACCACAAGCAGCUGG
 AACUGAGGCGGAAGAUCGGGACGUGCGGAAGGCCACCGAUGAGUGCACAAA
 GACAGUGCUGGAACUGGAAGAGACACAGCGGAACGUGUCCUCCAGCCUGCUG
 GAAAAACAGGAAAAGCUGAGCGUGAUCAGGCCGACUUCGACACCCUGGAAG
 CUGACCUGACAAGACUGGGAGCCCUGAAAAGACAGAACCUGUCCGAGAUCGU
 GGCACUGCAGACCCGGCUGAAACAUCUGCAGGCUGUGAAAGAGGGACGCUAC
 GUGUCCUGUUCAGAUCCAAGCAGUCUCUGGUGCUGGAAAGACAGCGGCUG
 GACAAGCGGCUGGCACUGAUUGCCACCAUCCUGGAUAGAGUGCGCGACGAG
 UACCCACAGUUCAGGAAGCACUGCACAAGGUGUCCCAGAUGAUCGCCAACA
 AGCUGGAAUCCCCUGGCCCCAGCUGAUUCCG^{poli A}

SEQ ID NO: 7

Secuencia con UTR 5' de hAg pero sin UTR 3' (ETH031T08):

- 5 Parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris, UTR 5' de hAg, elemento de Kozak, codón de inicio (AUG), secuencia optimizada de codón que codifica una versión funcional de una proteína CDC40 humana, codón de parada (UGA), parte del sitio de restricción para BstBI, ^{poliA}: cola de "A" producida mediante poliadenilación posterior de ARNm

GGGAGA CUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAAACGCCACCAUGGCUGAACC
 UGGCGGAGCCGCCGGAAGAUAUCCACCCUGAAGAUGGCUCUGCCAGCGAGGG
 CGAGAAAGAGGGCAACAACGAGAGCCACAUGGUGUCCCCCCCAGAGAAGGAC
 GACGGCCAGAAAGGCGAAGAGGGCCGUGGGCUCUACCGAGCACCCUGAGGAA
 GUGACCACACAGGCCGAGGCCGCCAUUGAAGAGGGCGAGGUGGAAACAGAG
 GGCGAAGCCGCGUGUGGAAGGCGAAGAGGAAGCCGUGUCUUACGGCGACGCC
 GAGAGCGAGGAAGAGUACUACUACACCGAGACAAGCAGCCCCGAGGGCCAGA
 UCUCUGCCGCCGAUACCACCUACCCUACUUCAGCCCCCUACAGGAACUGCC
 UGGGGAAGAGGCCUACGAUAGCGUGUCCGGCGAAGCUGGCCUGCAGGGCUU
 UCAGCAGGAAGCCACAGGCCCUCCCGAGAGCCGGGAAAGAAGAGUGACAAGC
 CCCGAGCCUAGCCACGGCGUGCUGGGACCAUCUGAGCAGAUGGGCCAAGUG
 ACCUCUGGCCCUUGCUGUGGGCAGACUGACAGGCAGCACAGAGGAACCUCAG
 GGCCAGGUGCUGCCUAUGGGAGUGCAGCACCGGUUCAGACUGAGCCACGGC
 AGCGACAUCGAGAGCAGCGACCUGGAAGAGUUCGUCAGCCAGGAACCCGUGA
 UCCCUCCUGGCGUGCCAGAUGCCCAUCCAGGGAAGGCGAUCUGCCCGUGU
 UCCAGGACCAGAUCCAGCAGCCUUCUACCGAAGAGGGGGCUAUGGCCGAGAG
 AGUGGAAAGCGAGGGCUCCGACGAAGAAGCCGAGGACGAGGGAUCUCAGCU
 GGUGGUGCUGGACCCCGACCACCCUCUGAUGGUGCGGUUUCAGGCCGCCCU
 GAAGAACUACCUGAACCGGCAGAUUCGAGAAGCUGAAACUGGACCUGCAGGAA
 CUGGUGGUGGCCACAAAGCAGAGCAGAGCCCAGAGACAGGAACUGGGCGUG
 AACCUGUACGAGGUGCAGCAGCAUCUGGUGCAUCUGCAGAAGCUGCUGGAAA
 AGAGCCACGACCGGCACGCCAUGGCCAGCUCUGAGCGCAGACAGAAAGAGGA
 AGAACUGCAGGCCGCCAGAGCCCUGUACACCAAGACAUGCGCCGCGUGCCAAC
 GAGGAACGGAAGAAGCUGGCUGCCCUGCAGACCGAGAUGGAAAACCUGGCUC
 UGCACCUGUUCUACAUGCAGAAUAUCGACCAGGACAUCGCGGGACGACAUCAG
 AGUGAUGACCCAGGUCGUGAAGAAGGCCGAGACAGAGAGAAUCCGGGCCGAG
 AUUGAGAAGAAAAAGCAGGACCUGUACGUGGACCAGCUGACCACCAGGGCCC
 AGCAGCUGGAAGAGGAUAUCGCCUGUUCGAGGCCCAGUACCUGGCCCAGG
 CCGAAGAUACCCGGAUCCUGAGAAAGGCCGUGUCCGAGGCCUGCACCGAGAU
 CGAUGCCAUCAGCGUGGAAAAGCGGCGGAUCAUGCAGCAGUGGGCCAGCAG
 CCUCGUGGGCAUGAAGCACAGAGAUGAGGCCACCGGGCCGUGCUGGAAGC
 UCUGAGAGGCUGUCAGCACCGGCCAAGAGCACCGACGGCGAGAUCGAGGC
 CUACAAGAAAUCCAUAUGAAGGAAGAGGAAAAGAACGAGAAACUGGCCAGCA
 UCCUGAACAGAAACCGAAACCGAGGCCACCCUGCUGCAGAAACUGACCACCCA
 GUGCCUGACCAAACAGGUGGCCCUUGCAGUCCAGUUAACACCUACAGACUG
 ACCCUGCAGGACACCGAGGACGCCUGAGUCAGGAUCAGCUGGAACAGAUGA
 UUCUGACCGAGGAACUGCAGGCUAUCCGGCAGGCCAUUCAGGGGGAGCUGG
 AACUGCGGAGAAAGACCGACGCCGCCAUCAGAGAGAAGCUGCAGGAACACAU
 GACCAGCAACAAGACCACCAAGUACUUAACCAGCUGAUUCUGCGCCUGCAG
 AAAGAAAAGACCAACAUGAUGACACACCUGAGCAAGAUCAACGGCGACAUUGC
 CCAGACCACCCUGGACAUCACCCACACCAGCAGCAGACUGGACGCCACCCAG
 AAAACCCUGGUGGAACUGGACCAGGAUGUGAAGAAAGUGAACGAGCUGAUCA
 CCAACAGCCAGAGCGAGAUCAGCCGGCGGACCAUCCUGAUCGAGAGAAAGCA
 GGGCCUGAUAACUCCUGAACAAACAGCUGGAAAGAAUGGUGUCCGAGCUG
 GGCGGCGAGGAAGUGGGACCUCUGGAACUGGAAAUCAAGCGGCUGAGCAAG

CUGAUCGACGAGCACGACGGCAAGGCCGUGCAGGCUCAAGUGACAUGGCUG
 CGGCUGCAGCAGGAAAUGGUCAAAGUGACCCAGGAACAGGAAGAACAGCUGG
 CCUCCCUGGACGCCAGCAAGAAAGAACUGCACAUCAUGGAACAGAAAAAGCU
 GCGGGUGGAAAGCAAGAUCGAGCAGGAAAAAAGAACAGAAAGAAAUCGAGC
 ACCACAUGAAGGACCUGGACAACGACCUGAAGAAACUGAAUAUGCUGAUGAAC
 AAGAACC GCUGCUCCAGCGAAGAACUGGAACAGAACACAGAGUGACCGAGA
 ACGAGUUCGUGCGGAGCCUGAAGGCCAGCGAGCGGGAAACCAUCAAGAUGCA
 GGACAAGCUGAACCAGCUGUCCGAGGAAAAAGCCACACUGCUGAACCAGCUG
 GUGGAAGCCGAGCACCAGAUCAUGCUGUGGGAGAAGAAGAUCCAGCUGGCCA
 AAGAAAUGCGGAGCAGCGUGGACAGCGAGAUCGGCCAGACCGAAAUCAGAGC
 CAUGAAGGGCGAGAUCACCAGGAUGAAAGUGCGGCUGGGACAGCUGCUGAAA
 CAGCAGGAAAAGAUGAUCCGGGCCAUGGAACUGGCCGUGGCCAGACGGGAAA
 CCGUGACAACCCAGGCUGAGGGCCAGCGGAAGAUGGACAGAAAGGCCCCUGAC
 CCGGACCGACUUCACCACAAGCAGCUGGAACUGAGGCGGAAGAUCGGGGAC
 GUGCGGAAGGCCACCGAUGAGUGCACAAGACAGUGCUGGAACUGGAAGAGA
 CACAGCGGAACGUGUCCUCCAGCCUGCUGGAAAAACAGGAAAAGCUGAGCGU
 GAUCCAGGCCGACUUCGACACCCUGGAAGCUGACCUGACAAGACUGGGAGCC
 CUGAAAAGACAGAACCUGUCCGAGAUCGUGGCACUGCAGACCCGGCUGAAC
 AUCUGCAGGCUGUGAAAGAGGGACGCUACGUGUUCUGUUCAGAUCCAAGCA
 GUCUCUGGUGCUGGAAAGACAGCGGCUGGACAAGCGGCUGGCACUGAUUGC
 CACCAUCCUGGAUAGAGUGCGCGACGAGUACCCACAGUUCAGGAAGCACUG
 CACAAGGUGUCCAGAUGAUCGCCAACAAGCUGGAUCCCCUGGCCCCAGCU
GAUUCG:^{poliA}

SEQ ID NO: 8

Secuencia con UTR 5' de IE9 de CMV humano y UTR 3' de hormona de crecimiento humano (ETH031T10):

5 Parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris, UTR 5' de IE9 de CMV humano, elemento de Kozak, codón de inicio (AUG), secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana, codón de parada (UGA), UTR 3' de hormona de crecimiento humano, parte del sitio de restricción para BstBI, ^{poliA}: cola de "A" producida mediante la poliadenilación posterior del ARNm

GGGAGA CCAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAG
ACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCG
GAUUCGCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGGGCCACCAUGGCUG
 AACCUGGCGGAGCCGCCGGAAGAUCACCCUGAAGAUGGCUCUGCCAGCGA
 GGGCGAGAAAGAGGGCAACAACGAGAGCCACAUGGUGUCCCCCAGAGAAG
 GACGACGGCCAGAAAGGCCAAGAGGCCGUGGGCUCUACCGAGCACCCUGAG
 GAAGUGACCACACAGGCCGAGGCCGCAUUGAAGAGGGCGAGGUGGAAACAG
 AGGGCGAAGCCGCUGUGGAAGGCCAAGAGGAAGCCGUGUCUUACGGCGACG
 CCGAGAGCGAGGAAGAGUACUACUACACCGAGACAAGCAGCCCCGAGGGCCA

GAUCUCUGCCGCCGAUACCACCUACCCCUACUUCAGCCCCCUACAGGAACUG
 CCUGGGGAAGAGGCCUACGAUAGCGUGUCCGGCGAAGCUGGCCUGCAGGGC
 UUUCAGCAGGAAGCCACAGGCCCUCCCGAGAGCCGGGAAAGAAGAGUGACAA
 GCCCCGAGCCUAGCCACGGCGUGCUGGGACCAUCUGAGCAGAUUGGGCCAAG
 UGACCUCUGGGCCUGCUGUGGGCAGACUGACAGGCAGCACAGAGGAACCUCA
 GGGCCAGGUGCUGCCUAUGGGAGUGCAGCACCGGUUCAGACUGAGCCACGG
 CAGCGACAUCGAGAGCAGCGACCUGGAAGAGUUCGUCAGCCAGGAACCCGUG
 AUCCCUCCUGGCGUGCCAGAUGCCCAUCCCAGGGAAGGCGAUCUGCCCGUG
 UUCAGGACCAGAUCAGCAGCCUCUACCGAAGAGGGGGCUAUGGCCGAGA
 GAGUGGAAAGCGAGGGCUCCGACGAAGAAGCCGAGGACGAGGGAUCUCAGC
 UGGUGGUGCUGGACCCCGACCACCCUCUGAUGGUGCGGUUUCAGGCCGCC
 UGAAGAACUACCUGAACCGGCAGAUUCGAGAAGCUGAAACUGGACCUGCAGGA
 ACUGGUGGUGGCCACAAAGCAGAGCAGAGCCAGAGACAGGAACUGGGCGU
 GAACCUGUACGAGGUGCAGCAGCAUCUGGUGCAUCUGCAGAAGCUGCUGGAA
 AAGAGCCACGACCGGCACGCCAUGGCCAGCUCUGAGCGCAGACAGAAAGAGG
 AAGAACUGCAGGCCGCCAGAGCCUGUACACCAAGACAUGCGCCGCUGCCAA
 CGAGGAACGGAAGAAGCUGGCUGCCUGCAGACCGAGAUGGAAAACUGGCU
 CUGCACCUGUUCUACAUGCAGAAUAUCGACCAGGACAUGCGGGACGACAUC
 GAGUGAUGACCCAGGUCGUGAAGAAGGCCGAGACAGAGAGAAUCCGGGCCGA
 GAUUGAGAAGAAAAAGCAGGACCUGUACGUGGACCAGCUGACCACCAGGGCC
 CAGCAGCUGGAAGAGGAUAUCGCCUGUUCGAGGCCCAGUACCUGGCCCAG
 GCCGAAGAUACCCGGAUCCUGAGAAAGGCCGUGUCCGAGGCCUGCACCGAGA
 UCGAUGCCAUCAGCGUGGAAAAGCGGCCGAUCAUGCAGCAGUGGGCCAGCA
 GCCUCGUGGGCAUGAAGCACAGAGAUAGAGGCCACCGGGCCGUGCUGGAAG
 CUCUGAGAGGCUGUCAGCACCGGCCAAGAGCACCGACGGCGAGAUCGAGG
 CCUACAAGAAAUCCAUCAUGAAGGAAGAGGAAAAGAACGAGAAACUGGCCAGC
 AUCCUGAACAGAACCGAAACCGAGGCCACCCUGCUGCAGAAACUGACCACCC
 AGUGCCUGACCAAACAGGUGGCCUGCAGUCCAGUUAACACCUACAGACU
 GACCCUGCAGGACACCGAGGACGCCUGAGUCAGGAUCAGCUGGAACAGAUG
 AUUCUGACCGAGGAACUGCAGGCUAUCCGGCAGGCCAUUCAGGGGGAGCUG
 GAACUGCGGAGAAAGACCGACGCCGCCAUCAGAGAGAAGCUGCAGGAACACA
 UGACCAGCAACAAGACCACCAAGUACUUAACCAGCUGAUUCUGCGCCUGCA
 GAAAGAAAAGACCAACAUGAUGACACACCUGAGCAAGAUAACGGCGACAUIUG
 CCCAGACCACCCUGGACAUCACCCACACCAGCAGCAGACUGGACGCCACCA
 GAAAACCCUGGUGGAACUGGACCAGGAUGUGAAGAAAGUGAACGAGCUGAUC
 ACCAACAGCCAGAGCGAGAUACGCCGGCGGACCAUCCUGAUCGAGAGAAAGC
 AGGGCCUGAUAACUUCUGAACAACAGCUGGAAAGAAUGGUGUCCGAGCU
 GGGCGGCAGGAAGUGGGACCUCUGGAACUGGAAAUCAAGCGGCUGAGCAA
 GCUGAUCGACGAGCACGACGGCAAGGCCGUGCAGGCUCAAGUGACAUGGCU
 GCGGCUGCAGCAGGAAAUGGUCAAAGUGACCCAGGAACAGGAAGAACAGCUG
 GCCUCCUGGACGCCAGCAAGAAAGAACUGCACAUAUGGAACAGAAAAAGC
 UGCGGGUGGAAAGCAAGAUAGCAGGAAAAAAGAACAGAAAGAAAUCGAG
 CACCACAUGAAGGACCUGGACAACGACCUGAAGAAACUGAAUAUGCUGAUGAA
 CAAGAACCGCUGCUCCAGCGAAGAACUGGAACAGAACACAGAGUGACCGAG
 AACGAGUUCGUGCGGAGCCUGAAGGCCAGCGAGCGGGAAACCAUCAAGAUGC

AGGACAAGCUGAACCAGCUGUCCGAGGAAAAAGCCACACUGCUGAACCAGCU
 GGUGGAAGCCGAGCACCAGAUCAUGCUGUGGGAGAAGAAGAUCCAGCUGGC
 CAAAGAAAUGCGGAGCAGCGUGGACAGCGAGAUCGGCCAGACCGAAAUCAGA
 GCCAUGAAGGGCGAGAUCACCAGGAUGAAAGUGCGGCUGGGACAGCUGCUG
 AAACAGCAGGAAAAGAUGAUCCGGGCCAUGGAACUGGCCGUGGCCAGACGGG
 AAACCGUGACAACCCAGGCUGAGGGGCCAGCGGAAGAUGGACAGAAAGGCCCU
 GACCCGGACCGACUCCACCACAAGCAGCUGGAACUGAGGCGGAAGAUCGG
 GACGUGCGGAAGGCCACCGAUGAGUGCACAAAGACAGUGCUGGAACUGGAAG
 AGACACAGCGGAACGUGUCCUCCAGCCUGCUGGAAAAACAGGAAAAGCUGAG
 CGUGAUCCAGGCCGACUUCGACACCCUGGAAGCUGACCUGACAAGACUGGGA
 GCCCUGAAAAGACAGAACCUGUCCGAGAUCGUGGCACUGCAGACCCGGCUGA
 AACAUCUGCAGGCUGUGAAAGAGGGACGCUACGUGUUCUGUUCAGAUCCAA
 GCAGUCUCUGGUGCUGGAAAGACAGCGGCUGGACAAGCGGCUGGCACUGAU
 UGCCACCAUCCUGGAUAGAGUGCGCGACGAGUACCCACAGUUCAGGAAGCA
 CUGCACAAGGUGUCCCAGAUGAUCGCCAACAAAGCUGGAAUCCCCUGGCCCA
 GCUGACGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUG
GAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGC
AUCUUCG-poliA

SEQ ID NO: 9

ETH031T28: etiqueta de EGFP en el terminal N-CCDC40

- 5 Parte del promotor T7, UTR 5' mínimo de Ethris, elemento de Kozak, codón de inicio (AUG), secuencia que codifica una proteína EGFP, espaciador G4S, secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana, codón de parada (UGA), parte del sitio de restricción para BstBI, cola de poli (A)

GGGAGACGCCACCAUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGCUGUUCACCGGGGUGGUGC
CCAUCCUGGUCGAGCUGGACGGCGACGUAAACGGCCACAAGUUCAGCGUGU
CCGGCGAGGGCGAGGGCGAUGCCACCUACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUA
UCUGCACCAACCGGCAAGCUGCCCGUGCCCGUGGCCACCCUCGUGACCACCCU
GACCUACGGCGUGCAGUGCUUCAGCCGCUACCCCGACCACAUGAAGCAGCAC
GACUUCUUAAGUCCGCCAUGCCCGAAGGCUACGUCCAGGAGCGCACCAUCU
UCUUAAGGACGACGGCAACUACAAGACCCGCGCCGAGGUGAAGUUCGAGGG
CGACACCCUGGUGAACCAGCAUCGAGCUGAAGGGCAUCGACUUAAGGAGGAC
GGCAACAUCCUGGGGCACAAGCUGGAGUACAACUACAACAGCCACAACGUCU
AUAUCAUGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAUCAAGGUGAACUUAAGAUCGG
CCACAACAUCGAGGACGGCAGCGUGCAGCUCGCCGACCACUACCAGCAGAAC
ACCCCCAUCGGCGACGGCCCCGUGCUGCUGCCCGACAACCACUACCUGAGCA
CCCAGUCCGCCUGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAUCACAUGGUCCU
GCUGGAGUUCGUGACCGCCGCCGGGAUCACUCUCGGCAUGGACGAGCUGUA
CAAG^{GGCGGAGGGGGCAGC}GCUGAACCUUGCGGAGCCGCCGGAAGAUCACCCUG
 AAGAUGGCUCUGCCAGCGAGGGCGAGAAAGAGGGCAACAACGAGAGCCACAU

GGUGUCCCCCCCAGAGAAGGACGACGGCCAGAAAGGCGAAGAGGCCGUGGG
 CUCUACCGAGCACCCUGAGGAAGUGACACACAGGCCGAGGCCGCCAUUGAA
 GAGGGCGAGGUGGAAACAGAGGGCGAAGCCGCUGUGGAAGGCGAAGAGGAA
 GCCGUGUCUUACGGCGACGCCGAGAGCGAGGAAGAGUACUACUACACCGAGA
 CAAGCAGCCCCGAGGGCCAGAUUCUGCCGCCGAUACCACCUACCCCUACUU
 CAGCCCCCCUCAGGAACUGCCUGGGGAAGAGGCCUACGAUAGCGUGUCCGG
 CGAAGCUGGCCUGCAGGGCUUUCAGCAGGAAGCCACAGGCCCUCCCGAGAG
 CCGGGAAAGAAGAGUGACAAGCCCCGAGCCUAGCCACGGCGUGCUGGGACCA
 UCUGAGCAGAUUGGGCCAAGUGACCUCUGGCCCUUGCUGUGGGGCAGACUGACA
 GGCAGCACAGAGGAACCUCAGGGCCAGGUGCUGCCUAUGGGAGUGCAGCAC
 CGGUUCAGACUGAGCCACGGCAGCGACAUCGAGAGCAGCGACCUGGAAGAGU
 UCGUCAGCCAGGAACCCGUGAUCCCUCCUGGCGUGCCAGAUGCCCAUCCAG
 GGAAGGCGAUCUGCCCGUGUUCAGGACCAGAUCCAGCAGCCCUCUACCGAA
 GAGGGGGCUAUGGCCGAGAGAGUGGAAAGCGAGGGCUCCGACGAAGAAGCC
 GAGGACGAGGGAUCUCAGCUGGUGGUGCUGGACCCCGACCACCCUCUGAUG
 GUGCGGUUUCAGGCCGCCUGAAGAACUACCUGAACCAGGCGAGAUUCGAGAAGC
 UGAAACUGGACCUGCAGGAACUGGUGGUGGCCACAAAGCAGAGCAGAGCCCA
 GAGACAGGAACUGGGCGUGAACCUGUACGAGGUGCAGCAGCAUCUGGUGCA
 UCUGCAGAAGCUGCUGGAAAAGAGCCACGACCGGCACGCCAUGGCCAGCUCU
 GAGCGCAGACAGAAAGAGGAAGAACUGCAGGCCGCCAGAGCCCUGUACACCA
 AGACAUGCGCCGCGUGCCAACGAGGAACGGAAGAAGCUGGCUGCCCUGCAGAC
 CGAGAUGGAAAACUGGCUCUGCACCUGUUCUACAUGCAGAAUAUCGACCAG
 GACAUGCGGGACGACAUCAGAGUGAUGACCCAGGUCGUGAAGAAGGCCGAGA
 CAGAGAGAAUCCGGGCCGAGAUUGAGAAGAAAAAGCAGGACCUGUACGUGGA
 CCAGCUGACCACCAGGGGCCAGCAGCUGGAAGAGGAUAUCGCCCUUGUUCGAG
 GCCCAGUACCUGGCCCAGGCCGAAGAUACCCGGAUCCUGAGAAAGGCCGUGU
 CCGAGGCCUGCACCAGAGAUUGCAUCAGCGUGGAAAAGCGGCGGAUCAU
 GCAGCAGUGGGCCAGCAGCCUCUGGGGCAUGAAGCACAGAGAUAGAGGCCCA
 CCGGGCCGUGCUGGAAGCUCUGAGAGGCUGUCAGCACCAGGCCAAGAGCAC
 CGACGGCGAGAUUCGAGGCCUACAAGAAAUCCAUCAUGAAGGAAGAGGAAAAG
 AACGAGAAACUGGCCAGCAUCCUGAACAGAACCAGAAACCGAGGCCACCCUGC
 UGCAGAAACUGACCACCCAGUGCCUGACCAAACAGGUGGCCCUGCAGUCCCA
 GUUCAACACCUACAGACUGACCCUGCAGGACACCCAGGACGCCCUAGUCAG
 GAUCAGCUGGAACAGAUGAUUCUGACCGAGGAACUGCAGGCUAUCCGGCAGG
 CCAUUCAGGGGGAGCUGGAACUGCGGAGAAAGACCGACGCCGCCAUCAGAGA
 GAAGCUGCAGGAACACAUGACCAGCAACAAGACCACCAAGUACUUAACCAGC
 UGAUUCUGCGCCUGCAGAAAGAAAAGACCAACAUGAUGACACACCUGAGCAA
 GAUCAACGGCGACAUIUGCCCAGACCACCCUGGACAUCACCCACACCAGCAGC
 AGACUGGACGCCACCAGAAAACCCUGGUGGAACUGGACCAGGAUGUGAAGA
 AAGUGAACGAGCUGAUCACCAACAGCCAGAGCGAGAUAGCCGGCGGACCAU
 CCUGAUCGAGAGAAAGCAGGGCCUGAUAACUUCUGAACAAACAGCUGGAA
 AGAAUGGUGUCCGAGCUGGGCGGCGAGGAAGUGGGACCUCUGGAACUGGAA
 AUCAAGCGGCUGAGCAAGCUGAUCGACGAGCACGACGGCAAGGCCGUGCAG
 GCUCAAGUGACAUGGCUGCGGCUGCAGCAGGAAAUGGUCAAAGUGACCCAGG
 AACAGGAAGAACAGCUGGCCUCCUGGACGCCAGCAAGAAAGAACUGCACAU

CAUGGAACAGAAAAAGCUGCGGGUGGAAAGCAAGAUCGAGCAGGAAAAAAA
 GAACAGAAAGAAAUCGAGCACCACAUGAAGGACCUGGACAACGACCUGAAGAA
 ACUGAAUAUGCUGAUGAACAAGAACCGCUGCUCCAGCGAAGAACUGGAACAG
 AACAAACAGAGUGACCGAGAACGAGUUCGUGCGGAGCCUGAAGGCCAGCGAGC
 GGGAAACCAUCAAGAUGCAGGACAAGCUGAACCAGCUGUCCGAGGAAAAAGC
 CACACUGCUGAACCAGCUGGUGGAAGCCGAGCACCAGAUAUCGUGUGGGAG
 AAGAAGAUCCAGCUGGCCAAAGAAAUGC GGAGCAGCGUGGACAGCGAGAUCG
 GCCAGACCGAAAUCAGAGCCAUGAAGGGCGAGAUCACCGGAUGAAAGUGCG
 GCUGGGACAGCUGCUGAAACAGCAGGAAAAGAUGAUCCGGGCCAUGGAACUG
 GCCGUGGCCAGACGGGAAACCGUGACAACCCAGGCUGAGGGGCCAGCGGAAG
 AUGGACAGAAAGGCCUGACCCGGACCGACUCCACCACAAGCAGCUGGAAC
 UGAGGCGGAAGAUCGCGGACGUGCGGAAGGCCACCGAUGAGUGCACAAGA
 CAGUGCUGGAACUGGAAGAGACACAGCGGAACGUGUCCUCCAGCCUGCUGGA
 AAAACAGGAAAAGCUGAGCGUGAUCCAGGCCGACUUCGACACCCUGGAAGCU
 GACCUGACAAGACUGGGAGCCUGAAAAGACAGAACCUGUCCGAGAUCGUGG
 CACUGCAGACCCGGCUGAAACAUCUGCAGGCUGUGAAAGAGGGACGCUACGU
 GUUCCUGUUCAGAUCCAAGCAGUCUCUGGUGCUGGAAAGACAGCGGCUGGA
 CAAGCGGCUGGCACUGAUUGCCACCAUCCUGGAUAGAGUGCGCGACGAGUAC
 CCACAGUUCAGGAAGCACUGCACAAGGUGUCCAGAUGAUCGCCAACAAGC
 UGGAAUCCCCUGGCCCCAGCUGAUUCCG. AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 10

ETH031T30: etiqueta de EGFP en el terminal C-CCDC40

- 5 Parte del promotor T7, UTR 5' mínimo de Ethris, elemento de Kozak, codón de inicio (AUG), secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40 humana, espaciador G4S, secuencia que codifica una proteína EGFP, codón de parada (UGA), parte del sitio de restricción para BstBI, cola de poli (A)

GGGAGA **CGCCACCA**UGGCUGAACCUGGCGGAGCCGCCGGAAGAUCACCCUG
 AAGAUGGCUCUGCCAGCGAGGGCGAGAAAGAGGGCAACAACGAGAGCCACAU
 GGUGUCCCCCCCAGAGAAGGACGACGGCCAGAAAGGCGAAGAGGCCGUGGG
 CUCUACCGAGCACCCUGAGGAAGUGACACACAGGCCGAGGCCGCCAUUGAA
 GAGGGCGAGGUGGAAACAGAGGGCGAAGCCGCUGUGGAAGGCGAAGAGGAA
 GCCGUGUCUACGGCGACGCCGAGAGCGAGGAAGAGUACUACUACACCGAGA
 CAAGCAGCCCCGAGGGCCAGAUCUCUGCCGCCGAUACCACCUACCCCUACUU
 CAGCCCCCUCAGGAACUGCCUGGGGAAGAGGCCUACGAUAGCGUGUCCGG
 CGAAGCUGGCCUGCAGGGCUUUCAGCAGGAAGCCACAGGCCCUCCCGAGAG
 CCGGGAAAGAAGAGUGACAAGCCCCGAGCCUAGCCACGGCGUGCUGGGACCA
 UCUGAGCAGAUUGGGCCAAGUGACCUCUGGCCCUUGCUGUGGGCAGACUGACA
 GGCAGCACAGAGGAACCUCAGGGCCAGGUGCUGCCUAUGGGAGUGCAGCAC
 CGGUUCAGACUGAGCCACGGCAGCGACAUCGAGAGCAGCGACCUGGAAGAGU

UCGUCAGCCAGGAACCCGUGAUCCCUCCUGGCGUGCCAGAUGCCCAUCCAG
 GGAAGGCGAUCUGCCCGUGUUCAGGACCAGAUCAGCAGCCCUACCGAA
 GAGGGGGCUAUGGCCGAGAGAGUGGAAAGCGAGGGCUCCGACGAAGAAGCC
 GAGGACGAGGGAUUCAGCUGGUGGUGCUGGACCCCGACCACCCUCUGAUG
 GUGCGGUUUCAGGGCCGCCUGAAGAACUACCUGAACCGGCAGAUUCGAGAAGC
 UGAAACUGGACCUGCAGGAACUGGUGGUGGCCACAAAGCAGAGCAGAGCCCA
 GAGACAGGAACUGGGCGUGAACCUGUACGAGGUGCAGCAGCAUCUGGUGCA
 UCUGCAGAAGCUGCUGGAAAAGAGCCACGACCGGCACGCCAUGGCCAGCUCU
 GAGCGCAGACAGAAAGAGGAAGAACUGCAGGGCCGCCAGAGCCUGUACACCA
 AGACAUGC GCCGUGCCAACGAGGAACGGAAGAAGCUGGCUGCCUGCAGAC
 CGAGAUGGAAAACCUGGCUCUGCACCUGUUCUACAUGCAGAAUAUCGACCAG
 GACAUGCGGGACGACAUCAGAGUGAUGACCCAGGUCGUGAAGAAGGCCGAGA
 CAGAGAGAAUCCGGGCCGAGAUUGAGAAGAAAAAGCAGGACCUGUACGUGGA
 CCAGCUGACCACCAGGGGCCAGCAGCUGGAAGAGGAUAUCGCCCUUGUUCGAG
 GCCCAGUACCUGGCCCAGGCCGAAGAUACCCGGAUCCUGAGAAAGGCCGUGU
 CCGAGGGCCUGCACCAGAGAUUGCAUGCCAUCAGCGUGGAAAAGCGGCCGAUCAU
 GCAGCAGUGGGCCAGCAGCCUCUGUGGGCAUGAAGCACAGAGAUGAGGCCCA
 CCGGGCCGUGCUGGAAGCUCUGAGAGGCUGUCAGCACCAGGCCAAGAGCAC
 CGACGGCGAGAUUCGAGGCCUACAAGAAAUCCAUCAUGAAGGAAGAGGAAAAG
 AACGAGAAACUGGCCAGCAUCCUGAACAGAACCGAAACCGAGGCCACCCUGC
 UGCAGAAACUGACCACCCAGUGCCUGACCAAACAGGUGGCCCUAGUCCCA
 GUUCAACACCUACAGACUGACCCUGCAGGACACCGAGGACGCCCUAGUCAG
 GAUCAGCUGGAACAGAUUAUCUGACCGAGGAACUGCAGGCUAUCCGGCAGG
 CCAUUCAGGGGGAGCUGGAACUGCGGAGAAAGACCGACGCCGCCAUCAGAGA
 GAAGCUGCAGGAACACAUGACCAGCAACAAGACCACCAAGUACUUAACCAGC
 UGAUUCUGCGCCUGCAGAAAGAAAAGACCAACAUGAUGACACACCUGAGCAA
 GAUCAACGGCGACAUAUGCCCAGACCACCCUGGACAUCACCCACACCAGCAGC
 AGACUGGACGCCACCAGAAAACCCUGGUGGAACUGGACCAGGAUGUGAAGA
 AAGUGAACGAGCUGAUCACCAACAGCCAGAGCGAGAUUCAGCCGGCGGACCAU
 CCUGAUCGAGAGAAAGCAGGGCCUGAUCAACUUCUGAACAAACAGCUGGAA
 AGAAUGGUGUCCGAGCUGGGCGGCGAGGAAGUGGGACCUCUGGAACUGGAA
 AUCAAGCGGCUGAGCAAGCUGAUCGACGAGCAGCAGCGGCAAGGCCGUGCAG
 GCUCAAGUGACAUGGCUGCGGCUGCAGCAGGAAAUGGUCAAAGUGACCCAGG
 AACAGGAAGAACAGCUGGCCUCCUGGACGCCAGCAAGAAAGAACUGCACAU
 CAUGGAACAGAAAAAGCUGCGGGUGGAAAGCAAGAUUCGAGCAGGAAAAAAA
 GAACAGAAAGAAUUCGAGCACCAUAUGAAGGACCUGGACAACGACCUGAAGAA
 ACUGAAUAUGCUGAUGAACAAGAACCGCUGCUCCAGCGAAGAACUGGAACAG
 AACAAACAGAGUACCGAGAACGAGUUCGUGCGGAGCCUGAAGGCCAGCGAGC
 GGGAAACCAUCAAGAUGCAGGACAAGCUGAACCAAGCUGUCCGAGGAAAAAGC
 CACACUGCUGAACCAAGCUGGUGGAAGCCGAGCACCAGAUCAUGCUGUGGGAG
 AAGAAGAUCCAGCUGGCCAAAGAAAUGCGGAGCAGCGUGGACAGCGAGAUUCG
 GCCAGACCGAAAUCAGAGCCAUGAAGGGCGAGAUCCACCGGAUGAAAGUGCG
 GCUGGGACAGCUGCUGAAACAGCAGGAAAAGAUGAUCCGGGCCAUGGAACUG
 GCCGUGGCCAGACGGGAAACCGUGACAACCCAGGCUGAGGGCCAGCGGAAG
 AUGGACAGAAAGGCCCUAGACCCGGACCGACUUCACCACAAGCAGCUGGAAC

UGAGGCGGAAGAUCCGGGACGUGCGGAAGGCCACCGAUGAGUGCACAAAGA
 CAGUGCUGGAACUGGAAGAGACACAGCGGAACGUGUCCUCCAGCCUGCUGGA
 AAAACAGGAAAAGCUGAGCGUGAUCCAGGCCGACUUCGACACCCUGGAAGCU
 GACCUGACAAGACUGGGAGCCCUGAAAAGACAGAACCUGUCCGAGAUUCGUGG
 CACUGCAGACCCGGCUGAAACAUCUGCAGGCUGUGAAAGAGGGACGCUACGU
 GUUCCUGUUCAGAUCCAAGCAGUCUCUGGUGCUGGAAAGACAGCGGCUGGA
 CAAGCGGCUGGCACUGAUUUGCCACCAUCCUGGAUAGAGUGCGCGACGAGUAC
 CCACAGUUCCAGGAAGCACUGCACAAGGUGUCCAGAUGAUCGCCAACAAAGC
 UGGAUCCCCUGGCCCCAGC^{GGCGGAGGGGGCAGC}GUGAGCAAGGGCGAGGAGCUG
UUCACCGGGGUGGUGCCCAUCCUGGUCGAGCUGGACGGCGACGUAAACGGC
CACAAGUUCAGCGUGUCCGGCGAGGGCGAGGGCGAUGCCACCUACGGCAAG
CUGACCCUGAAGUUCAUCUGCACCACCGGCAAGCUGCCCGUGCCCUUGGCCCA
CCCUCGUGACCACCCUGACCUACGGCGUGCAGUGCUUCAGCCGCUACCCCGA
CCACAUGAAGCAGCAGCAGACUUCUUAAGUCCGCCAUGCCCGAAGGCUACGUC
CAGGAGCGCACCAUCUUCUUAAGGACGACGGCAACUACAAGACCCGCGCCG
AGGUGAAGUUCGAGGGCGACACCCUGGUGAACCAGCAUCGAGCUGAAGGGCA
UCGACUUAAGGAGGACGGCAACAUCUGGGGCGACAAGCUGGAGUACAACUA
CAACAGCCACAACGUCUUAUAUCAUGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAUCAAG
GUGAACUUAAGAUCGCGCCACAACAUCGAGGACGGCAGCGUGCAGCUCGCCG
ACCACUACCAGCAGAACACCCCAUCGGCGACGGCCCGUGCUGCUGCCCGA
CAACCACUACCUGAGCACCCAGUCCGCCUGAGCAAAGACCCCAACGAGAAG
CGCGAUCACAUGGUCCUGCUGGAGUUCGUGACCGCCGCGGGAUCACUCUC
GGCAUGGACGAGCUGUACAAGUGAUUCC^{AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA}
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 11

ETH031T26: Etiqueta de HA en el terminal N-CCDC40-péptido T2A-tdTomato con las UTR de CYBA 5' y 3'

5 Parte del promotor T7, **UTR 5' mínima de Ethris**, *UTR 5'* de CYBA, **elemento de Kozak**, codón de inicio (AUG),
 etiqueta HA, espaciador G4S, secuencia de codón optimizada que codifica una versión funcional de una proteína CCDC40
 humana, péptido T2A, *tdTomato*, codón de parada (UGA), **UTR 3'** de CYBA, parte del sitio de restricción para BstBI, ^{cola}
 poli (A)

GGGAGA^{CCCCUACGACGUGCCCGACUACGCC}CGCGCCUAGCAGUGUCCAGCCGGGUUCGUGUCGCCGCCACCAUG^{UA}
^{CCCCUACGACGUGCCCGACUACGCC}GGCGGAGGGGGCAGCGCUGAACCUGGCGGAGCCGCCGGA
 AGAUCCCACCCUGAAGAUGGCUCUGCCAGCGAGGGCGAGAAAGAGGGCAACA
 ACGAGAGCCACAUGGUGUCCCCCCCAGAGAAGGACGACGGCCAGAAAGGCCGA
 AGAGGCCGUGGGCUCUACCGAGCACCCUGAGGAAGUGACCACACAGGCCGA
 GGCCGCCAUUGAAGAGGGCGAGGUGGAAACAGAGGGCGAAGCCGCUGUGGA
 AGGCGAAGAGGAAGCCGUGUCUACGGCGACGCCGAGAGCGAGGAAGAGUA
 CUACUACACCGAGACAAGCAGCCCCGAGGGCCAGAUUCUCUGCCGCCGAUACC
 ACCUACCCCUACUUCAGCCCCCCUCAGGAACUGCCUGGGGAAGAGGCCUACG

AUAGCGUGUCCGGCGAAGCUGGCCUGCAGGGCUUUCAGCAGGAAGCCACAG
 GCCCUCCCGAGAGCCGGGAAAGAAGAGUGACAAGCCCCGAGCCUAGCCACGG
 CGUGCUGGGACCAUCUGAGCAGAUGGGCCAAGUGACCUCUGGCCUCUGCUGU
 GGGCAGACUGACAGGCAGCACAGAGGAACCUCAGGGCCAGGUGCUGCCUUAU
 GGGAGUGCAGCACCGGUUCAGACUGAGCCACGGCAGCGACAUCGAGAGCAG
 CGACCUGGAAGAGUUCGUCAGCCAGGAACCCGUGAUCCCUCCUGGCGUGCC
 AGAUGCCCAUCCCAAGGGAAGGCGAUCUGCCCGUGUUCAGGACCAGAUCACAG
 CAGCCCUCUACCGAAGAGGGGGCUAUGGCCGAGAGAGUGGAAAGCGAGGGC
 UCCGACGAAGAAGCCGAGGACGAGGGGAUCUCAGCUGGUGGUGCUGGACCCC
 GACCACCCUCUGAUGGUGCGGUUUCAGGCCGCCUGAAGAACUACCUGAACC
 GGCAGAUUCGAGAAGCUGAAACUGGACCUGCAGGAACUGGUGGUGGCCACAAA
 GCAGAGCAGAGCCCAGAGACAGGAACUGGGCGUGAACCUGUACGAGGUGCA
 GCAGCAUCUGGUGCAUCUGCAGAAGCUGCUGGAAAAGAGCCACGACCGGCAC
 GCCAUGGCCAGCUCUGAGCGCAGACAGAAAGAGGAAGAACUGCAGGCCGCCA
 GAGCCCUGUACACCAAGACAUGCGCCGUGCCAACGAGGAACGGAAGAAGCU
 GGCUGCCCUGCAGACCGAGAUGGAAAACUGGCUCUGCACCUGUUCUACAUG
 CAGAAUAUCGACCAGGACAUGCGGGACGACAUCAGAGUGAUGACCCAGGUCG
 UGAAGAAGGCCGAGACAGAGAGAAUCCGGGCCGAGAUUGAGAAGAAAAAGCA
 GGACCUGUACGUGGACCAGCUGACCACCAGGGGCCAGCAGCUGGAAGAGGA
 UAUCGCCCUGUUCGAGGCCCAGUACCUGGCCCAGGCCGAAGAUACCCGGAUC
 CUGAGAAAGGCCGUGUCCGAGGCCUGCACCAGAUUCGAUGCCAUCAGCGUG
 GAAAAGCGGCGGAUCAUGCAGCAGUGGGCCAGCAGCCUCUGGGGCAUGAAG
 CACAGAGAUAGGGCCACCAGGCCGUGCUGGAAGCUCUGAGAGGCUGUCAG
 CACCAGGCCAAGAGCACCGACGGCGAGAUCGAGGCCUACAAGAAAUCCAUCA
 UGAAGGAAGAGGAAAAGAACGAGAAACUGGCCAGCAUCCUGAACAGAACCGAA
 ACCGAGGCCACCCUGCUGCAGAAACUGACCACCCAGUGCCUGACCAAACAGG
 UGGCCCUGCAGUCCAGUUAACACCUACAGACUGACCCUGCAGGACACCGA
 GGACGCCCUGAGUCAGGAUCAGCUGGAACAGAUGAUUCUGACCGAGGAACUG
 CAGGCUAUCCGGCAGGCCAUUCAGGGGGAGCUGGAACUGCGGAGAAAAGACC
 GACGCCGCCAUCAGAGAGAAGCUGCAGGAACACAUGACCAGCAACAAGACCA
 CCAAGUACUUAACAGCUGAUUCUGCGCCUGCAGAAAGAAAAGACCAACAUG
 AUGACACACCUGAGCAAGAUCAACGGCGACAUCGCCCAGACCACCCUGGACA
 UCACCCACACCAGCAGCAGACUGGACGCCACACAGAAAACCCUGGUGGAACU
 GGACCAGGAUGUGAAGAAAGUGAACGAGCUGAUCACCAACAGCCAGAGCGAG
 AUCAGCCGGCGGACCAUCCUGAUCGAGAGAAAGCAGGGCCUGAUAACUUC
 UGAACAAACAGCUGGAAAGAAUGGUGUCCGAGCUGGGCGGCGAGGAAGUGG
 GACCUCUGGAACUGGAAAUCAAGCGGCUGAGCAAGCUGAUCGACGAGCACGA
 CGGCAAGGCCGUGCAGGCUCAAGUGACAUGGCUGCGGCUGCAGCAGGAAAU
 GGUCAAAGUGACCCAGGAACAGGAAGAAGCUGGGCCUCCUGGACGCCAGC
 AAGAAAGAACUGCACAUCAUGGAACAGAAAAAGCUGCGGGUGGAAAGCAAGAU
 CGAGCAGGAAAAAAAGAACAGAAAGAAAUCGAGCACCACAUGAAGGACCUGG
 ACAACGACCUGAAGAAACUGAAUAUGCUGAUGAACAAGAACCGCUGCUCCAGC
 GAAGAACUGGAACAGAACACAGAGUGACCGAGAACGAGUUCGUGCGGAGCC
 UGAAGGCCAGCGAGCGGGAAACCAUCAAGAUGCAGGACAAGCUGAACCAGCU
 GUCCGAGGAAAAAGCCACACUGCUGAACCAGCUGGUGGAAGCCGAGCACCAG

AUCAUGCUGUGGGAGAAGAAGAUCCAGCUGGCCAAAGAAAUGCGGAGCAGCG
 UGGACAGCGAGAUCGGCCAGACCGAAAUCAGAGCCAUGAAGGGCGAGAUGCA
 CCGGAUGAAAGUGCGGCUGGGACAGCUGCUGAAACAGCAGGAAAAGAUGAUC
 CGGGCCAUGGAACUGGCCGUGGCCAGACGGGAAACCGUGACAACCCAGGCU
 GAGGGCCAGCGGAAGAUGGACAGAAAGGCCUGACCCGGACCGACUUCACC
 ACAAGCAGCUGGAACUGAGGCGGAAGAUCGGGACGUGCGGAAGGCCACCG
 AUGAGUGCACAAAGACAGUGCUGGAACUGGAAGAGACACAGCGGAACGUGUC
 CUCCAGCCUGCUGGAAAAACAGGAAAAGCUGAGCGUGAUCCAGGCCGACUUC
 GACACCCUGGAAGCUGACCUGACAAGACUGGGAGCCCUGAAAAGACAGAACC
 UGUCCGAGAUUCGUGGCACUGCAGACCCGGCUGAAACAUCUGCAGGCUGUGAA
 AGAGGGACGCUACGUGUUCUGUUCAGAUCCAAGCAGUCUCUGGUGCUGGA
 AAGACAGCGGCUGGACAAGCGGCUGGCACUGAUUGCCACCAUCCUGGAUAGA
 GUGCGCGACGAGUACCCACAGUUCAGGAAGCACUGCACAAGGUGUCCAGA
 UGAUCGCCAACAAGCUGGAAUCCCCUGGCCCCAGCGGCAGCGGC^{SAGGGCAGAGG}
 CAGCCUGCUGACCU^{GCGGCGACGUGGAGGAGAACCCCGGCCCC}AUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGG
UCAUCAAGAGAGUUCAUGCGCUUCAAGGUGCGCAUGGAGGGCUCCAUGAACGG
CCACGAGUUCGAGAUCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCUACGAGGGGCAC
CCAGACCGCCAAGCUGAAGGUGACCAAGGGCGGCCCCUGCCCUUCGCCUG
GGACAUCCUGUCCCCCAGUUCAUGUACGGCUCCAAGGCGUACGUGAAGCAC
CCCGCCGACAUCCCCGAUUACAAGAAGCUGUCCUUC^{CCCCGAGGGCUUCAAGU}
GGGAGCGCGUGAUGAACUUCGAGGACGGCGGUCUGGUGACCGUGACCCAGG
ACUCCUCCUGCAGGACGGCACGCUGAUCUACAAGGUGAAGAUGCGCGGCAC
CAACUUC^{CCCCCGACGGCCCCGUA}U^{GCAGAAGAAGACCAUGGGCUGGGAG}
GCCUCCACCGAGCGCCUGUACCCCGCGACGGCGUGCUGAAGGGCGGAGAU
CACCAGGCCUGAAGCUGAAGGACGGCGGCCACUACCUGGUGGAGUUCAAGA
CCAUCUACAUGGCCAAGAAGCCCGUGCAACUGCCCGGCUACUACUACGUGGA
CACCAAGCUGGACAUCACCUCCCAACAACGAGGACUACACCAUCGUGGAACAG
UACGAGCGCUCCGAGGGCCGCCACCACCGUUCUCCUGGGGCAUGGCACCGGC
AGCACCGGCAGCGGCAGCUCCGGCACCGCCUCCUCCGAGGACAACAACAUGG
CCGUCAUCAAGAGAGUUCAUGCGCUUCAAGGUGCGCAUGGAGGGCUCCAUGAA
CGGCCACGAGUUCGAGAUCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCUACGAGGG
CACCCAGACCGCCAAGCUGAAGGUGACCAAGGGCGGCCCCUGCCCUUCGCC
UGGGACAUCUGUCCCCCAGUUCAUGUACGGCUCCAAGGCGUACGUGAAGC
ACCCCGCCGACAUCCCCGAUUACAAGAAGCUGUCCUUC^{CCCCGAGGGCUUCA}
GUGGGAGCGCGUGAUGAACUUCGAGGACGGCGGUCUGGUGACCGUGACCCA
GGACUCCUCCUGCAGGACGGCACGCUGAUCUACAAGGUGAAGAUGCGCGG
CACCAACUUC^{CCCCCGACGGCCCCGUA}U^{GCAGAAGAAGACCAUGGGCUGG}
GAGGCCUCCACCGAGCGCCUGUACCCCGCGACGGCGUGCUGAAGGGCGAG
AUCCACCAGGCCCUGAAGCUGAAGGACGGCGGCCACUACCUGGUGGAGUUCA
AGACCAUCUACAUGGCCAAGAAGCCCGUGCAACUGCCCGGCUACUACUACGU
GGACACCAAGCUGGACAUCACCUCCCAACAACGAGGACUACACCAUCGUGGAA
CAGUACGAGCGCUCCGAGGGCCGCCACCACCGUUCUCCUGUACGGCAUGGAC
GAGCUGUACAAGUGACCUCGCCCCGGACCUGCCCUCCCGCCAGGUGCACCC
ACCUGCAAUAAUGCAGCGAAGCCGGGAUUCG^{AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA}

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

AAAA

SEQ ID NO: 12

ETH047T02 (CCDC39 con UTR mínima de Ethris):

5 Parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris, elemento de Kozak, codón de inicio (AUG), secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC39 humana, codón de parada (UGA), parte del sitio de restricción para BstBI, cola poli A

GGGAGA**CGCCACCAUG**AGCAGCGAGUUUCUGGCCGAACUGCACUGGGAGGACG
GCUUCGCUAUUCCCGUGGCCAACGAGGAAAACAAGCUGCUGGAAGAUCAGCU
GAGCAAGCUGAAGGACGAGAGAGCCUCUCUGCAGGACGAGCUGAGAGAGUAC
GAGGAACGGAUCAACAGCAUGACCAGCCACUUCAAGAACGUGAAGCAAGAGC
UGAGCAUACCCAGAGCCUGUGCAAGGCCAGAGAGAGAGAAACCGAGAGCGA
GGAACACUUCAAGGCUAUCGCCCAGCGCGAGCUGGGAAGAGUGAAGGAUGAG
AUCCAGCGGCUGGAAAACGAGAUGGCCAGCAUCCUGGAAAAGAAGUCCGACA
AAGAGAACGGCAUCUUCAAGGCCACACAGAAGCUGGACGGCCUGAAGUGCCA
GAUGAACUGGGAUCAGCAGGCCUGGAAGCCUGGCUGGAAGAGUCUGCCCA
CAAGGAUUCUGACGCCCUGACACUGCAGAAGUACGCCCAGCAGGACGACAAC
AAGAUCCGGGCUCUGACCCUGCAGCUGGAAAGACUGACCCUGGAUUGCAACC
AGAAGCGGAAGAUCUGGACAACGAGCUGACCGAGACAAUCAGCGCCCAGCU
GGAACUGGAUAAGGCCGCUCAGGACUUCAGAAAGAUCCACAACGAGCGGCAA
GAACUGAUCAAGCAGUGGGAGAACACCAUUCGAGCAGAUGCAGAAACGCGACG
GCGACAUCGACAACUGCGCCCUGGAACUCGCCCAGGAUCAAGCAAGAGACACG
CGAGAAAGAGAACCUGGUCAAAGAGAAGAUCAAGUUCUCGAGUCCGAGAUC
GGCAACAACACCGAGUUCGAGAAGCGGAUCAGCGUGGCCGACAGAAAGCUGC
UGAAGUGCAGAACCGCCUAC CAGGACCACGAGACAAGCCGGAUUCAGCUCAA
GGGCGAGCUGGAUUCUCUGAAGGCCACCGUGAACAGAACCAGCAGCGAUCUG
GAAGCCCUGCGGAAGAACAUCAGCAAGAUCAAGAAGGACAUCCACGAGGAAA
CCGCCAGGCUGCAGAAAACAAAGAACCACAAUGAGAUCAUCCAGACCAAGCUG
AAAGAGAUCAACCGAAAAGACCAUGAGCGUGGAAGAGAAGGCCACAAACCUGG
AAGAU AUGCUCAAAGAGGAAGAGAAAGACGUCAAAGAGGUGGACGUUCAACU
GAACCUGAUUAAGGGCGUGCUGUUAAGAAGGCCCAAGAGCUGCAGACCGAA
ACCAUGAAGGAAAAGGCCGUCCUGUCUGAGAUUCGAGGGCACCAGAUUCUAGCC
UGAAGCACCUGAACCAUCAGCUGCAGAAGCUCGACUUCGAGACACUGAAGCA
GCAAGAGAUCAUGUACAGCCAGGAUUUCCACAUC CAGCAGGUCGAGCGGCGG
AUGUCUAGACUGAAGGGCGAGAUCAACUCCGAGGAAAAACAGGCCUCGAGG
CCAAGAUUCGUGGAACUGAGAAAGAGCCUCGAAGAGAAGAAGUCUACCUGCGG
CCUGCUGGAAACCCAGAUUAAGAAGCUGCACAACGACCUGUACUUCAUCAAG
AAAGCCCACAGCAAGAACAGCGACGAGAAGCAGAGCCUGAUGACCAAGAUCAA
UGAGCUGAACCUGUUCAUCGAUCGGAGCGAAAAAGAGCUGGACAAGGCCAAG
GGCUUCAAGCAGGACCUGAUGAUUCGAGGACAACCUGCUGAAGCUGGAAGUGA

AGCGGACCAGAGAGAUGCUGCACAGCAAGGCCGAGGAAGUGCUGUCUCUGG
 AAAAGCGGAAGCAGCAGCUGUACACCGCCAUGGAAGAGAGAACCGAAGAGAU
 CAAGGUGCACAAGACCAUGCUGGCUUCCCAGAUACAGUACGUGGACCAAGAG
 CGCGAGAACAUCUCCACCGAGUUUAGAGAGAGACUGUCCAAGAUCGAGAAGC
 UGAAGAACCGCUACGAGAUCCUGACCGUCGUGAUGCUGCCUCCUGAGGGCG
 AAGAGGAAAAGACCCAGGCCUACUACGUGAUAAGGCAGCCCAAGAAAAAGAG
 GAACUCCAGAGAGAAGGGCGACUGCCUGGACGCCAAGAUUAACAAGGCCGAAA
 AAGAAUUCUACGCCUCGAGAACACCCUGCAGGUCCUGAACAGCUGCAACAA
 CAACUACAAGCAGAGCUUCAAGAAAGUCACCCCUAGCUCCGACGAGUACGAG
 CUGAAGAUUCAGCUGGAAGAACAGAAAAGAGCCGUGGACGAGAAGUACAGAU
 ACAAGCAGCGGCAGAUACAGAGAGCUGCAAGAGGAUAUCCAGAGCAUGGAAAA
 CACCCUGGACGUGAUCGAGCACCUGGCCAACAACGUGAAAGAGAAGCUGUCC
 GAGAAACAGGCCUACAGCUUUCAGCUGUCCAAGAGACAGAGGAACAGAAAGC
 CAAACUGGAACGCGUGACCAAGCAGUGCGCCAAGCUGACAAAAGAGAUCCG
 GCUGCUGAAAGACACCAAGGACGAAACCAUGGAAGAACAAGACAUCAAGCUGC
 GCGAGAUGAAGCAGUUCACAAAGUGAUCGACGAGAUGCUGGUGGACAUCAU
 UGAAGAGAACACAGAGAUCCGCAUCAUCCUGCAGACCUAUUUUCAGCAGAGC
 GGCCUGGAACUGCCUACCGCCUCUACAAAGGGCAGCAGACAGAGCAGCAGAU
 CCCCUGGCCACACAAGCCUGAGCGCCAGAAGCUCUAGAAGCACCAGCACCUC
 UACCAGCCAGUCCAGCAUUAAGGUGCUGGAACUCAAGUUCGCCGAGCUCU
 AGCCUCGUGGGAAGCCCUUCUAGACCUAGCAGCGCCUCUAGCAGCUCACAGCA
 ACGUGAAGUCCAAGAAAAGCUCCAAGUGAUUUGG. AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAA

SEQ ID NO: 13

ARN que codifica la secuencia CCDC39 humana y contiene el **elemento de TISU** como UTR 5' (ETH047T03)

- 5 Parte del promotor T7, **UTR 5' mínima de Ethris con nucleótido U adicional**, **elemento de TISU**, codón de inicio (AUG), secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC39 humana, codón de parada (UGA), parte del sitio de restricción para BstBI, cola poli(A)

GGGAGA **CUGCCAAGAU**GAGCAGCGAGUUUCUGGCCGAACUGCACUGGGAGGAC
 GGCUUCGCUAUUCCCGUGGCCAACGAGGAAAACAAGCUGCUGGAAGAUCAGC
 UGAGCAAGCUGAAGGACGAGAGAGCCUCUCUGCAGGACGAGCUGAGAGAGUA
 CGAGGAACGGAUCAACAGCAUGACCAGCCACUUCAAGAACGUGAAGCAAGAG
 CUGAGCAUACCCAGAGCCUGUGCAAGGCCAGAGAGAGAGAAACCGAGAGCG
 AGGAACACUUAAGGCUAUCGCCAGCGCGAGCUGGGAAGAGUGAAGGAUGA
 GAUCCAGCGGCUGGAAAACGAGAUGGCCAGCAUCCUGGAAAAGAAGUCCGAC
 AAAGAGAACGGCAUCUUAAGGCCACACAGAAGCUGGACGGCCUGAAGUGCC
 AGAUGAACUGGGAUCAGCAGGCCCUUGGAAGCCUGGCUGGAAGAGUCUGCCC

ACAAGGAUUCUGACGCCCUGACACUGCAGAAGUACGCCCAGCAGGACGACAA
 CAAGAUCCGGGCUCUGACCCUGCAGCUGGAAAGACUGACCCUGGAAUGCAAC
 CAGAAGCGGAAGAUCUGGACAACGAGCUGACCGAGACAAUCAGCGCCCAGC
 UGGAACUGGAUAAGGCCGCUACAGGACUUCAGAAAGAUAUCCACAACGAGCGGCA
 AGAACUGAUAAGCAGUGGGGAGAACACCAUCGAGCAGAUGCAGAAACGCGAC
 GCGGACAUCGACAACUGCGCCCUGGAACUCGCCCUGGAUCAAGCAAGAGACAC
 GCGAGAAAGAGAACCUGGUCAAAGAGAAGAUCAAGUUCCUCGAGUCCGAGAU
 CGGCAACAACACCGAGUUCGAGAAGCGGAUCAGCGUGGCCGACAGAAAGCUG
 CUGAAGUGCAGAACCGCCUACCAGGACCACGAGACAAGCCGGAUUCAGCUCA
 AGGGCGAGCUGGAUUCUCUGAAGGCCACCGUGAACAGAACCAGCAGCGAUCU
 GGAAGCCCUGCGGAAGAACAUCAGCAAGAUCAAGAAGGACAUCCACGAGGAA
 ACCGCCAGGCUGCAGAAAACAAAGAACCACAAUGAGAUCAUCCAGACCAAGCU
 GAAAGAGAUCAACCGAAAAGACCAUGAGCGUGGAAGAGAAGGCCACAAACCUG
 GAAGAUUAUGCUCAAAGAGGAAGAGAAAGACGUCAAAGAGGUGGACGUUCAAC
 UGAACCUGAUUAAGGGCGUGCUGUUAAGAAGGCCCAAGAGCUGCAGACCGA
 AACCAUGAAGGAAAAGGCCGUCCUGUCUGAGAUCGAGGGCACCAGAUUCUAGC
 CUGAAGCACCUGAACCAUCAGCUGCAGAAGCUCGACUUCGAGACACUGAAGC
 AGCAAGAGAUCAUGUACAGCCAGGAUUUCCACAUCAGCAGGUCGAGCGGCG
 GAUGUCUAGACUGAAGGGCGAGAUCAACUCCGAGGAAAAACAGGCCCUAGCAG
 GCCAAGAUUCGUGGAACUGAGAAAGAGCCUCGAAGAGAAGAAGUCUACCUGCG
 GCCUGCUGGAAACCCAGAUUAAGAAGCUGCACAACGACCUGUACUUCAUCA
 GAAAGCCCACAGCAAGAACAGCGACGAGAAGCAGAGCCUGAUGACCAAGAUC
 AAUGAGCUGAACCUUGUUAUCGAUCGGAGCGAAAAAGAGCUGGACAAGGCCA
 AGGGCUUCAAGCAGGACCUGAUGAUCGAGGACAACCUGCUGAAGCUGGAAGU
 GAAGCGGACCAGAGAGAUGCUGCACAGCAAGGCCGAGGAAGUGCUGUCUCU
 GGAAAAGCGGAAGCAGCAGCUGUACACCGCCAUGGAAGAGAGAACCGAAGAG
 AUCAAGGUGCACAAGACCAUGCUGGCUUCCAGAUCAAGUACGUGGACCAAG
 AGCGCGAGAACAUUCUCCACCGAGUUUAGAGAGAGACUGUCCAAGAUUCGAGAA
 GCUGAAGAACCGCUACGAGAUCCUGACCGUCGUGAUGCUGCCUCCUGAGGG
 CGAAGAGGAAAAGACCCAGGCCUACUACGUGAUAAGGCAGCCCAAGAAAAA
 GAGGAACUCCAGAGAGAAGGGCGACUGCCUGGACGCCAAGAUUAACAAGGCCG
 AAAAAGAAAUCUACGCCCUCGAGAACACCCUGCAGGUCCUGAACAGCUGCAAC
 AACAAUCUAAGCAGAGCUUCAAGAAAGUCACCCCUAGCUCCGACGAGUACGA
 GCUGAAGAUUCAGCUGGAAGAACAGAAAAGAGCCGUGGACGAGAAGUACAGA
 UACAAGCAGCGGCAGAUCAAGAGAGCUGCAAGAGGAUAUCCAGAGCAUGGAAA
 ACACCCUGGACGUGAUCGAGCACCUGGCCAACAAACGUGAAAGAGAAGCUGUC
 CGAGAAACAGGCCUACAGCUUUCAGCUGUCCAAAGAGACAGAGGAACAGAAG
 CCCAAACUGGAACGCGUGACCAAGCAGUGCGCCAAGCUGACAAAAGAGAUC
 GGCUGCUGAAAGACACCAAGGACGAAACCAUGGAAGAACAAGACAUAAGCU
 GCGCGAGAUGAAGCAGUUCACAAAGUGAUCGACGAGAUGCUGGUGGACAUC
 AUUGAAGAGAACACAGAGAUCCGCAUCAUCCUGCAGACCUAUUUUCAGCAGA
 GCGGCCUGGAACUGCCUACCGCCUCUACAAAGGGCAGCAGACAGAGCAGCAG
 AUCCCCUAGCCACACAAGCCUGAGCGCCAGAAGCUCUAGAAGCACCAGCACC
 UCUACCAGCCAGUCCAGCAUUAAGGUGCUGGAACUCAAGUUCGCCGAGCU
 CUAGCCUCGUGGGAAGCCCUUCUAGACCUAGCAGCGCCUCUAGCAGCUCCAG

CAACGUGAAGUCCAAGAAAAGCUCCAAGUGAUUCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAA

SEQ ID NO: 14

ETH047T05: SP30; ARN que codifica una CCDC39 humana y que contiene una secuencia aleatoria de 30 nucleótidos (SP30) que se usó como UTR 5'

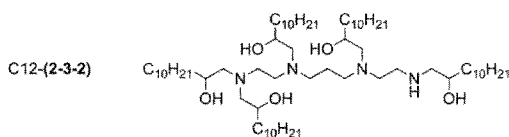
- 5 Parte del promotor T7, UTR 5' mínima de Ethris, SP30 como UTR 5', elemento de Kozak, codón de inicio (AUG), secuencia de codón optimizado que codifica una versión funcional de una proteína CCDC39 humana, codón de parada (UGA), parte de la restricción sitio para BstBI, cola poli (A)

GGGAGA **CAUUGAAAUUUAUCUCUUGUGUUGUGGUCGCGCCACCAUG**AGCAGCGAGUUU
 CUGGCCGAACUGCACUGGGAGGACGGCUUCGCUAUUCCCGUGGCCAACGAG
 GAAAACAAGCUGCUGGAAGAUACGUGAGCAAGCUGAAGGACGAGAGAGCCU
 CUCUGCAGGACGAGCUGAGAGAGUACGAGGAACGGAUCAAACAGCAUGACCAG
 CCACUUCAAGAACGUGAAGCAAGAGCUGAGCAUACCCAGAGCCUGUGCAAG
 GCCAGAGAGAGAGAAACCGAGAGCGAGGAACACUUAAGGCUAUCGCCCAGC
 GCGAGCUGGGAAGAGUGAAGGAUGAGAUCAGCGGCUGGAAAACGAGAUGG
 CCAGCAUCCUGGAAAAGAAGUCCGACAAAGAGAACGGCAUCUUAAGGCCAC
 ACAGAAGCUGGACGGCCUGAAGUGCCAGAUGAACUGGGAUACAGCAGGCCUG
 GAAGCCUGGCUGGAAGAGUCUGCCACAAGGAUUCUGACGCCUGACACUGC
 AGAAGUACGCCCAGCAGGACGACAACAAGAUCCGGGCUCUGACCCUGCAGCU
 GGAAAGACUGACCCUGGAUUGCAACCAGAAGCGGAAGAUCCUGGACAACGAG
 CUGACCGAGACAAUCAGCGCCAGCUGGAACUGGAUAAGGCCGCUACAGGACU
 UCAGAAAGAUCCACAACGAGCGGCAAGAACUGAUCAAGCAGUGGGAGAACAC
 CAUCGAGCAGAUUCAGAAACGCGACGGCGACAUCGACAACUGCGCCUGGAA
 CUCGCCCGGAUCAAGCAAGAGACACGCGAGAAAGAGAACCUGGUCAAAGAGA
 AGAUCAAGUCCUCGAGUCCGAGAUCCGCAACAACACCGAGUUCGAGAAGCG
 GAUCAGCGUGGCCGACAGAAAGCUGCUGAAGUGCAGAACCGCCUACCAGGAC
 CACGAGACAAGCCGGAUUCAGCUCAAGGGCGAGCUGGAUUCUCUGAAGGCCA
 CCGUGAACAGAACCAGCAGCGAUCUGGAAGCCCUGCGGAAGAACAUCAGCAA
 GAUCAAGAAGGACAUCACGAGGAAACCGCCAGGCUGCAGAAAACAAAGAACC
 ACAUAGAGAUCAUCCAGACCAAGCUGAAAGAGAUACCGAAAAGACCAUGAGC
 GUGGAAGAGAAGGCCACAAACCUGGAAGAUUAGCUCAAAGAGGAAGAGAAAG
 ACGUCAAGAGAGGUGGACGUUCAACUGAACCUGAUUAAGGGCGUGCUGUUCAA
 GAAGGCCCAAGAGCUGCAGACCGAAACCAUGAAGGAAAAGGCCGUCCUGUCU
 GAGAUCCGAGGGCACCAGAUUCUAGCCUGAAGCACCUGAACCAUCAGCUGCAGA
 AGCUCGACUUCGAGACACUGAAGCAGCAAGAGAUAUGUACAGCCAGGAUUU
 CCACAUCCAGCAGGUCGAGCGGCGGAUGUCUAGACUGAAGGGCGAGAUCAAC
 UCCGAGGAAAAACAGGCCUCGAGGCCAAGAUUCUGGAACUGAGAAAGAGCC
 UCGAAGAGAAGAAGUCUACCUGCGGCCUGCUGGAACCCAGAUUAAGAAGCU
 GCACAACGACCUGUACUUAUCAAGAAAGCCACAGCAAGAACAGCGACGAGA

AGCAGAGCCUGAUGACCAAGAUCAAUGAGCUGAACCUGUUCAUCGAUCGGAG
 CGAAAAAGAGCUGGACAAGGCCAAGGGCUUCAAGCAGGACCUGAUGAUCGAG
 GACAACCUGCUGAAGCUGGAAGUGAAGCGGACCAGAGAGAUGCUGCACAGCA
 AGGCCGAGGAAGUGCUGUCUCUGGAAAAGCGGAAGCAGCAGCUGUACACCGC
 CAUGGAAGAGAGAACC GAAGAGAUCAAGGUGCACAAGACCAUGCUGGCUUCC
 CAGAU CAGAUACGUGGACCAAGAGCGCGAGAACAUCUCCACCGAGUUUAGAG
 AGAGACUGUCCAAGAU CGAGAAGCUGAAGAACC GCUACGAGA UCCUGACCGU
 CGUGAUGCUGCCUCCUGAGGGCGAAGAGGAAAAGACCCAGGCCUACUACGUG
 AUCAAGGCAGCCCAAGAAAAAGAGGAACUCCAGAGAGAAGGCGACUGCCUGG
 ACGCCAAGAUUAACAAGGCCGAAAAAGAAAUCUACGCCCU CGAGAACACCCUG
 CAGGUCCUGAACAGCUGCAACAACAACUACAAGCAGAGCUUCAAGAAAGUCAC
 CCCUAGCUCCGACGAGUACGAGCUGAAGAUUCAGCUGGAAGAACAGAAAAGA
 GCCGUGGACGAGAAGUACAGAUACAAGCAGCGGCAGAU CAGAGAGCUGCAAG
 AGGAUAUCCAGAGCAUGGAAAACACCCUGGACGUGAUCGAGCACCUGGCCAA
 CAACGUGAAAGAGAAGCUGUCCGAGAAACAGGCCUACAGCUUUCAGCUGUCC
 AAAGAGACAGAGGAACAGAAGCCCAAACUGGAACGCGUGACCAAGCAGUGCG
 CCAAGCUGACAAAAGAGAUCCGGCUGCUGAAAGACACCAAGGACGAAACCAU
 GGAAGAACAAGACAUCAAGCUGCGCGAGAUGAAGCAGUUCCACAAAGUGAUC
 GACGAGAUGCUGGUGGACAUCAUUGAAGAGAACACAGAGAUCCGCAUCAUCC
 UGCAGACCUAUUUUUCAGCAGAGCGGCCUGGAACUGCCUACCGCCUCUACAAA
 GGGCAGCAGACAGAGCAGCAGAUCCCCUAGCCACACAAGCCUGAGCGCCAGA
 AGCUCUAGAAGCACCAGCACCUCUACCAGCCAGUCCAGCAUUAAGGUGCUGG
 AACUCAAGUUCGCCGAGCUCUAGCCUCGUGGGGAAGCCCUUCUAGACCUAG
 CAGCGCCUCUAGCAGCUCCAGCAACGUGAAGUCCAAGAAAAGCUCCAAGUGA
UUCG.AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para analizar el efecto de un polirribonucleótido sobre la ciliogénesis, en el que dicho polirribonucleótido codifica una proteína implicada y/o requerida para la ciliogénesis, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - 5 (a) obtener un frotis de nariz de un sujeto que tiene una ciliopatía, comprendiendo dicho frotis de nariz células basales no diferenciadas y células ciliadas diferenciadas,
 - (b) cultivar las células obtenidas en la etapa (a) como un cultivo celular sumergido para obtener células basales no diferenciadas y células ciliadas desdiferenciadas,
 - 10 (c) cultivar células basales no diferenciadas y células ciliadas desdiferenciadas obtenidas en la etapa (b) como un cultivo celular de interfaz aire-líquido y realizar un levantamiento por aire,
 - (d) transfectar células obtenidas en la etapa (c) con un polirribonucleótido que codifica una proteína implicada y/o necesaria para la ciliogénesis,
 - (e) cultivar las células transfectadas obtenidas en la etapa (d) para obtener células ciliadas diferenciadas, y
 - 15 (f) determinar el efecto de dicho polirribonucleótido sobre la ciliogénesis usando una medición de lactato deshidrogenasa, un ensayo NucGreen, una microscopía de video de alta velocidad, una medición de frecuencia de latido ciliar, un ensayo de eliminación mucociliar y/o tinción de inmunofluorescencia.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las células se transfectan dentro de 0 a 48 horas después de que se realiza el levantamiento por aire en la etapa (c).
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que las células se transfectan con un
20 polirribonucleótido que codifica una proteína implicada y/o requerida para la ciliogénesis usando un lipidoide que tiene la estructura mostrada en la fórmula (V):



Fórmula (V)

4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células se cultivan en las etapas (b) a (e) usando Medio G que tiene la siguiente composición:

Sustancia	Volumen	Concentración final
DMEM/F12 de Ham	100 ml	
Ultroser G	2 ml	2%
Clon fetal II	2 ml	2%
Insulina	100 μ l	2,5 μ g/ml
Extracto de cerebro bovino	250 μ l	22,5 μ g/ml
Transferrina	100 μ l	2,5 μ g/ml
Hidrokortisona	20 μ l	20 nM
3,3',5-Triyodo-L-tironina	3,33 μ l	500 nM
Epinefrina	10 μ l	1,5 μ M
Ácido retinoico	10 μ l	10 nM
Fosforiletanolamina	5 μ l	250 nM
Etanolamina	100 μ l	250 nM
DAPT	10 μ l	1 μ M

5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el frotis nasal comprende además fibroblastos y en el que se inhibe el crecimiento de dichos fibroblastos en las etapas (b) a (e).

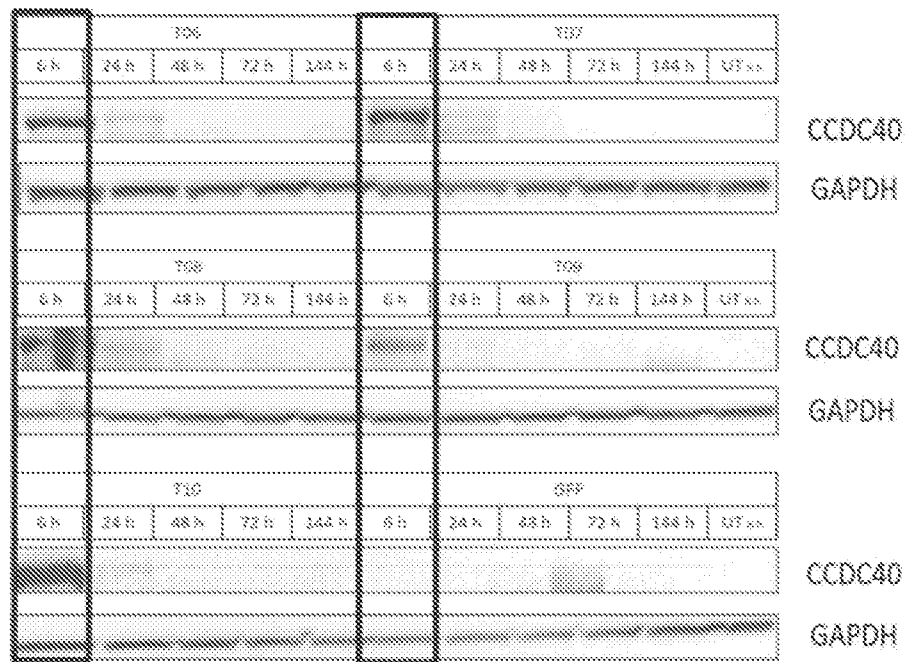


Figura 1

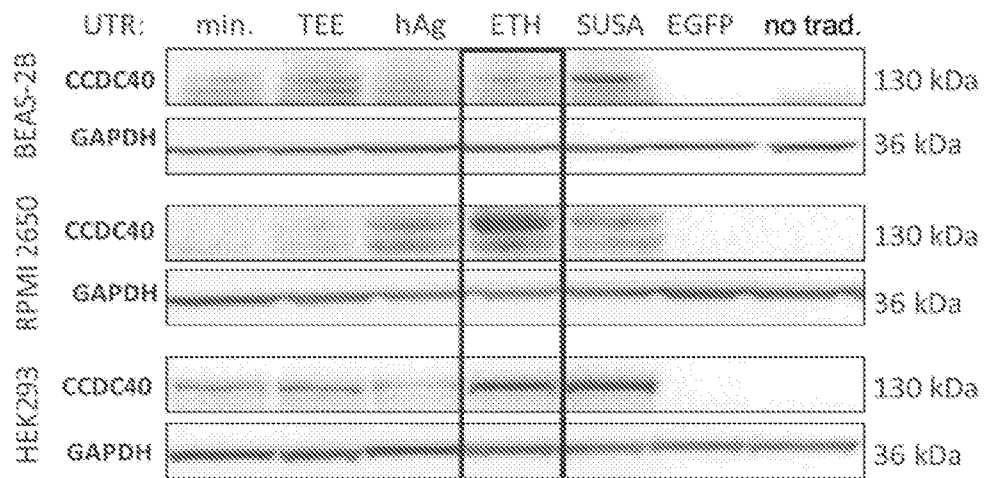


Figura 2

Figura 3

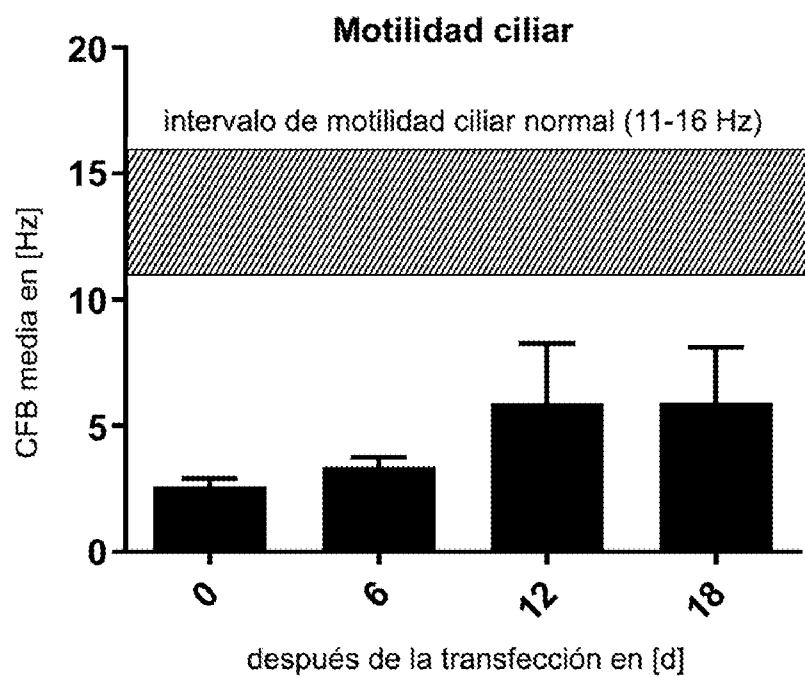


Figura 4

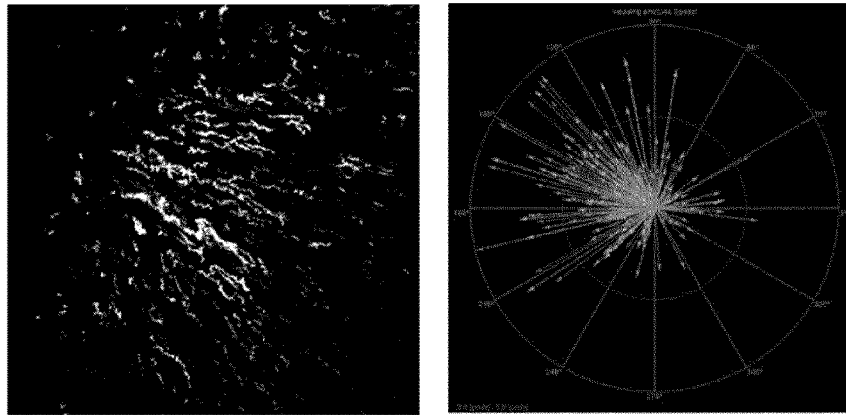


Figura 5

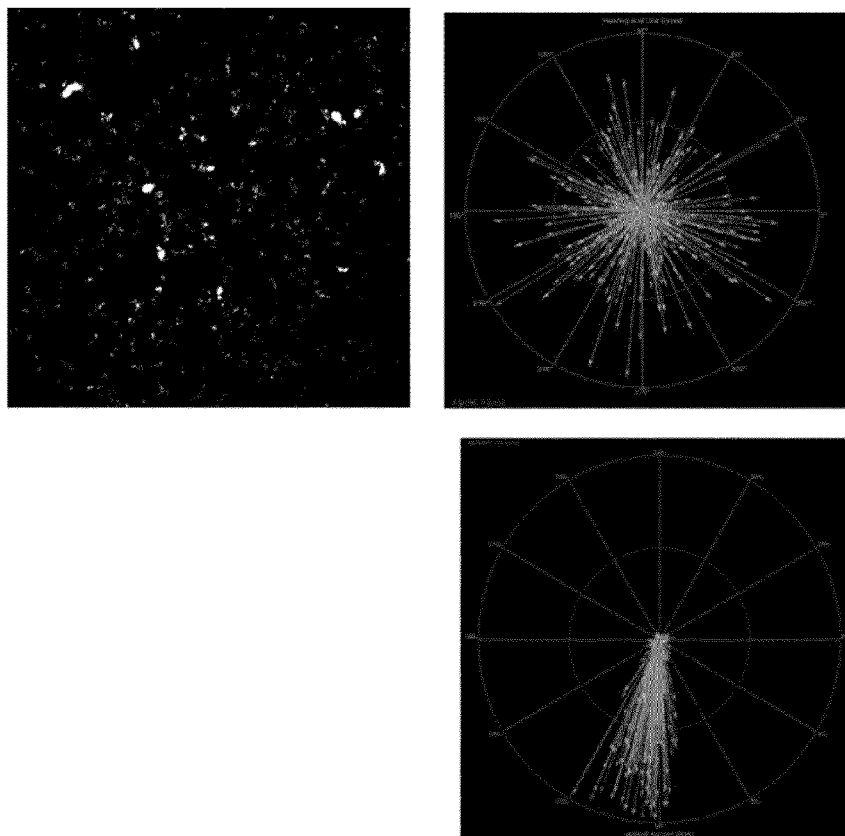
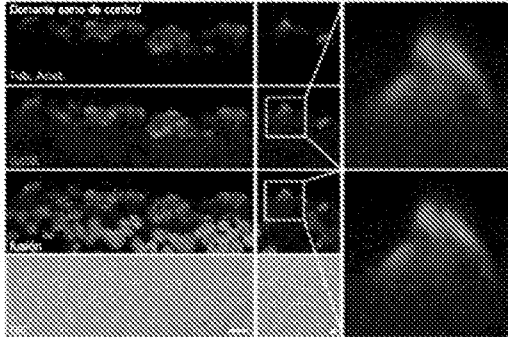
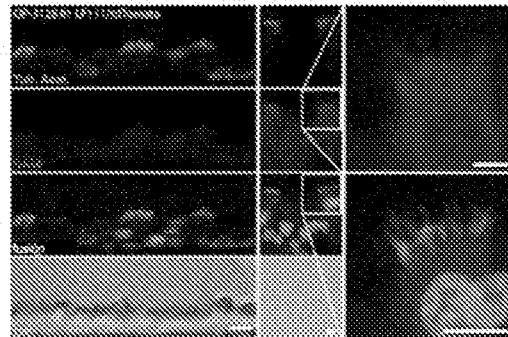


Figura 6

Control sano, no tratado



ALI del paciente, ARNm de tdTomato



ALI del paciente, ARNm de CCDC40

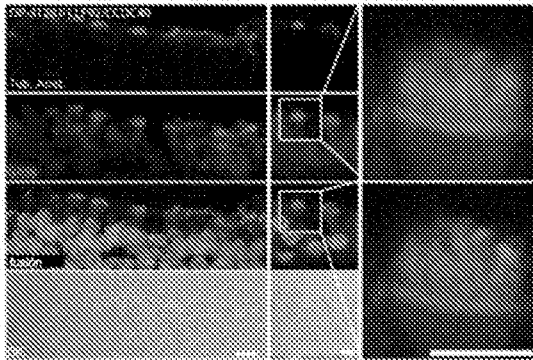


Figura 7

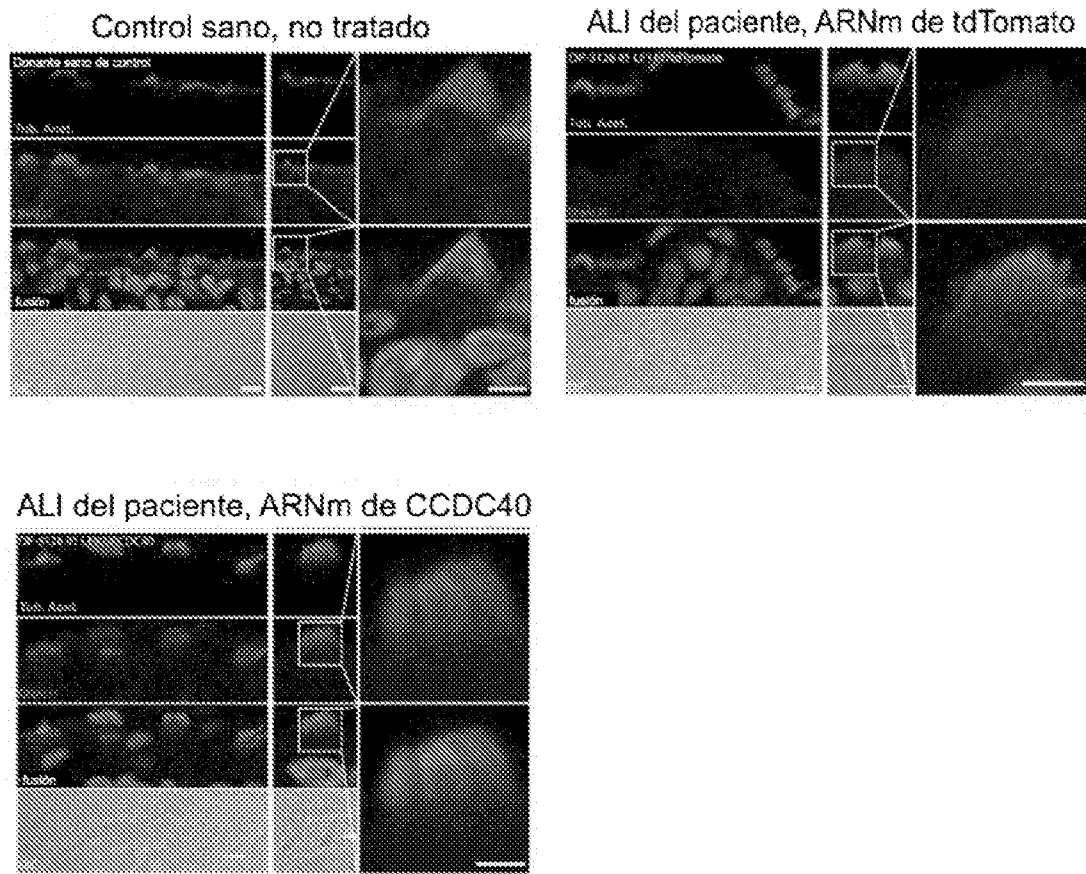
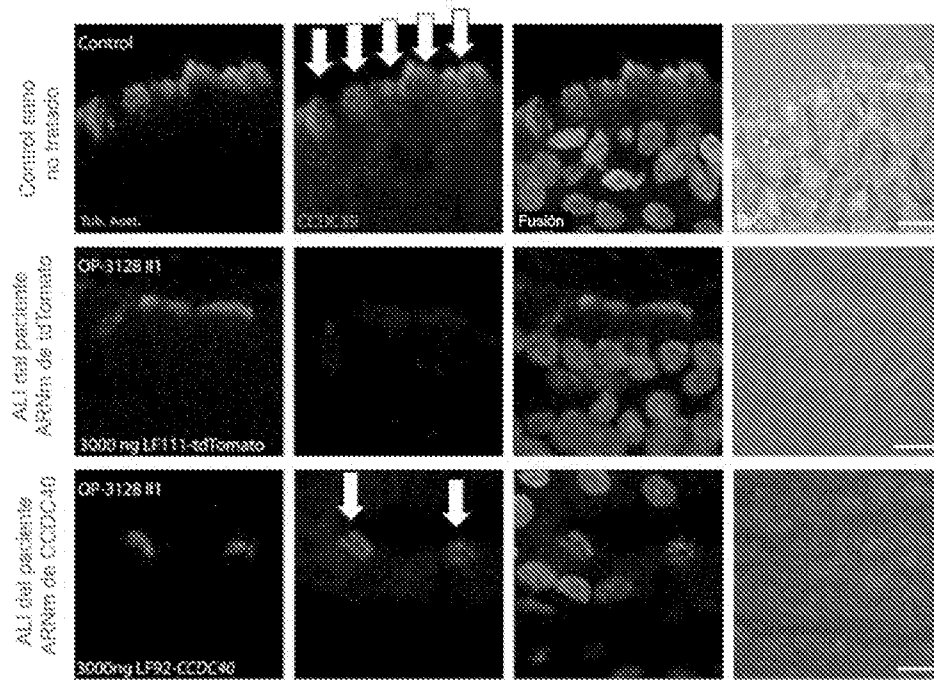


Figura 8



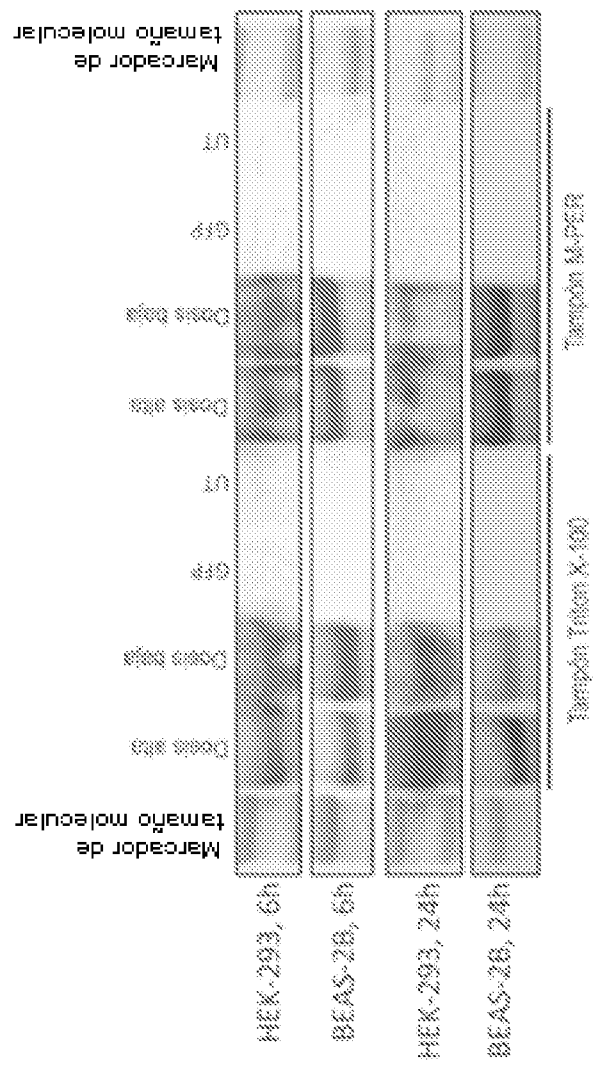


Figura 9

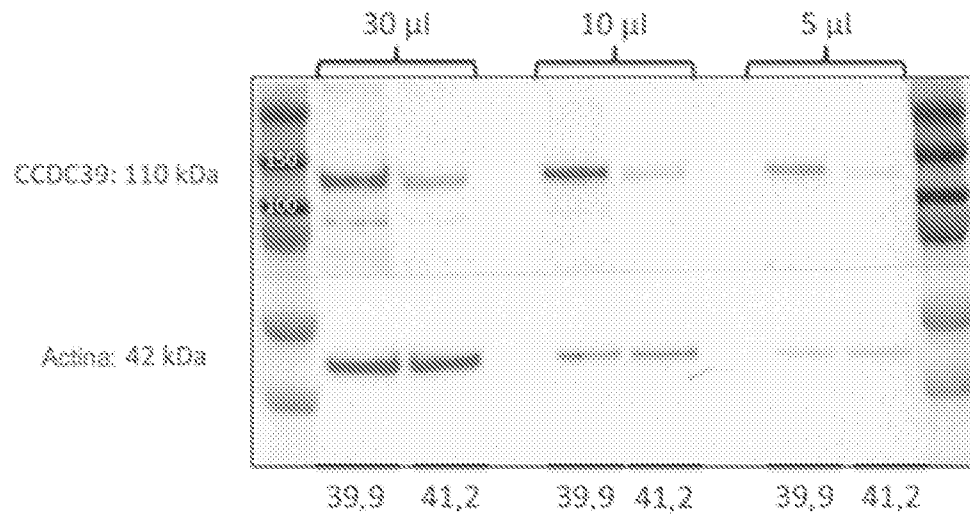


Figura 10

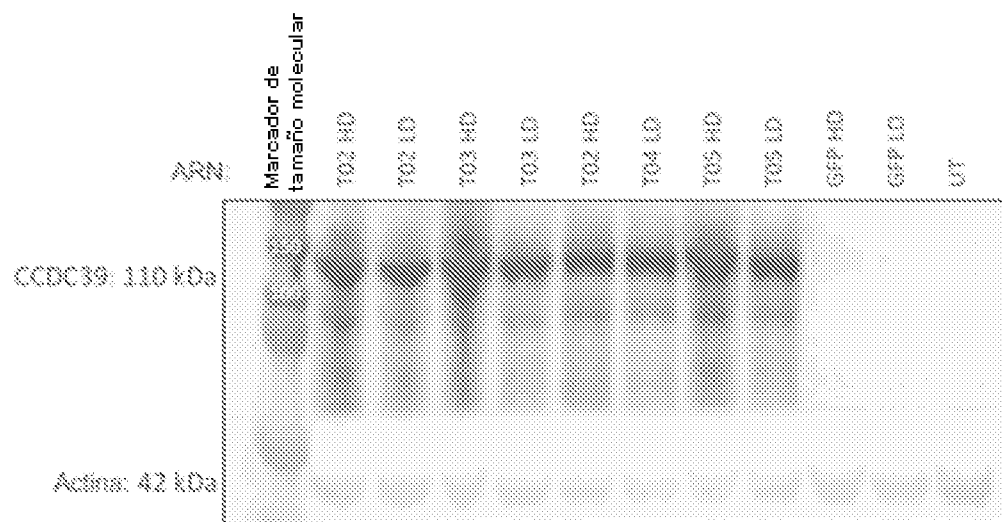


Figura 11

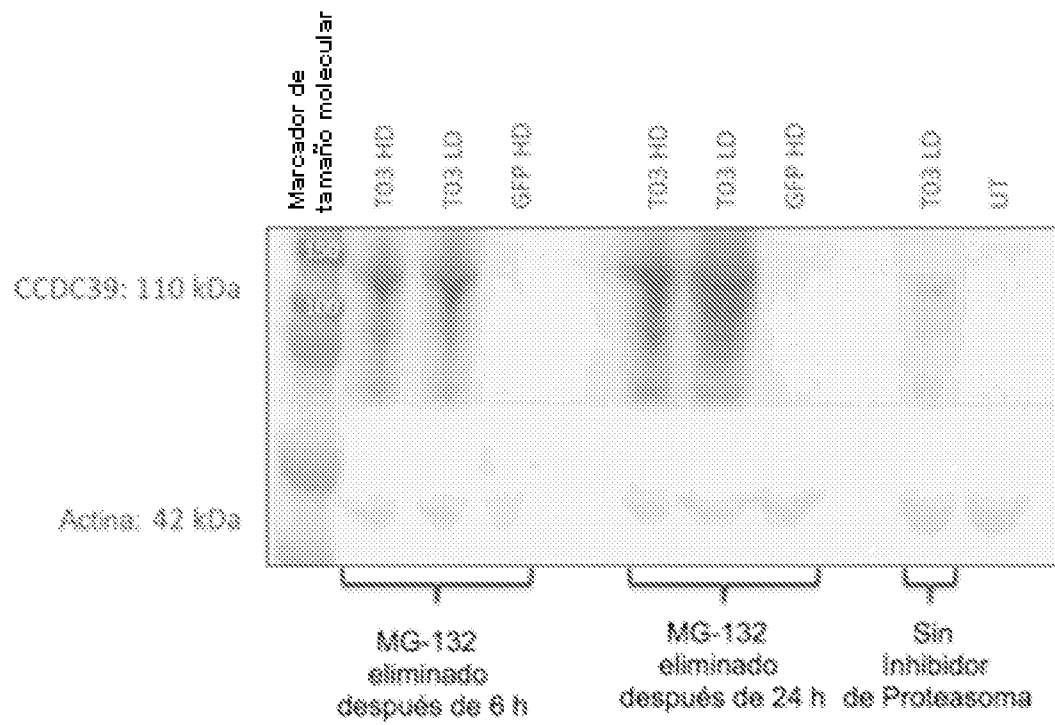


Figura 12