

REIVINDICACIONES

1. Un método para administrar un ARNm a una célula progenitora y/o célula madre hematopoyética (HSPC) o una población de HSPC, el método comprende:
 - a. preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende el ARNm, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG;
 - b. poner en contacto la HSPC o población de HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*; y
 - c. cultivar la HSPC o población de HSPC *in vitro*;mediante lo cual se administra el ARNm a la HSPC o la población de HSPC.
2. Un método para administrar un ARNm a una HSPC, el método comprende:
 - a. preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende el ARNm y un lípido de amina;
 - b. poner en contacto la HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*; y
 - c. cultivar la HSPC *in vitro*;mediante lo cual se administra el ARNm a la HSPC.
3. Un método para administrar un ARNm a una célula madre o una población de células madre, el método comprende:
 - a. preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende el ARNm;
 - b. poner en contacto las células madre o la población de células madre con la composición de LNP preincubada *in vitro*; y
 - c. cultivar la célula madre o la población de células madre *in vitro*;mediante lo cual se administra el ARNm a la célula madre o a la población de células madre.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el ARNm codifica una nucleasa Cas.
5. Un método para introducir un ARNg y un ARNm de nucleasa Cas en una HSPC, el método comprende:
 - a. preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende el ARNm de nucleasa Cas, un ARNg, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG;
 - b. poner en contacto la HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*; y
 - c. cultivar la HSPC;mediante lo cual se introduce el ARNg y ARNm de nucleasa Cas en la HSPC.

6. Un método para producir una HSPC modificada genéticamente *in vitro*, el método comprende:

- a. preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende un ARNm de nucleasa Cas, un ARNg, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG;
 - b. poner en contacto una HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*; y
 - c. cultivar la HSPC *in vitro*;
- mediante lo cual se produce una HSPC modificada genéticamente.

7. Un método para introducir un ARNg y un ARNm de nucleasa Cas en una célula madre, el método comprende:

- a. preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende el ARNm de nucleasa Cas, un ARNg y un lípido de amina;
 - b. poner en contacto la célula madre con la composición de LNP preincubada *in vitro*; y
 - c. cultivar la célula madre;
- mediante lo cual se introduce el ARNg y ARNm de nucleasa Cas en la célula madre.

8. Un método para producir una célula madre modificada genéticamente *in vitro*, el método comprende:

- a. preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende un ARNm de nucleasa Cas, un ARNg y un lípido biodegradable;
 - b. poner en contacto una célula con la composición de LNP preincubada *in vitro*; y
 - c. cultivar la célula madre *in vitro*;
- mediante lo cual se produce la célula madre modificada genéticamente.

9. El método de la reivindicación 4, donde la composición de LNP comprende, además, un ARNg.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-9, donde la nucleasa Cas es una nucleasa Cas clase 2.

11. El método de la reivindicación 10, donde la nucleasa Cas clase 2 es una nucleasa Cas9.

12. El método de la reivindicación 11, donde la nucleasa Cas9 es una Cas9 de *S. pyogenes*.

13. El método de la reivindicación 10, donde la nucleasa Cas clase 2 es una nucleasa Cpf1.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-13, donde el ARNg es un ARN guía dual (ARNgd).
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-13, donde el ARNg es un ARN guía simple (ARNgs).
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, una etapa de lavado después de la etapa de puesta en contacto.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa de puesta en contacto tiene una duración de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 72 horas.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa de puesta en contacto tiene una duración de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 24 horas.
19. El método de la reivindicación 17 o 18, donde la etapa de puesta en contacto tiene una duración de entre alrededor de 2 horas y alrededor de 24 horas.
20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17-19, donde la etapa de puesta en contacto tiene una duración de entre alrededor de 4 horas y alrededor de 12 horas.
21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17-20, donde la etapa de puesta en contacto tiene una duración de entre alrededor de 6 horas y alrededor de 12 horas.
22. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la supervivencia celular posterior a la transfección es de al menos 60%.
23. El método de la reivindicación 22, donde la supervivencia celular posterior a la transfección es de al menos 70%.
24. El método de la reivindicación 22, donde la supervivencia celular posterior a la transfección es de al menos 80%.
25. El método de la reivindicación 22, donde la supervivencia celular posterior a la transfección es de al menos 90%.
26. El método de la reivindicación 22, donde la supervivencia celular posterior a la transfección es de al menos 95%.

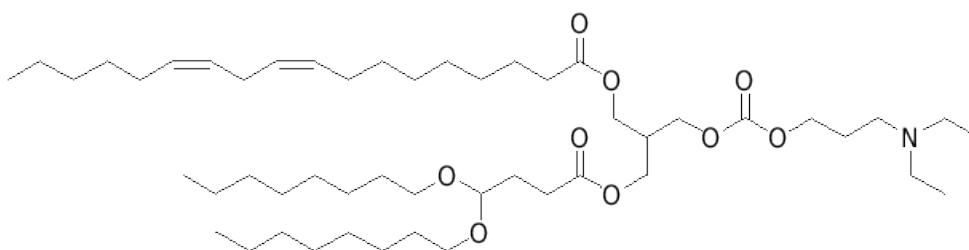
27. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, preincubar un factor de suero y la composición de LNP durante de alrededor de 30 segundos a durante la noche.
28. El método de la reivindicación 27, que comprende preincubar durante alrededor de 1 minuto a 1 hora.
29. El método de la reivindicación 27, que comprende preincubar durante alrededor de 1-30 minutos.
30. El método de la reivindicación 27, que comprende preincubar durante alrededor de 1-10 minutos.
31. El método de la reivindicación 27, que comprende preincubar durante alrededor de 5 minutos.
32. El método de la reivindicación 27 o la reivindicación 31, que comprende preincubar durante alrededor de 5 minutos ± 2 minutos.
33. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la preincubación se produce a alrededor de 4 °C.
34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, donde la preincubación se produce a alrededor de 25°C.
35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, donde la preincubación se produce a alrededor de 37°C.
36. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de preincubación comprende poner en contacto la célula madre, la población de células madre, la HSPC o la población de HSPC con un tampón.
37. El método de la reivindicación 36, donde el amortiguador comprende o consiste en un medio de cultivo de HSPC.
38. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición de LNP se preincuba con suero.
39. El método de la reivindicación 38, donde el suero es suero de mamífero, ratón, primate o humano.

40. El método de la cualquiera de las reivindicaciones 1-37, donde la composición de LNP se preincuba con un factor de suero aislado.
41. El método de la reivindicación 40, donde el factor de suero es un ApoE.
42. El método de la reivindicación 40, donde el factor de suero es seleccionado de ApoE2, ApoE3 y ApoE4.
43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 40-42, donde la ApoE es una proteína humana recombinante.
44. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa de cultivo comprende expandir la célula madre, la población de células madre, la HSPC o la población de HSPC en un amortiguador de cultivo de HSPC.
45. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, cambiar el medio de cultivo entre las etapas de puesta en contacto y cultivo.
46. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa de cultivo comprende poner en contacto la célula madre, la población de células madre, la HSPC o la población de HSPC con un expansor de células madre.
47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, y 5-6 donde la HSPC es una célula madre hematopoyética (HSC).
48. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula madre, la población de células madre, la HSPC o la población de HSPC es una muestra o célula humana.
49. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 y 7-8, en el que la célula madre es una HSPC.
50. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-48, en el que la composición de LNP comprende un primer LNP y un segundo LNP; y el mRNA y el gRNA están coencapsulados en el primer LNP.
51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-48, en el que la composición de LNP comprende un primer LNP y un segundo LNP; el ARNm está encapsulado en el primer LNP; y el ARNg se encapsula en el segundo LNP.

52. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, introducir un ácido nucleico plantilla en la célula madre, la población de células madre, la HSPC o la población de HSPC.

53. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición de LNP comprende: un componente de ARN y un componente lipídico, donde el componente lipídico comprende un lípido de amina, un lípido neutro, un lípido auxiliar y un lípido de ocultación; y donde la relación entre N/P de es de alrededor de 1-10 en la que la relación N / P es una relación de grupos amina cargados positivamente del lípido amina (N) y grupos fosfato cargados negativamente (P) del componente de ARN.

54. El método de la reivindicación 53, donde el componente lipídico comprende el lípido A representado por la siguiente estructura



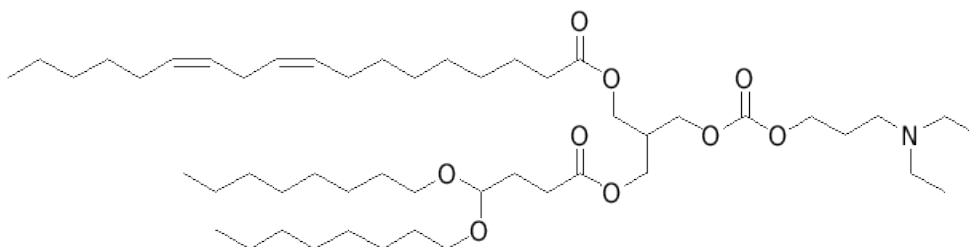
o un análogo de acetal del lípido A.

55. El método de la reivindicación 53, donde el componente lipídico comprende:
alrededor de 40-60 % molar de lípido de amina;
alrededor de 5-15 % molar de lípido neutro;
alrededor de 1,5-10 % molar de lípido de PEG, y
lípido auxiliar y
donde la relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de 3-10.

56. El método de la reivindicación 53, donde el componente lipídico comprende:
alrededor de 50-60 % molar de lípido de amina;
alrededor de 8-10 % molar de lípido neutro;
alrededor de 2,5-4 % molar de lípido de PEG, y
lípido auxiliar y
donde la relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de 3-8.

57. El método de la reivindicación 53, donde el componente lipídico comprende:
alrededor de 50-60 % molar de lípido de amina;
alrededor de 5-15 % molar de DSPC;
alrededor de 2,5-4 % molar de lípido de PEG, y
colesterol y
donde la relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de 3-8.

58. El método de la reivindicación 53, donde el componente lipídico comprende:
48-53 % molar de lípido A representado por la siguiente estructura



alrededor de 8-10 % molar de DSPC;

1,5-10 % molar de lípido de PEG, y

colesterol y

donde la relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de $3-8 \pm 0,2$.

.

59. El método de cualquier reivindicación precedente, donde el ARNm es un ARNm modificado.

60. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ARNm comprende un marco de lectura abierto que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN, donde el marco de lectura abierto tiene un contenido de uridina que oscila de su contenido mínimo de uridina hasta 150% del contenido mínimo de uridina.

61. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ARNm comprende un marco de lectura abierto que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN, donde el marco de lectura abierto tiene un contenido de dinucleótido de uridina que oscila de su contenido mínimo de dinucleótido de uridina hasta 150% del contenido mínimo de dinucleótido de uridina.

62. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ARNm comprende una secuencia con al menos 90% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 4, 10, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66, donde el ARNm comprende un marco de lectura abierto que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN.

63. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-9, donde el ARNg es un ARNg modificado.

64. El método de la reivindicación 63, donde el ARNm comprende una modificación seleccionada de un nucleótido modificado de 2'-O-metil (2'-O-Me), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos; y un nucleótido modificado de 2'-fluoro (2'-F).

65. El método de la reivindicación 63 o 64, donde el ARNm comprende una modificación en uno o más de los cinco primeros nucleótidos del extremo 5'.
66. El método de cualquiera de las reivindicaciones 63-65, donde el ARNm comprende una modificación en uno o más de los cinco últimos nucleótidos del extremo 3'.
67. El método de cualquiera de las reivindicaciones 63-66, donde el ARNm comprende enlaces PS entre los cuatro primeros nucleótidos.
68. El método de cualquiera de las reivindicaciones 63-67, donde el ARNm comprende enlaces PS entre los cuatro últimos nucleótidos.
69. El método de cualquiera de las reivindicaciones 63-68, que comprende, además, nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los tres primeros nucleótidos en el extremo 5'.
70. El método de cualquiera de las reivindicaciones 63-69, que comprende, además, nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los tres últimos nucleótidos en el extremo 3'.
71. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 5-6, and 49 , donde la HSPC o población de HSPC es CD34+.
72. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 5-6, and 49 , donde la HSPC o población de HSPC es CD34+CD90+.
73. Una célula madre o población de células madre modificadas genéticamente producidas mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 3, 7 y 8.
74. Una HSPC o población de HSPC modificadas genéticamente producidas mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5, 6, 47, 49, 71, and 72.
75. El método de cualquier reivindicación precedente de las reivindicaciones 1 a 72, en el que la célula madre, la población de células madre, la HSPC o la población de HSPC es autóloga con respecto a un paciente al que se le administrará la célula madre, la población de células madre, la HSPC, o la población de HSPC.
76. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, en el que la célula madre, la población de células madre, la HSPC o la población de HSPC es alogénica con respecto a un paciente al que se le administrará la célula madre, la población de células madre, la HSPC o la población HSPC.

77. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-72, 75 y 76, que comprende además lograr la edición del gen CRISPR-Cas en la célula madre, la población de células madre, la HSPC o la población HSPC.
78. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-72 y 75-77, que comprende además detectar la edición de genes en la célula madre, la población de células madre, la HSPC o la población HSPC.
79. El método de la reivindicación 77 o 78, donde la edición génica se mide como porcentaje de edición o porcentaje de modificación de ADN.
80. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de edición es de al menos 40%.
81. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de edición es de al menos 60%.
82. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de edición es de al menos 70%.
83. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de edición es de al menos 80%.
84. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de edición es de al menos 90%.
85. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de edición es de al menos 95%.
86. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de modificación de ADN es de al menos 40%.
87. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de modificación de ADN es de al menos 60%.
88. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de modificación de ADN es de al menos 70%.
89. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de modificación de ADN es de al menos 80%.

90. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de modificación de ADN es de al menos 90%.

91. El método de la reivindicación 79, donde el porcentaje de modificación de ADN es de al menos 95%.

92. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-72 y 75-91, en el que la célula madre, la población de células madre, la HSPC o la población HSPC es de una muestra de médula ósea.