

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 198**

51 Int. Cl.:

C12N 15/87 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61M 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2015 PCT/US2015/013949**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15117021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2015 E 15743915 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3099801**

54 Título: **ARN sintético para su uso en el tratamiento de la epidermólisis ampollosa distrófica**

30 Prioridad:

31.01.2014 US 201461934397 P
18.08.2014 US 201462038608 P
28.10.2014 US 201462069667 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2020

73 Titular/es:

FACTOR BIOSCIENCE INC. (100.0%)
8 Museum Way 2204
Cambridge, Massachusetts 02141, US

72 Inventor/es:

ANGEL, MATTHEW y
ROHDE, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 787 198 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

ARN sintético para su uso en el tratamiento de la epidermólisis ampollosa distrófica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a ARN sintético para su uso en el tratamiento de la epidermólisis ampollosa distrófica

10 **Antecedentes**

ARN sintético y agentes terapéuticos de ácido nucleico

15 El ácido ribonucleico (ARN) está presente de manera ubicua tanto en células procariotas como eucariotas, donde codifica información genética en la forma de ARN mensajero, se une y transporta aminoácidos en forma de ARN de transferencia, ensambla aminoácidos en proteínas en la forma de ARN ribosómico y realiza otras numerosas funciones, inclusive la regulación de la expresión génica en las formas de micro ARN y ARN no codificante. El ARN puede producirse sintéticamente mediante métodos que incluyen síntesis química directa y transcripción *in vitro*, y puede administrarse a pacientes para uso terapéutico. No obstante, las moléculas sintéticas de ARN descritas anteriormente son inestables y desencadenan una respuesta inmunitaria inherente potente en células humanas. Además, no se describieron anteriormente los métodos para una administración no viral eficaz de ácidos nucleicos a pacientes, órganos, tejidos y células *in vivo*. Las diversas desventajas de las tecnologías existentes de ARN sintético y métodos para la administración de ácidos nucleicos los tornan indeseables para uso cosmético o terapéutico.

25 *Reprogramación de células y terapias basadas en células*

Se pueden reprogramar las células mediante su exposición a estímulos extracelulares específicos y/o mediante la expresión ectópica de proteínas específicas, micro ARN, etc. Si bien se han descrito anteriormente varios métodos de reprogramación, la mayoría de los que se basan en la expresión ectópica requieren la introducción de ADN exógeno, lo que puede acarrear riesgos de mutación. Se han descrito métodos de reprogramación libres de ADN basados en la administración directa de proteínas de reprogramación. Sin embargo, estos métodos son muy ineficaces y no son confiables para su uso comercial. Además, se han descrito métodos de reprogramación basados en ARN (ver, por ejemplo, Angel. MIT Thesis. 2008. 1-56; Angel et ál. PLoS ONE. 2010. 5,107; Warren et ál. Cell Stem Cell. 2010. 7,618-630; Angel. MIT Thesis. 2011. 1-89; y Lee et ál. Cell. 2012. 151,547-558; cuyo contenido se incorpora en la presente en su totalidad mediante esta referencia). Sin embargo, los métodos existentes de reprogramación basados en ARN son lentos, poco fiables e ineficaces cuando se realizan en células adultas, requieren muchas transfecciones (que da como resultado un costo significativo y da lugar a errores), pueden reprogramar solo una cantidad limitada de tipos de células, pueden reprogramar células solamente a una cantidad limitada de tipos de células, requieren el uso de inmunosupresores y requieren el uso de múltiples componentes derivados de seres humanos, incluido HSA derivado de la sangre y fibroblastos nutrientes humanos. Las diversas desventajas de los métodos de reprogramación basados en ARN descritos anteriormente los hacen inadecuados para su uso *in vivo*.

Edición génica

45 Diversas proteínas de origen natural contienen dominios de unión al ADN que pueden reconocer secuencias de ADN específicas, por ejemplo, dedos de cinc (ZF, por sus siglas en inglés) y efectores similares al activador de la transcripción (TALE, por sus siglas en inglés). Se pueden utilizar proteínas de fusión que contengan uno o más de estos dominios de unión al ADN y el dominio de escisión de endonucleasa FokI para crear una ruptura de cadena doble en una región deseada del ADN en una célula (véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense US 2012/0064620, la publicación de solicitud de patente estadounidense solicitud de patente estadounidense US 2011/0239315, la patente estadounidense n.º 8.470.973, la publicación de solicitud de patente estadounidense solicitud de patente estadounidense US 2013/0217119, la patente estadounidense n.º 8.420.782, la publicación de solicitud de patente estadounidense solicitud de patente estadounidense US 2011/0301073, la publicación de solicitud de patente estadounidense solicitud de patente estadounidense US 2011/0145940, la patente estadounidense n.º 8.450.471, la patente estadounidense n.º 8.440.431, la patente estadounidense n.º 8.440.432 y la publicación de solicitud de patente estadounidense solicitud de patente estadounidense 2013/0122581). El uso de las TALEN para la reparación dirigida por homología de una mutación génica se ha descrito en Osborn *et al.* (Molecular Therapy (2013), 21(6):1151-1159). Sin embargo, los métodos actuales para la edición génica en células son ineficaces e implican un riesgo de mutagénesis descontrolada, lo que los hace inadecuados para su uso terapéutico y en la investigación. Los métodos de edición génica de células somáticas sin ADN, ni los métodos de edición génica y reprogramación simultánea o secuencial de células somáticas no han sido analizados previamente. Además, los métodos para la edición génica en células en pacientes (es decir, *in vivo*) tampoco han sido analizados previamente, y el desarrollo de dichos métodos se ha visto limitado por la falta de objetivos aceptables, administración ineficaz, expresión ineficaz de las proteínas de edición génica, edición génica ineficaz por las proteínas de edición génica expresadas, debida en parte a la unión insuficiente de dominios de unión al ADN, efectos excesivos fuera del objetivo, debidos en parte a la dimerización no dirigida del dominio de escisión FokI y especificidad insuficiente de los dominios

de unión al ADN y otros factores. Por último, el uso de la edición génica en un tratamiento antibacteriano, antiviral o contra el cáncer no ha sido analizado previamente.

5 Por consiguiente, sigue siendo necesaria la mejora de métodos y composiciones para la producción y administración de ácidos nucleicos a células, tejidos, órganos y pacientes.

Compendio de la invención

10 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

10 La presente divulgación proporciona, en parte, composiciones, métodos, artículos y dispositivos para administrar ácidos nucleicos a células, tejidos, órganos y pacientes, métodos para inducir que las células expresen proteínas, métodos, artículos y dispositivos para producir estas composiciones, métodos, artículos y dispositivos, y composiciones y artículos que incluyen células, organismos, cosméticos y agentes terapéuticos producidos mediante el uso de estas composiciones, métodos, artículos y dispositivos. A diferencia de los métodos informados previamente, determinadas modalidades no implican exponer las células a ADN exógeno o a materiales derivados de animales o alogénicos, lo cual hace que los productos elaborados de acuerdo con los métodos de la presente divulgación sean útiles para aplicaciones terapéuticas y cosméticas.

20 En algunos aspectos, se divulga un método para expresar una proteína en una población de células de un paciente, que comprende introducir un ARN en la población de células, donde el ARN comprende uno o más nucleótidos no canónicos que no inducen una respuesta inmunitaria celular significativa y no reducen sustancialmente la expresión de proteínas. En algunos aspectos, al menos 50 %, al menos 75 % o al menos 90 % de los nucleótidos no canónicos se selecciona de uno o más de 5-hidroxicitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-carboxicitidina, 5-formilcitidina, 5-hidroxiuridina, 5-hidroximetiluridina, 5-carboxiuridina y 5-formiluridina o, en algunas modalidades se selecciona de uno o más de 5-hidroximetilcitidina, 5-carboxicitidina y 5-formilcitidina. Otros aspectos se refieren a elementos adicionales de ARN, por ejemplo, una estructura de casquete 5', una cola poli(A) 3', y 5'-UTR y/o 3'-UTR, que comprende opcionalmente uno o más de una secuencia de consenso de Kozak, una secuencia que aumenta la estabilidad de ARN in vivo (tal como, a modo ilustrativo, una 5'-UTR de alfa globina o beta globina).

30 En algunos aspectos, se proporcionan parches de administración de ácido nucleico. En un aspecto, se proporcionan dispositivos para administrar ácidos nucleicos mediante el uso de campos eléctricos. Otros aspectos conciernen a métodos y composiciones para la administración de ácidos nucleicos a la piel. Otros aspectos adicionales conciernen a métodos y composiciones para la expresión de proteínas en la piel.

35 En un aspecto, se divulgan métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedades y afecciones en humanos, inclusive, de modo no taxativo, tratamientos profilácticos, tratamientos para enfermedades raras, inclusive, de modo no taxativo, enfermedades dermatológicas raras, y tratamientos para su uso en medicina estética y dermatología médica. En otro aspecto, se divulgan cosméticos que comprenden ácidos nucleicos. Aun otros aspectos se refieren a métodos y composiciones para alterar la pigmentación, por ejemplo, para el tratamiento de trastornos de pigmentación. Aun otros aspectos se refieren a métodos y composiciones para potenciar la cicatrización, inclusive, de modo no taxativo, cicatrización como respuesta a una herida o cirugía. Otros aspectos se refieren a ácidos nucleicos que comprenden uno o más nucleótidos no canónicos. En un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que comprenden, por ejemplo, uno o más de 5-hidroxicitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-carboxicitidina, 5-formilcitidina, 5-hidroxiuridina, 5-hidroximetiluridina, 5-carboxiuridina y 5-formiluridina o, en algunas modalidades se selecciona de uno o más de 5-hidroximetilcitidina, 5-carboxicitidina y/o 5-formilcitidina.

50 Las composiciones pueden alterar, modificar y/o cambiar la apariencia de un miembro del sistema integumentario de un sujeto tal como, de modo no taxativo, piel, cabello y uñas. Dicha alteración, modificación y/o cambio puede ser en el contexto de métodos de tratamiento y/o usos terapéuticos que se describen en la presente que incluyen, a modo de ejemplo no taxativo, tratamientos dermatológicos y procedimientos cosméticos.

55 En algunos aspectos, se proporcionan moléculas de ARN sintéticas con baja toxicidad y alta eficacia de traducción. En un aspecto, se proporciona un medio de cultivo celular para la transfección *in vivo* de alta eficacia, reprogramación y edición génica en células. Otros aspectos se refieren a métodos para producir moléculas sintéticas de ARN que codifican proteínas de reprogramación. Otros aspectos adicionales se refieren a métodos para producir moléculas sintéticas de ARN que codifica proteínas de edición génica.

60 En un aspecto, se proporcionan proteínas de edición génica de alta eficacia que comprende dominios de escisión de nucleasa modificados genéticamente. En otro aspecto, se proporcionan proteínas de edición génica de alta fidelidad que comprenden dominios de escisión de nucleasa modificados genéticamente. Otros aspectos se refieren a proteínas de edición génica de alta eficacia que comprenden dominios de unión al ADN modificados genéticamente. Los aspectos adicionales se refieren a proteínas de edición génica de alta fidelidad que comprenden dominios de unión al ADN modificados genéticamente. Otros aspectos adicionales se refieren a proteínas de edición génica que comprenden secuencias de repeticiones modificadas genéticamente. Algunos aspectos se refieren a métodos para alterar la secuencia de ADN de una célula mediante la transfección de la célula o la inducción para que la célula

expresen una proteína de edición génica. Otros aspectos se refieren a métodos para alterar la secuencia del ADN de una célula que está presente en un cultivo *in vitro*. Otros aspectos adicionales se refieren a métodos para alterar la secuencia del ADN de una célula que está presente *in vivo*.

5 En algunos aspectos, se proporcionan métodos para tratar el cáncer que comprenden administrarle a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de edición génica o un ácido nucleico que codifica una proteína de edición génica. En un aspecto, la proteína de edición génica es capaz de alterar la secuencia de ADN de un gen asociado con el cáncer. En otro aspecto, el gen asociado con el cáncer es el gen BIRC5. Aun otros aspectos se refieren a agentes terapéuticos que comprenden ácidos nucleicos y/o células y métodos para usar los agentes terapéuticos que comprenden ácidos nucleicos y/o células para el tratamiento, por ejemplo, de diabetes tipo 1, enfermedad cardíaca, inclusive las cardiomiopatías isquémica y dilatada, degeneración macular, enfermedad de Parkinson, fibrosis quística, anemia de células falciformes, talasemia, anemia de Fanconi, inmunodeficiencia combinada grave, neuropatía sensorial hereditaria, xeroderma pigmentoso, enfermedad de Huntington, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, cáncer y enfermedades infecciosas, inclusive hepatitis y VIH/SIDA. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos comprenden ARN sintético. En otros aspectos, los ácidos nucleicos son introducidos en células mediante el uso de un virus. En algunos aspectos, el virus es un virus competente para la replicación. En otros aspectos, el virus es un virus incompetente para la replicación.

20 Los detalles de la invención se establecen en la descripción adjunta que figura a continuación. Si bien pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o experimentación de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales ilustrativos. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones. En la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares también incluyen el plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Descripción detallada de las figuras

30 Las figuras que no pertenecen a la invención son solo para fines ilustrativos.

La Figura 1 representa el ARN que codifica la proteína elastina humana y contiene adenosina, guanosa al 50 %, 7-deazaguanosina al 50 %, uridina al 60 %, 5-metiluridina al 40 % y 5-metilcitosina, resuelto en un gel desnaturalizante de formaldehído-agarosa.

35 **La Figura 2** representa fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios transfectados con el ARN de la **Figura 1**.

La Figura 3 representa el resultado de un análisis inmunocitoquímico de los fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios de la **Figura 2** mediante el uso de un anticuerpo que se dirige a la proteína elastina humana.

40 **La Figura 4** representa fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios transfectados con ARN sintético que comprende citidina, 5-metilcitosina ("5mC"), 5-hidroximetilcitosina ("5hmC"), 5-carboxicitidina ("5cC") o 5-formilcitosina ("5fC") y codifica la proteína Oct4. Se fijaron las células y se tiñeron para la proteína Oct4 24 horas después de la transfección.

45 **La Figura 5** representa fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios transfectados con ARN sintético que comprende 5-hidroximetilcitosina y codifica la proteína verde fluorescente ("GFP", por sus siglas en inglés). Se tomaron imágenes de las células 24 horas luego de la transfección.

50 **La Figura 6** representa una región ventral del antebrazo de un sujeto humano masculino saludable de 33 años tratado con ARN sintético que comprende 5-hidroximetilcitosina ("5hmC") y codifica la GFP. Las flechas indican células fluorescentes.

55 **La Figura 7** representa una región ventral del antebrazo de un paciente masculino saludable de 33 años tratado con ARN sintético que comprende 5-hidroximetilcitosina ("5hmC") y codifica la GFP. El panel superior muestra un área sin tratamiento del mismo antebrazo, mientras que los paneles inferiores muestran dos campos dentro de la misma área de tratamiento. Las células fluorescentes (indicadas con flechas) son claramente visibles en los paneles inferiores.

60 **La Figura 8** representa fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios transfectados con ARN sintético que comprende 5-metiluridina y 5-hidroximetilcitosina y codifica la proteína indicada. Se fijaron las células y se tiñeron mediante el uso de anticuerpos dirigidos a la proteína indicada 48 horas después de la transfección.

65 **La Figura 9** representa fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios transfectados con ARN sintético que comprende 5-metiluridina y 5-hidroximetilcitosina y codifica la tirosinasa humana. Se fijaron las células y se tiñeron mediante el uso de un anticuerpo dirigido a la tirosinasa humana 24 horas después de la transfección.

La **Figura 10** representa melanocitos epidérmicos humanos primarios.

La **Figura 11** representa fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios transfectados con ARN sintético que comprende 5-hidroximetilcitosina y codifica las proteínas indicadas.

5 La **Figura 12** representa fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios transfectados de forma diaria con ARN sintético que comprende 5-hidroximetilcitosina y codifica la tirosinasa humana. Se indica sobre cada muestra la cantidad de transfecciones. Se tomaron imágenes de las células 48 horas después de la transfección final.

10 La **Figura 13** representa fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios transfectados de forma diaria con ARN sintético que comprende los nucleótidos indicados y codifica la tirosinasa humana. Se tomaron imágenes de las células 48 horas después de la transfección.

15 La **Figura 14** representa la expresión de IFNB1 y producción de pigmentos en fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios transfectados con ARN sintético que comprende los nucleótidos indicados y codifica la tirosinasa humana. Los valores se normalizaron a la muestra transfectada con ARN sintético que comprende únicamente nucleótidos canónicos ("A,G,U,C"). Se utilizó GAPDH como control de carga. Las barras de error indican el error estándar (n = 2).

20 La **Figura 15** representa la expresión de los genes indicados, medidos tal como en la **Figura 14**.

La **Figura 16** representa una región ventral del antebrazo de un sujeto humano masculino saludable de 33 años tratado con ARN sintético que comprende 5-metiluridina y 5-hidroximetilcitosina y codifica la tirosinasa humana (panel superior), y una efélides en la parte ventral del antebrazo del mismo sujeto (panel inferior). Se usó la misma amplificación para ambas imágenes.

25 La **Figura 17** representa fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios transfectados con ARN sintético que comprende 5-hidroximetilcitosina y codifica colágeno I (A1) ("+ COL1 RNA"). Se fijaron las células y se tiñeron mediante el uso de un anticuerpo dirigido al colágeno I entre 24 y 72 horas después de la transfección. Se muestran dos campos representativos para cada una de: las células transfectadas y las células sin transfectar ("Neg."). Las flechas indican depósitos extracelulares de colágeno I.

30 La **Figura 18** representa fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios transfectados con ARN sintético que comprende 5-hidroximetilcitosina y codifica colágeno VII (A1) ("+ COL7 RNA"). Se fijaron las células y se tiñeron mediante el uso de un anticuerpo dirigido al colágeno I entre 24 y 72 horas después de la transfección. Se muestra un campo representativo para cada una de: las células transfectadas y las células sin transfectar ("Neg.").

Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Definiciones

El término "molécula" significa una entidad molecular (molécula, ion, complejo, etc.).

45 La expresión "molécula de ARN" significa a una molécula que comprende ARN.

La expresión "molécula sintética de ARN" significa una molécula de ARN que se produce fuera de una célula o que se produce dentro de una célula utilizando bioingeniería, a modo de ejemplo no taxativo, una molécula de ARN que se produce en una reacción de transcripción *in vitro*, una molécula de ARN que se produce mediante síntesis química directa o una molécula de ARN que se produce en una célula de *E. coli* genéticamente modificada.

50 El término "transfección" significa poner en contacto una célula con una molécula, donde la molécula es internalizada por la célula.

55 La expresión "tras la transfección" significa un período durante o después de la transfección.

La expresión "reactivo de transfección" significa una sustancia o a una mezcla de sustancias que se asocia con una molécula y que facilita la administración de la molécula y/o la internalización de la molécula por una célula, a modo de ejemplo no taxativo, un lípido catiónico, un polímero cargado o un péptido de penetración celular.

60 La expresión "transfección basada en reactivo" significa una transfección que utiliza un reactivo de transfección.

La expresión "medio de cultivo celular" significa un medio que se puede utilizar para el cultivo celular, a modo de ejemplo no taxativo, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) o DMEM + suero fetal bovino (FBS) al 10 %, aunque el medio se utilice *in vitro* o *in vivo*.

La expresión "medio de formación de complejos" significa un medio al cual se le añade un reactivo de transfección y una molécula que se transfectará, y donde el reactivo de transfección se asocia con la molécula que se transfectará.

5 La expresión "medio de transfección" significa un medio que puede utilizarse para la transfección, a modo de ejemplo no taxativo, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), DMEM/F12, solución salina o agua, aunque el medio se utilice *in vitro* o *in vivo*.

10 La expresión "proteína recombinante" significa una proteína o un péptido que no se produce en los animales ni en los seres humanos. Algunos ejemplos no taxativos incluyen transferrina humana producida en bacterias, fibronectina humana producida en un cultivo *in vitro* de células de ratón y albúmina sérica humana producida en una planta de arroz.

15 La expresión "portador lipídico" significa una sustancia que puede aumentar la solubilidad de un lípido o de una molécula soluble en lípidos en una solución acuosa, a modo de ejemplo no taxativo, albúmina de suero humano o metil-beta-ciclodextrina.

20 La expresión "proteína Oct4" se refiere a una proteína que es codificada por el gen POU5F1, o una variante natural o modificada genéticamente, miembro de la familia, ortólogo, fragmento o construcción de fusión de estas, a modo de ejemplo no taxativo, proteína Oct4 humana (SEQ ID NO: 8), proteína Oct4 de ratón, proteína Oct1, una proteína codificada por el pseudogén 2 POU5F1, un dominio de unión al ADN de la proteína Oct4 o una proteína de fusión de Oct4-GFP. En algunas modalidades la proteína Oct4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70 % con la SEQ ID NO: 8, o en otras modalidades, al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, la proteína Oct4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene entre 1 y 20 inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos (colectivamente) con respecto a la SEQ ID NO: 8. O, en otras modalidades, la proteína Oct4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene entre 1 y 15 o entre 1 y 10 inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos (colectivamente) con respecto a la SEQ ID NO: 8.

30 La expresión "proteína Sox2" se refiere a una proteína que es codificada por el gen Sox2, o una variante natural o modificada genéticamente, miembro de la familia, ortólogo, fragmento o construcción de fusión de estas, a modo de ejemplo no taxativo, proteína Sox2 humana (SEQ ID NO: 9), proteína Sox2 de ratón, un dominio de unión al ADN de la proteína Sox2 o una proteína de fusión Sox2-GFP. En algunas modalidades la proteína Sox2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70 % con la SEQ ID NO: 9, o en otras modalidades, al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, la proteína Sox2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene entre 1 y 20 inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos (colectivamente) con respecto a la SEQ ID NO: 9. O, en otras modalidades, la proteína Sox2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene entre 1 y 15 o entre 1 y 10 inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos (colectivamente) con respecto a la SEQ ID NO: 9.

40 La expresión "proteína Klf4" se refiere a una proteína que es codificada por el gen Klf4, o una variante natural o modificada genéticamente, miembro de la familia, ortólogo, fragmento o construcción de fusión de estas, a modo de ejemplo no taxativo, proteína Klf4 humana (SEQ ID NO: 10), proteína Klf4 de ratón, un dominio de unión al ADN de la proteína Klf4 o una proteína de fusión Klf4-GFP. En algunas modalidades la proteína Klf4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70 % con la SEQ ID NO: 10, o en otras modalidades, al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, la proteína Klf4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene entre 1 y 20 inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos (colectivamente) con respecto a la SEQ ID NO: 10. O, en otras modalidades, la proteína Klf4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene entre 1 y 15 o entre 1 y 10 inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos (colectivamente) con respecto a la SEQ ID NO: 10.

50 La expresión "proteína c-Myc" se refiere a una proteína que es codificada por el gen MYC, o una variante natural o modificada genéticamente, miembro de la familia, ortólogo, fragmento o construcción de fusión de estas, a modo de ejemplo no taxativo, proteína c-Myc humana (SEQ ID NO: 11), proteína c-Myc de ratón, proteína l-Myc, proteína c-Myc (T58A), un dominio de unión al ADN de la proteína c-Myc o una proteína de fusión c-Myc-GFP. En algunas modalidades la proteína c-Myc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70 % con la SEQ ID NO: 11, o en otras modalidades, al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 11. En algunas modalidades, la proteína c-Myc comprende un aminoácido que tiene entre 1 y 20 inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos, (colectivamente) con respecto a la SEQ ID NO: 11. O, en otras modalidades, la proteína c-Myc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene entre 1 y 15 o entre 1 y 10 inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos (colectivamente) con respecto a la SEQ ID NO: 11.

65 El término "reprogramación" significa provocar un cambio en el fenotipo de una célula, a modo de ejemplo no taxativo, provocar que un progenitor de células β se diferencie en una célula β madura, provocar que un fibroblasto se desdiferencie en una célula madre pluripotente, provocar que un queratinocito se transdiferencie en una célula madre cardíaca, provocar que se alarguen los telómeros de una célula o provocar que crezca el axón de una neurona.

La expresión "factor de reprogramación" significa una molécula que, cuando se pone en contacto con una célula y/o cuando la célula expresa la molécula, puede, ya sea sola o en combinación con otras moléculas, causar la reprogramación, a modo de ejemplo no taxativo, de la proteína Oct4.

5 El término "nutriente" significa una célula que se puede utilizar para acondicionar un medio o para sustentar de otro modo el crecimiento de otras células en cultivo.

El término "acondicionar" significa poner en contacto uno o más nutrientes con un medio.

10 El término "ácido graso" significa una molécula que comprende una cadena alifática de al menos dos átomos de carbono, a modo de ejemplo no taxativo, ácido linoleico, ácido α -linoléico, ácido octanoico, un leucotrieno, una prostaglandina, colesterol, un glucocorticoide, una resolvina, una protectina, un tromboxano, una lipoxina, una maresina, un esfingolípido, un triptófano, un N-acetil triptófano o una sal, un éster metílico o derivado de estos.

15 La expresión "ácido graso de cadena corta" significa un ácido graso que comprende una cadena alifática de entre dos y 30 átomos de carbono.

El término "albúmina" significa una proteína que es altamente soluble en agua, a modo de ejemplo no taxativo, albúmina de suero humano.

20 La expresión "molécula asociada" significa una molécula que no está unida por enlace covalente a otra molécula.

25 La expresión "molécula asociada a un componente de albúmina" significa una o más moléculas que están unidas a un polipéptido de albúmina, a modo de ejemplo no taxativo, lípidos, hormonas, colesterol, iones de calcio, etc., que están unidos a un polipéptido de albúmina.

30 La expresión "albúmina tratada" significa albúmina tratada para reducir, eliminar, reemplazar o desactivar de otro modo la molécula asociada a un componente de albúmina, a modo de ejemplo no taxativo, albúmina de suero humano que se incuba a una temperatura elevada, albúmina de suero humano que se pone en contacto con octanoato de sodio o albúmina de suero humano que se pone en contacto con un material poroso.

35 La expresión "resina de intercambio iónico" significa un material que, cuando se pone en contacto con una solución que contiene iones, puede reemplazar a uno o más de los iones por uno o más iones diferentes, a modo de ejemplo no taxativo, un material que puede reemplazar uno o más iones de calcio por uno o más iones de sodio.

El término "célula germinal" significa una célula de esperma o a un óvulo.

40 La expresión "célula madre pluripotente" significa una célula que se puede diferenciar en células de las tres capas germinales (endoderma, mesoderma y ectoderma) *in vivo*.

La expresión "célula somática" significa una célula que no es una célula madre pluripotente ni una célula germinal, a modo de ejemplo no taxativo, una célula de la piel.

45 La expresión "célula productora de insulina que responde a la glucosa" significa una célula que, cuando se expone a determinada concentración de glucosa, puede producir y/o secretar una cantidad de insulina que es diferente (ya sea menor o mayor) de la cantidad de insulina que la célula produce y/o secreta cuando la célula se expone a una concentración de glucosa diferente, a modo de ejemplo no taxativo, una célula β .

50 El término "célula hematopoyética" significa una célula sanguínea o una célula que se puede diferenciar en una célula sanguínea, a modo de ejemplo no taxativo, una célula madre hematopoyética o un leucocito.

El término "célula cardíaca" significa una célula del corazón o a una célula que se puede diferenciar en una célula del corazón, a modo de ejemplo no taxativo, una célula madre cardíaca o un cardiomiocito.

55 El término "célula de la retina" significa una célula de la retina o a una célula que se puede diferenciar en una célula de la retina, a modo de ejemplo no taxativo, una célula del epitelio pigmentario retinal.

60 El término "célula de la piel" significa una célula que normalmente se encuentra en la piel, a modo de ejemplo no taxativo, un fibroblasto, un queratinocito, un melanocito, un adipocito, una célula madre mesenquimal, una célula madre adiposa o una célula sanguínea.

65 La expresión "agonista de señalización de Wnt" significa una molécula que puede realizar una o más de las funciones biológicas de uno o más miembros de la familia Wnt de proteínas, a modo de ejemplo no taxativo, Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a o 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina.

La expresión "agonista de señalización de IL-6" significa una molécula que puede realizar una o más de las funciones

biológicas de la proteína IL-6, a modo de ejemplo no taxativo, la proteína IL-6 o el receptor IL-6 (también denominado receptor IL-6 soluble, IL-6R, IL-6R alfa, etc.).

5 La expresión "agonista de señalización de TGF- β " significa una molécula que puede realizar una o más de las funciones biológicas de uno o más miembros de la superfamilia TGF- β de proteínas, a modo de ejemplo no taxativo, TGF- β 1, TGF- β 3, Activina A, BMP-4 o Nodal.

10 El término "inmunosupresor" significa una sustancia que puede suprimir uno o más aspectos de un sistema inmunológico y que no está presente normalmente en un mamífero, a modo de ejemplo no taxativo, B18R o dexametasona.

La expresión "ruptura de cadena simple" significa una región de ADN de cadena simple o de cadena doble en la cual se ha roto uno o más de los enlaces covalentes que unen los nucleótidos en la cadena o en una de las dos cadenas.

15 La expresión "ruptura de cadena doble" significa una región de ADN de cadena doble en la cual se ha roto uno o más de los enlaces covalentes que unen los nucleótidos en cada una de las dos cadenas.

20 El término "nucleótido" significa un nucleótido o a un fragmento o derivado de este, a modo de ejemplo no taxativo, una nucleobase, un nucleósido, un nucleótido-trifosfato, etc.

El término "nucleósido" significa un nucleótido o a un fragmento o derivado de este, a modo de ejemplo no taxativo, una nucleobase, un nucleósido, un nucleótido-trifosfato, etc.

25 La expresión "edición génica" se refiere a alteración de la secuencia de ADN de una célula, a modo de ejemplo no taxativo, mediante transfección de la célula con una proteína que causa una mutación en el ADN de la célula.

30 La expresión "proteína de edición génica" significa una proteína que puede, ya sea sola o en combinación con una o más moléculas, modificar la secuencia de ADN de una célula, a modo de ejemplo no taxativo, una nucleasa, una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción (TALEN), una nucleasa de dedos de cinc, una meganucleasa, una nickasa, una proteína asociada a las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) o una variante natural o modificada, un miembro de la familia, un ortólogo, fragmento o construcción de fusión de estos.

35 La expresión "plantilla de reparación" significa un ácido nucleico que contiene una región de al menos 70 % de homología con una secuencia que está dentro de 10 kb de un sitio objetivo de una proteína de edición génica.

40 La expresión "secuencias de repetición" significa una secuencia de aminoácidos que está presente en más de una copia de una proteína, con una homología de al menos 10 %, a modo de ejemplo no taxativo, una repetición de monómeros de un efector similar al activador de la transcripción.

45 La expresión "dominio de unión al ADN" significa una región de una molécula que es capaz de unirse a una molécula de ADN, a modo de ejemplo no taxativo, un dominio de proteínas comprende uno o más dedos de cinc, un dominio de proteínas comprende uno o más secuencias de repetición de efectores similares al activador de la transcripción (TAL) o un lugar de unión de una molécula pequeña que es capaz de unirse a una molécula de ADN.

50 El término "sitio de unión" significa una secuencia de ácido nucleico que es capaz de ser reconocida por una proteína de edición génica, proteína de unión al ADN, dominio de unión al ADN o fragmento biológicamente activo o variante de estos o una secuencia de ácido nucleico para la cual una proteína de edición génica, proteína de unión al ADN, dominio de unión al ADN o un fragmento biológicamente activo o variante de estos que tiene una afinidad, a modo de ejemplo no taxativo, con una secuencia de alrededor de 20 pares de bases de ADN en el exón 1 del gen BIRC5 humano.

El término "objetivo" significa un ácido nucleico que contiene un sitio de unión.

55 Se establecen otras definiciones en la solicitud estadounidense n.º 13/465.490, solicitud provisional estadounidense n.º 61/664.494, solicitud provisional estadounidense n.º 61/721.302, solicitud internacional n.º PCT/US12/67966, solicitud provisional estadounidense n.º 61/785.404, solicitud provisional estadounidense n.º 61/842.874, solicitud internacional n.º PCT/US13/68118, solicitud provisional estadounidense n.º 61/934.397, solicitud estadounidense n.º 14/296.220, solicitud provisional estadounidense n.º 62/038.608 y solicitud provisional estadounidense n.º 62/069.667.

60 La glicación y la glicosilación son procesos a través de los cuales una o más moléculas de azúcar se unen a una proteína. Se ha descubierto ahora que la alteración de la cantidad o ubicación de los sitios de glicación y glicosilación puede aumentar o disminuir la estabilidad de una proteína. Por lo tanto, determinadas modalidades se dirigen a una proteína con uno o más sitios de glicación o glicosilación. En una modalidad, la proteína se modifica genéticamente para tener más sitios de glicación o glicosilación que una variante natural de la proteína. En otra modalidad, la proteína se modifica genéticamente para tener menos sitios de glicación o glicosilación que una variante natural de la proteína.

En aun otra modalidad, la proteína tiene una mayor estabilidad. En aun otra modalidad, la proteína tiene una menor estabilidad.

5 Se ha descubierto además que, en determinadas situaciones, la inclusión de uno o más esteroides y/o uno o más antioxidantes en el medio de transfección puede aumentar la eficacia de transfección *in vivo*, la eficacia de reprogramación *in vivo* y la eficacia de la edición génica *in vivo*. Por lo tanto, determinadas modalidades se dirigen a poner en contacto una célula o paciente con un glucocorticoide, tal como hidrocortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona o betametasona. Otras modalidades se refieren a un método para inducir que una célula exprese una proteína de interés mediante el contacto de una célula con un medio que contiene un esteroide y el contacto de la célula con una o más moléculas de ácido nucleico. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico comprende ARN sintético. En otra modalidad, el esteroide es hidrocortisona. En aun otra modalidad, la hidrocortisona está presente en el medio a una concentración de alrededor de 0,1 uM a alrededor de 10 uM, o alrededor de 1 uM. Otras modalidades se dirigen a un método para inducir que una célula *in vivo* exprese una proteína de interés mediante el contacto de la célula con un medio que contiene un antioxidante y el contacto de la célula con una o más moléculas de ácido nucleico. En una modalidad, el antioxidante es ácido ascórbico o ácido ascórbico-2-fosfato. En otra modalidad, el ácido ascórbico o ácido ascórbico-2-fosfato está presente en el medio a una concentración de alrededor de 0,5 mg/L a alrededor de 500 mg/L, inclusive alrededor de 50 mg/L. Aun otras modalidades se dirigen a un método para reprogramar y/o editar genes de una célula *in vivo* al poner en contacto a la célula con un medio que contiene un esteroide y/o un antioxidante y poner en contacto a la célula con una o más moléculas de ácido nucleico, donde la una o más moléculas de ácido nucleico codifican una o más proteínas de edición génica y/o reprogramación. En determinadas modalidades, la célula está presente en un organismo y el esteroide y/o antioxidante se suministran al organismo.

25 Se ha informado que añadir transferrina al medio de complejación aumenta la eficacia de la transfección de los plásmidos en determinadas situaciones. Se ha descubierto ahora que la adición de transferrina al medio de formación de complejos también puede aumentar la eficacia de la transfección *in vivo* con moléculas sintéticas de ARN. Por lo tanto, determinadas modalidades se dirigen a un método para inducir que una célula *in vivo* exprese una proteína de interés mediante la adición de una o más moléculas sintéticas de ARN y un reactivo de transfección a una solución que contiene transferrina. En una modalidad, la transferrina está presente en la solución a una concentración de alrededor de 1 mg/L a alrededor de 100 mg/L, tal como alrededor de 5 mg/L. En otra modalidad, la transferrina es recombinante.

35 Las células, tejidos, órganos y organismos, inclusive, de modo no taxativo, humanos, tienen diversas características que pueden inhibir o prevenir la administración de ácidos nucleicos, inclusive, por ejemplo, la capa córnea, que puede funcionar como una barrera para ácidos nucleicos y organismos externos. Estas características, por lo tanto, pueden inhibir los efectos de los agentes terapéuticos y cosméticos que comprenden ácidos nucleicos. Se ha descubierto ahora que muchas de estas características pueden evitarse o superarse mediante el uso de un parche que comprende una membrana flexible y múltiples agujas, y que dicho parche puede funcionar como un artículo eficaz y seguro para la administración de ácidos nucleicos. Por lo tanto, determinadas modalidades se dirigen a un parche para la administración de ácido nucleico. En una modalidad, el parche de administración de ácido nucleico comprende una membrana flexible. En otra modalidad, el parche de administración de ácido nucleico comprende múltiples agujas. En aun otra modalidad, las múltiples agujas se acoplan a la membrana flexible. En algunas modalidades, el parche comprende un ácido nucleico. En una modalidad, el ácido nucleico está presente en una solución. En una modalidad, las múltiples agujas incluyen una o más agujas con un lumen. En otra modalidad, el parche comprende además una segunda membrana flexible. En aun otra modalidad, la membrana flexible y la segunda membrana flexible se disponen para formar una cavidad. En una modalidad adicional, la cavidad contiene un ácido nucleico. En otra modalidad adicional, la membrana comprende uno o más huecos a través de los cuales puede pasar un ácido nucleico. En otra modalidad adicional, uno o más huecos y una o más agujas con lúmenes se disponen de forma que se permita el pasaje de una solución que contiene un ácido nucleico a través de al menos uno de los uno o más huecos y a través de al menos una de la una o más agujas con lúmenes. En algunas modalidades, el parche se configura para administrar una solución a la piel. En una modalidad, la solución comprende un ácido nucleico. En otra modalidad, la solución comprende un vehículo. En aun otra modalidad, el vehículo es un lípido o lipidoide. En otra modalidad adicional, el vehículo es un reactivo de transfección a base de lípidos.

55 La membrana celular puede funcionar como una barrera para los ácidos nucleicos externos. Se ha descubierto ahora que la combinación del parche de la presente divulgación con un campo eléctrico puede aumentar la eficacia de la administración de los ácidos nucleicos. Por lo tanto, determinadas modalidades se dirigen a un parche de administración de ácido nucleico que comprende múltiples agujas, donde al menos dos agujas forman parte de un circuito de alto voltaje. En una modalidad, el circuito de alto voltaje genera un voltaje mayor que alrededor de 10 V. En otra modalidad, el circuito de alto voltaje genera un voltaje mayor que alrededor de 20 V. En aun otra modalidad, se produce un campo eléctrico entre dos de las agujas. En una modalidad adicional, la magnitud del campo eléctrico es al menos alrededor de 100 V/cm. En otra modalidad adicional, la magnitud del campo eléctrico es al menos alrededor de 200 V/cm. En algunas modalidades, el parche se configura para administrar un ácido nucleico a la epidermis. En otras modalidades, el parche se configura para administrar un ácido nucleico a la dermis. En aun otras modalidades, el parche se configura para administrar un ácido nucleico al tejido subdérmico. En aun otras modalidades, el parche se configura para administrar un ácido nucleico a un músculo. Determinadas modalidades se dirigen a un parche para

la administración de ácido nucleico que comprende múltiples electrodos. En una modalidad, los múltiples electrodos se acoplan a una membrana flexible. Otras modalidades se dirigen a un parche para la administración de ácido nucleico que comprende una estructura rígida. En una modalidad, múltiples electrodos se acoplan a la estructura rígida.

5 Otras modalidades se dirigen a un método para administrar un ácido nucleico a una célula *in vivo* que comprende aplicar un ácido nucleico a un tejido que contiene una célula *in vivo*. En una modalidad, el método comprende además aplicar un campo eléctrico transitorio cerca de la célula. En otra modalidad, el método produce que la célula *in vivo* internalice el ácido nucleico. En aun otra modalidad, el ácido nucleico comprende ARN sintético. En una modalidad adicional, el método produce además que la célula internalice una cantidad terapéuticamente eficaz o cosméticamente eficaz del ácido nucleico. En una modalidad, la célula es una célula cutánea. En otra modalidad, la célula es una célula muscular. En aun otra modalidad, la célula es un fibroblasto dérmico. En una modalidad adicional, la célula es un queratinocito. En otra modalidad adicional, la célula es un mioblasto. En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende una proteína de interés. En una modalidad, la proteína de interés es una proteína fluorescente. En otra modalidad, la proteína de interés es una proteína de matriz extracelular. En aun otra modalidad, la proteína de interés es un miembro del grupo: elastina, colágeno, laminina, fibronectina, vitronectina, lisil oxidasa, proteína de unión a elastina, un factor de crecimiento, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento transformante beta, factor de estimulación de colonias de granulocitos, una metaloproteínasa de matriz, una actina, fibrilina, glicoproteína asociada con microfibrilos, una proteína similar a lisil oxidasa, factor del crecimiento derivado de plaquetas, una lipasa, una proteína de disociación, termogenina, y una proteína implicada en la producción de pigmentos. En algunas modalidades, el método comprende además administrar el ácido nucleico a la epidermis. En otras modalidades, el método comprende además administrar el ácido nucleico debajo de la dermis. En una modalidad, la administración es mediante inyección. En otra modalidad, la administración es por inyección mediante el uso de un conjunto de microagujas. En aun otra modalidad, la administración es mediante administración tópica. En una modalidad adicional, la administración comprende la alteración o extracción de una parte del tejido. En otra modalidad adicional, la administración comprende la alteración o extracción de la capa córnea. En algunas modalidades, el ácido nucleico está presente en una solución. En una modalidad, la solución comprende un factor de crecimiento. En otra modalidad, el factor de crecimiento es un miembro del grupo: un factor de crecimiento de fibroblastos y un factor de crecimiento transformante. En aun otra modalidad, el factor de crecimiento es un miembro del grupo: factor de crecimiento de fibroblastos básicos y un factor de crecimiento transformante beta. En otras modalidades, la solución comprende colesterol.

En otra modalidad, el método comprende además poner en contacto la célula con una o más moléculas de ácido nucleico. En aun otra modalidad, al menos una de la una o más moléculas de ácido nucleico codifica una proteína de interés. En una modalidad adicional, el método provoca que la célula exprese la proteína de interés. En otra modalidad adicional, el método provoca que la célula exprese una cantidad terapéuticamente eficaz o cosméticamente eficaz de la proteína de interés.

En otra modalidad, la célula se pone en contacto con una molécula de ácido nucleico. En aun otra modalidad, el método provoca que la célula internalice la molécula de ácido nucleico. En una modalidad adicional, el método provoca que la célula internalice una cantidad terapéuticamente eficaz o cosméticamente eficaz de la molécula de ácido nucleico. En una modalidad, el ácido nucleico codifica una proteína de interés. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico comprende un miembro del grupo: una molécula de ADNcd, una molécula de ADNcs, una molécula de ARNcd, una molécula de ARNcs, un plásmido, un oligonucleótido, una molécula sintética de ARN, una molécula de miARN, una molécula de ARNm y una molécula de ARNip.

El ARN sintético que comprende únicamente nucleótidos canónicos puede unirse a receptores de reconocimiento de patrones puede reconocerse como un patrón molecular asociado con patógenos, y puede desencadenar una respuesta inmunitaria potente en células, lo que puede producir un bloque de traducción, la secreción de citocinas inflamatorias y la muerte celular. Se ha descubierto ahora que el ARN sintético que comprende determinados nucleótidos no canónicos puede evadir la detección por parte del sistema inmunitario inherente, y puede convertirse con gran eficacia en proteína. También se ha descubierto que el ARN sintético que comprende al menos un miembro del grupo: 5-hidroxicitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-carboxicitidina, 5-formilcitidina, 5-hidroxiuridina, 5-hidroximetiluridina, 5-carboxiuridina y 5-formiluridina puede evadir la detección por parte del sistema inmunitario inherente, y puede convertirse con gran eficacia en proteína. Por lo tanto, determinadas modalidades se dirigen a un método para inducir que una célula exprese una proteína de interés que comprende poner en contacto una célula con ARN sintético. Otras modalidades se dirigen a un método para transfectar una célula con ARN sintético que comprende poner en contacto a una célula con una solución que comprende una o más moléculas sintéticas de ARN. Aun otras modalidades se dirigen a un método para tratar a un paciente que comprende administrar al paciente ARN sintético. En una modalidad, el ARN sintético comprende al menos un miembro del grupo: 5-hidroxicitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-carboxicitidina, 5-formilcitidina, 5-hidroxiuridina, 5-hidroximetiluridina, 5-carboxiuridina y 5-formiluridina. En otra modalidad, el ARN sintético codifica una proteína de interés. Los ejemplos de ARN pueden contener combinaciones y niveles de nucleótidos no canónicos y no canónicos tal como se describe en otra parte de la presente, inclusive con respecto a la expresión de cualquier proteína de interés descrita en la presente. En otra modalidad adicional, el método provoca la expresión de la proteína de interés. En una modalidad adicional, el método provoca la expresión de la proteína de interés en la piel del paciente.

Se ha descubierto además que poner en contacto a una célula con un esteroide puede suprimir la respuesta inmunitaria inherente a ácidos nucleicos externos, y puede aumentar la eficacia de la administración y traducción de un ácido nucleico. Por lo tanto, determinadas modalidades se dirigen a poner en contacto a una célula con un esteroide. Otras modalidades se dirigen a la administración de un esteroide a un paciente. En una modalidad, el esteroide es hidrocortisona. En otra modalidad, el esteroide es dexametasona. Aun otras modalidades se dirigen a administrar a un paciente un miembro del grupo: un antibiótico, un antimicótico y un inhibidor de RNAsa.

Otras modalidades se dirigen a un método para administrar un ácido nucleico a una célula *in vivo*. Aun otras modalidades se dirigen a un método para inducir que una célula *in vivo* exprese una proteína de interés. Aun otras modalidades se dirigen a un método para tratar a un paciente. En una modalidad, el método comprende alterar la capa córnea. En otra modalidad, el método comprende poner en contacto a una célula con un ácido nucleico. En aun otra modalidad, el método provoca que la célula internalice el ácido nucleico. En una modalidad adicional, el método provoca que la célula exprese la proteína de interés. En otra modalidad adicional, el método provoca la expresión de la proteína de interés en el paciente. En otra modalidad adicional, el método provoca la mejora de uno o más de los síntomas del paciente. En otra modalidad adicional, el paciente precisa la proteína de interés. En otra modalidad adicional, el paciente tiene una deficiencia de la proteína de interés.

Aun otras modalidades se dirigen a un método para tratar a un paciente que comprende administrar a un paciente una composición. En una modalidad, la composición comprende albúmina que se trata con carbón o una resina de intercambio de iones. En otra modalidad, la composición comprende una o más moléculas de ácido nucleico. En aun otra modalidad, al menos una de la una o más moléculas de ácido nucleico codifica una proteína de interés. En una modalidad, el método provoca la expresión de la proteína en la piel del paciente. En otra modalidad, el método provoca la expresión de una cantidad terapéuticamente eficaz o cosméticamente eficaz de la proteína de interés en el paciente. En aun otra modalidad, el método comprende administrar un esteroide. En una modalidad adicional, el esteroide es un miembro del grupo: hidrocortisona y dexametasona.

Determinadas modalidades se dirigen a una molécula sintética de ARN. En una modalidad, la molécula sintética de ARN codifica una proteína de interés. En otra modalidad, la molécula sintética de ARN comprende un miembro del grupo: 5-hidroxicitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-carboxicitidina, 5-formilcitidina, 5-hidroxiuridina, 5-hidroximetiluridina, 5-carboxiuridina y 5-formiluridina. Otras modalidades se dirigen a una composición cosmética. En una modalidad, la composición cosmética comprende albúmina. En otra modalidad, la albúmina se trata con carbón o una resina de intercambio de iones. En aun otra modalidad, la composición cosmética comprende una molécula de ácido nucleico. En una modalidad adicional, la composición cosmética comprende tanto albúmina como una molécula de ácido nucleico. Aun otras modalidades se dirigen a un artículo de tratamiento cosmético que comprende una composición cosmética contenida en un dispositivo configurado para administrar la composición a un paciente. Aun otras modalidades se dirigen a un dispositivo configurado para administrar una composición cosmética a un paciente. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico codifica un miembro del grupo: elastina, colágeno, tirosinasa, receptor de melanocortina 1 y hialuronano sintasa.

Determinadas proteínas tienen semividas largas, y pueden permanecer en tejidos durante varias horas, días, semanas, meses o años. Se ha descubierto ahora que determinados métodos para tratar a un paciente pueden provocar la acumulación de una o más proteínas, inclusive, por ejemplo, una o más proteínas favorables. Por lo tanto, determinadas modalidades se dirigen a un método para tratar a un paciente que comprende administrar a un paciente en una serie de dosis un ácido nucleico que codifica una o más proteínas. En una modalidad, el ácido nucleico comprende ARN sintético. En otra modalidad, se administra una primera dosis en un primer momento. En aun otra modalidad, se administra una segunda dosis en un segundo momento. En una modalidad adicional, la cantidad de la menos una de la una o más proteínas en el paciente en el segundo momento es mayor que la cantidad de dicha proteína en el primer momento. En otra modalidad adicional, el método provoca la acumulación de dicha proteína en el paciente.

Otras modalidades se dirigen a una composición terapéutica que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una o más proteínas, donde al menos una de la una o más proteínas es una proteína de matriz extracelular. Aun otras modalidades se dirigen a una composición cosmética que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una o más proteínas, donde al menos una de la una o más proteínas es una proteína de matriz extracelular.

Los trastornos de pigmentación pueden provocar síntomas graves en pacientes. Se ha descubierto ahora que los trastornos de pigmentación pueden tratarse al administrar a un paciente un ácido nucleico que codifica una tirosinasa. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para tratar un trastorno de pigmentación. Otras modalidades se refieren a un método para alterar la pigmentación de un paciente. En una modalidad, el método comprende administrar a un paciente un ácido nucleico que codifica una tirosinasa. Otras modalidades se dirigen a una composición cosmética que comprende un ácido nucleico que codifica una tirosinasa. Aun otras modalidades se dirigen a una composición terapéutica que comprende un ácido nucleico que codifica una tirosinasa. Aun otras modalidades se refieren a un método para aumentar la absorción ultravioleta de la piel de un paciente. En una modalidad, el método comprende administrar a un paciente un ácido nucleico que codifica una tirosinasa. En otra modalidad, el método provoca el aumento de la absorción ultravioleta de la piel del paciente. Aun otras modalidades

se dirigen a un método para reducir el fotodaño de la piel de una persona tras exposición a luz ultravioleta. En una modalidad, el método provoca la reducción del fotodaño de la piel de la persona tras exposición a luz ultravioleta. Aun otras modalidades se dirigen a un método para tratar xeroderma pigmentoso. En una modalidad, el método comprende administrar a un paciente un ácido nucleico que codifica una tirosinasa. Aun otras modalidades se dirigen a un método para tratar epidermólisis ampollosa. En una modalidad, el método comprende administrar a un paciente un ácido nucleico que codifica colágeno de tipo VII. En otra modalidad, el método comprende administrar a un paciente un ácido nucleico que codifica el receptor de melanocortina 1. Aun otras modalidades se dirigen a un método para tratar la xerosis. En una modalidad, el método comprende administrar a un paciente un ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa. En otra modalidad, se diagnosticó al paciente con dermatitis atópica. En aun otra modalidad, se diagnosticó al paciente con ictiosis. Determinadas modalidades se refieren a un método para tratar una afección cosmética. Otras modalidades se refieren a un método para inducir la cicatrización del tejido. En una modalidad, el método comprende administrar a un paciente un ácido nucleico que codifica una hialuronano sintasa. En otra modalidad, la afección cosmética es un miembro del grupo: arrugas, piel caída, piel delgada, decoloración y piel seca. En aun otra modalidad, el paciente se sometió a cirugía por cataratas. En algunas modalidades, el ácido nucleico es ARN sintético. En otras modalidades, el método provoca la mejora de uno o más de los síntomas del paciente. Otras modalidades se dirigen a un método para tratar un indicio al administrar a una célula o a un paciente un ácido nucleico que codifica una proteína o un péptido. Aun otras modalidades se dirigen a una composición que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína o un péptido. Los indicios que pueden tratarse mediante el uso de los métodos y composiciones de la presente divulgación y las proteínas y péptidos que pueden ser codificados mediante composiciones de la presente divulgación se indican en la Tabla 1, y se proporcionan a modo de ejemplo, y no de modo taxativo. En una modalidad, el indicio se selecciona de la Tabla 1. En otra modalidad, la proteína o péptido se selecciona de la Tabla 1. En aun otra modalidad, el indicio y la proteína o péptido se seleccionan de la misma fila de la Tabla 1. En una modalidad adicional, la proteína de interés es un miembro del grupo: UCP1, UCP2 y UCP3. Otras modalidades se dirigen a métodos para inducir que una célula exprese múltiples proteínas de interés. En una modalidad, las proteínas de interés incluyen al menos dos miembros del grupo: una lipasa, UCP1, UCP2 y UCP3. En otra modalidad, las proteínas de interés incluyen una lipasa y un miembro del grupo: UCP1, UCP2 y UCP3. En otra modalidad, la proteína es una proteína de edición génica. En aun otra modalidad, la proteína de edición génica se dirige a un gen que es al menos parcialmente responsable por un fenotipo de la enfermedad. En aun otra modalidad, la proteína de edición génica se dirige a un gen que codifica una proteína seleccionada de la Tabla 1. En aun otra modalidad, la proteína de edición génica corrige o elimina, ya sea por sí sola o combinada con una o más moléculas distintas o proteínas de edición génica, una mutación que es al menos parcialmente responsable por un fenotipo de la enfermedad.

Tabla 1. Indicaciones ilustrativas.

Indicación ilustrativa	Proteína/péptido ilustrativo
Acné	Retinol deshidroxigenasa 10
Maduración	Elastina
Maduración	Colágeno de tipo I
Maduración	Colágeno de tipo III
Maduración	Colágeno de tipo VII
Maduración	Hialuronano sintasa
Maduración	Transcriptasa inversa de telomerasa
Albinismo	Tirosinasa
Síndrome de Alport	Colágeno de tipo IV
Anemia	Eritropoyetina
Dermatitis atópica	Filagrina
Cutis laxa	Elastina
Epidermólisis ampollosa distrófica	Colágeno de tipo VII
Síndrome de Ehlers-Danlos	Colágeno de tipo V
Síndrome de Ehlers-Danlos	Colágeno de tipo I
Epidermólisis ampollosa acantolítica letal	ADAM17
Epidermólisis ampollosa de tipo IV	Colágeno de tipo III
Protoporfiria eritropoyética	Ferroquelatasa
Exceso de grasa	Termogenina
Exceso de grasa	Lipasa
Hipotricosis	ADAM17
Ictiosis vulgaris	Filagrina

(continuación)

Infecciones	Antibióticos genéticos (por ejemplo, factores anti-sigma)
Enfermedad inflamatoria intestinal y piel ampollosa	Desmogleína 2
Queratosis pilaris	Retinol deshidroxigenasa 10
Piel grasosa	Retinol deshidroxigenasa 10
Osteoartritis	Hialuronano sintasa
Pénfigo vulgar	Placofilina-1
Pseudoxantoma elástico	Elastina
Psoriasis	Retinol deshidroxigenasa 10
Tratamiento de cicatrices	Tirosinasa
Cicatrices	Elastina
Cicatrices	Colágeno de tipo I
Cicatrices	Colágeno de tipo III
Cáncer de piel	Interferón
Queratodermia palmoplantar estriada	ADAM17
Bronceado	Tirosinasa
Vitiligo	Hormona estimulante de melanocitos
Vitiligo	Tirosinasa
Verrugas	Interferón
Cicatrización de heridas	Elastina
Cicatrización de heridas	Colágeno de tipo I
Cicatrización de heridas	Colágeno de tipo III
Xeroderma pigmentoso	ADN polimerasa eta

Otros objetivos ilustrativos de la presente divulgación incluyen los objetivos cosméticos enumerados en la Tabla 6 de la publicación de patente internacional n.º WO 2013/151671.

5

Además, las presentes composiciones y métodos pueden utilizarse para alterar un proceso biológico y/o fisiológico, por ejemplo, para reducir la flacidez de la piel, aumentar el espesor de la piel, aumentar el volumen de la piel, reducir la cantidad de arrugas, la longitud de las arrugas y/o la profundidad de las arrugas, aumentar la tirantez, firmeza, tono y/o elasticidad de la piel, aumentar la hidratación de la piel y su capacidad de retener la humectación, el flujo de agua y balance osmótico, aumentar los niveles de lípidos de la piel; aumentar la matriz extracelular y/o polipéptidos de comunicación y adhesión; aumentar la producción, conservación y uso de energía de la piel; mejorar el uso del oxígeno; mejorar la vida celular de la piel; mejorar la defensa inmunitaria de las células cutáneas, la respuesta al estrés por insolación, la capacidad de defensa antioxidante para neutralizar radicales libres, y/o la defensa tóxica; mejorar la protección y recuperación de rayos ultravioleta; mejorar la comunicación de las células cutáneas y la innervación de las células cutáneas; mejorar la cohesión/adhesión de las células; mejorar el metabolismo mineral de calcio y otros metabolismos minerales; mejorar la regeneración celular; y mejorar el ritmo circadiano de las células.

15

Además, en algunas modalidades, las presentes composiciones pueden utilizarse para tratar una enfermedad, trastorno y/o afección y/o pueden alterar, modificar o cambiar la apariencia de un miembro del sistema integumentario de un sujeto que padece una enfermedad, trastorno y/o afección tal como, de modo no taxativo, acné vulgar, acné estival, acné conglobata, acné cosmético, acné fulminante, acné queiloideo de la nuca, acné mecánico, acné medicamentoso, acné necrótico miliar, acné necrótico, acné rosácea, queratosis actínica, acné vulgar, acné estival, acné conglobata, acné cosmético, acné fulminante, acné queiloideo de la nuca, acné mecánico, acné medicamentoso, acné necrótico miliar, acné necrótico, acné rosácea, urticaria aguda, dermatitis de contacto alérgica, alopecia areata, angioedema, pie de atleta, dermatitis atópica, autoeccematización, acné de bebé, calvicie, blastomicosis, puntos negros, marcas de nacimiento y otros problemas de pigmentación de la piel, forúnculos, moretones, picaduras de insectos, quemaduras, celulitis, niguas, cloracné, urticaria colinérgica o por estrés, urticaria crónica, urticaria por frío, papilomatosis confluyente y reticulada, callos, quistes, caspa, dermatitis herpetiforme, dermatografismo, eccema dishidrótico, dermatitis del pañal, piel seca, dishidrosis, displasia ectodérmica, tal como displasia ectodérmica hipohidrótica y displasia ectodérmica hipohidrótica ligada al cromosoma X, eccema, epidermodisplasia verruciforme, eritema nodoso, acné excoriado, anafilaxia inducida por el ejercicio, foliculitis, exceso de aceite en la piel, foliculitis, pecas, congelación, uñas micóticas, densidad del vello, velocidad de crecimiento del cabello, acné halógeno, pérdida del cabello, sarpullido por calor, hematoma, infecciones por herpes simple (por ejemplo, no genital), hidradenitis supurativa, urticaria, hiperhidrosis, hiperpigmentación, displasia ectodérmica hipohidrótica, hipopigmentación, impétigo, vellos encarnados, urticaria por calor, uñas encarnadas, acné infantil o acné neonatal, comezón, dermatitis de contacto irritativa, tiña inguinal, queiloide, queratosis pilaris, liquen plano, liquen escleroso, lupus miliar diseminado facial, melasma, lunares, molusco contagioso, velocidad de crecimiento de las uñas, salud de las uñas, neurodermatitis, eccema numular, acné ocupacional, acné por aceites, oncomicosis, urticaria física, quiste pilonidal, pitiriasis rosada, pitiriasis versicolor, hiedra venenosa, acné por pomadas, pseudofoliculitis de la barba o acné queiloideo de la nuca, psoriasis, artritis psoriática, urticaria por presión o por presión retardada, heridas punzantes tales como cortes y raspones, erupción, urticaria acuagénica o rara, rinoplastia, tiña, rosácea, síndrome de rothmund-thomson, flacidez de la piel, sarna, cicatrices, seborrea, dermatitis seborreica, herpes zoster, cáncer de piel,

35

40

5 acrocordón, urticaria de tipo solar, picadura de araña, estrías, quemadura de sol, acné provocado por químicos, acné tropical, debilitamiento de la piel, candidiasis, pitiriasis versicolor, dermatosis acantolítica transitoria, acné necrótico miliar, tonos de piel desiguales, venas varicosas, eccema venoso, angioedema vibratorio, vitiligo, verrugas, enfermedad de Weber-Christian, arrugas, displasia ectodérmica hipohidrótica ligada al cromosoma X, eccema xerótico, candidiasis e indicios generales de envejecimiento.

10 En algunas modalidades, se proporcionan métodos para el tratamiento de la piel seca con las presentes composiciones. En algunas modalidades, la proflagrina (una proteína que se convierte en filagrina) es una proteína de interés (por ejemplo, cuando se trata la ictiosis vulgaris).

15 En algunas modalidades, se proporcionan métodos para tratar cualquiera de los diversos tipos de psoriasis (por ejemplo, psoriasis en placa, psoriasis guttata, psoriasis pustulosa, psoriasis invertida y psoriasis eritrodérmica). En diversas modalidades, la proteína de interés es cualquiera de los productos de los genes de susceptibilidad a la psoriasis 1 a 9 (PSORS1-PSORS9).

20 Diversas modalidades se refieren al tratamiento del eccema (por ejemplo, dermatitis atópica, eccema numular, eccema dishidrótico, dermatitis seborreica, dermatitis de contacto irritativa, dermatitis de contacto alérgica, dishidrosis, eccema venoso, dermatitis herpetiforme, neurodermatitis, autoeczematización y eccema xerótico) y, opcionalmente, puede tomarse como objetivo uno o más de los siguientes: filagrina; tres variantes genéticas, similar a ovo 1 (OVOL1), similar a actina 9 (ACTL9) y el miembro de la familia quinesina 3 A (KIF3A) se asociaron con el eccema; y los genes factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el precursor de la taquicinina 1 (TAC1).

25 La urticaria, inclusive, de modo no taxativo, urticaria aguda, urticaria crónica y angioedema, urticaria física, urticaria por presión o presión retardada, urticaria colinérgica o por estrés, urticaria por frío, urticaria por calor, urticaria solar, urticaria acuagénica o rara, angioedema vibratorio, anafilaxia inducida por el ejercicio y dermatografismo pueden tratarse con las presentes composiciones mediante, por ejemplo, el direccionamiento de PLCG-2.

30 Diversas modalidades se refieren al tratamiento de la rosácea, que incluye, de modo no taxativo, rosácea eritematotelangiectásica, rosácea papulopustular, rosácea fimatosa y rosácea ocular. Opcionalmente, el péptido antimicrobiano catelicidina (CAMP) y/o la peptidasa relacionada con la calicreína 5 (también conocida como enzima trípica de la capa córnea (SCTE)) son proteínas de interés.

35 En algunas modalidades, se proporcionan métodos para el tratamiento del acné con las presentes composiciones. Por ejemplo, el acné puede incluir, de modo no taxativo, erupciones acneiformes, acné estival, acné conglobata, acné cosmético, acné fulminante, acné queloideo de la nuca, acné mecánico, acné medicamentoso, acné necrótico miliar, acné necrótico, acné rosácea, acné de bebé, puntos negros, cloracné, acné excoriado, acné halógeno, acné infantil o acné neonatal, lupus miliar diseminado facial, acné ocupacional, acné por aceites, acné por pomadas, acné provocado por químicos, acné tropical, acné necrótico miliar, pseudofoliculitis de la barba o acné queloideo de la nuca, e hidradenitis supurativa. En estas modalidades, la proteína de interés puede ser una o más metaloproteinasas de matriz (MMP), por ejemplo, metaloproteinasa de matriz-1 (MMP-1 o colagenasa intersticial), metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9) y metaloproteinasa de matriz-13 (MMP-13).

40 En modalidades adicionales, el vitiligo se trata con las presentes composiciones, por ejemplo, donde el objetivo es un gen de la familia NLR que contiene un dominio de pirina 1 (NALP1).

45 En algunas modalidades, las presentes composiciones se pueden utilizar en el tratamiento de la displasia ectodérmica hipohidrótica (HED), por ejemplo, mediante el gen de la ectodisplasina A (EDA), el receptor (EDAR) y el dominio de muerte asociado al receptor (EDARADD).

50 En algunas modalidades, las presentes composiciones se utilizan en el tratamiento de la calvicie o debilitamiento del cabello (por ejemplo, calvicie de patrón masculino o alopecia androgénica (AGA)) y, opcionalmente, uno o más de los siguientes pueden ser la proteína de interés: receptor de andrógenos (AR), receptor de ectodisplasina A2 (EDA2R) y receptor de ácido lisofosfatídico 6 (P2RY5).

55 Las presentes composiciones también pueden utilizarse en métodos para el tratamiento de cicatrices y estrías, por ejemplo, mediante colágeno, quinasa ribosomal s6, fosfoproteína secretada 1 (también conocida como osteopontina) o factor de crecimiento transformante beta 3.

60 La epidermodisplasia verruciforme (también conocida como epidermodisplasia de Lutz-Lewandowsky), trastorno cutáneo hereditario genético autosómico recesivo, también puede tratarse con composiciones de la presente invención, por ejemplo, mediante genes del tipo proteína transmembrana 8 (EVER2) o del tipo proteína transmembrana 6 (EVER1) dirigidos.

65 En algunas modalidades, la flacidez, debilitamiento o arrugas de la piel pueden tratarse con la presente composición, por ejemplo, mediante el direccionamiento de una o más de las proteínas de interés tales como colágeno, elastina, factor de crecimiento de fibroblastos 7, inhibidores de metalopeptidasa TIMP, metalopeptidasas de matriz, superóxido

dismutasa y otros proteoglicanos y proteínas de matriz extracelular.

Otras modalidades se utilizan en el bronceado de la piel, tal como mediante la hormona estimulante de melanocitos y/o pro-opiomelanocortina.

5 En algunas modalidades, las presentes composiciones pueden utilizarse para el tratamiento de heridas. En algunas modalidades, los métodos para el tratamiento de heridas con las presentes composiciones comprenden las etapas adicionales, por ejemplo, de limpiar la herida para facilitar su cierre y cicatrización, inclusive, de modo no taxativo: desbridamiento, desbridamiento agudo (extracción quirúrgica de tejido muerto o infectado de una herida), que incluye
10 opcionalmente agentes químicos de desbridamiento, tales como enzimas, para extraer tejido necrótico; apósitos para proporcionar a la herida un entorno húmedo y cálido, y para propomover la reparación y cicatrización de tejidos (por ejemplo, apósitos que comprenden hidrogeles (por ejemplo, AQUASORB®; DUODERM®), hidrocoloides (por ejemplo, AQUACEL®; COMFEEL®), espumas (por ejemplo, LYOFoAM®; SPYROSORB®) y alginatos (por ejemplo, ALGISITE®; CURASORB®); administración de factores de crecimiento para estimular la división y proliferación celular, y para promover la cicatrización de heridas, por ejemplo, becaplermina; y (iv) cobertura de heridas de tejido blando, puede ser necesario un injerto de piel para obtener una cobertura de heridas limpias que no cicatrizan (por ejemplo, injertos de piel autólogos, injerto de piel de cadáver, sustitutos cutáneos desarrollados por ingeniería de tejidos (por ejemplo, APLIGRAF®; DERMAGRAFT®)).

20 En diversas modalidades, una variedad de cánceres se trata con las presentes composiciones (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas y cáncer de estómago). En algunas modalidades, el cáncer de piel se trata con las presentes composiciones. Por ejemplo, cáncer de células basales (BCC, por sus siglas en inglés), cáncer de células escamosas (SCC, por sus siglas en inglés) y melanoma. En algunas modalidades, las presentes composiciones se utilizan como complemento para una evaluación completa del margen
25 periférico y profundo circunferencial, cirugía de Mohs, radiación (por ejemplo, braquiterapia o radioterapia de rayos externos), quimioterapia (inclusive, de modo no taxativo, quimioterapia tópica, por ejemplo, con imiquimod o 5-fluorouracilo) y crioterapia. Las presentes composiciones también se utilizan en el tratamiento de diversas etapas de cáncer, inclusive cáncer de piel (por ejemplo, cáncer de células basales (BCC), cáncer de células escamosas (SCC) y melanoma), tales como las etapas del sistema TNM del American Joint Committee on Cancer [Comité Conjunto Americano del Cáncer] (AJCC) (por ejemplo, uno o más de TX, T0, Tis, T1, T1a, T1b, T2, T2A, T2B, T3, T3a, T3b, T4, T4a, T4b, NX, N0, N1, N2, N3, M0, M1a, M1b, M1c) y/o un sistema de etapas (por ejemplo, Etapa 0, Etapa IA, Etapa IB, Etapa IIA, Etapa IIB, Etapa IIC, Etapa IIIA, Etapa IIIB, Etapa IIIC, Etapa IV).

35 En diversas modalidades, una o más enfermedades raras se tratan con las presentes composiciones, inclusive, a modo ilustrativo, protoporfiria eritropoyética, enfermedad de Hailey-Hailey, epidermólisis ampollosa (EB), xeroderma pigmentoso, síndrome de Ehlers-Danlos, cutis laxa, deficiencia de proteína C y proteína S, síndrome de Alport, queratodermia palmoplantar estriada, EB acantolítica letal, pseudoxantoma elástico (PXE), ictiosis vulgar, pénfigo bulgar y síndrome del nevo de células basales.

40 En determinadas situaciones, puede ser deseable reemplazar los componentes de origen animal por componentes de origen no animal y/o recombinantes, en parte porque los componentes de origen no animal y/o recombinantes se pueden producir con un mayor grado de consistencia que los componentes de origen animal y, en parte, porque los componentes de origen no animal y/o recombinantes tienen menos riesgo de contaminación con sustancias tóxicas y/o patogénicas que los componentes de origen animal. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a una
45 proteína que es de origen no animal y/o recombinante. Otras modalidades se refieren a un medio, donde algunos o todos los componentes del medio son de origen no animal y/o recombinantes.

Otras modalidades se refieren a un método para transfectar una célula *in vivo*. En una modalidad, se transfecta una célula *in vivo* con uno o más ácidos nucleicos y se realiza la transfección mediante el uso de un reactivo de transfección, como un reactivo de transfección a base de lípidos. En una modalidad, el o los ácidos nucleicos incluyen al menos una molécula de ARN. En otra modalidad, se transfecta la célula con uno o más ácidos nucleicos y el o los ácidos nucleicos codifican al menos uno de: p53, TERT, una citocina, una proteína secretada, una proteína unida a una membrana, una enzima, una proteína de edición génica, una proteína modificadora de cromatina, una proteína de unión a ADN, un factor de transcripción, una histona deacetilasa, un patrón molecular asociado a un patógeno y un
55 antígeno asociado a un tumor o un fragmento biológicamente activo, análogo, variante o miembro de la familia de este. En otra modalidad, se transfecta la célula reiteradamente, tal como al menos alrededor de 2 veces durante alrededor de 10 días consecutivos, o al menos alrededor de 3 veces durante alrededor de 7 días consecutivos, o al menos alrededor de 4 veces durante alrededor de 6 días consecutivos.

60 La reprogramación puede realizarse al transfectar células con uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más factores de reprogramación. Algunos ejemplos de factores de reprogramación incluyen, entre otros: la proteína Oct4, la proteína Sox2, la proteína Klf4, la proteína c-Myc, la proteína l-Myc, la proteína TERT, la proteína Nanog, la proteína Lin28, la proteína Utf1, la proteína Aicda, micro-ARN miR200, micro-ARN miR302, micro-ARN miR367, micro-ARN miR369 y fragmentos biológicamente activos, análogos, variantes y miembros de la familia de estos. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para reprogramar una célula *in vivo*. En una modalidad, se reprograma la célula *in vivo* mediante la transfección de la célula con uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o

más factores de reprogramación. En una modalidad, el o los ácidos nucleicos incluyen una molécula de ARN que codifica una proteína Oct4. En otra modalidad, el o los ácidos nucleicos también incluyen una o más moléculas de ARN que codifican la proteína Sox2, la proteína Klf4 y la proteína c-Myc. En aun otra modalidad, el o los ácidos nucleicos también incluyen una molécula de ARN que codifica una proteína Lin28. En una modalidad, la célula es una célula de piel humana y se reprograma la célula de piel humana a una célula madre pluripotente. En otra modalidad, la célula es una célula de piel humana y se reprograma la célula de piel humana a una célula productora de insulina que responde a la glucosa. Algunos ejemplos de otras células que se pueden reprogramar y de otras células a las cuales se puede reprogramar una célula incluyen, de modo no taxativo: células de la piel, células madre pluripotentes, células madre mesenquimales, células β , células del epitelio pigmentario retinal, células hematopoyéticas, células cardíacas, células epiteliales de las vías respiratorias, células madre neuronales, neuronas, células gliales, células óseas, células sanguíneas y células madre de la pulpa dental. En una modalidad, se pone en contacto con la célula en un medio que brinda soporte a la célula reprogramada. En una modalidad, el medio también brinda soporte a la célula.

De manera importante, se ha informado que la infección de células de la piel con virus que codifican Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, combinada con el cultivo de las células en un medio que apoya el crecimiento de cardiomiocitos provoca una reprogramación de las células de la piel a cardiomiocitos, sin reprogramar primero las células de la piel a células madre pluripotentes (ver Efs et ál. Nat Cell Biol. 2011;13:215-22). En determinadas situaciones, es posible que sea deseable la reprogramación directa (reprogramación de una célula somática a otra célula somática sin reprogramar primero la célula somática a una célula madre pluripotente, también denominada "transdiferenciación"), en parte porque el cultivo de células madre pluripotentes puede ser lento y costoso, la manipulación adicional que implica establecer y caracterizar una línea celular de células madre pluripotentes estables puede conllevar un mayor riesgo de contaminación y el tiempo adicional en el cultivo asociado con producir primero células madre pluripotentes puede conllevar un mayor riesgo de inestabilidad genómica y la adquisición de mutaciones, inclusive mutaciones puntuales, variaciones del número de copias y anomalías cariotípicas. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para reprogramar una célula somática *in vivo*, donde se reprograma la célula a una célula somática y donde no se produce una línea de células madre pluripotentes caracterizada.

También se ha descubierto que, en determinadas situaciones, se pueden requerir menos transfecciones totales para reprogramar una célula de acuerdo con los métodos de la presente divulgación que de acuerdo con otros métodos. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para reprogramar una célula *in vivo*, donde se realizan de alrededor de 1 a alrededor de 12 transfecciones durante alrededor de 20 días consecutivos, o de alrededor de 4 a alrededor de 10 transfecciones durante alrededor de 15 días consecutivos, o de alrededor de 4 a alrededor de 8 transfecciones durante alrededor de 10 días consecutivos. Se reconoce que cuando una célula se pone en contacto con un medio que contiene moléculas de ácido nucleico, la célula puede probablemente entrar en contacto y/o internalizar más de una molécula de ácido nucleico, ya sea de forma simultánea o en momentos diferentes. Por consiguiente, se puede poner en contacto una célula con un ácido nucleico más de una vez, por ejemplo, reiteradamente, incluso cuando una célula se pone en contacto únicamente una vez con un medio que contiene ácidos nucleicos.

Cabe señalar que los ácidos nucleicos pueden contener uno o más residuos no canónicos o "modificados" (por ejemplo, un residuo que no sea adenina, guanina, timina, uracilo y citosina o los derivados convencionales de nucleósido, nucleótido, desoxinucleósido o desoxinucleótido). Cabe destacar específicamente que se puede sustituir la pseudouridina-5'-trifosfato por uridina-5'-trifosfato en una reacción de transcripción *in vitro* para dar ARN sintético, donde se puede reemplazar hasta el 100 % de los residuos de uridina del ARN sintético por residuos de pseudouridina. La transcripción *in vitro* puede producir ARN con inmunogenicidad residual, incluso cuando la pseudouridina y 5-metilcitidina se sustituyen completamente por uridina y citidina, respectivamente (ver, por ejemplo, Angel. Reprogramming Human Somatic Cells to Pluripotency Using RNA [tesis de doctorado]. Cambridge, MA: MIT; 2011). Por este motivo, es frecuente añadir un inmunosupresor al medio de transfección cuando se transfectan células con ARN. En determinadas situaciones, puede no ser deseable añadir un inmunosupresor al medio de transfección, en parte porque el inmunosupresor recombinante utilizado más comúnmente para este fin, B18R, puede ser costoso y difícil de fabricar. Se ha descubierto que las células *in vivo* se pueden transfectar y/o reprogramar de acuerdo con los métodos de la presente divulgación, sin utilizar B18R ni ningún otro inmunosupresor. También se ha descubierto que la reprogramación de células *in vivo* de acuerdo con los métodos de la presente divulgación sin utilizar inmunosupresores puede ser rápida, eficaz y confiable. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para transfectar una célula *in vivo*, donde el medio de transfección no contiene un inmunosupresor. Otras modalidades se refieren a un método para reprogramar una célula *in vivo*, donde el medio de transfección no contiene un inmunosupresor. En determinadas situaciones, por ejemplo, cuando se utiliza una alta densidad celular, es posible que sea beneficioso añadir un inmunosupresor al medio de transfección. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para transfectar una célula *in vivo*, donde el medio de transfección contiene un inmunosupresor. Otras modalidades se refieren a un método para reprogramar una célula *in vivo*, donde el medio de transfección contiene un inmunosupresor. En una modalidad, el inmunosupresor es B18R o un fragmento biológicamente activo, análogo, variante o miembro de la familia de este o una dexametasona o un derivado de esta. En una modalidad, el medio de transfección no contiene un inmunosupresor y se elige la dosis de ácido nucleico para evitar la toxicidad excesiva. En otra modalidad, la dosis de ácido nucleico es menor que alrededor de 1 mg/cm² de tejido o menor que alrededor de 1 mg/100.000 de células, o menor que alrededor de 10 mg/kg.

Las células reprogramadas producidas de acuerdo con determinadas modalidades de la presente invención son adecuadas para aplicaciones terapéuticas y/o cosméticas, ya que no contienen secuencias de ADN exógeno y no se exponen a productos de origen humano o animal, que pueden ser no definidos y contener contaminantes tóxicos y/o patogénicos. Además, la alta velocidad, la eficacia y la confiabilidad de determinadas modalidades de la presente invención pueden reducir el riesgo de adquisición y acumulación de mutaciones y de otras anomalías cromosómicas. Por lo tanto, determinadas modalidades de la presente invención se pueden utilizar para generar células que tienen un perfil de seguridad adecuado para utilizar en aplicaciones terapéuticas y/o cosméticas. Por ejemplo, la reprogramación de células mediante el uso de ARN y el medio de la presente divulgación, donde el medio no contiene componentes de origen animal o humano, puede proporcionar células que no se han expuesto a material alogénico. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a una célula reprogramada que tiene un perfil de seguridad deseado. En una modalidad, la célula reprogramada tiene un cariotipo normal. En otra modalidad, la célula reprogramada tiene menos que alrededor de 5 variaciones del número de copias (CNV) con relación al genoma del paciente, tal como menos que alrededor de 3 variaciones del número de copias con relación al genoma del paciente o ninguna variación del número de copias con relación al genoma del paciente. En aun otra modalidad, la célula reprogramada tiene un cariotipo normal y menos que alrededor de 100 variantes de nucleótidos únicos en las regiones codificantes con relación al genoma del paciente o menos que alrededor de 50 variantes de nucleótidos únicos en las regiones codificantes con relación al genoma del paciente o menos que alrededor de 10 variantes de nucleótidos únicos en las regiones codificantes con relación al genoma del paciente.

Las endotoxinas y las nucleasas se pueden copurificar y/o asociar con otras proteínas, como la albúmina de suero. Las proteínas recombinantes, en particular, con frecuencia pueden tener altos niveles de endotoxinas y nucleasas asociadas, debido en parte a la lisis de las células que se puede producir durante su producción. Las endotoxinas y las nucleasas se pueden reducir, eliminar, reemplazar o desactivar de otro modo a través de muchos de los métodos de la presente divulgación, inclusive, por ejemplo, mediante acetilación, mediante adición de un estabilizador como octanoato de sodio, seguido de tratamiento con calor, mediante el añadido de inhibidores de nucleasas a la solución y/o medio de albúmina, mediante cristalización, mediante el contacto con una o más resinas de intercambio iónico, mediante el contacto con carbón, mediante electroforesis preparativa o mediante cromatografía por afinidad. Se ha descubierto que reducir, eliminar, reemplazar o desactivar de otro modo, de forma total o parcial, las endotoxinas y/o las nucleasas de un medio y/o de uno o más componentes de un medio puede aumentar la eficacia con la cual se pueden transfectar y reprogramar las células. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para transfectar una célula *in vivo* con uno o más ácidos nucleicos, donde se trata el medio de transfección para reducir, eliminar, reemplazar o desactivar de otro modo, de forma total o parcial, una o más endotoxinas y/o nucleasas. Otras modalidades se refieren a un medio que provoca degradación mínima de los ácidos nucleicos. En una modalidad, el medio contiene menos que alrededor de 1 EU/ml, menos que alrededor de 0,1 EU/ml o menos que alrededor de 0,01 EU/ml.

En determinadas situaciones, los portadores de lípidos a base de proteínas, tal como la albúmina de suero, se pueden reemplazar por portadores de lípidos no basados en proteínas como la metil-beta-ciclodextrina. Se puede utilizar el medio de la presente divulgación sin un portador de lípidos, por ejemplo, cuando la transfección se realiza mediante el uso de un método que puede no requerir o que puede no beneficiarse de la presencia de un portador de lípidos, por ejemplo, mediante el uso de uno o más reactivos de transfección a base de lípidos, reactivos de transfección a base de polímeros o reactivos de transfección a base de péptidos, o mediante el uso de electroporación. Muchas moléculas asociadas a las proteínas, tales como los metales, pueden ser altamente tóxicas para las células *in vivo*. Esta toxicidad puede provocar una disminución de la viabilidad, así como la adquisición de mutaciones. Por lo tanto, determinadas modalidades presentan el beneficio adicional de producir células que carecen de moléculas tóxicas.

Se puede medir el componente de la molécula asociada de una proteína mediante la suspensión de la proteína en solución y la medición de la conductividad de la solución. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un medio que contiene una proteína, donde una solución aproximadamente al 10 % de la proteína en agua tiene una conductividad de menos que aproximadamente 500 $\mu\text{mho/cm}$. En una modalidad, la solución tiene una conductividad menor que alrededor de 50 $\mu\text{mho/cm}$. En otra modalidad, menos de alrededor de 0,65 % del peso en seco de la proteína comprende lípidos y/o menos de alrededor de 0,35 % del peso en seco de la proteína comprende ácidos grasos libres.

Se puede aumentar la cantidad de ácido nucleico administrado a las células *in vivo* para aumentar el efecto deseado del ácido nucleico. Sin embargo, aumentar la cantidad de ácido nucleico administrado a las células *in vivo* más allá de determinada medida puede provocar una disminución en la viabilidad de las células, debido, en parte, a la toxicidad del reactivo de transfección. Se ha descubierto que cuando se administra un ácido nucleico a una población de células *in vivo* en un volumen fijo (por ejemplo, células en una región de tejido), la cantidad de ácido nucleico administrado a cada célula puede depender de la cantidad total de ácido nucleico administrado a la población de células y a la densidad de las células, donde una mayor densidad celular produce una disminución del ácido nucleico administrado a cada célula. En determinadas modalidades, se transfecta una célula *in vivo* con uno o más ácidos nucleicos más de una vez. En determinadas condiciones, por ejemplo, cuando las células se proliferan, la densidad celular puede cambiar de una transfección a la siguiente. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para transfectar una célula *in vivo* con un ácido nucleico, donde se transfecta la célula más de una vez y donde la cantidad

de ácido nucleico administrado a la célula es diferente para dos de las transfecciones. En una modalidad, la célula se prolifera entre dos de las transfecciones y la cantidad de ácido nucleico administrada a la célula es mayor para la segunda de las dos transfecciones que para la primera de las dos transfecciones. En otra modalidad, se transfecta la célula más de dos veces y la cantidad de ácido nucleico administrado a la célula es mayor para la segunda de tres transfecciones que para la primera de las mismas tres transfecciones, y la cantidad de ácido nucleico administrado a las células es mayor para la tercera de las mismas tres transfecciones que para la segunda de las mismas tres transfecciones. En aun otra modalidad, se transfecta la célula más de una vez y la cantidad máxima de ácido nucleico administrado a la célula durante cada transfección es lo suficientemente baja como para proporcionar al menos alrededor de 80 % de viabilidad para al menos dos transfecciones consecutivas.

Se ha descubierto que modular la cantidad de ácido nucleico administrado a una población de células *in vivo* en proliferación en una serie de transfecciones puede dar como resultado un efecto aumentado del ácido nucleico y una mayor viabilidad de las células. También se ha descubierto que, en determinadas situaciones, cuando las células *in vivo* se ponen en contacto con uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más factores de reprogramación en una serie de transfecciones, la eficacia de la reprogramación puede aumentar cuando la cantidad de ácido nucleico administrado en las transfecciones posteriores es mayor que la cantidad de ácido nucleico administrado en las transfecciones previas, para al menos parte de la serie de transfecciones. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para reprogramar una célula *in vivo*, donde uno o más ácidos nucleicos se administran reiteradamente a la célula en una serie de transfecciones y la cantidad del ácido nucleico administrado a la célula es mayor para al menos una transfección posterior que para al menos una transfección previa. En una modalidad, se transfecta la célula de alrededor de 2 a alrededor de 10 veces, de alrededor de 3 a alrededor de 8 veces, o de alrededor de 4 a alrededor de 6 veces. En otra modalidad, el o los ácidos nucleicos incluyen al menos una molécula de ARN, se transfecta la célula de alrededor de 2 a alrededor de 10 veces, y la cantidad de ácido nucleico administrado a la célula en cada transfección es la misma o mayor que la cantidad de ácido nucleico administrado a la célula en la transfección previa más reciente. En aun otra modalidad, la cantidad de ácido nucleico administrado a la célula en la primera transfección es de alrededor de 20 ng/cm² a alrededor de 250 ng/cm² o de 100 ng/cm² a 600 ng/cm². En otra modalidad, se transfecta la célula alrededor de 5 veces en intervalos de alrededor de 12 a alrededor de 48 horas y la cantidad de ácido nucleico administrado a la célula es alrededor de 25 ng/cm² para la primera transfección, alrededor de 50 ng/cm² para la segunda transfección, alrededor de 100 ng/cm² para la tercera transfección, alrededor de 200 ng/cm² para la cuarta transfección y alrededor de 400 ng/cm² para la quinta transfección. En otra modalidad, se transfecta adicionalmente la célula al menos una vez después de la quinta transfección y la cantidad de ácido nucleico administrado a la célula es alrededor de 400 ng/cm².

Determinadas modalidades se refieren a un método para transfectar una célula *in vivo* con un ácido nucleico, donde la cantidad de ácido nucleico se determina mediante la medición de la densidad celular y la elección de la cantidad de ácido nucleico para transfectar en función de la medición de la densidad celular. En una modalidad, densidad celular se mide con medios ópticos. En otra modalidad, la célula se transfecta reiteradamente, la densidad celular aumenta entre dos transfecciones y la cantidad de ácido nucleico transfectado es mayor para la segunda de las dos transfecciones que para la primera de las dos transfecciones.

Se ha descubierto que, en determinadas situaciones, la eficacia de transfección *in vivo* y la viabilidad de las células que se pusieron en contacto con el medio de la presente divulgación se pueden mejorar mediante el acondicionamiento del medio. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para acondicionar un medio. Otras modalidades se refieren a un medio que se acondiciona. En una modalidad, los soportes biológicos son fibroblastos y el medio se acondiciona durante aproximadamente 24 horas. Otras modalidades se refieren a un método para transfectar una célula *in vivo*, donde el medio de transfección se acondiciona. Otras modalidades se refieren a un método para reprogramar y/o editar los genes de una célula *in vivo*, donde el medio se acondiciona. En una modalidad, los soportes biológicos se desactivan de forma mitótica, por ejemplo, mediante exposición a una sustancia química como una mitomicina-C o mediante la exposición a radiación gamma. En determinadas modalidades, puede resultar beneficioso utilizar solamente materiales autólogos, en parte, por ejemplo, y sin pretender limitarse a la teoría, para evitar el riesgo de la transmisión de enfermedades de los soportes biológicos a la célula o al paciente. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para transfectar una célula *in vivo*, donde el medio de transfección se acondiciona y donde los soportes biológicos se derivan del mismo individuo que la célula transfectada. Otras modalidades se refieren a un método para reprogramar y/o editar los genes de una célula *in vivo*, donde el medio se acondiciona y donde los soportes biológicos se derivan del mismo individuo que la célula reprogramada y/o cuyos genes se editan.

Se pueden añadir varias moléculas a los medios mediante acondicionamiento. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un medio que se complementa con una o más moléculas que están presentes en un medio acondicionado. En una modalidad, el medio se complementa con Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a o un fragmento biológicamente activo, análogo, variante, agonista o miembro de la familia de estos. En otra modalidad, el medio se complementa con TGF-β o un fragmento biológicamente activo, análogo, variante, agonista o miembro de la familia de este. En aun otra modalidad, se reprograma una célula *in vivo* de acuerdo con el método de la presente divulgación, donde el medio no se complementa con TGF-β durante de alrededor de 1 a alrededor de 5 días y después se complementa con TGF-β durante al menos alrededor de 2 días. En otra modalidad, el medio se complementa con IL-6, IL-6R o un fragmento biológicamente activo, análogo, variante, agonista o miembro de la familia de estos. En otra modalidad, se

complementa el medio con un esfingolípido o un ácido graso. En aun otra modalidad, el esfingolípido es ácido lisofosfatídico, lisoesfingomielina, esfingosina-1-fosfato o un análogo biológicamente activo, variante o derivado de estos.

5 Además de desactivar mitóticamente las células, en determinadas condiciones, la irradiación puede cambiar la expresión genética de las células, lo que provoca que las células produzcan menos de determinadas proteínas y más de determinadas proteínas que las células no irradiadas, por ejemplo, los miembros de la familia Wnt de proteínas. Además, determinados miembros de la familia Wnt de proteínas pueden promover el crecimiento y la transformación de las células. Se ha descubierto que, en determinadas situaciones, la eficacia de la reprogramación puede aumentar
10 ampliamente mediante el contacto de una célula *in vivo* con un medio que se acondiciona mediante el uso de soportes biológicos irradiados en lugar de soportes biológicos tratados con mitomicina-c. Además, se ha descubierto que el aumento de la eficacia de reprogramación observada cuando se utilizan soportes biológicos irradiados es causado en parte por las proteínas Wnt que son secretadas por los soportes biológicos. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para reprogramar una célula *in vivo*, donde la célula se pone en contacto con Wnt1, Wnt2,
15 Wnt3, Wnt3a o un fragmento biológicamente activo, análogo, variante, miembro de la familia o agonista de estos, inclusive agonistas de objetivos posteriores de las proteínas Wnt y/o agentes que imitan uno o más de los efectos biológicos de las proteínas Wnt, por ejemplo, 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina.

Debido a la baja eficacia de muchos métodos de reprogramación basados en ADN, es posible que estos métodos sean difíciles o imposibles de utilizar con células derivadas de muestras de pacientes, que pueden contener solo una pequeña cantidad de células. Por el contrario, la alta eficacia de determinadas modalidades de la presente invención puede permitir la reprogramación confiable de una pequeña cantidad de células, inclusive una única célula. Determinados aspectos se refieren a un método para reprogramar una pequeña cantidad de células. Otras
20 modalidades se refieren a un método para reprogramar una única célula. En una modalidad, la célula se pone en contacto con una o más enzimas. En otra modalidad, la enzima es colagenasa. En aun otra modalidad, la colagenasa no tiene componentes animales. En una modalidad, la colagenasa está presente a una concentración de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 10 mg/ml, o de alrededor de 0,5 mg/ml a alrededor de 5 mg/ml. En otra modalidad, la célula es un glóbulo. En aun otra modalidad, la célula se pone en contacto con un medio que contiene una o más proteínas que se derivan de la sangre del paciente. En aun otra modalidad, la célula se pone en contacto con un medio que comprende: DMEM/F12 + 2 mM L-alanil-L-glutamina + de alrededor de 5 % a alrededor de 25 % de suero derivado del paciente o de alrededor de 10 % a alrededor de 20 % de suero derivado del paciente, o alrededor de 20 % de suero derivado del paciente.

Se ha descubierto que, en determinadas situaciones, transfectar las células *in vivo* con una mezcla de ARN que codifica Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc con el medio de la presente divulgación puede provocar que el índice de proliferación de las células aumente. Cuando la cantidad de ARN administrado a las células es demasiado baja para garantizar que todas las células se hayan transfectado, solo una fracción de las células puede mostrar un aumento del índice de proliferación. En determinadas situaciones, tal como cuando se genera un agente terapéutico personalizado, puede ser deseable aumentar el índice de proliferación de las células, en parte porque hacerlo puede reducir el tiempo necesario para generar el agente terapéutico y, por lo tanto, se puede reducir el costo del agente terapéutico. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para transfectar una célula *in vivo* con una mezcla de ARN que codifica Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. En una modalidad, la célula presenta una mayor velocidad de proliferación. En otra modalidad, la célula se reprograma.

Muchas enfermedades están asociadas con una o más mutaciones. Se pueden corregir las mutaciones mediante el contacto de una célula con un ácido nucleico que codifica una proteína que, ya sea sola o en combinación con otras moléculas, corrige la mutación (un ejemplo de edición génica). Algunos ejemplos de dichas proteínas incluyen: nucleasas de dedos de zinc y TALEN. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para transfectar una célula *in vivo* con un ácido nucleico, donde el ácido nucleico codifica una proteína que, ya sea sola o en combinación con otras moléculas, crea una ruptura de cadena doble o de cadena simple en una molécula de ADN. En una modalidad, la proteína es una nucleasa de dedo de zinc o una TALEN. En otra modalidad, el ácido nucleico es una molécula de ARN. En aun otra modalidad, la ruptura de cadena doble o de cadena simple se encuentra dentro de alrededor de 5.000.000 bases del sitio de inicio de la transcripción de un gen seleccionado del grupo: CCR5, CXCR4, GAD1, GAD2, CFTR, HBA1, HBA2, HBB, HBD, FANCA, XPA, XPB, XPC, ERCC2, POLH, HTT, DMD, SOD1, APOE, PRNP, BRCA1 y BRCA2 o un análogo, variante o miembro de la familia de estos. En otra modalidad, se transfecta la célula con un ácido nucleico que actúa como un molde de reparación ya sea al provocar la inserción de una secuencia de ADN en la región de la ruptura de cadena doble o de cadena simple o al provocar un cambio de otro modo en la secuencia de ADN en la región de la ruptura de cadena doble o de cadena simple. En aun otra modalidad, se reprograma la célula, y posteriormente, se editan los genes de la célula. En aun otra modalidad, se editan los genes de la célula, y posteriormente, se reprograma la célula. En aun otra modalidad, la reprogramación y edición génica se realizan con alrededor de 7 días entre sí. En aun otra modalidad, la edición génica y la reprogramación ocurren de manera simultánea o el mismo día. En otra modalidad, la célula es una célula de piel, se editan los genes de la célula de piel para alterar al gen de CCR5, se reprograma la célula de piel a una célula madre hematopoyética, lo cual produce un agente terapéutico para el VIH/SIDA y se utiliza el agente terapéutico para tratar a un paciente con VIH/SIDA. En otra modalidad, se deriva la célula de piel del mismo paciente que se trata con el agente terapéutico.

Los genes que se pueden editar de acuerdo con los métodos de la presente divulgación para producir los agentes terapéuticos de la presente divulgación incluyen genes que se pueden editar para recuperar la función normal, así como genes que se pueden editar para reducir o eliminar la función. Estos genes incluyen, de modo no taxativo, beta globina (HBB), mutaciones en las cuales se puede provocar anemia drepanocítica (SCD) y β -talasemia, cáncer de mama 1, aparición temprana (BRCA1) y cáncer de mama 2, aparición temprana (BRCA2), mutaciones en las cuales puede aumentar la susceptibilidad al cáncer de mama, receptor de quimiocinas C-C tipo 5 (CCR5) y receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4), mutaciones en las cuales puede conferir resistencia a la infección de VIH, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), mutaciones en las cuales puede causar fibrosis quística, distrofina (DMD), mutaciones en las cuales puede causar distrofia muscular, incluido distrofia muscular de Duchenne y distrofia muscular de Becker, glutamato descarboxilasa 1 y glutamato descarboxilasa 2 (GAD1, GAD2), mutaciones en las cuales puede evitar la destrucción autoinmunitaria de las células β , hemoglobina alfa 1, hemoglobina alfa 2 y hemoglobina delta (HBA1, HBA2 y HBD), mutaciones en las cuales puede causar talasemia, Huntington (HTT), mutaciones en las cuales puede causar enfermedad de Huntington, superóxido dismutasa 1 (SOD1), mutaciones en las cuales puede causar esclerosis lateral amiotrófica (ALS), XPA, XPB, XPC, XPD (ERCC6) y polimerasa (dirigido a ADN), eta (POLH), mutaciones en las cuales puede causar xeroderma pigmentoso, cinasa de repetición rica en leucina 2 (LRRK2), mutaciones en las cuales puede causar enfermedad de Parkinson y anemia de Fanconi, grupos de complementación A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N, P (FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCJ, FANCL, FANCM, FANCN, FANCP) y RAD51 homólogo C (*S. cerevisiae*) (RAD51C), mutaciones en las cuales puede causar anemia de Fanconi.

Determinadas modalidades se refieren a un agente terapéutico que comprende un ácido nucleico. En una modalidad, el ácido nucleico codifica una o más proteínas de edición génica. Otras modalidades se refieren a un agente terapéutico que comprende una o más células que se transfectan, se reprograman y/o se les editan los genes *in vivo* de acuerdo con los métodos de la presente divulgación. En una modalidad, una célula se transfecta, se reprograma y/o se le editan los genes y la célula transfectada, reprogramada y/o con edición génica se introduce en un paciente. En otra modalidad, se recolecta la célula del mismo paciente en el cual se introduce la célula transfectada, reprogramada y/o con edición génica. Algunos ejemplos de enfermedades que se pueden tratar con los agentes terapéuticos de la presente divulgación incluyen, entre otros, mal de Alzheimer, lesión de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica, fibrosis quística, enfermedad cardíaca, incluido cardiomiopatía isquémica y dilatada, degeneración macular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, diabetes, anemia de células falciformes, talasemia, anemia de Fanconi, xeroderma pigmentoso, distrofia muscular, inmunodeficiencia combinada grave, neuropatía sensorial hereditaria, cáncer y VIH/SIDA. En determinadas modalidades, el agente terapéutico comprende un cosmético. En una modalidad, se recolecta una célula de un paciente, se reprograma la célula y se amplía a una gran cantidad de células adiposas, para producir un cosmético y este se introduce en el paciente. En otra modalidad, se utiliza el cosmético para la reconstrucción de tejidos.

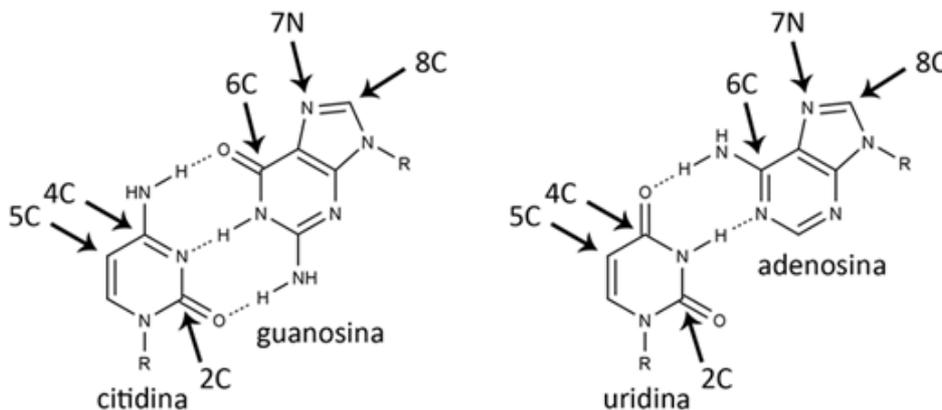
Si bien en la presente se proporcionan ejemplos detallados para la producción de tipos de células específicos y para la producción de agentes terapéuticos que comprenden tipos específicos de células, se reconoce que se pueden utilizar los métodos de la presente divulgación para producir muchos otros tipos de células, y para producir agentes terapéuticos que comprenden uno o más de muchos otros tipos de células, por ejemplo, mediante la reprogramación de una célula de acuerdo con los métodos de la presente divulgación y el cultivo de la célula en condiciones que imitan uno o más aspectos del desarrollo proporcionando condiciones que se asemejan a las condiciones presentes en el microambiente celular durante el desarrollo.

Determinadas modalidades se refieren a una biblioteca de células con diversos tipos de antígenos leucocitarios humanos (HLA) ("bibliotecas que coinciden con HLA"). Una biblioteca que coincide con HLA puede ser beneficiosa en parte porque puede provocar la producción y/o distribución rápida de agentes terapéuticos, sin que el paciente tenga que esperar a que se produzca un agente terapéutico a partir de las células del paciente. Esta biblioteca puede ser especialmente favorable para la producción de cosméticos y para el tratamiento de la enfermedad cardíaca y de las enfermedades de la sangre y/o el sistema inmunológico, por lo cual los pacientes se pueden beneficiar de la disponibilidad inmediata de un agente terapéutico o cosmético.

Determinados nucleótidos no canónicos, cuando se incorporan en las moléculas de ARN sintéticas, pueden reducir la toxicidad de las moléculas de ARN sintéticas, en parte mediante la interferencia con la unión de las proteínas que detectan ácidos nucleicos exógenos, por ejemplo, la proteína cinasa R, Rig-1 y la familia de proteínas oligoadenilato sintetasa. Los nucleótidos no canónicos que se ha informado que reducen la toxicidad de las moléculas de ARN sintéticas cuando se incorporan en estas incluyen: pseudouridina, 5-metiluridina, 2-tiouridina, 5-metilcitidina, N6-metiladenosina y determinadas combinaciones de estas. Sin embargo, hasta ahora se desconocen las características químicas de los nucleótidos no canónicos que les permiten reducir la toxicidad *in vivo* de las moléculas de ARN sintéticas. Además, la incorporación de grandes cantidades de la mayoría de los nucleótidos no canónicos, por ejemplo, 5-metiluridina, 2-tiouridina, 5-metilcitidina y N6-metiladenosina, puede reducir la eficacia con la cual se pueden traducir las moléculas de ARN sintéticas en proteína, lo que limita la utilidad de las moléculas de ARN sintéticas que contienen estos nucleótidos en las aplicaciones que requieren expresión de proteínas. Además, si bien la pseudouridina se puede sustituir completamente por uridina en las moléculas de ARN sintéticas, sin reducir la eficacia con la cual se pueden traducir las moléculas de ARN sintéticas en proteína, en determinadas situaciones, por ejemplo, cuando se realizan transfecciones frecuentes y reiteradas, las moléculas de ARN sintéticas que contienen solamente

adenosina, guanosina, citidina y pseudouridina pueden presentar una toxicidad excesiva.

Se ha descubierto que las moléculas de ARN sintéticas que contienen uno o más nucleótidos no canónicos que incluyen una o más sustituciones en las posiciones 2C, 4C y/o 5C en el caso de una pirimidina o en las posiciones 6C, 7N y/u 8C en el caso de una purina pueden ser menos tóxicas que las moléculas de ARN sintéticas que contienen solamente nucleótidos canónicos, debido, en parte, a la capacidad de las sustituciones en estas posiciones de interferir con el reconocimiento de las moléculas de ARN sintéticas por las proteínas que detectan los ácidos nucleicos exógenos y, además, que las sustituciones en estas posiciones pueden tener un efecto mínimo sobre la eficacia con la cual se pueden traducir las moléculas de ARN sintéticas en proteína, debido, en parte, a la falta de interferencia de las sustituciones en estas posiciones con las interacciones de apareamiento de bases y de apilamiento de bases.



Algunos ejemplos de nucleótidos no canónicos que incluyen una o más sustituciones en las posiciones 2C, 4C y/o 5C en el caso de una pirimidina o en las posiciones 6C, 7N y/u 8C en el caso de una purina incluyen, de modo no taxativo:

2-tiouridina, 5-azauridina, pseudouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, 5-aminouridina, 5-hidroxiuridina, 5-metil-5-azauridina, 5-amino-5-azauridina, 5-hidroxi-5-azauridina, 5-metilpseudouridina, 5-aminopseudouridina, 5-hidroxipseudouridina, 4-tio-5-azauridina, 4-tiopseudouridina, 4-tio-5-metiluridina, 4-tio-5-aminouridina, 4-tio-5-hidroxiuridina, 4-tio-5-metil-5-azauridina, 4-tio-5-amino-5-azauridina, 4-tio-5-hidroxi-5-azauridina, 4-tio-5-metilpseudouridina, 4-tio-5-aminopseudouridina, 4-tio-5-hidroxipseudouridina, 2-tiocitidina, 5-azacitidina, pseudoisocitidina, N4-metilcitidina, N4-aminocitidina, N4-hidroxicitidina, 5-metilcitidina, 5-aminocitidina, 5-hidroxicitidina, 5-metil-5-azacitidina, 5-amino-5-azacitidina, 5-hidroxi-5-azacitidina, 5-metilpseudoisocitidina, 5-aminopseudoisocitidina, 5-hidroxipseudoisocitidina, N4-metil-5-azacitidina, N4-metilpseudoisocitidina, 2-tio-5-azacitidina, 2-tiopseudoisocitidina, 2-tio-N4-metilcitidina, 2-tio-N4-aminocitidina, 2-tio-N4-hidroxicitidina, 2-tio-5-metilcitidina, 2-tio-5-aminocitidina, 2-tio-5-hidroxicitidina, 2-tio-5-metil-5-azacitidina, 2-tio-5-amino-5-azacitidina, 2-tio-5-hidroxi-5-azacitidina, 2-tio-5-metilpseudoisocitidina, 2-tio-5-aminopseudoisocitidina, 2-tio-5-hidroxipseudoisocitidina, 2-tio-N4-metil-5-azacitidina, 2-tio-N4-metilpseudoisocitidina, N4-metil-5-metilcitidina, N4-metil-5-aminocitidina, N4-metil-5-hidroxicitidina, N4-metil-5-metil-5-azacitidina, N4-metil-5-amino-5-azacitidina, N4-metil-5-hidroxi-5-azacitidina, N4-metil-5-metilpseudoisocitidina, N4-metil-5-aminopseudoisocitidina, N4-metil-5-hidroxipseudoisocitidina, N4-amino-5-azacitidina, N4-aminopseudoisocitidina, N4-amino-5-metilcitidina, N4-amino-5-aminocitidina, N4-amino-5-hidroxicitidina, N4-amino-5-metil-5-azacitidina, N4-amino-5-amino-5-azacitidina, N4-amino-5-hidroxi-5-azacitidina, N4-amino-5-metilpseudoisocitidina, N4-amino-5-aminopseudoisocitidina, N4-amino-5-hidroxipseudoisocitidina, N4-hidroxi-5-azacitidina, N4-hidroxipseudoisocitidina, N4-hidroxi-5-metilcitidina, N4-hidroxi-5-aminocitidina, N4-hidroxi-5-hidroxicitidina, N4-hidroxi-5-metil-5-azacitidina, N4-hidroxi-5-amino-5-azacitidina, N4-hidroxi-5-hidroxi-5-azacitidina, N4-hidroxi-5-metilpseudoisocitidina, N4-hidroxi-5-aminopseudoisocitidina, N4-hidroxi-5-hidroxipseudoisocitidina, 2-tio-N4-metil-5-metilcitidina, 2-tio-N4-metil-5-aminocitidina, 2-tio-N4-metil-5-hidroxicitidina, 2-tio-N4-metil-5-metil-5-azacitidina, 2-tio-N4-metil-5-amino-5-azacitidina, 2-tio-N4-metil-5-hidroxi-5-azacitidina, 2-tio-N4-metil-5-metilpseudoisocitidina, 2-tio-N4-metil-5-aminopseudoisocitidina, 2-tio-N4-metil-5-hidroxipseudoisocitidina, 2-tio-N4-amino-5-azacitidina, 2-tio-N4-aminopseudoisocitidina, 2-tio-N4-amino-5-metilcitidina, 2-tio-N4-amino-5-aminocitidina, 2-tio-N4-amino-5-hidroxicitidina, 2-tio-N4-amino-5-metil-5-azacitidina, 2-tio-N4-amino-5-amino-5-azacitidina, 2-tio-N4-amino-5-hidroxi-5-azacitidina, 2-tio-N4-amino-5-metilpseudoisocitidina, 2-tio-N4-amino-5-aminopseudoisocitidina, 2-tio-N4-amino-5-hidroxipseudoisocitidina, 2-tio-N4-hidroxi-5-azacitidina, 2-tio-N4-hidroxipseudoisocitidina, 2-tio-N4-hidroxi-5-metilcitidina, N4-hidroxi-5-aminocitidina, 2-tio-N4-hidroxi-5-hidroxicitidina, 2-tio-N4-hidroxi-5-metil-5-azacitidina, 2-tio-N4-hidroxi-5-amino-5-azacitidina, 2-tio-N4-hidroxi-5-hidroxi-5-azacitidina, 2-tio-N4-hidroxi-5-metilpseudoisocitidina, 2-tio-N4-hidroxi-5-aminopseudoisocitidina, 2-tio-N4-hidroxi-5-hidroxipseudoisocitidina, N6-metiladenosina, N6-aminoadenosina, N6-hidroxiadenosina, 7-deazaadenosina, 8-azaadenosina, N6-metil-7-deazaadenosina, N6-metil-8-azaadenosina, 7-deaza-8-azaadenosina, N6-metil-7-deaza-8-azaadenosina, N6-amino-7-deazaadenosina, N6-amino-8-azaadenosina, N6-amino-7-deaza-8-azaadenosina, N6-hidroxiadenosina, N6-hidroxi-7-deazaadenosina, N6-hidroxi-8-azaadenosina, N6-hidroxi-7-deaza-8-azaadenosina, 6-tioguanosina, 7-deazaguanosina, 8-azaguanosina, 6-tio-7-deazaguanosina, 6-tio-8-azaguanosina, 7-deaza-8-azaguanosina y 6-tio-7-deaza-8-azaguanosina. Cabe señalar que existen esquemas de nombramiento alternativos para determinados nucleótidos no canónicos. Por ejemplo, en determinadas situaciones, la 5-metilpseudouridina se puede denominar "3-

metilpseudouridina", "N3-metilpseudouridina", "1-metilpseudouridina" o "N1-metilpseudouridina".

Los nucleótidos que contienen el prefijo "amino" se pueden referir a cualquier nucleótido que contenga un átomo de nitrógeno unido al átomo en la posición establecida del nucleótido, por ejemplo, 5-aminocitidina se puede referir a 5-aminocitidina, 5-metilaminocitidina y 5-nitrocitidina. De forma similar, los nucleótidos que contienen el prefijo "metil" se pueden referir a cualquier nucleótido que contenga un átomo de carbono unido al átomo en la posición establecida del nucleótido, por ejemplo, 5-metilcitidina se puede referir a 5-metilcitidina, 5-etilcitidina y 5-hidroximetilcitidina, los nucleótidos que contienen el prefijo "tio" se pueden referir a cualquier nucleótido que contenga un átomo de azufre unido al átomo en la posición dada del nucleótido y los nucleótidos que contienen el prefijo "hidroxi" se pueden referir a cualquier nucleótido que contenga un átomo de oxígeno unido al átomo en la posición dada del nucleótido, por ejemplo, 5-hidroxiuridina puede referirse a 5-hidroxiuridina y uridina con un grupo metilo unido a un átomo de oxígeno, donde el átomo de oxígeno se une al átomo en la posición 5C de la uridina.

Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a una molécula sintética de ARN, donde la molécula sintética de ARN contiene uno o más nucleótidos que incluyen una o más sustituciones en las posiciones 2C, 4C y/o 5C en el caso de una pirimidina o en las posiciones 6C, 7N y/u 8C en el caso de una purina. Otras modalidades se refieren a un agente terapéutico, donde el agente terapéutico contiene una o más moléculas sintéticas de ARN, y donde la o las moléculas sintéticas de ARN contienen uno o más nucleótidos que incluyen una o más sustituciones en las posiciones 2C, 4C y/o 5C en el caso de una pirimidina o en las posiciones 6C, 7N y/u 8C en el caso de una purina. En una modalidad, el agente terapéutico comprende un reactivo de transfección. En otra modalidad, el reactivo de transfección comprende un lípido catiónico, un liposoma o una micela. En aun otra modalidad, el liposoma o la micela comprende folato y la composición terapéutica tiene actividad contra el cáncer. En otra modalidad, el o los nucleótidos incluyen al menos uno de pseudouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-azauridina, 5-hidroxiuridina, 5-metiluridina, 5-aminouridina, 2-tiopseudouridina, 4-tiopseudouridina, 5-hidroxipseudouridina, 5-metilpseudouridina, 5-aminopseudouridina, pseudoisocitidina, N4-metilcitidina, 2-tiocitidina, 5-azacitidina, 5-hidroxicitidina, 5-aminocitidina, 5-metilcitidina, N4-metilpseudoisocitidina, 2-tiopseudoisocitidina, 5-hidroxipseudoisocitidina, 5-aminopseudoisocitidina, 5-metilpseudoisocitidina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 6-tioguanosina y 6-tio-7-deazaguanosina. En otra modalidad, el o los nucleótidos incluyen al menos uno de pseudouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-azauridina, 5-hidroxiuridina, 5-metiluridina, 5-aminouridina, 2-tiopseudouridina, 4-tiopseudouridina, 5-hidroxipseudouridina y 5-metilpseudouridina y al menos uno de pseudoisocitidina, N4-metilcitidina, 2-tiocitidina, 5-azacitidina, 5-hidroxicitidina, 5-aminocitidina, 5-metilcitidina, N4-metilpseudoisocitidina, 2-tiopseudoisocitidina, 5-hidroxipseudoisocitidina, 5-aminopseudoisocitidina y 5-metilpseudoisocitidina. En otra modalidad, el o los nucleótidos incluyen al menos uno de pseudouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-azauridina, 5-hidroxiuridina, 5-metiluridina, 5-aminouridina, 2-tiopseudouridina, 4-tiopseudouridina, 5-hidroxipseudouridina y 5-metilpseudouridina, 5-aminopseudouridina y al menos uno de pseudoisocitidina, N4-metilcitidina, 2-tiocitidina, 5-azacitidina, 5-hidroxicitidina, 5-aminocitidina, 5-metilcitidina, N4-metilpseudoisocitidina, 2-tiopseudoisocitidina, 5-hidroxipseudoisocitidina, 5-aminopseudoisocitidina, 5-metilpseudoisocitidina y al menos uno de 7-deazaguanosina, 6-tioguanosina y 6-tio-7-deazaguanosina. En otra modalidad, el uno o más nucleótidos incluyen: 5-metilcitidina y 7-deazaguanosina. En otra modalidad, el o los nucleótidos también incluyen pseudouridina o 4-tiouridina o 5-metiluridina o 5-aminouridina o 4-tiopseudouridina o 5-metilpseudouridina o 5-aminopseudouridina. En otra modalidad, el o los nucleótidos incluyen 7-deazaadenosina. En otra modalidad, el o los nucleótidos incluyen: pseudoisocitidina y 7-deazaguanosina y 4-tiouridina. En otra modalidad, el o los nucleótidos incluyen: pseudoisocitidina o 7-deazaguanosina y pseudouridina. En aun otra modalidad, el uno o más nucleótidos incluyen: 5-metiluridina, 5-metilcitidina y 7-deazaguanosina. En otra modalidad, el o los nucleótidos incluyen: pseudouridina o 5-metilpseudouridina y 5-metilcitidina y 7-deazaguanosina. En otra modalidad, el o los nucleótidos incluyen: pseudoisocitidina y 7-deazaguanosina y pseudouridina. En una modalidad, la molécula de ARN sintética está presente *in vivo*.

Se pueden incorporar determinados nucleótidos no canónicos de forma más eficaz que otros nucleótidos no canónicos en moléculas sintéticas de ARN mediante polimerasas de ARN que se utilizan comúnmente para la transcripción *in vitro*, debido en parte a la tendencia de estos determinados nucleótidos no canónicos a participar en interacciones de apareamiento de bases y de apilamiento de bases convencionales y a interactuar con la ARN polimerasa de un modo similar al modo en que interactúa el nucleótido canónico correspondiente con la ARN polimerasa. Como consecuencia, determinadas mezclas de nucleótidos que contienen uno o más nucleótidos no canónicos pueden ser favorables en parte porque las reacciones de transcripción *in vitro* que contienen estas mezclas de nucleótidos pueden dar una gran cantidad de ARN sintético. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a una mezcla de nucleótidos que contiene uno o más nucleótidos que incluyen una o más sustituciones en las posiciones 2C, 4C y/o 5C en el caso de una pirimidina o en las posiciones 6C, 7N y/u 8C en el caso de una purina. Las mezclas de nucleótidos incluyen, de modo no taxativo (los números que preceden cada nucleótido indican un ejemplo de fracción del nucleótido no canónico trifosfato en una reacción de transcripción *in vitro*, por ejemplo, 0,2 pseudoisocitidina se refiere a una reacción que contiene adenosina-5'-trifosfato, guanosina-5'-trifosfato, uridina-5'-trifosfato, citidina-5'-trifosfato y pseudoisocitidina-5'-trifosfato, donde pseudoisocitidina-5'-trifosfato está presente en la reacción en una cantidad aproximadamente igual a 0,2 veces la cantidad total de pseudoisocitidina-5'-trifosfato + citidina-5'-trifosfato que está presente en la reacción, con las cantidades medidas ya sea en moles o en masa y donde más de un número que precede un nucleósido indica un intervalo de ejemplos de fracciones): 1,0 pseudouridina, 0,1 - 0,8 2-tiouridina, 0,1 - 0,8 5-metiluridina, 0,2 - 1,0 5-hidroxiuridina, 0,1 - 1,0 5-aminouridina, 0,1 - 1,0 4-tiouridina, 0,1 - 1,0 2-tiopseudouridina, 0,1 - 1,0 4-tiopseudouridina, 0,1 - 1,0 5-hidroxipseudouridina, 0,2 - 1 5-metilpseudouridina, 0,1 - 1,0 5-

5 aminopseudouridina, 0,2 - 1,0 2-tiocitidina, 0,1 - 0,8 pseudoisocitidina, 0,2 - 1,0 5-metilcitidina, 0,2 - 1,0 5-hidroxicitidina, 0,1 - 1,0 5-aminocitidina, 0,2 - 1,0 N4-metilcitidina, 0,2 - 1,0 5-metilpseudoisocitidina, 0,2 - 1,0 5-hidroxipseudoisocitidina, 0,2 - 1,0 5-aminopseudoisocitidina, 0,2 - 1,0 N4-metilpseudoisocitidina, 0,2 - 1,0 2-tiopseudoisocitidina, 0,2 - 1,0 7-deazaguanosina, 0,2 - 1,0 6-tioguanosina, 0,2 - 1,0 6-tio-7-deazaguanosina, 0,2 - 1,0 8-azaguanosina, 0,2 - 1,0 7-deaza-8-azaguanosina, 0,2 - 1,0 6-tio-8-azaguanosina, 0,1 - 0,5 7-deazaadenosina y 0,1 - 0,5 N6-metiladenosina.

10 En diversas modalidades, la composición sintética de ARN o composición sintética de polinucleótidos (por ejemplo, que puede prepararse mediante transcripción *in vitro*) contiene de forma sustancial o completa el nucleótido canónico en las posiciones que tienen una adenina o "A" en el código genético. El término "sustancialmente", en este contexto, se refiere a al menos 90 %. En estas modalidades, la composición sintética de ARN o composición sintética de polinucleótidos puede contener además (por ejemplo, consistir en) 7-deazaguanosina en posiciones con "G" en el código genético, así como el nucleótido canónico "G" correspondiente, y el nucleótido canónico y no canónico en posiciones con G puede encontrarse en el intervalo de 5:1 a 1:5 o, en algunas modalidades, en el intervalo de 2:1 a 1:2. En estas modalidades, la composición sintética de ARN o composición sintética de polinucleótidos puede contener además (por ejemplo, consistir en) uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) de 5-hidroximetilcitidina, 5-hidroxicitidina, 5-carboxicitidina y 5-formilcitidina en posiciones con "C" en el código genético, así como el nucleótido canónico "C", y el nucleótido canónico y no canónico en posiciones con G puede encontrarse en el intervalo de 5:1 a 1:5 o, en algunas modalidades, en el intervalo de 2:1 a 1:2. En algunas modalidades, el nivel de nucleótido no canónico en las posiciones de "C" se describe en el párrafo que antecede. En estas modalidades, la composición sintética de ARN o composición sintética de polinucleótidos puede contener además (por ejemplo, consistir en) uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) de 5-hidroximetiluridina, 5-hidroxiuridina, 5-carboxiuridina y 5-formiluridina en posiciones con "U" en el código genético, así como el nucleótido canónico "U", y el nucleótido canónico y no canónico en posiciones con G puede encontrarse en el intervalo de 5:1 a 1:5 o, en algunas modalidades, en el intervalo de 2:1 a 1:2. En algunas modalidades, el nivel de nucleótido no canónico en las posiciones de "U" se describe en el párrafo que antecede.

30 Se ha descubierto que combinar determinados nucleótidos no canónicos puede ser beneficioso en parte porque la contribución de los nucleótidos no canónicos a bajar la toxicidad de las moléculas de ARN sintéticas puede ser aditiva. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a una mezcla de nucleótidos, donde la mezcla de nucleótidos contiene más de uno de los nucleótidos no canónicos enumerados anteriormente, por ejemplo, la mezcla de nucleótidos contiene la pseudoisocitidina y 7-deazaguanosina o la mezcla de nucleótidos contiene N4-metilcitidina y 7-deazaguanosina, etc. En una modalidad, la mezcla de nucleótidos contiene más de uno de los nucleótidos no canónicos enumerados anteriormente y cada uno de los nucleótidos no canónicos está presente en la mezcla en la fracción enumerada anteriormente, por ejemplo, la mezcla de nucleótidos contiene 0,1 - 0,8 pseudoisocitidina y 0,2 - 1,0 7-deazaguanosina o la mezcla de nucleótidos contiene 0,2 - 1,0 N4-metilcitidina y 0,2 - 1,0 7-deazaguanosina, etc.

40 En determinadas situaciones, por ejemplo, cuando no resulta deseable o necesario maximizar el rendimiento de una reacción de transcripción *in vitro*, se pueden utilizar fracciones de nucleótidos diferentes de las mencionadas anteriormente. Los ejemplos de fracciones y los intervalos de fracciones enumerados anteriormente se refieren a soluciones de nucleótido-trifosfato de una pureza típica (más de 90 % de pureza). Se pueden utilizar fracciones más grandes de estos y otros nucleótidos mediante el uso de soluciones de nucleótido-trifosfato de mayor pureza, por ejemplo, mayor que alrededor de 95 % de pureza o mayor que alrededor de 98 % de pureza o mayor que alrededor de 99 % de pureza o mayor que alrededor de 99,5 % de pureza, que se pueden lograr, por ejemplo, mediante la purificación de la solución de nucleótido trifosfato mediante el uso de las tecnologías de purificación química actuales, como la cromatografía líquida a presión alta (HPLC) o a través de otros medios. En una modalidad, se purificaron nucleótidos con múltiples isómeros para enriquecer al isómero deseado.

50 Otras modalidades se refieren a un método para inducir que una célula *in vivo* exprese una proteína de interés mediante el contacto de la célula con una molécula de ARN sintética que contiene uno o más nucleótidos no canónicos que incluyen una o más sustituciones en las posiciones 2C, 4C y/o 5C en el caso de una pirimidina o en las posiciones 6C, 7N y/u 8C en el caso de una purina. Otras modalidades se refieren a un método para transfectar, reprogramar y/o editar los genes de una célula *in vivo* mediante el contacto de la célula con una molécula de ARN sintética que contiene uno o más nucleótidos no canónicos que incluyen una o más sustituciones en las posiciones 2C, 4C y/o 5C en el caso de una pirimidina o en las posiciones 6C, 7N y/u 8C en el caso de una purina. En una modalidad, se produce la molécula de ARN sintética mediante transcripción *in vitro*. En una modalidad, la molécula de ARN sintética codifica uno o más factores de reprogramación. En otra modalidad, el o los factores de reprogramación incluyen la proteína Oct4. En otra modalidad, la célula también se pone en contacto con una molécula de ARN sintética que codifica una proteína Sox2. En otra modalidad, la célula también se pone en contacto con una molécula de ARN sintética que codifica una proteína Klf4. En otra modalidad, la célula también se pone en contacto con una molécula de ARN sintética que codifica una proteína c-Myc. En otra modalidad, la célula también se pone en contacto con una molécula de ARN sintética que codifica una proteína Lin28.

65 Las enzimas como la ARN polimerasa T7 pueden incorporar preferentemente nucleótidos canónicos en una reacción de transcripción *in vitro* que contiene nucleótidos canónicos y no canónicos. Como consecuencia, una reacción de transcripción *in vitro* que contiene una determinada fracción de un nucleótido no canónico puede producir ARN que

5 contiene una fracción diferente, a menudo inferior, del nucleótido no canónico que la fracción con la que el nucleótido no canónico estaba presente en la reacción. En determinadas modalidades, por lo tanto, las referencias a las fracciones de incorporación de nucleótidos (por ejemplo, "una molécula de ARN sintética que contiene 50 % de pseudoisocitidina" o "0,1 - 0,8 pseudoisocitidina") se pueden referir a moléculas de ARN que contienen la fracción indicada del nucleótido y a moléculas de ARN sintetizadas en una reacción que contiene la fracción indicada del nucleótido (o del derivado del nucleótido, por ejemplo, nucleótido-trifosfato), aunque dicha reacción pueda producir ARN que contiene una fracción diferente del nucleótido que la fracción de nucleótido no canónico que estaba presente en la reacción.

10 Diferentes secuencias de nucleótidos pueden codificar la misma proteína mediante el uso de codones alternativos. En determinadas modalidades, por lo tanto, las referencias a las fracciones de incorporación de nucleótidos se pueden referir a moléculas de ARN que contienen la fracción indicada del nucleótido y a moléculas de ARN que codifican la misma proteína que una molécula de ARN diferente, donde la molécula de ARN diferente contiene la fracción indicada del nucleótido.

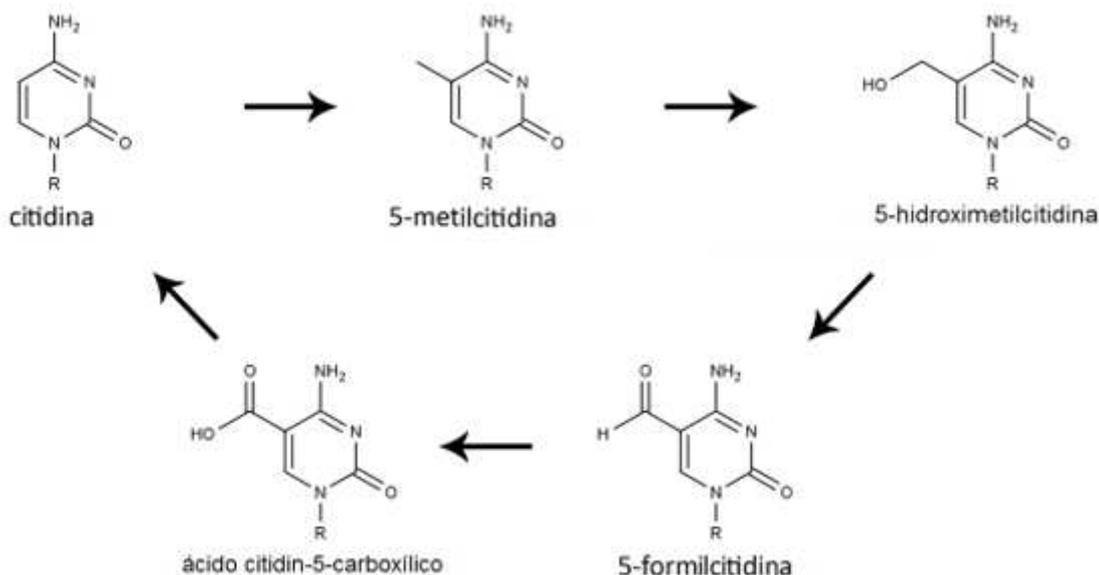
15 Determinadas modalidades se refieren a un kit que contiene uno o más materiales necesarios para llevar a la práctica la presente invención. En una modalidad, el kit contiene una o más moléculas sintéticas de ARN. En una modalidad, el kit contiene una o más moléculas de ARN sintéticas que codifican uno o más factores de reprogramación y/o proteínas de edición génica. En otra modalidad, la una o más moléculas de ARN sintéticas contienen uno o más nucleótidos no canónicos que incluyen una o más sustituciones en las posiciones 2C, 4C y/o 5C en el caso de una pirimidina o en las posiciones 6C, 7N y/u 8C en el caso de una purina. En otra modalidad, el kit contiene uno o más de: un medio de transfección, un reactivo de transfección, un medio de complejación y una solución de matriz. En una modalidad, la solución de matriz contiene fibronectina y/o vitronectina, o fibronectina recombinante y/o vitronectina recombinante. En una modalidad, uno o más de los componentes del kit están presentes como múltiples alícuotas. En una modalidad, el kit contiene alícuotas de los complejos de reactivos de transfección de ácido nucleico. En otra modalidad, el kit contiene alícuotas de los complejos de reactivos de transfección de ácido nucleico que se proporcionan en forma sólida, por ejemplo, como sedimentos congelados o liofilizados. En aun otra modalidad, el kit contiene alícuotas de medio, donde cada alícuota contiene complejos de reactivos de transfección-ácidos nucleicos que se estabilizan ya sea mediante tratamiento químico o por congelamiento.

20 La transfección, en general, y la reprogramación, en particular, pueden ser técnicas difíciles y lentas que pueden ser repetitivas y propensas a errores. Sin embargo, estas técnicas se suelen realizar manualmente debido a la falta de equipos de transfección automatizados. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un sistema que puede transfectar, reprogramar y/o editar los genes de las células *in vivo* de una manera automatizada o semiautomatizada.

25 Se ha descubierto que los miembros nucleótidos no canónicos de la vía de desmetilación de 5-metilcitidina, cuando se incorporan en ARN sintético, pueden aumentar la eficacia con la cual el ARN sintético puede traducirse en proteínas *in vivo*, y puede disminuir la toxicidad del ARN sintético *in vivo*. Estos nucleótidos no canónicos incluyen, por ejemplo: 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-formilcitidina y 5-carboxicitidina (también conocida como "ácido citidin-5-carboxílico"). Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un ácido nucleico. En algunas modalidades, el ácido nucleico está presente *in vivo*. En una modalidad, el ácido nucleico es una molécula sintética de ARN. En otra modalidad, el ácido nucleico comprende uno o más nucleótidos no canónicos. En una modalidad, el ácido nucleico comprende uno o más miembros no canónicos de la vía de desmetilación de 5-metilcitidina. En otra modalidad, el ácido nucleico comprende al menos uno de: 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-formilcitidina y 5-carboxicitidina o un derivado de estas. En una modalidad adicional, el ácido nucleico comprende al menos uno de: pseudouridina, 5-metilpseudouridina, 5-hidroxiuridina, 5-metiluridina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, N4-metilcitidina, N4-acetilcitidina y 7-deazaguanosinaf o un derivado de estas.

30 *Vía de desmetilación de 5-metilcitidina*

50



Determinadas modalidades se refieren a una proteína. Otras modalidades se refieren a un ácido nucleico que codifica una proteína. En una modalidad, la proteína es una proteína de interés. En otra modalidad, la proteína se selecciona de: una proteína de desprogramación y una proteína de edición génica. En una modalidad, el ácido nucleico es un plásmido. En otra modalidad, el ácido nucleico está presente en un virus o vector viral. En una modalidad adicional, el virus o vector viral es incompetente para la replicación. En otra modalidad adicional, el virus o vector viral es competente para la replicación. En una modalidad, el virus o vector viral incluye al menos uno de: un adenovirus, un retrovirus, un lentivirus, un virus de herpes, un virus adenoasociado o una variante natural o modificada genéticamente de estos, y un virus modificado genéticamente.

También se ha descubierto que determinadas combinaciones de nucleótidos no canónicos pueden ser particularmente eficaces para aumentar la eficacia con la cual el ARN sintético puede traducirse en la proteína *in vivo*, y disminuir la toxicidad del ARN sintético *in vivo*, por ejemplo, las siguientes combinaciones: 5-metiluridina y 5-metilcitidina, 5-hidroxiuridina y 5-metilcitidina, 5-hidroxiuridina y 5-hidroximetilcitidina, 5-metiluridina y 7-deazaguanosina, 5-metilcitidina y 7-deazaguanosina, 5-metiluridina, 5-metilcitidina, y 7-deazaguanosina, y 5-metiluridina, 5-hidroximetilcitidina y 7-deazaguanosina. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un ácido nucleico que comprende al menos dos de: 5-metiluridina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, y 7-deazaguanosina o uno o más derivados de estas. Otras modalidades se refieren a un ácido nucleico que comprende al menos tres de: 5-metiluridina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, y 7-deazaguanosina o uno o más derivados de estas. Otras modalidades se refieren a un ácido nucleico que comprende todas las siguientes: 5-metiluridina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, y 7-deazaguanosina o uno o más derivados de estas. En una modalidad, el ácido nucleico comprende uno o más residuos de 5-metiluridina, uno o más residuos de 5-metilcitidina, y uno o más residuos de 7-deazaguanosina o uno o más residuos de 5-metiluridina, uno o más residuos de 5-hidroximetilcitidina, y uno o más residuos de 7-deazaguanosina.

Se ha descubierto además que las moléculas sintéticas de ARN que contienen determinadas fracciones de determinados nucleótidos no canónicos y combinaciones de estos pueden presentar una eficacia de traducción particularmente alta y baja toxicidad *in vivo*. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un ácido nucleico que comprende al menos uno de: uno o más residuos de uridina, uno o más residuos de citidina y uno o más residuos de guanosina, y comprende uno o más nucleótidos no canónicos. En una modalidad, entre alrededor del 20 % y alrededor del 80 % de los residuos de uridina son residuos de 5-metiluridina. En otra modalidad, entre alrededor del 30 % y alrededor del 50 % de los residuos de uridina son residuos de 5-metiluridina. En una modalidad adicional, alrededor del 40 % de los residuos de uridina son residuos de 5-metiluridina. En una modalidad, entre alrededor del 60 % y alrededor del 80 % de los residuos de citidina son residuos de 5-metilcitidina. En otra modalidad, entre alrededor del 80 % y alrededor del 100 % de los residuos de citidina son residuos de 5-metilcitidina. En una modalidad adicional, alrededor del 100 % de los residuos de citidina son residuos de 5-metilcitidina. En otra modalidad adicional, entre alrededor del 20 % y alrededor del 100 % de los residuos de citidina son residuos de 5-hidroximetilcitidina. En una modalidad, entre alrededor del 20 % y alrededor del 80 % de los residuos de guanosina son residuos de 7-deazaguanosina. En otra modalidad, entre alrededor del 40 % y alrededor del 60 % de los residuos de guanosina son residuos de 7-deazaguanosina. En una modalidad adicional, alrededor del 50 % de los residuos de guanosina son residuos de 7-deazaguanosina. En una modalidad, entre alrededor del 20 % y alrededor del 80 % o entre alrededor del 30 % y alrededor del 60 % o alrededor del 40 % de los residuos de citidina son residuos de N4-metilcitidina y/o N4-acetilcitidina. En otra modalidad, cada residuo de citidina es un residuo de 5-metilcitidina. En una modalidad adicional,

alrededor del 100 % de los residuos de citidina son residuos de 5-metilcitidina, y/o residuos de 5-hidroximetilcitidina, y/o residuos de N4-metilcitidina, y/o residuos de N4-acetilcitidina, y/o uno o más derivados de estos. En otra modalidad adicional alrededor del 40 % de los residuos de uridina son residuos de 5-metiluridina, entre alrededor del 20 % y alrededor del 100 % de los residuos de citidina son residuos de N4-metilcitidina y/o residuos de N4-acetilcitidina, y alrededor del 50 % de los residuos de guanosina son residuos de 7-deazaguanosina. En una modalidad, alrededor del 40 % de los residuos de uridina son residuos de 5-metiluridina y alrededor del 100 % de los residuos de citidina son residuos de 5-metilcitidina. En otra modalidad, alrededor del 40 % de los residuos de uridina son residuos de 5-metiluridina y alrededor del 100 % de los residuos de citidina son residuos de 5-metiluridina y alrededor del 50 % de los residuos de guanosina son residuos de 7-deazaguanosina. En otra modalidad adicional, alrededor del 100 % de los residuos de citidina son residuos de 5-metilcitidina y alrededor del 50 % de los residuos de guanosina son residuos de 7-deazaguanosina. En una modalidad adicional, alrededor del 100 % de los residuos de uridina son residuos de 5-hidroxiuridina. En una modalidad, alrededor del 40 % de los residuos de uridina son residuos de 5-metiluridina, alrededor del 100 % de los residuos de citidina son residuos de 5-metilcitidina, y alrededor del 50 % de los residuos de guanosina son residuos de 7-deazaguanosina. En otra modalidad, alrededor del 40 % de los residuos de uridina son residuos de 5-metiluridina, entre alrededor del 20 % y alrededor del 100 % de los residuos de citidina son residuos de 5-hidroximetilcitidina, y alrededor del 50 % de los residuos de guanosina son residuos de 7-deazaguanosina. En algunas modalidades, menos del 100% de los residuos de citidina son residuos de 5-metilcitidina. En otras modalidades, menos del 100% de los residuos de citidina son residuos de 5-hidroximetilcitidina. En una modalidad, cada residuo de uridina en la molécula sintética de ARN es un residuo de pseudouridina o un residuo de 5-metilpseudouridina. En otra modalidad, alrededor del 100 % de los residuos de uridina son residuos de pseudouridina y/o residuos de 5-metilpseudouridina. En otra modalidad adicional, alrededor del 100% de los residuos de uridina son residuos de pseudouridina 5-metilpseudouridina, alrededor del 100 % de los residuos de citidina son residuos de 5-metilcitidina, y alrededor del 50 % de los residuos de guanosina son residuos de 7-deazaguanosina.

Otros nucleótidos no canónicos que pueden utilizarse en lugar de 5-metiluridina o en combinación con esta incluyen, de modo no taxativo: pseudouridina, 5-hidroxiuridina y 5-metilpseudouridina (conocida como "1-metilpseudouridina", conocida como "N1-metilpseudouridina") o uno o más derivados de estas. Otros nucleótidos no canónicos que pueden utilizarse en lugar de 5-metilcitidina y/o 5-hidroximetilcitidina o en combinación con estas incluyen, de modo no taxativo: pseudoisocitidina, 5-metilpseudoisocitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-formilcitidina, 5-carboxicitidina, N4-metilcitidina, N4-acetilcitidina o uno o más derivados de estas. En determinadas modalidades, por ejemplo, al realizar solo una única transfección, inyección o administración o cuando las células, tejido, órgano o paciente que a los que se transfecta, inyecta o administra no son particularmente sensibles a la toxicidad asociada con la transfección o a la señalización inmunitaria innata, pueden reducirse las fracciones de nucleótidos no canónicos. La reducción de la fracción de nucleótidos no canónicos puede ser útil, en parte, dado a la que la reducción de la fracción de nucleótidos no canónicos puede reducir el costo del ácido nucleico. En determinadas situaciones, por ejemplo, cuando se desea una inmunogenicidad mínima del ácido nucleico, pueden aumentarse las fracciones de nucleótidos no canónicos.

Las enzimas como la ARN polimerasa T7 pueden incorporar preferentemente nucleótidos canónicos en una reacción de transcripción *in vitro* que contiene nucleótidos canónicos y no canónicos. Como consecuencia, una reacción de transcripción *in vitro* que contiene una determinada fracción de un nucleótido no canónico puede producir ARN que contiene una fracción diferente, a menudo inferior, del nucleótido no canónico que la fracción con la que el nucleótido no canónico estaba presente en la reacción. En determinadas modalidades, por lo tanto, las referencias a las fracciones de incorporación de nucleótidos (por ejemplo, "5-metiluridina al 50 %") se pueden referir a ácidos nucleicos que contienen la fracción indicada del nucleótido y a ácidos nucleicos sintetizados en una reacción que contiene la fracción indicada del nucleótido (o derivado del nucleótido, por ejemplo, nucleótido-trifosfato), a pesar de que dicha reacción pueda producir un ácido nucleico que contiene una fracción diferente del nucleótido que la fracción con la que el nucleótido no canónico estaba presente en la reacción. Además, distintas secuencias de nucleótidos pueden codificar la misma proteína mediante el uso de codones alternativos. En determinadas modalidades, por lo tanto, las referencias a las fracciones de incorporación de nucleótidos se pueden referir a ácidos nucleicos que contienen la fracción indicada del nucleótido y a ácidos nucleicos que codifican la misma proteína que un ácido nucleico diferente, donde el ácido nucleico diferente contiene la fracción indicada del nucleótido.

La secuencia de ADN de una célula puede ser alterada al poner en contacto la célula con una proteína de edición génica o mediante la inducción de la célula para expresar una proteína de edición génica. No obstante, las proteínas de edición génica descritas anteriormente poseen una eficacia de unión baja y actividad excesiva fuera del objetivo, lo que puede introducir mutaciones no deseadas en el ADN de la célula, limitando seriamente su uso *in vivo*, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas y cosméticas, donde la introducción de mutaciones no deseadas en las células de un paciente podría llevar al desarrollo de cáncer. Se ha descubierto recientemente que las proteínas de edición génica que comprenden el dominio de escisión de la endonucleasa StsI (SEQ ID NO: 1) pueden presentar una actividad *in vivo* fuera del objetivo sustancialmente menor que las proteínas de edición génica descritas anteriormente, al mismo tiempo que mantienen un nivel elevado de actividad *in vivo* en el objetivo. Se han descubierto también otras proteínas novedosas modificadas genéticamente que pueden presentar una actividad *in vivo* elevada en el objetivo, actividad *in vivo* baja fuera del objetivo, tamaño pequeño, solubilidad y otras características deseables cuando se utilizan como el dominio de nucleasa de una proteína de edición génica: StsI-HA (SEQ ID NO: 2), StsI-HA2 (SEQ ID NO: 3), StsI-UHA (SEQ ID NO: 4), StsI-UHA2 (SEQ ID NO: 5), StsI-HF (SEQ ID NO: 6) y StsI-UHF (SEQ ID NO: 7). StsI-HA, StsI-HA2 (actividad alta), StsI-UHA y StsI-UHA2 (actividad ultra alta) pueden presentar mayor actividad *in*

in vivo en el objetivo que ambas StsI de tipo salvaje y FokI de tipo salvaje, parcialmente debido a sustituciones específicas de aminoácidos dentro de la región del extremo N en las posiciones 34 y 61, mientras que StsI-HF (fidelidad alta) y StsI-UHF (fidelidad ultra alta) pueden presentar menor actividad *in vivo* fuera del objetivo que ambos StsI de tipo salvaje y FokI de tipo salvaje, parcialmente debido a sustituciones específicas de aminoácidos dentro del extremo C en las posiciones 141 y 152.

Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a una proteína. En algunas modalidades, la proteína está presente *in vivo*. En otras modalidades, la proteína comprende un dominio de nucleasa. En una modalidad, el dominio de nucleasas comprende uno o más de: el dominio de escisión de la endonucleasa FokI (SEQ ID NO: 53), el dominio de escisión de la endonucleasa StsI (SEQ ID NO: 1), StsI-HA (SEQ ID NO: 2), StsI-HA2 (SEQ ID NO: 3), StsI-UHA (SEQ ID NO: 4), StsI-UHA2 (SEQ ID NO: 5), StsI-HF (SEQ ID NO: 6) y StsI-UHF (SEQ ID NO: 7) o una variante o fragmento biológicamente activo de estas.

También se ha descubierto que las proteínas de edición génica modificadas genéticamente que comprenden dominios de unión a ADN que comprenden determinadas secuencias novedosas de repetición pueden presentar una actividad *in vivo* menor fuera del objetivo que las proteínas de edición génica descritas anteriormente, a la vez que mantienen un nivel alto de actividad *in vivo* en el objetivo. Algunas de estas proteínas de edición génica modificadas genéticamente pueden proporcionar diversas ventajas con respecto a proteínas de edición génica descritas anteriormente, inclusive, por ejemplo, mayor flexibilidad de la región de bisagra que conecta secuencias de repetición, lo que puede dar como resultado una mayor eficacia de unión. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a una proteína que comprende una pluralidad de secuencias de repetición. En una modalidad, al menos una de las secuencias de repetición contiene la secuencia de aminoácidos: GabG, donde "a" y "b", cada una, representan cualquier aminoácido. En una modalidad, la proteína es una proteína de edición génica. En otra modalidad, una o más de las secuencias de repetición están presentes en un dominio de unión a ADN. En una modalidad adicional, "a" y "b", cada una, se seleccionan de manera independiente del grupo: H y G. En otra modalidad adicional, "a" y "b" son H y G, respectivamente. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos está presente dentro de alrededor de 5 aminoácidos del extremo C de la secuencia de repetición. En otra modalidad, la secuencia de aminoácidos está presente en el extremo C de la secuencia de repetición. En algunas modalidades, una o más G de la secuencia de aminoácidos GabG se reemplaza con uno o más aminoácidos distintos de G, por ejemplo, A, H o GG. En una modalidad, la secuencia de repetición tiene una longitud de entre alrededor de 32 y alrededor de 40 aminoácidos, entre alrededor de 33 y alrededor de 39 aminoácidos, entre alrededor de 34 y 38 aminoácidos, entre alrededor de 35 y alrededor de 37 aminoácidos o alrededor de 36 aminoácidos, o más de alrededor de 32 aminoácidos, más de alrededor de 33 aminoácidos, más de alrededor de 34 aminoácidos o más de alrededor de 35 aminoácidos. Otras modalidades se refieren a una proteína que comprende uno o más dominios efectores similares al activador de la transcripción. En una modalidad, al menos uno de los dominios efectores similares al activador de la transcripción comprende una secuencia de repetición. Otras modalidades tienen como objetivo una proteína que comprende una pluralidad de secuencias de repetición generadas mediante la inserción de uno o más aminoácidos entre al menos dos de las secuencias de repetición de un dominio efector similar al activador de la transcripción. En una modalidad, uno o más aminoácidos se insertan a alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4 o alrededor de 5 aminoácidos a partir del extremo C de al menos una secuencia de repetición. Otras modalidades adicionales tienen como objetivo una proteína que comprende una pluralidad de secuencias de repetición, donde alrededor de una cada dos secuencias de repetición tiene una longitud distinta a la de la secuencia de repetición inmediatamente anterior o posterior a la secuencia de repetición. En una modalidad, una de cada dos secuencias de repetición tiene alrededor de 36 aminoácidos de longitud. En otra modalidad, una de cada dos secuencias de repetición tiene 36 aminoácidos de longitud. Aun otras modalidades tienen como objetivo una proteína que comprende una pluralidad de secuencias de repetición, donde la pluralidad de secuencias de repetición comprende al menos dos secuencias de repetición que tienen al menos 36 aminoácidos de longitud, y donde al menos dos de las secuencias de repetición que tienen al menos 36 aminoácidos de longitud están separadas por al menos una secuencia de repetición que tiene menos de 36 aminoácidos de longitud. Algunas modalidades tienen como objetivo una proteína que comprende una o más secuencias seleccionadas de, por ejemplo, la SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60.

Otras modalidades tienen como objetivo una proteína que comprende un dominio de unión a ADN. En algunas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende una pluralidad de secuencias de repetición. En una modalidad, la pluralidad de secuencias de repetición permite el reconocimiento de alta especificidad de un sitio de unión en una molécula de ADN objetivo. En otra modalidad, al menos dos de las secuencias de repetición tienen al menos alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % de homología entre sí. En una modalidad adicional, al menos una de las secuencias de repetición comprende una o más regiones capaces de unirse a un sitio de unión en una molécula de ADN objetivo. En otra modalidad adicional, el sitio de unión comprende una secuencia definida de entre alrededor de 1 y alrededor de 5 bases de longitud. En una modalidad, el dominio de unión a ADN comprende un dedo de cinc. En otra modalidad, el dominio de unión a ADN comprende un efector similar al activador de la transcripción (TALE). En una modalidad adicional, la pluralidad de secuencias de repetición tiene al menos una secuencia de repetición con al menos alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % de homología con un TALE. En otra modalidad adicional, la proteína de edición génica comprende una proteína asociada a las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas

(CRISPR). En una modalidad, la proteína de edición génica comprende una secuencia de localización nuclear. En otra modalidad, la secuencia de localización molecular comprende la secuencia de aminoácidos: PKKKRKV (SEQ ID NO: 145). En una modalidad, la proteína de edición génica comprende una secuencia de localización mitocondrial. En otra modalidad, la secuencia de localización mitocondrial comprende la secuencia de aminoácidos: LGRVIPRKIASRASLM (SEQ ID NO: 146). En una modalidad, la proteína de edición génica comprende un enlazador. En otra modalidad, el enlazador conecta a un dominio de unión a ADN con un dominio de nucleasas. En una modalidad adicional, el enlazador tiene una longitud de entre alrededor de 1 y alrededor de 10 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10 aminoácidos. En una modalidad, la proteína de edición génica es capaz de generar un corte o una rotura de cadena doble en una molécula de ADN objetivo.

Determinadas modalidades se refieren a un método para modificar el genoma de una célula *in vivo*, donde el método comprende introducir en la célula *in vivo* una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de origen no natural que comprende un dominio de repetición de efector similar al activador de la transcripción (TAL) que comprende una o más unidades de repetición con una longitud de 36 aminoácidos y un dominio de endonucleasas, donde el dominio de repetición se modifica genéticamente para el reconocimiento de una secuencia de nucleótidos predeterminada, y donde la proteína de fusión reconoce la secuencia de nucleótidos predeterminada. En una modalidad, la célula es una célula eucariota. En otra modalidad, la célula es una célula de animal. En una modalidad adicional, la célula es una célula de mamífero. En otra modalidad adicional, la célula es una célula de ser humano. En una modalidad, la célula es una célula vegetal. En otra modalidad, la célula es una célula procariota. En algunas modalidades, la proteína de fusión introduce una escisión endonucleolítica en un ácido nucleico de la célula, mediante la cual se modifica el genoma de la célula.

Determinadas modalidades se refieren a una composición para alterar la secuencia de ADN de una célula *in vivo* que comprende un ácido nucleico, donde el ácido nucleico codifica una proteína de edición génica. Otras modalidades se refieren a una composición para alterar la secuencia de ADN de una célula *in vivo* que comprende una mezcla de ácido nucleico, donde la mezcla de ácido nucleico comprende: un primer ácido nucleico que codifica una primera proteína de edición génica y un segundo ácido nucleico que codifica una segunda proteína de edición génica. En una modalidad, el sitio de unión de la primera proteína de edición génica y el sitio de unión de la segunda proteína de edición génica están presentes en la misma molécula de ADN objetivo. En otra modalidad, el sitio de unión de la primera proteína de edición génica y el sitio de unión de la segunda proteína de edición génica están separados por menos de alrededor de 50 bases, o menos de alrededor de 40 bases, o menos de alrededor de 30 bases o menos de alrededor de 20 bases, o menos de alrededor de 10 bases, o entre alrededor de 10 bases y alrededor de 25 bases o alrededor de 15 bases. En una modalidad, el dominio de nucleasa de la primera proteína de edición génica y el dominio de nucleasa de la segunda proteína de edición génica son capaces de formar un dímero. En una modalidad, el dímero es capaz de generar un corte o una rotura de cadena doble en una molécula de ADN objetivo.

Determinadas modalidades se dirigen a una composición terapéutica. Otras modalidades se dirigen a una composición cosmética. En algunas modalidades, la composición comprende una plantilla de reparación. En una modalidad adicional, la plantilla de reparación es una molécula de ADN de cadena simple o una molécula de ADN de cadena doble.

Otras modalidades se refieren a un artículo de fabricación para sintetizar una proteína o un ácido nucleico que codifica una proteína. En una modalidad, el artículo es un ácido nucleico. En otra modalidad, la proteína comprende un dominio de unión al ADN. En una modalidad adicional, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de unión al ADN. En una modalidad, la proteína comprende un dominio de nucleasa. En otra modalidad, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de nucleasa. En una modalidad, la proteína comprende una pluralidad de secuencias de repetición. En otra modalidad, el ácido nucleico codifica una pluralidad de secuencias de repetición. En una modalidad adicional, el dominio de nucleasa se selecciona de: FokI, StsI, StsI-HA, StsI-HA2, StsI-UHA, StsI-UHA2, StsI-HF y StsI-UHF o una variante natural o modificada genéticamente o un fragmento biológicamente activo de estos. En una modalidad, el ácido nucleico comprende un promotor de ARN polimerasa. En otra modalidad, el promotor de ARN polimerasa es un promotor T7 o un promotor SP6. En una modalidad adicional, el ácido nucleico comprende un promotor viral. En una modalidad, el ácido nucleico comprende una región no traducida. En otra modalidad, el ácido nucleico es una plantilla de transcripción *in vitro*.

Determinadas modalidades se refieren a una modalidad para inducir a células a expresar una proteína *in vivo*. Otras modalidades se refieren a un método para alterar la secuencia de ADN de una célula *in vivo* que comprende transfectar la célula *in vivo* con una proteína de edición génica o inducir a la célula para que exprese una proteína de edición génica *in vivo*. Aun otras modalidades adicionales se refieren a un método para reducir la expresión de una proteína de interés en una célula *in vivo*. En una modalidad, se induce a la célula para que exprese una proteína de edición génica, donde la proteína de edición génica es capaz de crear un corte o una rotura de cadena doble en una molécula de ADN objetivo. En otra modalidad, el corte o ruptura de cadena doble da como resultado la inactivación de un gen. Aun otras modalidades adicionales se refieren a un método para generar una forma inactiva, de actividad reducida o dominante negativa de una proteína *in vivo*. En una modalidad, la proteína es sobrevivina. Otras modalidades adicionales se refieren a un método para reparar una o más mutaciones en una célula *in vivo*. En una modalidad, la célula se pone

en contacto con una plantilla de reparación. En otra modalidad, la plantilla de reparación es una molécula de ADN. En una modalidad adicional, la plantilla de reparación no contiene un sitio de unión de la proteína de edición génica. En otra modalidad adicional, la plantilla de reparación codifica una secuencia de aminoácidos que es codificada por una secuencia de ADN que comprende un sitio de unión de la proteína de edición génica.

5 Otras modalidades se refieren a un método para tratar un paciente que comprende administrarle al paciente una cantidad terapéuticamente o cosméticamente eficaz de una proteína o un ácido nucleico que codifica una proteína. En una modalidad, el tratamiento da como resultado la mejora de uno o más síntomas del paciente. Determinadas modalidades se dirigen a un método para tratar a un paciente que comprende: a. inducir que una célula exprese una proteína de interés al transfectar la célula *in vivo* con un ácido nucleico que codifica la proteína de interés y/o b. reprogramar la célula *in vivo*. En una modalidad, la célula se reprograma a un estado menos diferenciado. En otra modalidad, se reprograma la célula mediante la transfección de la célula con una o más moléculas sintéticas de ARN que codifican una o más proteínas de reprogramación. En una modalidad adicional, la célula está diferenciada. En otra modalidad adicional, la célula está diferenciada en una de: una célula cutánea, una célula que produce insulina que responde a la glucosa, una célula hematopoyética, una célula cardíaca, una célula retiniana, una célula renal, una célula neuronal, una célula estromal, una célula de grasa, una célula ósea, una célula muscular, un ovocito y una célula de esperma. Otras modalidades se dirigen a un método para tratar a un paciente que comprende: a. inducir que una célula exprese una proteína de edición génica al transfectar la célula *in vivo* con un ácido nucleico que codifica una proteína de edición génica y/o b. reprogramar la célula *in vivo*.

20 Otras modalidades se refieren a un medio de formación de complejos. En una modalidad, el medio de formación de complejos tiene un pH mayor que alrededor de 7, o mayor que alrededor de 7,2, o mayor que alrededor de 7,4, o mayor que alrededor de 7,6, o mayor que alrededor de 7,8, o mayor que alrededor de 8,0, o mayor que alrededor de 8,2, o mayor que alrededor de 8,4, o mayor que alrededor de 8,6, o mayor que alrededor de 8,8, o mayor que alrededor de 9,0. En otra modalidad, el medio de formación de complejos comprende transferrina. En una modalidad adicional, el medio de formación de complejos comprende DMEM. En otra modalidad adicional, el medio de formación de complejos comprende DMEM/F12. Otras modalidades adicionales se refieren a un método para formar complejos de reactivo de transfección de ácido nucleico. En una modalidad, el reactivo de transfección se incuba con un medio de formación de complejos. En otra modalidad, la incubación ocurre antes de la etapa de mezcla. En una modalidad adicional, la etapa de incubación dura entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 5 minutos o entre alrededor de 10 segundos y alrededor de 2 minutos o entre alrededor de 15 segundos y alrededor de 1 minuto o entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 45 segundos. En una modalidad, el reactivo de transfección se selecciona de la Tabla 2. En otra modalidad, el reactivo de transfección es un lípido o lipidoide. En una modalidad adicional, el reactivo de transfección comprende un catión. En otra modalidad adicional, el catión es un catión multivalente. En otra modalidad adicional, el reactivo de transfección es N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropil)amino]-4-[di(3-aminopropil)amino]butilcarboxamido)etil]-3,4-di[oleiloxi]-benzamida (también conocido como MVL5) o un derivado de este.

35 Determinadas modalidades se refieren a un método para inducir a una célula a expresar una proteína mediante la puesta en contacto de la célula con un ácido nucleico *in vivo*. En una modalidad, la célula es una célula de mamífero. En otra modalidad, la célula es una célula humana o una célula de roedor. Otras modalidades se refieren a una célula producida usando uno o más de los métodos de la presente divulgación. En una modalidad, la célula está presente en un paciente. En otra modalidad, la célula se aísla de un paciente. Otras modalidades se refieren a una biblioteca de identificación que comprende una célula producida usando uno o más de los métodos de la presente divulgación. En una modalidad, la biblioteca de identificación se usa para al menos uno de: identificación de toxicidad, inclusive: 40 identificación de cardiotoxicidad, identificación de neurotoxicidad e identificación de hepatotoxicidad, identificación de eficacia, identificación de alto rendimiento, identificación de contenido elevado y otras identificaciones.

Otras modalidades se refieren a un kit que contiene un ácido nucleico. En una modalidad, el kit contiene un reactivo de administración (también conocido como "reactivo de transfección"). En otra modalidad, el kit es un kit de reprogramación. En una modalidad adicional, el kit es un kit de edición génica. Otras modalidades se refieren a un kit para la producción de ácidos nucleicos. En una modalidad, el kit contiene al menos dos de: pseudouridina-trifosfato, trifosfato de 5-metiluridina, trifosfato de 5-metilcitidina, trifosfato de 5-hidroximetilcitidina, trifosfato de N4-metilcitidina, trifosfato de N4-acetilcitidina y trifosfato de 7-deazaguanosina o uno o más derivados de estos. Otras modalidades se refieren a un agente terapéutico o cosmético que comprende un ácido nucleico. En una modalidad, el agente terapéutico o cosmético es una composición farmacéutica. En otra modalidad, la composición farmacéutica está formulada. En una modalidad adicional, la formulación comprende una suspensión acuosa de liposomas. Los ejemplos de componentes de liposomas se establecen en la Tabla 2, y se proporcionan a modo de ejemplo y no como limitación. En una modalidad, los liposomas incluyen una o más cadenas de polietilenglicol (PEG). En otra modalidad, el PEG es PEG2000. En una modalidad adicional, los liposomas incluyen 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) o un derivado de esta. En una modalidad, el agente terapéutico comprende uno o más ligandos. En otra modalidad, el agente terapéutico comprende al menos uno de: andrógenos, CD30 (TNFRSF8), péptido de penetración en células, CXCR, estrógenos, factor de crecimiento epidérmico, EGFR, HER2, folato, insulina, factor de crecimiento I similar a insulina, interleucina 13, integrina, progesterona, factor derivado de células estromales 1, trombina, vitamina D y transferrina, o un fragmento biológicamente activo o variante de estos. Aun otras modalidades adicionales se refieren a un agente terapéutico o cosmético que comprende una célula generada mediante el uso de uno o más de los métodos de la presente divulgación. En una modalidad, el agente terapéutico se administra a un paciente para el

tratamiento de al menos una de: diabetes tipo 1, enfermedad cardíaca, inclusive cardiomiopatía isquémica y dilatada, degeneración macular, enfermedad de Parkinson, fibrosis quística, anemia de células falciformes, talasemia, anemia de Fanconi, inmunodeficiencia combinada grave, neuropatía sensorial hereditaria, xeroderma pigmentoso, enfermedad de Huntington, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, cáncer y enfermedades infecciosas, inclusive: hepatitis y VIH/Sida.

Tabla 2. Ejemplos de lípidos biocompatibles

1	3 β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-colesterol)
2	1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP / 18:1 TAP)
3	N-(4-carboxibencil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)propan-1-aminio (DOBAQ)
4	1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio-propano (14:0 TAP)
5	1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (16:0 TAP)
6	1,2-estearoil-3-trimetilamonio-propano (18:0 TAP)
7	1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP / 18:1 DAP)
8	1,2-dimiristoil-3-dimetilamonio-propano (14:0 DAP)
9	1,2-dipalmitoil-3-dimetilamonio-propano (16:0 DAP)
10	1,2-distearoil-3-dimetilamonio-propano (18:0 DAP)
11	dimetildiocadecilamonio (18:0 DDAB)
12	1,2-dilauoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (12:0 EtilPC)
13	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (14:0 EtilPC)
14	1,2-dimiristoleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (14:1 EtilPC)
15	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (16:0 EtilPC)
16	1,2-distearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (18:0 EtilPC)
17	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (18:1 EtilPC)
18	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (16:1-18:1 EtilPC)
19	1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA)
20	N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropil)amino]-4-[di(3-amino-propil)amino]butilcarboxamido)etil]-3,4-di[oleiloxi]-benzamida (MVL5)
21	Trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2-espermina carboxamida]etil-N,N-dimetil-1-propanamonio (DOSPA)
22	1,3-di-oleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER)
23	Bromuro de N-[1-(2,3-dimiristiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxi)etil)amonio (DMRIE)
24	diocadecil amidogliceril espermina (DOGS)
25	dioleoil fosfatidil etanolamina (DOPE)

10 En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a una o más técnicas de administración descritas en las patentes estadounidenses n.º 5.711.964; 5.891.468; 6.316.260; 6.413.544; 6.770.291; y 7.390.780.

15 Determinadas modalidades se refieren a un ácido nucleico que comprende una estructura de casquete 5' seleccionada de un casquete 0, casquete 1, casquete 2 y casquete 3 o un derivado de estos. En una modalidad, el ácido nucleico comprende una o más UTR. En otra modalidad, la una o más UTR aumenta la estabilidad del ácido nucleico. En una modalidad adicional, la una o más UTR comprende una 5' UTR de alfa-globina o beta-globina. En otra modalidad adicional, la una o más UTR comprende una 3' UTR de alfa-globina o beta-globina. En otra modalidad adicional, la molécula sintética de ARN comprende una 5' UTR de alfa-globina o beta-globina y una 3' UTR de alfa-globina o beta-globina. En una modalidad, la 5' UTR comprende una secuencia de Kozak que es sustancialmente similar a la secuencia de consenso de Kozak. En otra modalidad, el ácido nucleico comprende una cola 3'-poli(A). En una modalidad adicional, la cola 3'-poli(A) está entre alrededor de 20 nt y alrededor de 250 nt o entre alrededor de 120 nt y alrededor de 150 nt de longitud. En una modalidad adicional, la cola 3'-poli(A) tiene alrededor de 20 nt, o alrededor de 30 nt, o alrededor de 40 nt, o alrededor de 50 nt, o alrededor de 60 nt, o alrededor de 70 nt, o alrededor de 80 nt, o alrededor de 90 nt, o alrededor de 100 nt, o alrededor de 110 nt, o alrededor de 120 nt, o alrededor de 130 nt, o alrededor de 140 nt, o alrededor de 150 nt, o alrededor de 160 nt, o alrededor de 170 nt, o alrededor de 180 nt, o alrededor de 190 nt, o alrededor de 200 nt, o alrededor de 210 nt, o alrededor de 220 nt, o alrededor de 230 nt, o alrededor de 240 nt, o alrededor de 250 nt de longitud.

20 Otras modalidades se refieren a un método para reprogramar una célula *in vivo*. En una modalidad, se reprograma la célula mediante la puesta en contacto de la célula con uno o más ácidos nucleicos. En una modalidad, la célula se pone en contacto con una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican al menos una de: una proteína Oct4, proteína Sox2, proteína Klf4, proteína c-Myc, proteína Lin28 o un fragmento biológicamente activo, variante o derivado de estas. En otra modalidad, la célula se pone en contacto con una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican una pluralidad de proteínas que incluye: una proteína Oct4, proteína Sox2, proteína Klf4 y proteína c-Myc, o uno o más fragmentos biológicamente activos, variantes o derivados de estas. Otras modalidades adicionales se refieren a un método para editar genes en una célula *in vivo*. En una modalidad, se editan los genes de la célula mediante la puesta en contacto de la célula con uno o más ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos, inclusive formulaciones que contienen ácidos nucleicos, cuando se administran *in vivo*, pueden acumularse en el hígado y/o el bazo. Se ha descubierto que los ácidos nucleicos que codifican proteínas pueden modular la expresión de proteínas en el hígado y el bazo, y los ácidos nucleicos usados de esta manera constituyen agentes terapéuticos potentes para el tratamiento de enfermedades del hígado y el bazo. Por lo tanto, determinadas modalidades se refieren a un método para tratar enfermedades del hígado y/o el bazo mediante la administración a un paciente de un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Otras modalidades se refieren a una composición terapéutica que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de interés, para el tratamiento de enfermedades del hígado y del bazo. Las enfermedades del hígado y del bazo que pueden ser tratadas incluyen, de modo no taxativo: hepatitis, enfermedad hepática inducida por alcohol, enfermedad hepática inducida por drogas, infección por el virus de Epstein Barr, infección por adenovirus, infección por citomegalovirus, toxoplasmosis, fiebre de las Montañas Rocosas, enfermedad de hígado graso no alcohólico, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, enfermedad de Gilbert y cáncer de hígado y/o del bazo.

Determinadas modalidades se dirigen a un método para inducir que una célula *in vivo* exprese una proteína de interés que comprende poner en contacto a una célula *in vivo* con una solución que comprende albúmina que se trata con una resina de intercambio de iones o carbón y una o más moléculas de ácido nucleico, donde al menos una de la una o más moléculas de ácido nucleico codifica una proteína de interés. En una modalidad, el método provoca que la célula exprese la proteína de interés. En otra modalidad, la o las moléculas de ácido nucleico comprenden una molécula sintética de ARN. En una modalidad, la célula es una célula cutánea. En otra modalidad, la célula es una célula muscular. En aun otra modalidad, la célula es un fibroblasto dérmico. En aun otra modalidad, la célula es un mioblasto. En una modalidad, la proteína de interés es una proteína de matriz extracelular. En otra modalidad, la proteína de interés se selecciona de: elastina, colágeno, laminina, fibronectina, vitronectina, lisil oxidasa, proteína de unión a elastina, un factor de crecimiento, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento transformante beta, factor de estimulación de colonias de granulocitos, una metaloproteínasa de matriz, una actina, fibrilina, glicoproteína asociada con microfibrilos, una proteína similar a lisil oxidasa y factor del crecimiento derivado de plaquetas. En una modalidad, la solución se administra a la dermis. En otra modalidad, la administración es mediante inyección. En aun otra modalidad, la administración es por inyección mediante el uso de un conjunto de microagujas. En una modalidad, la solución comprende además un factor de crecimiento. En otra modalidad, el factor de crecimiento se selecciona de: factor de crecimiento de fibroblastos y un factor de crecimiento transformante beta. En aun otra modalidad, la solución comprende además colesterol.

Otras modalidades se dirigen a un método para inducir que una célula *in vivo* exprese una proteína de interés que comprende poner en contacto a una célula *in vivo* con una solución que comprende colesterol y una o más moléculas de ácido nucleico, donde al menos una de la una o más moléculas de ácido nucleico codifica una proteína de interés. En una modalidad, el método provoca que la célula exprese la proteína de interés. Aun otras modalidades se dirigen a un método para transfectar una célula *in vivo* con una molécula de ácido nucleico que comprende poner en contacto a una célula *in vivo* con una solución que comprende albúmina que se trata con una resina de intercambio iónico o carbón, y una molécula de ácido nucleico. En una modalidad, el método provoca que la célula se transfecte con la molécula de ácido nucleico. En otra modalidad, la molécula de ácido nucleico es una de: una molécula de ADNcd, una molécula de ADNcs, una molécula de ARNcd, una molécula de ARNcs, un plásmido, un oligonucleótido, una molécula sintética de ARN, una molécula de miARN, una molécula de ARNm y una molécula de ARNip. Aun otras modalidades se dirigen a un método para tratar a un paciente que comprende administrar a un paciente una composición que comprende albúmina que se trata con una resina de intercambio de iones o carbón y una o más moléculas de ácido nucleico, donde al menos una de la una o más moléculas de ácido nucleico codifica una proteína de interés. En una modalidad, el método provoca la expresión de la proteína de interés en el paciente. En otra modalidad, el método provoca la expresión de la proteína de interés en la dermis del paciente.

Determinadas modalidades se dirigen a una composición cosmética que comprende una albúmina que se trata con una resina de intercambio iónico o carbón, y una molécula de ácido nucleico. Otras modalidades se dirigen a un artículo de tratamiento cosmético. En una modalidad, el artículo de tratamiento cosmético comprende un dispositivo configurado para administrar una composición a un paciente. En otra modalidad, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína de elastina o una proteína de colágeno. Aun otras modalidades se dirigen a una solución para transfectar una célula *in vivo* que comprende colesterol o un análogo de colesterol y una o más moléculas de ácido nucleico. En una modalidad, el colesterol o análogo de colesterol se une de forma covalente a al menos una de la una o más moléculas de ácido nucleico. En otra modalidad, el análogo de colesterol es un oxisterol. En aun otra modalidad, el análogo de colesterol incluye uno o más de: una sustitución del anillo A, una sustitución del anillo B, una sustitución del anillo D, una sustitución de cadena lateral, un ácido colestanoico, un ácido colestenoico, un resto poliinsaturado, un resto deuterado, un resto fluorinado, un resto sulfonado, un resto fosforilado y un resto fluorescente. En aun otra modalidad, el método comprende tratar al paciente con uno o más de: un relleno dérmico, una neurotoxina (a modo ilustrativo, inhibidores del canal de sodio (por ejemplo, tetrodotoxina), inhibidores del canal de potasio (por ejemplo, tetraetilamonio), inhibidores del canal de cloruro (por ejemplo, clorotoxina y curare), inhibidores del canal de calcio (por ejemplo, conotoxina), inhibidores de liberación de la vesícula sináptica (por ejemplo, la toxina botulínica y la toxina tétano) e inhibidores de la barrera hematoencefálica (por ejemplo, aluminio y mercurio)) y un tratamiento que induce la reparación.

Por ejemplo, la Administración de medicamentos y alimentos (FDA) aprobó la toxina botulínica tipo A para el

tratamiento de blefaroespasma esencial, estrabismo y espasmo hemifacial en pacientes con más de doce años, distonía cervical, arrugas de la línea glabellar (faciales) y para el tratamiento de la hiperhidrosis, y se aprobó la toxina botulínica tipo B para el tratamiento de distonía cervical. Las presentes composiciones pueden combinarse con estas toxinas en el tratamiento de estas enfermedades.

Además, la combinación de cualquiera de las toxinas antemencionadas puede utilizarse junto con las presentes composiciones para diversas intervenciones cosméticas, inclusive, de modo no taxativo, arrugas faciales, líneas faciales hiperkinéticas, líneas glabellares, patas de gallo, líneas de marioneta, trastornos cutáneos, pliegues nasolabiales, blefaroespasma, estrabismo, espasmos hemifaciales y trastornos de sudoración. De manera alternativa, las presentes composiciones pueden utilizarse en estas intervenciones cosméticas como una monoterapia.

Determinadas modalidades se refieren a una terapia de combinación que comprende una o más de las composiciones terapéuticas o cosméticas de la presente invención y uno o más tratamientos cosméticos o terapias con adyuvantes. En determinadas modalidades, una o más de las composiciones terapéuticas o cosméticas de la presente invención se administran a un sujeto que se somete a tratamiento con una o más terapias con adyuvantes o tratamientos cosméticos. Los ejemplos de terapias con adyuvantes y tratamientos cosméticos se establecen en la Tabla 3 y en la Tabla 5 de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/721.302 y se proporcionan a modo de ejemplo y no a modo taxativo.

Tabla 3. Ejemplos de terapias con adyuvantes

Clase de terapia / tratamiento	Enfermedad / Afección	Ejemplo de terapia / tratamiento
Inhibidores de acetilcolinesterasa	Miastenia grave, glaucoma, enfermedad de Alzheimer, demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de taquicardia postural	Edrofonio
Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina	Hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva	Perindopril
Agentes alquilantes	Cáncer	Cisplatino
Inhibidores de la angiogénesis	Cáncer, degeneración macular	Bevacizumab
Antagonistas del receptor II de angiotensina	Hipertensión, nefropatía diabética, insuficiencia cardíaca congestiva	Valsartán
Antibióticos	Infección bacteriana	Amoxicilina
Fármacos antidiabéticos	Diabetes	Metformina
Antimetabolitos	Cáncer, infección	5-fluorouracilo (5FU)
Oligonucleótidos antisentido	Cáncer, diabetes, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), hipercolesterolemia	Mipomersen
Antibióticos citotóxicos	Cáncer	Doxorrubicina
Estimulación cerebral profunda	Dolor crónico, enfermedad de Parkinson, temblores, distonía	N/C
Agonistas de dopamina	Enfermedad de Parkinson, diabetes tipo II, tumores pituitarios	Bromocriptina
Inhibidores de la fusión/entrada	VIH/Sida	Maraviroc
Agonistas del péptido 1 similar al glucagón	Diabetes	Exenatida
Glucocorticoides	Asma, insuficiencia suprarrenal, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunitarias, meningitis bacteriana	Dexametasona
Fármacos inmunosupresores	Trasplante de órganos, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunitarias	Azatioprina
Insulina/análogos de insulina	Diabetes	Insulina NPH
Inhibidores de la integrasa	VIH/Sida	Raltegravir
Inhibidores de MAO-B	Enfermedad de Parkinson, depresión, demencia	Selegilina

(continuación)

Clase de terapia / tratamiento	Enfermedad / Afección	Ejemplo de terapia / tratamiento
Inhibidores de la maduración	VIH/Sida	Bevirimat
Inhibidores análogos de nucleósidos de transcriptasa inversa	VIH/Sida, hepatitis B	Lamivudina
Inhibidores análogos de nucleótidos de transcriptasa inversa	VIH/Sida, hepatitis B	Tenofovir
Inhibidores no nucleósidos de transcriptasa inversa	VIH/Sida	Rilpivirina
Interferón pegilado	Hepatitis B/C, esclerosis múltiple	Interferón beta-1a
Alcaloides/terpenoides vegetales	Cáncer	Paclitaxel
Inhibidores de proteasa	VIH/Sida, hepatitis C, otras infecciones virales	Telaprevir
Radioterapia	Cáncer	Braquiterapia
Inhibidores de la rinina	Hipertensión	Aliskiren
Estatina	hipercolesterolemia	Atorvastatina
Inhibidores de la topoisomerasa	Cáncer	Topotecán
Antagonista receptor de vasopresina	Hiponatremia, enfermedad renal	Tolvaptán
Relleno dérmico	Arrugas, piel envejecida	Ácido hialurónico
Toxina botulínica	Arrugas, piel envejecida	Toxina botulínica tipo A
Inducción de la reparación de la piel	Cicatrices de acné, piel envejecida	Tratamiento con láser, dermoabrasión

Las preparaciones farmacéuticas pueden comprender además reactivos de administración (también conocidos como "reactivos de transfección") y/o excipientes. Los reactivos, excipientes de administración farmacéuticamente aceptables de y los métodos para prepararlos y utilizarlos, inclusive los métodos para preparar y administrar preparaciones farmacéuticas a pacientes (también llamados "sujetos") son conocidos en la técnica, y se establecen en numerosas publicaciones, inclusive, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2008/0213377.

Por ejemplo, las presentes composiciones pueden encontrarse en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Dichas sales incluyen las enumeradas, por ejemplo, en *J. Pharma. Sci.* 66, 2-19 (1977) y *The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use*. P. H. Stahl y C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Suiza) 2002. Los ejemplos no taxativos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen: sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, camforsulfonato, pamoato, fenilacetato, trifluoroacetato, acrilato, clorobenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, metilbenzoato, o-acetoxibenzoato, naftalen-2-benzoato, isobutirato, fenilbutirato, α -hidroxibutirato, butin-1,4-dicarboxilato, hexin-1,4-dicarboxilato, caprato, caprilato, cinamato, glicolato, heptanoato, hipurato, malato, hidroximaleato, malonato, mandelato, mesilato, nicotinato, ftalato, teraftalato, propiolato, propionato, fenilpropionato, sebacato, suberato, p-bromobencenosulfonato, clorobencenosulfonato, etilsulfonato, 2-hidroxietilsulfonato, metilsulfonato, naftalen-1-sulfonato, naftalen-2-sulfonato, naftalen-1,5-sulfonato, xilensulfonato, tartarato, hidróxidos de metales alcalinos tales como sodio, potasio y litio; hidróxidos de metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales, tales como aluminio y cinc; amonio y aminos orgánicas, tales como mono, di o tri-alquilaminas no sustituidas o sustituidas con hidroxilo, dicitclohexilamina; tributil amina; piridina; N-metil, N-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono, bis o tris-(2-OH-alquilaminas inferiores), tales como mono; bis o tris-(2-hidroxietil)amina, 2-hidroxiterc-butilamina o tris-(hidroximetil)metilamina, N,N-di-alquilo inferior-N-(hidroxilo-alquilo inferior)-aminas, tales como N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)amina o tri-(2-hidroxietil)amina; N-metil-D-glucamina; y aminoácidos, tales como arginina, lisina y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente pueden comprender excipientes, inclusive líquidos tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticos pueden ser una solución salina, goma acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, pueden utilizarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una modalidad, los excipientes farmacéuticamente aceptables son estériles cuando se administran a un sujeto. Los excipientes farmacéuticos aceptables también incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice,

estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada deshidratada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Cualquiera de los agentes descritos en la presente, de desearse, pueden también comprender cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores del pH.

5 En varias modalidades, las composiciones descritas en la presente pueden administrarse en una dosis eficaz de, por ejemplo, de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 100 mg/kg, alrededor de 2,5 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg, o de alrededor de 5 mg/kg a alrededor de 25 mg/kg. La determinación precisa de lo que se consideraría una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, inclusive su tamaño, edad y tipo de enfermedad. Las dosis pueden ser establecidas fácilmente por los expertos en la técnica a partir de esta descripción y del conocimiento de la técnica. Por ejemplo, las dosis pueden determinarse refiriéndose a *Physicians' Desk Reference*, 66ª edición, PDR Network; edición de 2012 (27 de diciembre de 2011).

15 Las composiciones activas de la presente invención pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones de acuerdo con la presente invención puede ser mediante cualquier vía común, siempre que el tejido objetivo esté disponible por medio de esa vía. Esto incluye vía oral, nasal o bucal. De manera alternativa, la administración puede ser por medio de inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, o a través de inyección directa en el tejido canceroso. Los agentes descritos en la presente también pueden administrarse por medio de sistemas de catéter. Dichas composiciones se administrarán normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables, tal como se describe en la presente.

25 Luego de la formulación, las soluciones pueden administrarse de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones pueden administrarse fácilmente en diversas formas de dosificación, tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución generalmente se amortigua de manera adecuada y el diluyente líquido primero se hace isotónico con, por ejemplo, una cantidad suficiente de solución salina o glucosa. Dichas soluciones acuosas pueden usarse, por ejemplo, para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Preferentemente, se emplea medio acuoso estéril como conocen los expertos en la técnica, particularmente en vista de la presente descripción.

30 Los ejemplos de sujetos o pacientes se refieren a cualquier vertebrado, inclusive, de modo no taxativo, humanos y otros primates (por ejemplo, chimpancés y otras especies de monos y simios), animales de granja (por ejemplo, ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos), mamíferos domésticos (por ejemplo, perros y gatos), animales de laboratorio (por ejemplo, roedores, tales como ratones, ratas y cobayos) y aves (por ejemplos, aves domésticas, salvajes y de caza, tales como pollos, pavos y otras aves galináceas, patos, gansos y similares). En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

35 La administración de las composiciones descritas en la presente puede ser, por ejemplo, mediante inyección, administración tópica, administración oftálmica y administración intranasal. La inyección puede incluir inyecciones tales como, de modo no taxativo, intradérmica, subcutánea e intramuscular. En algunas modalidades, la inyección puede vincularse a una fuerza eléctrica (por ejemplo, electroporación, inclusive con dispositivos que pueden utilizarse en la electroquimioterapia (por ejemplo, CLINIPORATOR, IGEA Srl, Carpi [MO], Italia)). La administración tópica puede ser, de modo no taxativo, una crema, loción, ungüento, gel, atomización, solución y similares. La administración tópica puede incluir además un potenciador de penetración tal como, de modo no taxativo, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, agentes no quelantes, no tensioactivos, polioxietilen-9-lauril éter, polioxietilen-20-cetil éter, ácidos grasos y/o sales junto con sales y/o ácidos biliares, sal de sodio junto con ácido láurico, ácido cáprico y UDCA, y similares. La administración tópica puede incluir también una fragancia, un colorante, una pantalla solar, un agente antibacteriano y/o un humectante. Las composiciones descritas en la presente pueden administrarse a al menos un sitio tal como, de modo no taxativo, frente, cuero cabelludo, folículos pilosos, cabello, párpados superiores, párpados inferiores, cejas, pestañas, área infraorbital, áreas periorbitales, sien, nariz, puente de la nariz, mejillas, lengua, pliegues nasolabiales, labios, áreas periobculares, quijada, orejas, cuello, mama, antebrazo, brazo, palma, mano, dedo, uñas, espalda, abdomen, costados, nalgas, muslo, pantorrilla, pies, dedos de los pies y similares.

Secuencias

55

SEQ ID NO	Descripción
1	Stsl
2	Stsl-HA
3	Stsl-HA2
4	Stsl-UHA
5	Stsl-UHA2
6	Stsl-HF
7	Stsl-UHF
8	Oct4

ES 2 787 198 T3

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción
9	Sox2
10	Klf4
11	c-Myc
12	BIRC5_exon1
13	BIRC5_exon2
14	BIRC5_exon3
15	BIRC5_exon4
16	BIRC5-1.1-L
17	BIRC5-1.1-R
18	BIRC5-1.2-L
19	BIRC5-1.2-R
20	BIRC5-1.3-L
21	BIRC5-1.3-R
22	BIRC5-2.1-L
23	BIRC5-2.1-R
24	BIRC5-2.2-L
25	BIRC5-2.2-R
26	BIRC5-3.1-L
27	BIRC5-3.1-R
28	CDK1
29	CDK2
30	CDK3
31	CDK4
32	CDK5
33	CDK6
34	BIRC5
35	HIF1A
36	RRM2
37	KRAS
38	EGFR
39	MYC
40	PKN3
41	KIF11
42	APC
43	BRCA1
44	BRCA2
45	TP53
46	APP
47	HTT
48	IAPP
49	MAPT
50	PRNP
51	SNCA
52	SOD1
53	FokI
54	Repetición1
55	Repetición2
56	Repetición3
57	EO-GHGG-FokI
58	GHGG-FokI
59	EO-GHGG-StsI
60	GHGG-StsI
61	Preproteína de cadena de colágeno alfa-1(I)
62	Precursor de cadena de colágeno alfa-2(I)
63	Precursor de isoforma 1 de cadena de colágeno alfa-1(II)
64	Precursor de isoforma 2 de cadena de colágeno alfa-1(II)
65	Preproteína de cadena de colágeno alfa-1(III)
66	Preproteína de cadena de colágeno alfa-1(IV)
67	Preproteína de cadena de colágeno alfa-2(IV)
68	Precursor de cadena de colágeno alfa-3(IV)
69	Precursor de cadena de colágeno alfa-4(IV)

ES 2 787 198 T3

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción
70	Precursor de isoforma 1 de cadena de colágeno alfa-5(IV)
71	Precursor de isoforma A de cadena de colágeno alfa-6(IV)
72	Preproteína de isoforma 1 de cadena de colágeno alfa-1(V)
73	Preproteína de cadena de colágeno alfa-2(V)
74	Preproteína de cadena de colágeno alfa-3(V)
75	Precursor de cadena de colágeno alfa-1(VI)
76	Precursor de isoforma 2C2 de cadena de colágeno alfa-2(VI)
77	Precursor de isoforma 1 de cadena de colágeno alfa-3(VI)
78	Precursor de cadena de colágeno alfa-1(VII)
79	Precursor de isoforma a de elastina
80	Precursor de isoforma b de elastina
81	Precursor de isoforma c de elastina
82	Precursor de isoforma d de elastina
83	Precursor de isoforma e de elastina
84	Precursor de isoforma f de elastina
85	Precursor de isoforma g de elastina
86	Precursor de isoforma h de elastina
87	Precursor de isoforma i de elastina
88	Precursor de isoforma j de elastina
89	Precursor de isoforma k de elastina
90	Precursor de isoforma l de elastina
91	Precursor de isoforma m de elastina
92	Preproteína de isoforma 1 de proteína-lisina 6-oxidasa
93	Isoforma 2 de proteína-lisina 6-oxidasa
94	Isoforma 1 de transcriptasa inversa de telomerasa
95	Isoforma 2 de transcriptasa inversa de telomerasa
96	Preproteína de isoforma 1 de fibronectina
97	Preproteína de isoforma 3 de fibronectina
98	Preproteína de isoforma 4 de fibronectina
99	Preproteína de isoforma 5 de fibronectina
100	Preproteína de isoforma 6 de fibronectina
101	Preproteína de isoforma 7 de fibronectina
102	Precursor de vitronectina
103	Precursor de nidogen-1
104	Precursor de subunidad alfa-1 de laminina
105	Preproteína de isoforma 1 de factor de crecimiento tipo insulina I
106	Precursor de isoforma 1 de factor de crecimiento de fibroblastos 1
107	factor de crecimiento de fibroblastos 2
108	Precursor de factor de crecimiento transformante beta-1
109	Precursor de isoforma 1 de factor de crecimiento transformante beta-2
110	Precursor de isoforma 2 de factor de crecimiento transformante beta-2
111	Actina, músculo esquelético alfa
112	actina, músculo liso aórtico
113	actina, citoplasmática 1
114	actina, proproteína del músculo cardíaco alfa 1
115	actina, citoplasmática 2
116	actina, precursor de isoforma 1 del músculo liso gamma-entérico
117	actina, precursor de isoforma 2 del músculo liso gamma-entérico
118	Precursor de isoforma a de factor de estimulación de colonias de granulocitos
119	Precursor de isoforma b de factor de estimulación de colonias de granulocitos
120	Precursor de isoforma c de factor de estimulación de colonias de granulocitos
121	Precursor de isoforma d de factor de estimulación de colonias de granulocitos
122	Preproteína de isoforma 1 de subunidad A del factor de crecimiento derivado de plaquetas
123	Preproteína de isoforma 2 de subunidad A del factor de crecimiento derivado de plaquetas
124	Preproteína de isoforma 1 de subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas
125	Preproteína de isoforma 2 de subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas
126	Precursor del factor de crecimiento derivado de plaquetas C

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción
127	Precursor de isoforma 1 del factor de crecimiento derivado de plaquetas D
128	Precursor de isoforma 2 del factor de crecimiento derivado de plaquetas D
129	Preproteína de isoforma 1 de colagenasa intersticial
130	Isoforma 2 de colagenasa intersticial
131	Preproteína de colagenasa de neutrófilos
132	Preproteína de estromelina-2
133	Preproteína de metaloelastasa de macrófagos
134	Precursor de fibrilina-1
135	Precursor de fibrilina-2
136	Preproteína de homólogo 1 de lisil oxidasa
137	Precursor de homólogo 2 de lisil oxidasa
138	Precursor de isoforma 1 de homólogo 3 de lisil oxidasa
139	Precursor de isoforma 2 de homólogo 3 de lisil oxidasa
140	Isoforma 3 de homólogo 3 de lisil oxidasa
141	Precursor de homólogo 4 de lisil oxidasa
142	Precursor de isoforma a de proteína asociada a microfibrillas 2
143	Precursor de isoforma b de proteína asociada a microfibrillas 2
144	Precursor de proteína asociada a microfibrillas 5
145	Preproteína de proteína 17 que contiene el dominio de metaloproteína y desintegrina
146	Preproteína de desmogleína-2
147	Isoforma 1 de ADN polimerasa ϵ
148	Isoforma 2 de ADN polimerasa ϵ
149	Isoforma 3 de ADN polimerasa ϵ
150	ferroquelatasa, precursor de isoforma a mitocondrial
151	ferroquelatasa, precursor de isoforma b mitocondrial
152	Filagrina
153	Isoforma 1 de hialuronano sintasa 1
154	Isoforma 1 de hialuronano sintasa 2
155	Hialuronano sintasa 2
156	Isoforma a de hialuronano sintasa 3
157	Isoforma b de hialuronano sintasa 3
158	Proopiomelanocortina
159	Isoforma 1a de placofilina-1
160	Isoforma 1b de placofilina-1
161	Retinol deshidrogenasa 10
162	Proteína de desacoplamiento de grasa marrón mitocondrial 1
163	Precursor de tirosinasa

La presente invención se ilustra adicionalmente a través de los siguientes ejemplos no taxativos.

Ejemplos

5

Los ejemplos que no pertenecen a la invención son solo para fines ilustrativos.

Ejemplo 1 Síntesis de ARN

10

El ARN que codifica la proteína verde fluorescente o las proteínas humanas elastina, tirosinasa, receptor de melanocortina 1, hialuronano sintasa 1, hialuronano sintasa 2, hialuronano sintasa 3, colágeno tipo III $\alpha 1$, colágeno tipo VII $\alpha 1$, interleucina 10, ligando-1 de glicoproteína P-selectina, Alfa-(1,3)-fucosiltransferasa Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc-2 (T58A) y Lin28 o TALEN que se dirigen a los genes humanos XPA, CCR5, TERT, MYC y BIRC5, y que comprenden varias combinaciones de nucleótidos canónicos o no canónicos, se sintetizaron a partir de plantillas de ADN mediante el uso del kit de síntesis de ARN de alto rendimiento T7 y el kit sistema de formación de casquetes de Vaccinia con casquete de ARNm 2'-O-metiltransferasa (todos de New England Biolabs, Inc.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las invenciones previamente descritas de los inventores de la presente (solicitud estadounidense n.º 13/465.490 (en la actualidad patente estadounidense n.º 8.497.124), solicitud internacional n.º PCT/US12/67966, solicitud estadounidense n.º 13/931.251 y solicitud internacional n.º PCT/US13/68118) (Tabla 4).

15

20

Se diluyó el ARN a con agua libre de nucleasa entre 100 ng/ μ l y 1000ng/ μ l. Para determinados experimentos, se añadió un inhibidor de RNasa (Superase-In, Life Technologies Corporation) a una concentración de 1 μ l/100 μ g de ARN. Se almacenaron las soluciones de ARN a 4 C. Para los experimentos de reprogramación, se mezcló ARN que codifica Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc-2 (T58A) y Lin28 a una relación molar de 3:1:1:1:1.

ES 2 787 198 T3

Tabla 4. Síntesis de ARN

Plantilla	Nucleótidos	Volumen de reacción/ μ l	Rendimiento de ivT/ μ g
hELN	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, 5mC	20	34,1
Oct4 (SEQ ID NO: 8)	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, 5mC	300	2752,0
Sox2 (SEQ ID NO: 9)	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, 5mC	100	965,0
Klf4 (SEQ ID NO: 10)	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, 5mC	100	1093,8
c-Myc-2 (T58A)	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, 5mC	100	1265,6
Lin28	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, 5mC	100	1197,8
ELN	A, G, U, 5hmC	20	67,6
GFP	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, 5mC	10	60,5
GFP	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, 5hmC	10	25,5
GFP	A, G, U, 5hmC	10	58,3
GFP	A, 0.5 7dG, U, 5hmC	10	47,3
GFP	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, 5cC	10	33,8
GFP	A, G, U, 5hmC	15	30,3
GFP	A, G, U, 5hmC	15	44,6
GFP	A, G, U, 5hmC	15	24,7
TYR	A, G, U, 5hmC	15	45,4
MC1R	A, G, U, 5hmC	15	47,5
TYR	A, G, U, C	20	67,0
TYR	A, G, psU, C	20	93,7
TYR	A, G, 5mU, C	20	85,7
TYR	A, G, U, 5mC	20	73,4
TYR	A, G, U, 5hmC	20	72,7
TYR	A, 0.5 7dG, U, C	20	62,7
TYR	A, G, psU, 5mC	20	116,3
TYR	A, G, psU, 5hmC	20	102,4
TYR	A, 0.5 7dG, psU, C	20	87,3
TYR	A, G, 0.4 5mU, 5mC	20	106,5
TYR	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	20	85,0
TYR	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, C	20	70,9
TYR	A, 0.5 7dG, U, 5mC	20	88,5
TYR	A, 0.5 7dG, U, 5hmC	20	59,1
TYR	A, 0.5 7dG, psU, 5mC	20	7,8
TYR	A, 0.5 7dG, psU, 5hmC	20	98,0
TYR	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, 5mC	20	106,5
TYR	A, 0.5 7dG, 0.4 5mU, 5hmC	20	82,3
HAS1	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	20	178,4
HAS2	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	20	59,3
HAS3	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	20	102,6
TYR	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	100	377,3
COL3A1	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	20	108,3
COL7A1	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	20	94,6
IL10	A, G, psU, C	75	569,5
SELPLG	A, G, psU, C	75	542,6
FUT7	A, G, psU, C	75	564,5
Oct4 (SEQ ID NO: 8)	A, G, U, C	10	100,7
Oct4 (SEQ ID NO: 8)	A, G, U, 5mC	10	120,6
Oct4 (SEQ ID NO: 8)	A, G, U, 5mC	10	115,3
Oct4 (SEQ ID NO: 8)	A, G, U, 5hmC	10	101,4
Oct4 (SEQ ID NO: 8)	A, G, U, 5cC	10	50,8
Oct4 (SEQ ID NO: 8)	A, G, U, 5fC	10	84,0
Oct4 (SEQ ID NO: 8)	A, G, U, 5hmC	10	99,5
Sox2 (SEQ ID NO: 9)	A, G, U, 5hmC	10	84,0
Klf4 (SEQ ID NO: 10)	A, G, U, 5hmC	10	72,6
c-Myc-2 (T58A)	A, G, U, 5hmC	10	82,4
Lin28	A, G, U, 5hmC	10	83,1
Oct4 (SEQ ID NO: 8)	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	10	78,9
Sox2 (SEQ ID NO: 9)	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	10	91,9

(continuación)

Plantilla	Nucleótidos	Volumen de reacción/ μ l	Rendimiento de ivT/ μ g
Klf4 (SEQ ID NO: 10)	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	10	91,2
c-Myc-2 (T58A)	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	10	104,6
Lin28	A, G, 0.4 5mU, 5hmC	10	103,2
Oct4 (SEQ ID NO: 8)	A, G, 5hU, 5hmC	300	1925,5
Sox2 (SEQ ID NO: 9)	A, G, 5hU, 5hmC	100	641,8
Klf4 (SEQ ID NO: 10)	A, G, 5hU, 5hmC	100	739,0
c-Myc-2 (T58A)	A, G, 5hU, 5hmC	100	574,0
Lin28	A, G, 5hU, 5hmC	100	556,0

"A" se refiere a adenosina-5'-trifosfato, "G" se refiere a guanosina-5'-trifosfato, "U" se refiere a uridina-5'-trifosfato, "C" se refiere a citidina-5'-trifosfato, "5mC" se refiere a 5-metilcitidina-5'-trifosfato, "5hmC" se refiere a 5-hidroximetilcitidina-5'-trifosfato, "5cC" se refiere a 5-carboxicitidina-5'-trifosfato, "5fC" se refiere a 5-formilcitidina-5'-trifosfato, "psU" se refiere a 5-pseudouridina-5'-trifosfato, "5mU" se refiere a 5-metiluridina-5'-trifosfato, "5hU" se refiere al 5'-trifosfato de uridina con un grupo metilo unido a un átomo de oxígeno, unido a la posición 5C de la uridina, y "7dG" se refiere a 7-deazaguanosina-5'-trifosfato.

Ejemplo 2 Transfección de células con ARN sintético

Para la transfección en placas de 6 pocillos, se diluyeron primero 2 μ g de ARN y 6 μ l de reactivo de transfección (Lipofectamine RNAiMAX, Life Technologies Corporation) por separado en medio de formación de complejos (Opti-MEM, Life Technologies Corporation o DMEM/F12 + 10 μ g/ml de insulina + 5,5 μ g/ml de transferrina + 6,7 ng/ml de selenita de sodio + 2 μ g/ml de etanolamina) hasta un volumen total de 60 μ l cada uno. Se mezclaron el ARN y el reactivo de transfección diluidos y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente, según las instrucciones del fabricante del reactivo de transfección. Se añadieron los complejos a las células en cultivo. Se añadieron entre 12 μ l y 240 μ l de los complejos a cada pocillo de una placa de 6 pocillos, que ya contenían 2 ml de medio de transfección por pocillo. Se agitaron suavemente las placas para distribuir los complejos en todo el pocillo. Se incubaron las células con los complejos durante 4 horas y hasta toda la noche, antes de reemplazar el medio por medio de transfección nuevo (2 ml/pocillo). Se ajustaron los volúmenes para la transfección en placas de 24 y de 96 pocillos. De manera alternativa, se diluyeron entre 0,5 μ g y 5 μ g de ARN y entre 2-3 μ l de reactivo de transfección (Lipofectamine 2000, Life Technologies Corporation) por μ g de ARN por separado en medio de formación de complejos (Opti-MEM, Life Technologies Corporation o DMEM/F12 + 10 μ g/ml de insulina + 5,5 μ g/ml de transferrina + 6,7 ng/ml de selenita de sodio + 2 μ g/ml de etanolamina) hasta un volumen total entre 5 μ l y 100 μ l cada uno. Se mezclaron el ARN y el reactivo de transfección diluidos y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadieron los complejos a las células en cultivo. Se añadieron entre 10 μ l y 200 μ l de los complejos a cada pocillo de una placa de 6 pocillos, que ya contenían 2 ml de medio de transfección por pocillo. En determinadas modalidades, se usó DMEM + FBS al 10 % o DMEM + FBS al 50 % en lugar del medio de transfección. Se agitaron suavemente las placas para distribuir los complejos en todo el pocillo. Las células se incubaron con complejos durante 4 horas, hasta toda la noche. En determinados experimentos, el medio se reemplazó con medio de transfección nuevo (2 ml/pocillo) 4 horas o 24 horas después de la transfección.

Ejemplo 3 Toxicidad y traducción de proteínas de ARN sintético que contiene nucleótidos no canónicos

Se transfectaron fibroblastos primarios humanos de acuerdo con el Ejemplo 2, mediante el uso de ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1. Se fijaron las células y se tiñeron 20-24 horas después de la transfección utilizando un anticuerpo contra Oct4. La toxicidad relativa del ARN se determinó mediante la evaluación de densidad celular en el momento de la fijación.

Ejemplo 4 Formulación del medio de transfección

Se desarrolló un medio de cultivo para sustentar la transfección eficaz de células con ácidos nucleicos y la reprogramación eficaz ("medio de transfección"):

DMEM/F12 + HEPES 15 mM + L-alanil-L-glutamina 2 mM + 10 μ g/ml de insulina + 5,5 μ g/ml transferrina + 6,7 ng/ml de selenito de sodio + 2 μ g/ml de etanolamina + 50 μ g/ml de sal de hidrato de ácido L-ascórbico 2-fosfato sesquimagnesio + 4 μ g/ml de colesterol + hidrocortisona 1 μ M + 25 μ g/ml de monooleato de polioxietileno sorbitán + 2 μ g/ml de acetato de D-alfa-tocoferol + 20ng/ml de bFGF + 5 mg/ml de albúmina de suero humano tratada.

Una variante de este medio se desarrolló para sustentar un cultivo potente a largo plazo de una variedad de tipos celulares, inclusive células madre pluripotentes ("medio de mantenimiento"):

DMEM/F12 + L-alanil-L-glutamina 2mM + 10 μ g/ml de insulina + 5,5 μ g/ml de transferrina + 6,7 ng/ml de selenita de sodio + 2 μ g/ml de etanolamina + 50 μ g/ml de sal de hidrato de ácido L-ascórbico 2-fosfato sesquimagnesio + 20 ng/ml de bFGF + 2 ng/ml de TGF- β 1.

El medio de transfección en el cual se trató la albúmina de suero humano tratada mediante la adición de octanoato de sodio 32 mM, seguido de calentamiento a 60 C durante 4 h, seguido de tratamiento con resina de intercambio iónico (AG501-X8(D), Bio-Rad Laboratories, Inc.) durante 6 h a temperatura ambiente, seguido de tratamiento con carbón activado cubierto con dextrano (C6241, Sigma-Aldrich Co. LLC.) durante la noche a temperatura ambiente, seguido de centrifugado, filtrado, ajuste a una solución al 10 % con agua sin nucleasa, seguido de la adición a los otros componentes del medio, se usó como medio de transfección en todos los Ejemplos descritos en la presente, a menos que se indique lo contrario. Para los experimentos de reprogramación, las células se colocaron en placas, ya sea no recubiertas en DMEM + suero al 10 %-20 % o en placas recubiertas con fibronectina y vitronectina en medio de transfección, a menos que se indique lo contrario. El medio de transfección no se acondicionó, a menos que se indique lo contrario. Se reconocerá que la formulación del medio de transfección se puede ajustar para satisfacer las necesidades de los tipos de células específicos que se cultivan. Se reconocerá además que la albúmina de suero humano tratada puede reemplazarse con otra albúmina tratada, por ejemplo, albúmina de suero bovino tratada, sin afectar de manera negativa el rendimiento del medio. Se observará además que se pueden utilizar otras fuentes de glutamina en lugar o además de la L-alanil-L-glutamina, por ejemplo, L-glutamina, que se pueden utilizar otros sistemas amortiguadores en lugar o además de HEPES, por ejemplo, fosfato, bicarbonato, etc., que se puede proporcionar el selenio en otras formas en lugar o además del selenito de sodio, por ejemplo, ácido selenoso, que se pueden utilizar otros antioxidantes en lugar o además de sal de hidrato de ácido L-ascórbico 2-fosfato sesquimagnesio y/o acetato de D-alfa-tocoferol, por ejemplo, ácido L-ascórbico, que se pueden utilizar otros tensioactivos en lugar o además de monooleato de polioxietileno sorbitán, por ejemplo, F-68 plurónico y/o F-127 plurónico, que se pueden utilizar otros medios basales en lugar o además de DMEM/F12, por ejemplo, MEM, DMEM, etc., y que los componentes del medio de cultivo pueden variar en el tiempo, por ejemplo, mediante el uso de un medio sin TGF- β del día 0 al día 5 y después el uso de un medio que contenga 2 ng/ml de TGF- β luego del día 5, sin afectar de manera negativa el rendimiento del medio. Se entenderá además que se pueden añadir otros ingredientes, por ejemplo, ácidos grasos, ácido lisofosfatídico, lisosfingomielina, esfingosina-1-fosfato, otros esfingolípidos, inhibidores de ROCK, inclusive Y-27632 y tiazovivina, miembros de la familia de proteínas TGF- β /NODAL, IL-6, miembros de la familia de proteínas Wnt, etc., a concentraciones adecuadas sin afectar de manera negativa el rendimiento del medio, y que se pueden añadir ingredientes que se conoce que promueven o inhiben el crecimiento de tipos de células específicos y/o agonistas y/o antagonistas de proteínas u otras moléculas que se sabe que promueven o inhiben el crecimiento de tipos de células específicos al medio a concentraciones adecuadas cuando se utiliza con esos tipos de células sin afectar de manera negativa el rendimiento del medio, por ejemplo, esfingosina-1-fosfato y células madre pluripotentes. La presente invención se refiere igualmente a ingredientes que se agregan como compuestos purificados, a ingredientes que se agregan como partes de mezclas bien definidas, a ingredientes que se agregan como partes de un complejo o mezclas indefinidas, por ejemplo, aceites animales o vegetales, y a ingredientes que se agregan mediante procesos biológicos, por ejemplo, acondicionamiento. Las concentraciones de los compuestos se pueden variar con respecto a los valores enumerados dentro de intervalos que serán evidentes para los expertos en la técnica, sin afectar de manera negativa el rendimiento del medio. Una versión sin componentes animales del medio se produjo mediante el uso de versiones recombinantes de todos los ingredientes proteicos, y las versiones no derivadas de animales de todos los demás componentes, inclusive colesterol semisintético derivado de plantas (Avanti Polar Lipids, Inc.).

40 *Ejemplo 5 Formulación del medio de transfección*

Se desarrolló un medio para apoyar la transfección, reprogramación y edición génica eficaz de las células:

45 DMEM/F12 + 10 μ g/ml insulina + 5,5 μ g/ml transferrina + 6,7 ng/ml selenito de sodio + 20 ng/ml bFGF + 5 mg/ml albúmina de suero humano tratada.

También se desarrollaron variantes de este medio para proporcionar un rendimiento mejorado cuando se utiliza con reactivos de transfección específicos, ácidos nucleicos específicos y tipos de células específicos: DMEM/F12 + 10 μ g/ml insulina + 5,5 μ g/ml transferrina + 6,7 ng/ml selenito de sodio + 4,5 μ g/ml colesterol + 20 ng/ml bFGF + 5 mg/ml albúmina de suero humano tratada, DMEM/F12 + 10 μ g/ml insulina + 5,5 μ g/ml transferrina + 6,7 ng/ml selenito de sodio + 1 μ M hidrocortisona + 20 ng/ml bFGF + 5 mg/ml albúmina de suero humano tratada y DMEM/F12 + 10 μ g/ml insulina + 5,5 μ g/ml transferrina + 6,7 ng/ml selenito de sodio + 4,5 μ g/ml colesterol + 1 μ M hidrocortisona + 20 ng/ml bFGF + 5 mg/ml albúmina de suero humano tratada.

55 Algunos ejemplos de componentes adicionales que se añadieron al medio de cultivo celular en determinados experimentos (enumerados con ejemplos de concentraciones) incluyen: HEPES 15 mM, L-alanil-L-glutamina 2 mM, 2 μ g/ml de etanolamina, 10 μ g/ml de ácidos grasos, 10 μ g/ml de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao (ésteres metílicos), 25 μ g/ml de monooleato de polioxietileno sorbitán, 2 μ g/ml acetato de D-alfa-tocoferol, 1-50 μ g/ml de sal de hidrato de ácido L-ascórbico 2-fosfato sesquimagnesio, 200 ng/ml de B18R y F-68 plurónico al 0,1%.

60 Para determinados experimentos en los cuales se acondicionó el medio, se utilizó la siguiente variante:

65 DMEM/F12 + HEPES 15 mM + L-alanil-L-glutamina 2 mM + 10 μ g/ml de insulina + 5,5 μ g/ml de transferrina + 6,7 ng/ml de selenito de sodio + 2 μ g/ml de etanolamina + 4,5 μ g/ml de colesterol + 10 μ g/ml de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao (ésteres metílicos) + 25 μ g/ml de monooleato de polioxietileno sorbitán + 2 μ g/ml de acetato de D-alfa-tocoferol + 1 μ g/ml de sal de hidrato de ácido L-ascórbico 2-fosfato sesquimagnesio + F-68 plurónico al 0,1 % +

20 ng/ml de bFGF + 5 mg/ml de albúmina sérica humana tratada.

Para determinados experimentos en los cuales no se acondicionó el medio, se utilizó la siguiente variante.

5 DMEM/F12 + HEPES 15 mM + L-alanil-L-glutamina 2 mM + 10 µg/ml de insulina + 5,5 µg/ml de transferrina + 6,7 ng/ml de selenito de sodio + 2 µg/ml de etanolamina + 4,5 µg/ml de colesterol + hidrocortisona 1 µM + 0-25 µg/ml de monooleato de polioxietileno sorbitán + 2 µg/ml de acetato de D-alfa-tocoferol + 50µg/ml de sal de hidrato de ácido L-ascórbico 2-fosfato sesquimagnesio + 20 ng/ml de bFGF + 5 mg/ml de albúmina de suero humano tratada.

10 Para la preparación de estas variantes, se trató la albúmina de suero humano tratada mediante la adición de octanoato de sodio 32 mM, seguido de calentamiento a 60 C durante 4 h, seguido de tratamiento con resina de intercambio iónico (AG501-X8(D)) durante 6 h a temperatura ambiente, seguido de tratamiento con carbón activado cubierto con dextrano (C6241, Sigma-Aldrich Co. LLC.) durante la noche a temperatura ambiente, seguido de centrifugado, filtrado, ajuste a una solución al 10 % con agua sin nucleasa, seguido de la adición a los otros componentes del medio. Para
15 determinados experimentos en los cuales se acondicionó el medio, se acondicionó el medio durante 24 h en soportes biológicos de fibroblastos neonatales humanos irradiados. Se colocaron en placas las células en placas recubiertas con fibronectina o en placas recubiertas con fibronectina y vitronectina, a menos que se indique lo contrario.

Se puede ajustar la formulación del medio para satisfacer las necesidades de los tipos específicos de células que se cultivan. Además, en determinadas situaciones, se puede reemplazar la albúmina de suero humano tratada por otra albúmina tratada, por ejemplo, albúmina de suero bovino tratada, se pueden utilizar otras fuentes de glutamina en lugar o además de la L-alanil-L-glutamina, por ejemplo, L-glutamina, se pueden utilizar otros sistemas de amortiguación en lugar o además de HEPES, por ejemplo, fosfato, bicarbonato, etc., se puede proporcionar el selenio de otras formas en lugar o además del selenito de sodio, por ejemplo, ácido selenoso, se pueden utilizar otros
20 antioxidantes en lugar o además de sal de hidrato de ácido L-ascórbico 2-fosfato sesquimagnesio y/o acetato de D-alfa-tocoferol, por ejemplo, ácido L-ascórbico, se pueden utilizar otros tensioactivos en lugar o además de monooleato de polioxietileno sorbitán y/o F-68 plurónico, por ejemplo, F-127 plurónico, se pueden utilizar otros medios basales en lugar o además de DMEM/F12, por ejemplo, MEM, DMEM, etc. y se pueden variar los componentes del medio de cultivo con el tiempo, por ejemplo, mediante el uso de un medio sin TGF-β desde el día 0 al día 5 y después el uso de un medio que contenga 2 ng/ml TGF-β después del día 5. En determinadas situaciones, se pueden añadir otros
30 ingredientes, por ejemplo, ácidos grasos, ácido lisofosfatídico, lisosfingomielina, esfingosina-1-fosfato, otros esfingolípidos, miembros de la familia de proteínas TGF-β/NODAL, IL-6, miembros de la familia de proteínas Wnt, etc., a concentraciones adecuadas y se pueden añadir ingredientes que se sabe que promueven o inhiben el crecimiento de tipos específicos de células y/o agonistas y/o antagonistas de proteínas u otras moléculas que se conoce que promueven o inhiben el crecimiento de tipos de células específicos al medio a concentraciones adecuadas cuando se utiliza con esos tipos de células, por ejemplo, esfingosina-1-fosfato y células madre pluripotentes. Los ingredientes pueden tener la forma de compuestos purificados, partes de mezclas bien definidas, partes de mezclas complejas o no definidas, por ejemplo, aceites animales o vegetales y se pueden añadir mediante procesos biológicos, por ejemplo, acondicionamiento. Las concentraciones de los componentes se pueden variar con respecto a los valores enumerados dentro de intervalos que serán evidentes para los expertos en la técnica.

Ejemplo 6 Transfección de células con ARN sintético

Para la transfección en placas de 6 pocillos, se diluyeron primero 2 µg de ARN y 6 µl de reactivo de transfección (Lipofectamine™ RNAiMAX, Life Technologies Corporation) por separado en medio de formación de complejos (Opti-MEM®, Life Technologies Corporation) a un volumen total de 60 µl cada uno. Se mezclaron el ARN y el reactivo de transfección diluidos y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente, según las instrucciones del fabricante del reactivo de transfección. Se añadieron los complejos a las células en cultivo. Se añadieron entre 30 µl y 240 µl de los complejos a cada pocillo de una placa de 6 pocillos, que ya contenían 2 ml de medio de transfección por pocillo. Se agitaron suavemente las placas para distribuir los complejos en todo el pocillo. Se incubaron las células con los complejos durante 2 horas y hasta toda la noche, antes de reemplazar el medio por medio de transfección nuevo (2 ml/pocillo). Se ajustaron los volúmenes para la transfección en placas de 24 y de 96 pocillos. Se fijaron las células y se tiñeron 20-24 h después de la transfección mediante el uso de un anticuerpo contra Oct4. Se tiñeron los núcleos y se contaron para determinar la toxicidad relativa del ARN.

Ejemplo 7 Análisis de la capacidad de las preparaciones de albúmina de suero humano no tratadas de apoyar la transfección de ácidos nucleicos y la reprogramación de ARN

Se cultivaron fibroblastos neonatales humanos primarios en medio con o sin 5 mg/ml de HSA. Se evaluaron la fracción V de Cohn (A6784, Sigma-Aldrich Co. LLC.) y cuatro preparaciones de HSA recombinantes diferentes (A6608, A7736, A9731 y A9986 todos de Sigma-Aldrich Co. LLC.). Se transfectaron las células de acuerdo con el Ejemplo 2, con ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1. Aunque las células no transfectadas crecieron bien en los medios que contenían cualquiera de las preparaciones de HSA, en los pocillos transfectados, cada una de las preparaciones de HSA dio morfologías y densidades celulares muy diferentes, y ninguna produjo cambios morfológicos que indicaran reprogramación.

Ejemplo 8 Producción de albúmina de suero humano tratada con octanoato

Se preincubó una solución al 10 % de HSA con cloruro de sodio 22 mM y octanoato de sodio 16 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se incubaron a 37 C durante 3 horas antes de formar el medio completo.

Ejemplo 9 Tratamiento de albúmina de suero humano mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico

Se preparó una solución al 20 % de HSA recombinante producida en *Pichia pastoris* (A7736, Sigma-Aldrich Co. LLC.) mediante la disolución de 2 g de HSA en 10 ml de agua sin nucleasa con agitación suave a temperatura ambiente. Se desionizó la solución de HSA mediante la adición primero de 1 g de resina desionizante de lecho mixto (AG 501-X8(D), Bio-Rad Laboratories, Inc.) y balanceo durante 1 h a temperatura ambiente. Se decantó la solución de HSA en un tubo que contenía 5 g de resina nueva y se balanceó durante 4 h a temperatura ambiente. Por último, se decantó la solución de HSA desionizada, se ajustó a un contenido proteico total del 10 % con agua sin nucleasa, se esterilizó por filtrado utilizando un filtro de membrana PES de 0,2 µm y se almacenó a 4 C.

Ejemplo 10 Análisis de la eficacia de transfección y de la viabilidad de las células cultivadas en medios que contienen albúmina de suero humano tratada con octanoato

Se cultivaron fibroblastos neonatales humanos primarios en medios que contenían HSA recombinante tratada de acuerdo con el Ejemplo 8 y/o Ejemplo 9 o que contenían HSA derivada de la sangre tratada (Bio-Pure HSA, Biological Industries). Se transfectaron las células diariamente de acuerdo con el Ejemplo 2, con ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1, comenzando el día 0. Se tomaron imágenes en el día 3. Se observaron varias áreas pequeñas de las células que sufrían cambios morfológicos similares a la transición mesenquimal a epitelial en los pocillos que contenían octanoato, lo que indica un aumento de la eficacia de transfección. Se observaron muchas áreas grandes de cambios morfológicos similares a la transición mesenquimal a epitelial en las muestras que contenían la HSA derivada de la sangre tratada. En ambos casos, los cambios morfológicos eran característicos de la reprogramación.

Ejemplo 11 Reprogramación de fibroblastos humanos mediante el uso de medios que contienen albúmina de suero humano tratada con octanoato

Se colocaron en placas fibroblastos neonatales humanos primarios en placas de 6 pocillos a una densidad de 5000 células/pocillo en medio de fibroblastos (DMEM + suero fetal bovino al 10 %). Después de 6 horas, se reemplazó el medio por medio de transfección que contenía HSA tratada con octanoato. Se transfectaron las células diariamente de acuerdo con el Ejemplo 2, con ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1, comenzando el día 0. Para el día 5, el pocillo contenía varias áreas de células que presentaban una morfología congruente con la reprogramación. Este experimento no incluyó el uso de soportes biológicos o inmunosupresores.

Ejemplo 12 Análisis de la eficacia de transfección y de la viabilidad de las células cultivadas en medios que contienen albúmina de suero humano tratada con resina de intercambio iónico

Se transfectaron fibroblastos neonatales humanos primarios de acuerdo con el Ejemplo 2, con ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1, comenzando el día 0. Se tomaron imágenes en el día 2. Las células en el pocillo que contenía HSA no tratada presentaron baja viabilidad en comparación con el pocillo que contenía HSA derivada de la sangre tratada o HSA recombinante tratada con resina de intercambio iónico.

Ejemplo 13 Reprogramación de fibroblastos humanos mediante el uso de albúmina de suero humano tratada con resina de intercambio iónico

Se colocaron en placas fibroblastos neonatales humanos primarios en placas de 6 pocillos sobre soportes biológicos a una densidad de 10.000 células/pocillo en medio de fibroblastos (DMEM + suero fetal bovino al 10 %). Se transfectaron las células diariamente de acuerdo con el Ejemplo 2, con ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1, comenzando el día 0. Se realizó un pasaje con una relación de división de 1:20 el día 4. Se tomaron imágenes en el día 10. El pocillo contenía muchas colonias grandes de células que presentaban morfología congruente con la reprogramación. No se observaron colonias en los pocillos expuestos a los medios de cultivo celular que contenían HSA no tratada.

Ejemplo 14 Reprogramación de fibroblastos humanos sin soportes biológicos ni inmunosupresores

Se colocaron en placas fibroblastos humanos primarios en placas de 6 pocillos a una densidad de 20.000 células/pocillo en medio de fibroblastos (DMEM + suero fetal bovino al 10 %). Después de 6 horas, se reemplazó el medio por medio de transfección que contenía HSA tratada y que no contenía inmunosupresores, y se transfectaron las células diariamente de acuerdo con el Ejemplo 2, con ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1, con la diferencia de que la dosis de ARN se redujo a 1 µg/pocillo y se realizaron un total de 5 transfecciones. Se tomaron imágenes en el día 7. Se observaron colonias pequeñas de células que presentaban morfología congruente con la reprogramación desde el día 5. En el día 7, se reemplazó el medio por DMEM/F12 + Knockout™ Serum Replacement al 20 % (Life Technologies Corporation) + 1X aminoácidos no esenciales + L-glutamina 2mM,

acondicionado sobre fibroblastos embrionarios de ratón irradiados durante 24 horas y después se complementó con 20 ng/ml de bFGF y Y-27632 10 μ M. Se pudieron ver colonias grandes con una morfología reprogramada desde el día 8. Se recogieron las colonias en el día 10 y se colocaron en placas en pocillos recubiertos con extracto de membrana basal (Cultrex® Human BME Pathclear®, Trevigen Inc.). Las células crecieron rápidamente y se pasaron para establecer líneas. Las líneas establecidas presentaron tinción positiva para los marcadores de las células madre pluripotentes Oct4 y SSEA4. Se repitió todo el protocolo y se obtuvieron resultados similares.

Ejemplo 15 Derivación y reprogramación eficaz y rápida de células de tejido de biopsia de piel humana

Se realizó una biopsia cutánea con sacabocados de espesor completo a un voluntario sano de 31 años, de acuerdo con el protocolo aprobado. En resumen, se anestesió un área de la piel en la parte superior del brazo izquierdo mediante aplicación tópica de lidocaína al 2,5 %. Se desinfectó el campo con isopropanol al 70 % y se realizó una biopsia cutánea de espesor completo mediante el uso de un sacabocados de 1,5 mm. Se enjuagó el tejido en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se colocó en un tubo de 1,5 ml que contenía 250 μ l de TrypLE™ Select CTS™ (Life Technologies Corporation) y se incubó a 37 C durante 30 min. Se transfirió el tejido a un tubo de 1,5 ml que contenía 250 μ l de DMEM/F12-CTS™ (Life Technologies Corporation) + 5 mg/ml de colagenasa y se incubó a 37 C durante 2 horas. Se retiró la epidermis mediante el uso de pinzas y se disoció mecánicamente el tejido. Se enjuagaron las células dos veces en DMEM/F12-CTS™ y se colocaron en placas en pocillos recubiertos con fibronectina de placas de 24 pocillos y 96 pocillos. También se le realizó una flebotomía al mismo voluntario y se recolectó sangre venosa en tubos Vacutainer® SST™ (Becton, Dickinson and Company). Se aisló el suero de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se preparó medio isogénico de colocación en placas mediante la mezcla de DMEM/F12-CTS™ + L-alanil-L-glutamina 2mM (Sigma-Aldrich Co. LLC.) + suero humano al 20 %. Se colocaron en placas las células del tejido cutáneo ya sea en medio de transfección o en medio de colocación en placas isogénico. Después de 2 días, se enjuagaron los pocillos y se reemplazó el medio por medio de transfección. Muchas células con una morfología de fibroblastos se unieron y comenzaron a extenderse en el día 2. Se transfectaron las células de acuerdo con el Ejemplo 2, con ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1, comenzando el día 2, con todos los volúmenes medidos para ajustarse a los pocillos más pequeños. Para el día 5, se observaron áreas de células con morfologías congruentes con la reprogramación.

Ejemplo 16 Reprogramación de fibroblastos humanos mediante el uso de ARN sintético que contiene nucleótidos no canónicos

Se colocaron en placas fibroblastos humanos primarios en placas de 6 pocillos recubiertos con fibronectina humana recombinante y vitronectina humana recombinante (cada una diluida en DMEM/F12 hasta una concentración de 1 μ g/ml, 1 ml/pocillo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h) a una densidad de 20.000 células/pocillo en medio de transfección. Al día siguiente, se transfectaron las células como en el Ejemplo 2, con ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1, con la diferencia de que la dosis de ARN fue 0,5 μ g/pocillo en el día 1, 0,5 μ g/pocillo en el día 2 y 2 μ g/pocillo en el día 3. Se tomaron imágenes en el día 4. Se pudieron observar colonias pequeñas de células que presentaban morfología congruente con la reprogramación en el día 4.

Ejemplo 17 Reprogramación de fibroblastos humanos con un medio de transfección no acondicionado

Se colocaron en placas fibroblastos humanos primarios en placas de 6 pocillos recubiertos con fibronectina humana recombinante y vitronectina humana recombinante (cada una diluida en DMEM/F12 hasta una concentración de 1 μ g/ml, 1 ml/pocillo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h) a una densidad de 20.000 células/pocillo en medio de transfección. Al día siguiente, se transfectaron las células como en el Ejemplo 2, con ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1, con la diferencia de que la dosis de ARN fue 0,5 μ g/pocillo en el día 1, 0,5 μ g/pocillo en el día 2, 2 μ g/pocillo en el día 3, 2 μ g/pocillo en el día 4 y 4 μ g/pocillo en el día 5. Se observaron colonias pequeñas de células que presentaban morfología congruente con la reprogramación desde el día 5. En el día 7, se reemplazó el medio por DMEM/F12 + Knockout™ Serum Replacement al 20 % (Life Technologies Corporation) + 1X aminoácidos no esenciales + L-glutamina 2mM, acondicionado sobre fibroblastos embrionarios de ratón irradiados durante 24 horas y después se complementó con 20 ng/ml de bFGF y Y-27632 10 μ M. Se pudieron ver colonias grandes con una morfología reprogramada desde el día 8. Se recogieron las colonias en el día 10 y se colocaron en placas en pocillos recubiertos con extracto de membrana basal (Cultrex® Human BME Pathclear®, Trevigen Inc.). Las células crecieron rápidamente y se pasaron para establecer líneas.

Ejemplo 18 Reprogramación de fibroblastos humanos mediante el uso de ARN sintético que contiene nucleótidos no canónicos

Se colocaron en placas fibroblastos neonatales humanos primarios en placas de 6 pocillos recubiertos con fibronectina humana recombinante y vitronectina humana recombinante (cada una diluida en DMEM/F12 hasta una concentración de 1 μ g/ml, 1 ml/pocillo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h) a una densidad de 10.000 células/pocillo en medio de transfección. Al día siguiente, las células se transfectaron como en el Ejemplo 2, mediante el uso de ARN que contenía A, 0,5 7dG, 0,5 5mU y 5mC, y una dosis de ARN de 0,5 μ g/pocillo en el día 1, 0,5 μ g/pocillo en el día 2, 2 μ g/pocillo en el día 3, 2 μ g/pocillo en el día 4, y 4 μ g/pocillo en el día 5. Se observaron colonias pequeñas de células que presentaban morfología congruente con la reprogramación desde el día 5. El medio se reemplazó con medio de

mantenimiento en el día 6. Las células se tiñeron con un anticuerpo contra Oct4. Se pudieron observar colonias positivas a Oct4 que presentaban morfología congruente con la reprogramación en todo el pocillo.

5 *Ejemplo 19 Reprogramación sin acondicionamiento, sin inmunosupresores, sin pasaje, sin nutrientes de fibroblastos humanos primarios mediante el uso de ARN sintético*

Se recubrieron los pocillos de una placa de 6 pocillos con una mezcla de fibronectina humana recombinante y vitronectina humana recombinante (1 µg/ml en DMEM/F12, 1 ml/pocillo) durante 1 h a temperatura ambiente. Los fibroblastos humanos primarios adultos se colocaron en placas en pocillos recubiertos con medio de transfección a una densidad de 10.000 células/pocillo. Las células se mantuvieron a 37 C, CO₂ al 5 % y O₂ al 5 %. Al comienzo del día siguiente, las células se transfectaron de acuerdo con el Ejemplo 2 a diario durante 5 días con ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1. La cantidad total de ARN transfectado en cada uno de los 5 días fue de 0,5 µg, 0,5 µg, 2 µg, 2 µg y 4 µg, respectivamente. Al comienzo de la cuarta transfección, el medio se reemplazó dos veces al día. Al día siguiente de la transfección final, el medio se reemplazó con medio de transfección, complementado con Y-27632 10 µM. De manera alternativa, la cantidad total de ARN transfectado cada día fue 0,25 µg, 0, 0,5 µg, 0,5 µg y 0,5 µg, respectivamente, o 0,25 µg, 0, 0,25 µg, 0,25 µg y 0,25 µg, respectivamente. En determinados experimentos, el medio de transfección se cambió únicamente una vez al día, al momento de la transfección. Se observaron colonias compactas de células con una morfología reprogramada en cada pocillo transfectado a partir del día 4.

20 *Ejemplo 20 Derivación y reprogramación eficaz y rápida de células de tejido de biopsia de piel humana adulta*

Se realizó una biopsia cutánea con sacabocados de espesor completo a un voluntario sano de 31 años, de acuerdo con el protocolo aprobado. En resumen, se anestesió un área de la piel en la parte superior del brazo izquierdo mediante aplicación tópica de lidocaína al 2,5 %. Se desinfectó el campo con isopropanol al 70 % y se realizó una biopsia cutánea de espesor completo utilizando un sacabocados de 1,5 mm. Se enjuagó el tejido en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), se colocó en un tubo de 1,5 ml que contenía 250 µl de TrypLE Select CTS (Life Technologies Corporation) y se incubó a 37 C durante 30 min. Se transfirió el tejido a un tubo de 1,5 ml que contenía 250 µl de DMEM/F12-CTS (Life Technologies Corporation) + 5 mg/ml colagenasa y se incubó a 37 C durante 2 h. Se retiró la epidermis mediante el uso de pinzas y se disoció mecánicamente el tejido. Las células se enjuagaron dos veces en DMEM/F12-CTS. También se le realizó una flebotomía al mismo voluntario y se recolectó sangre venosa en tubos Vacutainer SST (Becton, Dickinson and Company). Se aisló el suero de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó medio isogénico de colocación en placas mediante la mezcla de DMEM/F12-CTS + L-alanil-L-glutamina 2mM (Sigma-Aldrich Co. LLC.) + suero humano al 20 %. Las células de la muestra de tejido dérmico se colocaron en un pocillo recubierto en fibronectina de una placa de 6 pocillos en medio isogénico de colocación en placas. Muchas células con una morfología de fibroblastos se unieron y comenzaron a extenderse en el día 2. Las células se expandieron y se congelaron en Synth-a-Freeze (Life Technologies Corporation).

Las células se pasaron a placas de 6 pocillos a una densidad de 5000 células/pocillo. Al día siguiente, el medio se reemplazó con medio de transfección y las células se transfectaron como en el Ejemplo 2, con ARN que contenía A, 0,5 7dG, 0,4 5mU y 5mC, y una dosis de ARN de 0,5 µg/pocillo en el día 1, 0,5 µg/pocillo en el día 2, 2 µg/pocillo en el día 3, 2 µg/pocillo en el día 4, y 2 µg/pocillo en el día 5. Determinados pocillos recibieron transfecciones adicionales de 2 µg/pocillo en el día 6 y en el día 7. Además, determinados pocillos recibieron 2 ng/ml de TGF-β1 desde el día 4 en adelante. El medio se reemplazó con medio de mantenimiento en el día 6. Se observaron colonias de células que presentaban morfología congruente con la reprogramación entre el día 5 y el día 10. Las colonias crecieron rápidamente y muchas presentaron una morfología similar a la de las colonias de células madre embrionarias. Se tomaron las colonias y se colocaron en placas, en pocillos recubiertos con fibronectina humana recombinante (cada una diluida en DMEM/F12 hasta una concentración de 1 µg/ml, 1 ml/pocillo, incubadas a temperatura ambiente durante 1 h). Las células crecieron rápidamente y se pasaron para establecer líneas.

50 *Ejemplo 21 Edición génica de alta eficacia mediante transfección repetida con RiboSlice*

Los fibroblastos humanos primarios se colocaron en placas como en el Ejemplo 19. Al día siguiente, se transfectaron las células de acuerdo con el Ejemplo 2, con ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1. Al día siguiente, las células de uno de los pocillos se transfectaron una segunda vez. Dos días después de la segunda transfección, se midió la eficacia de la edición génica mediante el uso de un ensayo de nucleasa específica de la mutación.

Ejemplo 22 Transfección de células con ARN sintético que contiene nucleótidos no canónicos y ADN que codifica una plantilla de reparación

60 Para la transfección en placas de 6 pocillos, primero se diluyeron 1 µg de ARN que codificaba proteínas de edición génica dirigidas al exón 16 del gen APP humano, 1 µg de ADN plantilla de reparación de cadena simple que contenía un sitio de restricción de PstI que no estaba presente en las células objetivo y 6 µl de reactivo de transfección (Lipofectamina RNAiMAX, Life Technologies Corporation) por separado en medio de formación de complejos (Opti-MEM, Life Technologies Corporation) hasta un volumen total de 120 µl. El ARN, plantilla de reparación y reactivo de transfección diluidos se mezclaron y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente, según las instrucciones del fabricante del reactivo de transfección. Se añadieron complejos a las células en cultivo. Se añadieron

aproximadamente 120 μ l de complejos a cada pocillo de una placa de 6 pocillos, que ya contenían 2 ml de medio de transfección por pocillo. Se agitaron suavemente las placas para distribuir los complejos en todo el pocillo. Se incubaron las células con los complejos durante 4 horas y hasta toda la noche, antes de reemplazar el medio por medio de transfección nuevo (2 ml/pocillo). Al día siguiente, el medio se cambió a DMEM + FBS al 10 %. Dos días después de la transfección, se aisló y se purificó el ADN genómico. Se amplificó una región dentro del gen APP mediante PCR, y el producto amplificado se digirió con PstI y se analizó mediante electroforesis en gel.

Ejemplo 23 Estudio de seguridad de RiboSlice in vivo

10 A 40 ratones NCr nu/nu se les inyectaron 5×10^6 células tumorales MDA-MB-231 en Matrigel al 50% (BD Biosciences) por vía subcutánea. El volumen de inyección celular fue de 0,2 ml/ratón. La edad de los ratones al momento del comienzo del estudio era de 8 a 12 semanas. Se llevó a cabo una coincidencia de pares y los animales se dividieron en 4 grupos de 10 animales cada uno, donde los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 100-150 mm³, y comenzó el tratamiento. Se midió el peso corporal cada día durante los primeros 5 días y luego de forma bisemanal hasta el final del estudio. El tratamiento consistía en RiboSlice BIRC5-1.2 en complejo con vehículo (Lipofectamina 2000, Life Technologies Corporation). Para preparar la solución de dosificación para cada grupo, 308 μ l de amortiguador de formación de complejos (Opti-MEM, Life Technologies Corporation) se colocó con pipeta en cada uno de dos tubos de 1,5 ml esterilizados sin RNasa. Se agregaron 22 μ l de RiboSlice BIRC5-1.2 (500 ng/ μ l) a uno de los dos tubos, y el contenido del tubo se mezcló mediante el uso de una pipeta. Se agregaron 22 μ l del vehículo al segundo tubo. El contenido del segundo tubo se mezcló y se transfirió al primer tubo, y se mezcló con el contenido del primer tubo con pipeta para formar complejos. Los complejos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Durante la incubación, se cargaron las jeringas. A los animales se les inyectó por vía intravenosa o intratumoral una dosis total de 1 μ g de ARN/animal en un volumen total de 60 μ l/animal. Se proporcionó un total de 5 tratamientos y se administraron inyecciones cada día por medio. Las dosis no se ajustaron para el peso corporal. Se realizó seguimiento a los animales durante 17 días. No se observó una reducción significativa en el peso corporal promedio, lo que demuestra la seguridad *in vivo* del ARN de edición génica RiboSlice.

Ejemplo 24 Identificación de reactivos para la administración de ácidos nucleicos en células

30 Se seleccionaron agentes de administración, inclusive polietilenimina (PEI), varios reactivos de transfección a base de lípidos comerciales, un reactivo de transfección a base de péptidos (N-TER, Sigma-Aldrich Co. LLC.), y varios reactivos de administración a base de lípidos y a base de esteroides para verificar la eficacia de transfección y toxicidad *in vitro*. Se formaron complejos de reactivos de administración con RiboSlice BIRC5-1.2, y los complejos se administraron a células HeLa en cultivo. La toxicidad se evaluó mediante el análisis de la densidad celular 24 h después de la transfección. La eficacia de transfección se evaluó mediante el análisis de cambios morfológicos. Los reactivos evaluados presentaron un amplio rango de toxicidades y eficacias de transfección. Los reactivos que contenían una proporción alta de enlaces de éster presentaron toxicidades menores que los reactivos que contenían una proporción menor de enlaces de éster o sin enlaces de éster.

Ejemplo 25 RiboSlice liposómico de alta concentración

40 Se preparó RiboSlice liposómico de alta concentración mediante la mezcla de 1 μ g de ARN a 500 ng/ μ l con 3 μ l de medio de formación de complejos (Opti-MEM, Life Technologies Corporation), y 2,5 μ l de reactivo de transfección (Lipofectamina 2000, Life Technologies Corporation) por μ g de ARN con 2,5 μ l de medio de formación de complejos. Se mezclaron el ARN y el reactivo de transfección diluidos y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente para formar RiboSlice liposómico de alta concentración. De manera alternativa, se utilizó un reactivo de transfección que contenía DOSPA o DOSPER.

Ejemplo 26 Estudio de eficacia de RiboSlice in vivo - modelo de glioma subcutáneo

50 A 40 ratones NCr nu/nu se les inyectaron 1×10^7 células tumorales U-251 por vía subcutánea. El volumen de inyección celular fue de 0,2 ml/ratón. La edad de los ratones al momento del comienzo del estudio era de 8 a 12 semanas. Se llevó a cabo una coincidencia de pares y los animales se dividieron en 4 grupos de 10 animales cada uno, donde los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 35-50mm³, y comenzó el tratamiento. Se midió el peso corporal cada día durante los primeros 5 días y luego de forma bisemanal hasta el final del estudio. Se realizaron mediciones de calibre dos veces por semana y se calculó el tamaño del tumor. El tratamiento consistía en RiboSlice BIRC5-2.1 en complejo con vehículo (Lipofectamina 2000, Life Technologies Corporation). Para preparar la solución de dosificación, se colocaron 294 μ l de amortiguador de formación de complejos (Opti-MEM, Life Technologies Corporation) con una pipeta en un tubo que contenía 196 μ l de RiboSlice BIRC5-1.2 (500 ng/ μ l) y el contenido del tubo se mezcló con la pipeta. Se colocaron con pipeta 245 μ l de amortiguador de formación de complejos en un tubo que contenía 245 μ l de vehículo. El contenido del segundo tubo se mezcló y se transfirió al primer tubo, y se mezcló con el contenido del primer tubo con pipeta para formar complejos. Los complejos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Durante la incubación, se cargaron las jeringas. A los animales se les inyectó intratumoralmente una dosis de 2 μ g o 5 μ g de ARN/animal en un volumen total de 20 μ l o 50 μ l/animal. Se proporcionó un total de 5 tratamientos y se dieron inyecciones cada día por medio. Las dosis no se ajustaron para el peso corporal. Se realizó seguimiento a los animales durante 25 días.

Ejemplo 27 Formulación de liposomas y encapsulación de ácido nucleico

5 Se prepararon liposomas de acuerdo con la siguiente formulación: 3,2 mg/ml de N-(carbonil-etoxipolietilenglicol 2000)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (MPEG2000-DSPE), 9,6 mg/ml de fosfatidilcolina completamente hidrogenada, 3,2 mg/ml de colesterol, 2 mg/ml de sulfato de amonio e histidina como amortiguador. El pH se controló con hidróxido de sodio y se mantuvo la isotonicidad con sacarosa. Para formar los liposomas, se mezclan lípidos en un solvente orgánico, se secan, hidratan con agitación y se seleccionan por tamaño mediante extrusión a través de un filtro de policarbonato con un tamaño de poro promedio de 800 nm. Los ácidos nucleicos se encapsulan mediante la combinación de 10 µg de formulación de liposomas por cada 1 µg de ácido nucleico y se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Ejemplo 28 Formulación de liposomas dirigidos a folato

15 Los liposomas se preparan de acuerdo con el Ejemplo 62, salvo que se agregan 0,27 mg/ml de 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[folato(polietilenglicol)-5000] (FA-MPEG5000-DSPE) a la mezcla de lípidos.

Ejemplo 29 Terapia que comprende ARN que codifica proteínas liposomales

20 Se prepararon liposomas con ARN sintético encapsulado dirigido a proteínas terapéuticas, sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1, de acuerdo con el Ejemplo 27 o el Ejemplo 28. Los liposomas se administraron mediante inyección o infusión intravenosa.

Ejemplo 30 Generación de la plantilla de ARN de ivT de elastina

25 Se extrajo ARN total de fibroblastos dérmicos humanos neonatos mediante el uso del mini kit Rneasy (QIAGEN, GmbH), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó el ADNc que codifica elastina humana mediante el uso de la transcriptasa inversa MonsterScript™ (Epicentre Biotechnologies) y el cebador: AAAAAAACCGGTTCATTTTCTCTCCGGCCAC (SEQ ID NO: 147). Se preparó una plantilla de transcripción *in vitro* (ivT) a partir del ADNc mediante amplificación de PCR de la secuencia de codificación de elastina (CDS) mediante el uso de los cebadores: F: AAAAAAGCTAGCATGGCGGGTCTGACG (SEQ ID NO: 148) y R: AAAAAAACCGGTTCATTTTCTCTCCGGCCAC (SEQ ID NO: 149). El producto de PCR se purificó mediante el uso de electroforesis en gel de agarosa y el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN GmbH) y se clonó en un vector que contiene las regiones no traducidas 5' y 3' de beta globina humana (HBB) y una secuencia potente de Kozak. El vector se amplificó, purificó y linealizó antes de la síntesis de ARN.

Ejemplo 31 Síntesis de ARN de elastina

40 El ARN que codifica elastina humana se sintetizó mediante el uso de la plantilla de ADN del Ejemplo 30 y el kit de síntesis de ARN T7 High Yield (New England Biolabs, Inc.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Tabla 4). Se analizaron muestras del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa para evaluar la calidad del ARN (**Figura 1**). Se diluyó el ARN a 200 ng/µl y se añadió un inhibidor de RNasa (Superase-In™, Life Technologies Corporation) a una concentración de 1 µl/200 µg de ARN. La solución de ARN se almacenó a 4 C.

Ejemplo 32 Producción de albúmina de suero humano tratada con octanoato

45 Se preincubó una solución al 10 % de HSA con octanoato de sodio 16 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se incubó a 37 C durante 3 horas antes de formar el medio completo.

Ejemplo 33 Formulación para administración in vivo de ácidos nucleicos

50 La formulación para administración *in vivo* de ácidos nucleicos se prepara mediante combinación de ARN sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 31 y albúmina sérica humana tratada de acuerdo con los Ejemplos 8, 9 y/o 32 en un amortiguador adecuado (por ejemplo, agua, DMEM/F12, medio de formación de complejos, Opti-MEM, etc.).

Ejemplo 34 Aumento de la producción de elastina en la piel mediante inyección transdérmica por jeringa de albúmina tratada y ARN que codifica elastina

60 La formulación del ejemplo 33 se carga en una jeringa de insulina con una aguja de 0,5 pulgadas de calibre 28 y se administra en la dermis de un paciente a través de la epidermis. Se administran dosis adicionales según sea necesario.

Ejemplo 35 Aumento de la producción de elastina en la piel mediante inyección intradérmica por conjunto de microagujas motorizadas de albúmina tratada y ARN que codifica elastina

65 La formulación del ejemplo 33 se carga en la cámara de un conjunto de microagujas motorizadas con una profundidad de penetración de aproximadamente 0,1 mm. El conjunto de microagujas administra la formulación a la dermis de un

paciente a través de la epidermis.

Ejemplo 36 Aumento de la producción de colágeno en la piel mediante inyección transdérmica de albúmina tratada y ARN que codifica colágeno

5 La formulación del ejemplo 33 se prepara mediante el uso de ARN que codifica colágeno humano de tipo I y/o tipo III. La formulación se administra tal como en el Ejemplo 34 o 35.

Ejemplo 37 Aumento de la producción de actina en músculo esquelético mediante inyección intramuscular de albúmina tratada y ARN que codifica actina.

10 La formulación del ejemplo 33 se prepara mediante el uso de ARN que codifica alfa actina de músculo esquelético. La formulación se administra al paciente mediante inyección intramuscular.

Ejemplo 38 Tratamiento de cicatrización de heridas

15 La formulación del ejemplo 33 se prepara mediante el uso de ARN que codifica el factor de crecimiento de fibroblastos básicos. La formulación se administra tal como en el Ejemplo 34 o 35.

Ejemplo 39 Tratamiento anti-cicatrices

20 La formulación del ejemplo 33 se prepara mediante el uso de ARN que codifica colagenasa. La formulación se administra tal como en el Ejemplo 34 o 35.

Ejemplo 40 Generación de la plantilla de ARN de ivT de tirosinasa

25 Se extrajo ARN total de melanocitos epidérmicos humanos mediante el uso del mini kit Rneasy (QIAGEN, GmbH), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó el ADNc que codifica tirosinasa humana mediante el uso de la transcriptasa inversa MonsterScript™ (Epicentre Biotechnologies). Se preparó una plantilla de transcripción *in vitro* (ivT) a partir del ADNc mediante amplificación de PCR de la secuencia de codificación de tirosinasa (CDS). El producto de PCR se purificó mediante el uso de electroforesis en gel de agarosa y el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN GmbH) y se clonó en un vector que contiene las regiones no traducidas 5' y 3' de beta globina humana (HBB) y una secuencia potente de Kozak. El vector se amplificó, purificó y linealizó antes de la síntesis de ARN.

Ejemplo 41 Síntesis de ARN de tirosinasa

30 El ARN que codifica tirosinasa humana se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1, mediante el uso de la plantilla de ADN del Ejemplo 40 y el kit de síntesis de ARN T7 High Yield (New England Biolabs, Inc.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Tabla 4). Se analizaron muestras del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa para evaluar la calidad del ARN. Se diluyó el ARN a 1 µg/µl. La solución de ARN se almacenó a 4 C.

Ejemplo 42 Producción de albúmina de suero humano tratada con octanoato

45 Se preincubó una solución al 10 % de HSA con octanoato de sodio 16 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se incubó a 37 C durante 3 horas antes de formar el medio completo.

Ejemplo 43 Aumento de la producción de melanina en la piel mediante inyección transdérmica por jeringa de ARN que codifica tirosinasa

50 El ARN del Ejemplo 41 se cargó en una jeringa y se administró a la dermis del antebrazo ventral de un paciente masculino saludable de 33 años en el transcurso de aproximadamente 30 segundos.

Ejemplo 44 Aumento de la producción de melanina en la piel mediante administración combinada de ARN que codifica tirosinasa y electroporación

55 El área de piel tratada en el Ejemplo 43 se expuso a pulsos eléctricos de entre 10V y 155V y entre aproximadamente 10 milisegundos y aproximadamente 1 segundo mediante el uso de un conjunto de dos electrodos conectado de forma eléctrica a un capacitor. El paciente informó una sensación de cosquilleo con todos los voltajes y profundidades de penetración. El área tratada se tornó más oscura luego de 24-48 horas (ver **Figura 16**). El experimento se repitió varias veces con resultados similares.

Ejemplo 45 Aumento de la producción de melanina en la piel mediante aplicación intradérmica o tópica de ARN que codifica tirosinasa

65 El ARN del Ejemplo 41 o los liposomas del Ejemplo 29 se aplican directamente a la piel, con o sin interrupción de la capa córnea o se inyectan de forma intradérmica mediante el uso de un microgramo o menos por centímetro cuadrado.

Opcionalmente, se aplica un campo eléctrico tal como en el Ejemplo 44 o mediante el uso de un parche de contacto superficial para potenciar la administración del ARN.

5 *Ejemplo 46 Aumento de la producción de elastina en la piel mediante administración transdérmica de ARN que codifica elastina*

El ARN que codifica elastina se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1. El ARN se administra tal como en el Ejemplo 43, 44 o 45.

10 *Ejemplo 47 Aumento de la producción de colágeno en la piel mediante administración transdérmica de ARN que codifica colágeno*

El ARN que codifica colágeno se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1. El ARN se administra tal como en el Ejemplo 43, 44 o 45.

15 *Ejemplo 48 Terapia de anemia que comprende la administración de ARN que codifica eritropoyetina o darbepoyetina*

El ARN que codifica darbepoyetina alfa se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1. El ARN se administra tal como en el Ejemplo 43, 44 o 45.

20 *Ejemplo 49 Aumento de la producción de actina en músculo esquelético mediante administración intramuscular de ARN que codifica actina*

25 El ARN que codifica actina se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1. El ARN se administró al paciente mediante inyección intramuscular con o sin el uso de un campo magnético tal como en el Ejemplo 43, 44 o 45.

Ejemplo 50 Tratamiento de cicatrización de heridas

30 El ARN que codifica el factor de crecimiento de fibroblastos básicos se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1. El ARN se administra tal como en el Ejemplo 43, 44 o 45.

Ejemplo 51 Tratamiento anti-cicatrices

35 El ARN que codifica colagenasa se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1. El ARN se administra tal como en el Ejemplo 43, 44 o 45.

Ejemplo 52 Producción de toxina botulínica

40 El ARN que codifica la toxina botulínica se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1. El ARN se administra tal como en el Ejemplo 43, 44 o 45.

Ejemplo 53 Aumento de la producción de colágeno en células cutáneas mediante transfección con ARN que codifica colágeno I

45 El ARN que comprende la secuencia de codificación del gen COL1A1 humano se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1. Los fibroblastos dérmicos humanos primarios se colocaron en pocillos de una placa de 24 pocillos, y se transfectaron de acuerdo con el Ejemplo 2. Entre 24 y 72 horas después de la transfección, las células se fijaron y se tiñeron mediante el uso de un anticuerpo dirigido a colágeno I. Se observaron muchos depósitos extracelulares en los pocillos transfectados (**Figura 17**).

50 *Ejemplo 54 Aumento de la producción de colágeno en células cutáneas mediante transfección con ARN que codifica colágeno VII*

55 El ARN que comprende la secuencia de codificación del gen COL7 humano se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1. Los fibroblastos dérmicos humanos primarios se colocaron en pocillos de una placa de 24 pocillos, y se transfectaron de acuerdo con el Ejemplo 2. Entre 24 y 72 horas después de la transfección, las células se fijaron y se tiñeron mediante el uso de un anticuerpo dirigido a colágeno VII. Las células transfectadas presentaron niveles elevados de colágeno VII, en comparación con un control sin transfectar (**Figura 18**).

60 *Ejemplo 55 Aumento de la producción de colágeno en la piel mediante inyección transdérmica por jeringa de ARN que codifica colágeno I o colágeno VII*

65 El ARN que comprende la secuencia de codificación del gen COL1A1 humano o el gen COL7 humano se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 1. El ARN se cargó en una jeringa y se administró a la dermis de un paciente en el transcurso de aproximadamente 30 segundos o tal como en el Ejemplo 43, 44 o 45.

Ejemplo 56 Aumento de la producción de colágeno en la piel mediante administración combinada de ARN que codifica colágeno I o colágeno VII y electroporación

5 El área de piel tratada en el Ejemplo 55 se expuso a pulsos eléctricos de entre 10V y 155V y entre aproximadamente 50 microsegundos y aproximadamente 1 segundo mediante el uso de un conjunto de múltiples electrodos conectado de forma eléctrica a una fuente eléctrica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ARN sintético para su uso en el tratamiento de la epidermólisis ampollosa distrófica, donde el ARN sintético codifica una proteína de edición génica que se dirige a un gen COL7, donde
- 10 el ARN sintético es adecuado para la administración *in vivo* a los queratinocitos de un sujeto, donde la proteína de edición génica edita el gen COL7, y donde la proteína de edición génica comprende un dominio de unión al ADN y un dominio de nucleasa, provocando la proteína de edición génica una ruptura de cadena simple o de cadena doble en el gen COL7 de los queratinocitos del paciente.
- 15 2. El ARN sintético para el uso de la reivindicación 1, donde la proteína de edición génica corrige o elimina, sola o en combinación con una o más moléculas o proteínas de edición génica, una mutación que es al menos parcialmente responsable del fenotipo de la enfermedad epidermólisis ampollosa distrófica.
- 20 3. El ARN sintético para el uso de la reivindicación 1, donde la proteína de edición génica se dirige a una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78.
4. El ARN sintético para el uso de la reivindicación 1, donde la proteína de edición génica se selecciona del grupo que consiste en una nucleasa, una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción (TALEN), una nucleasa de dedos de zinc, una meganucleasa, una nickasa y una proteína asociada a las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR).
- 25 5. El ARN sintético para el uso de la reivindicación 1, donde la molécula de ARN sintético comprende además uno o más de un casquete 5', una estructura de casquete 5' 1 y una cola 3'-poli(A).

FIG. 1

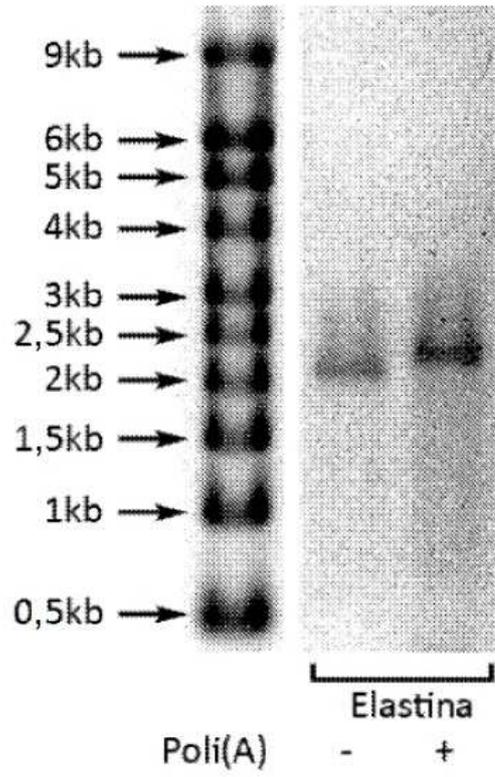


FIG. 2

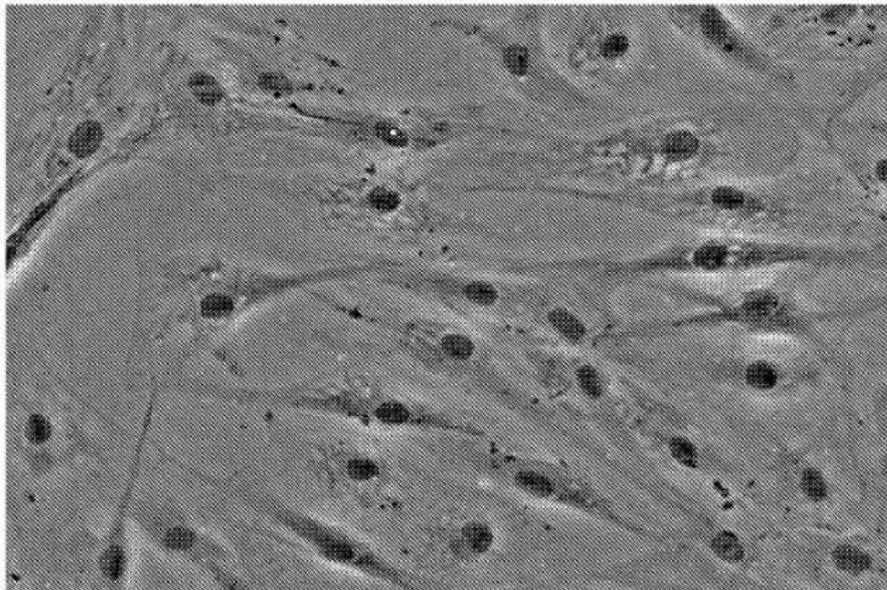


FIG. 3

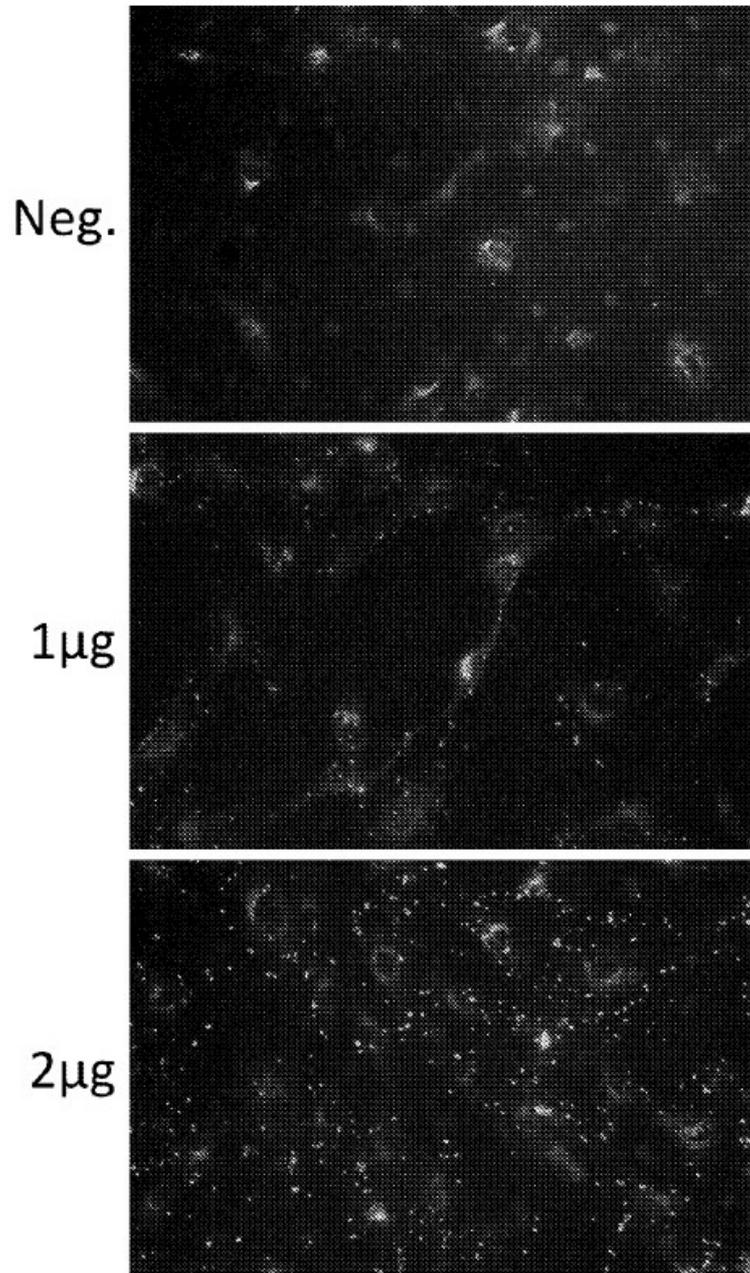


FIG. 4

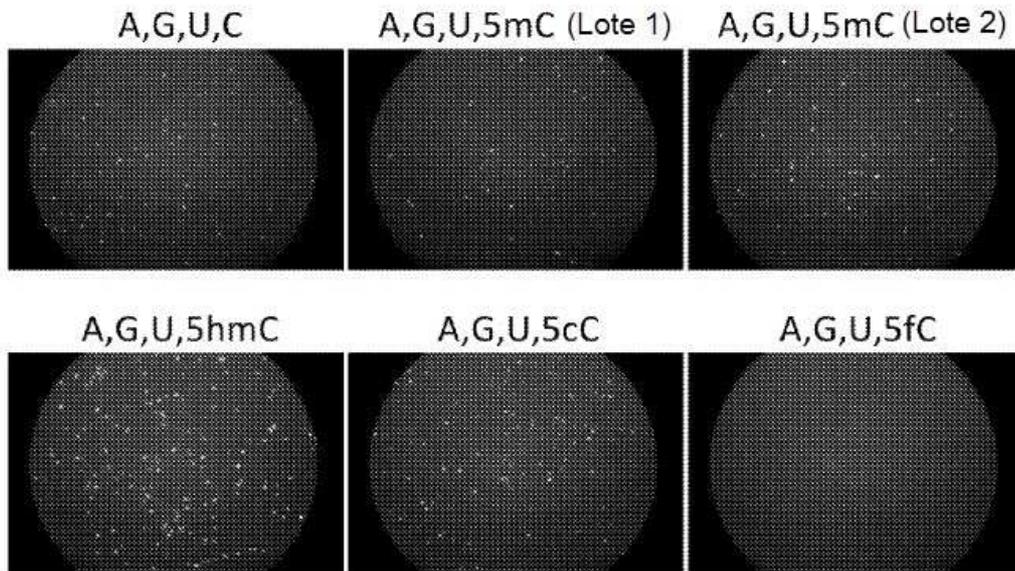


FIG. 5

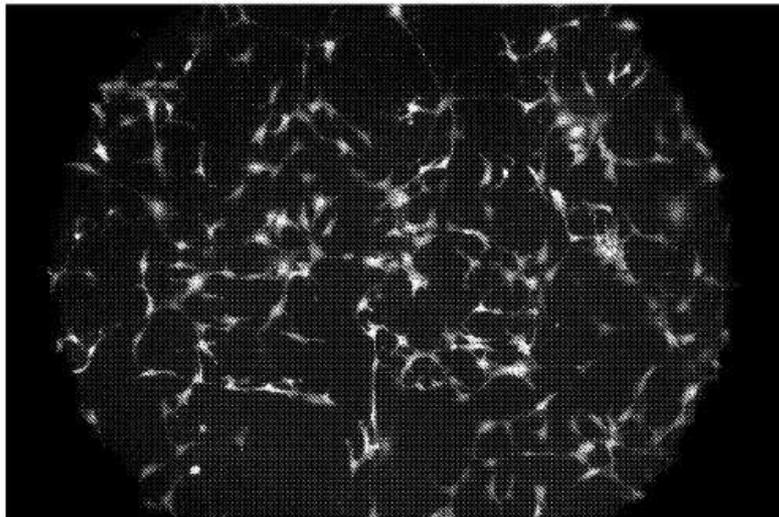


FIG. 6

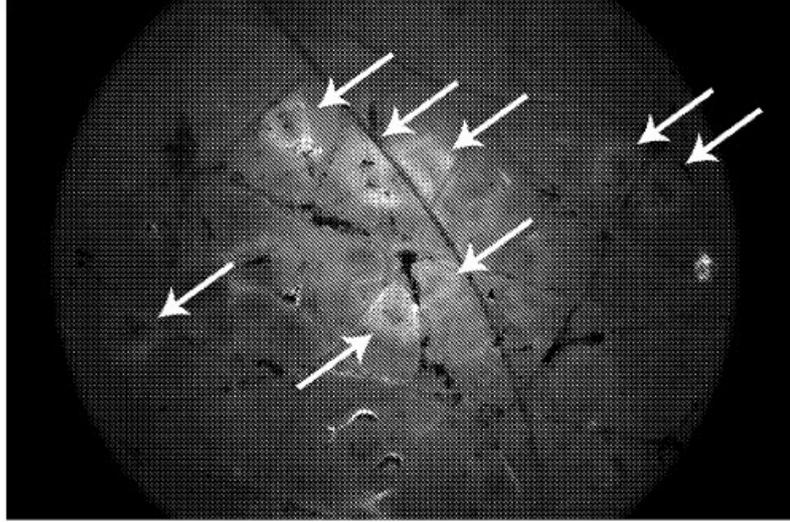


FIG. 7

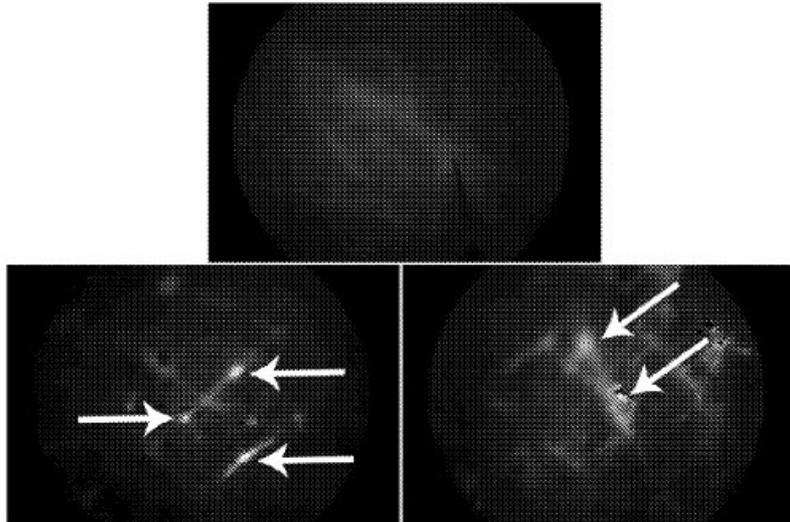


FIG. 8

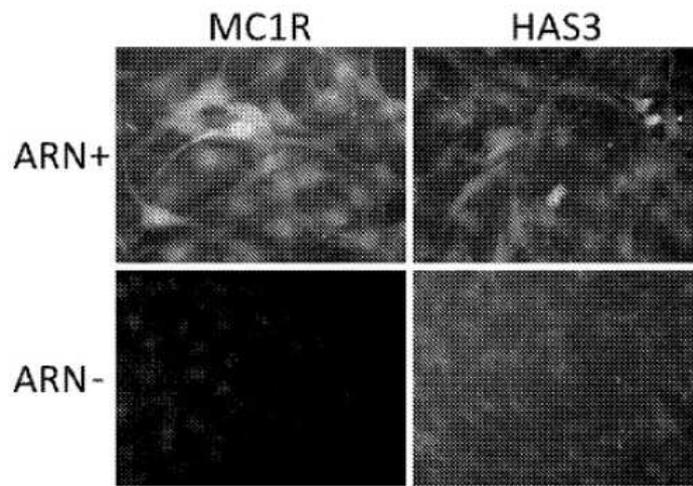


FIG. 9

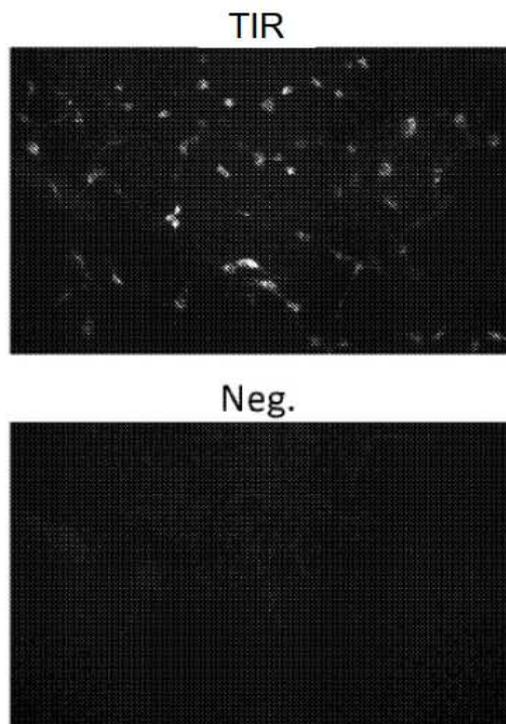


FIG. 10

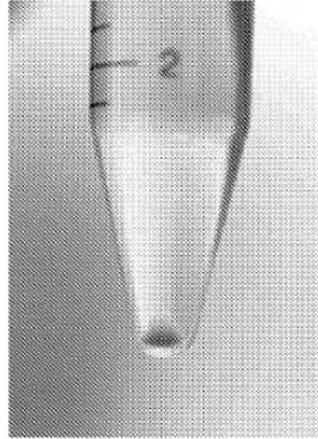


FIG. 11

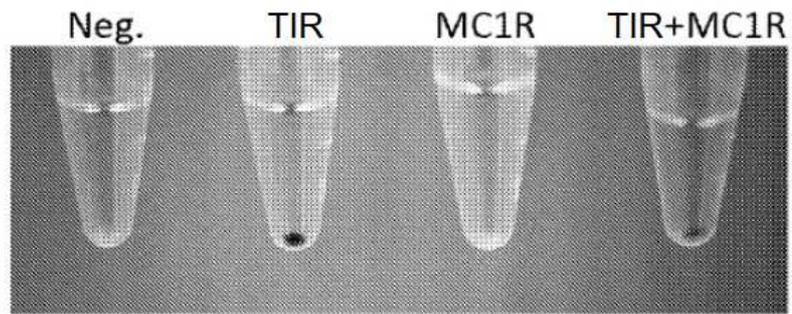


FIG. 12

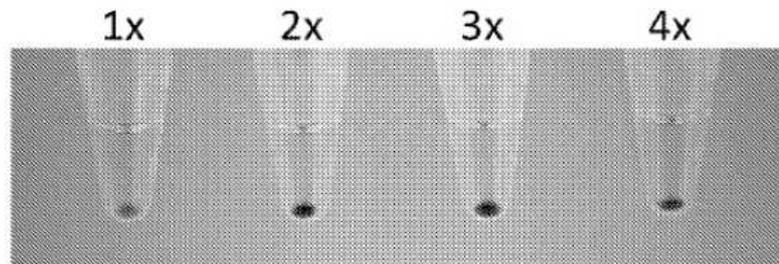


FIG. 13

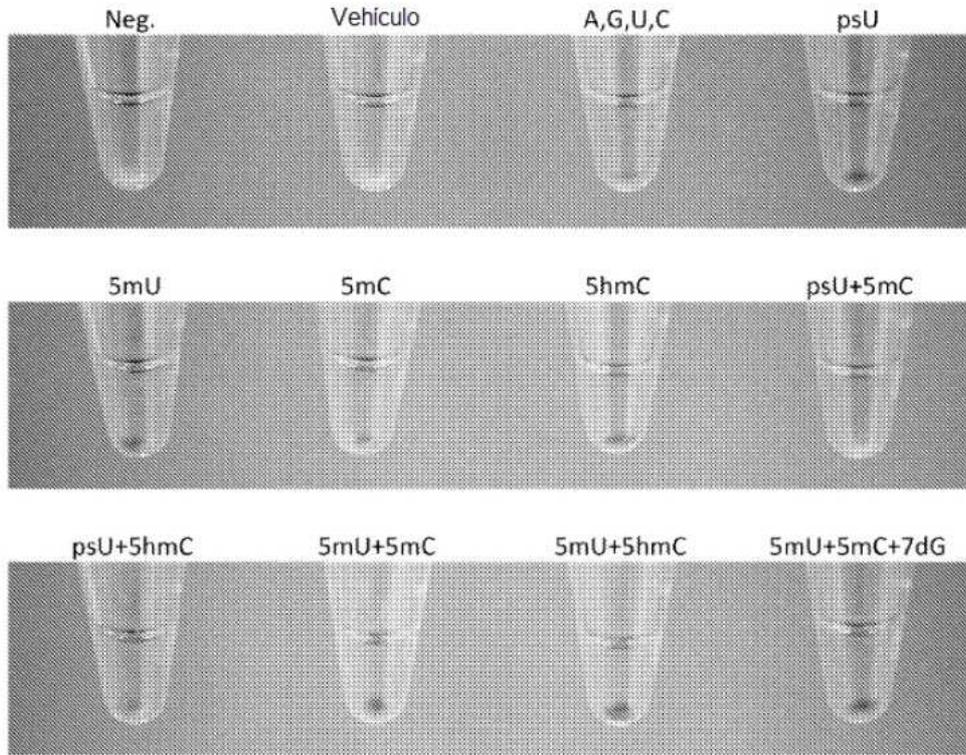


FIG. 14

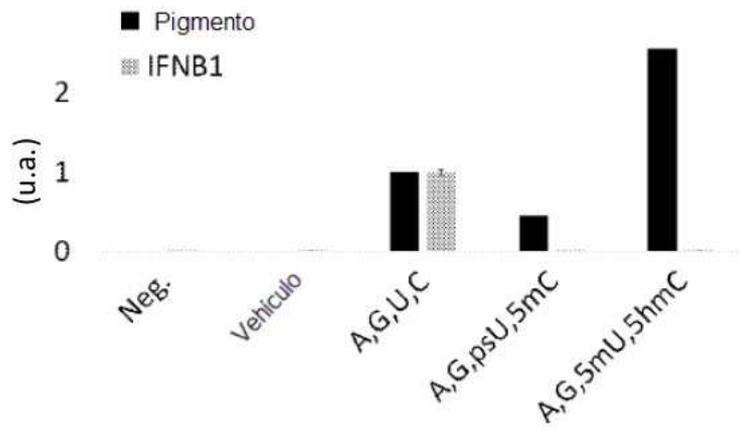


FIG. 15

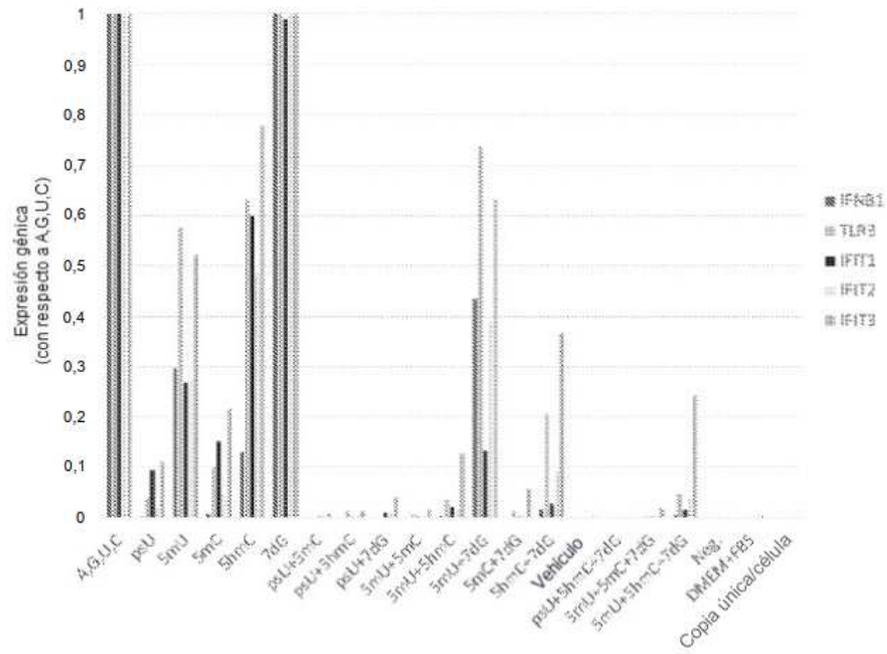
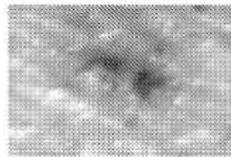


FIG. 16

ARN TIR



Efélides

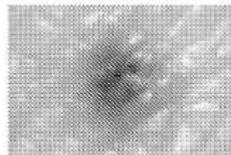


FIG. 17

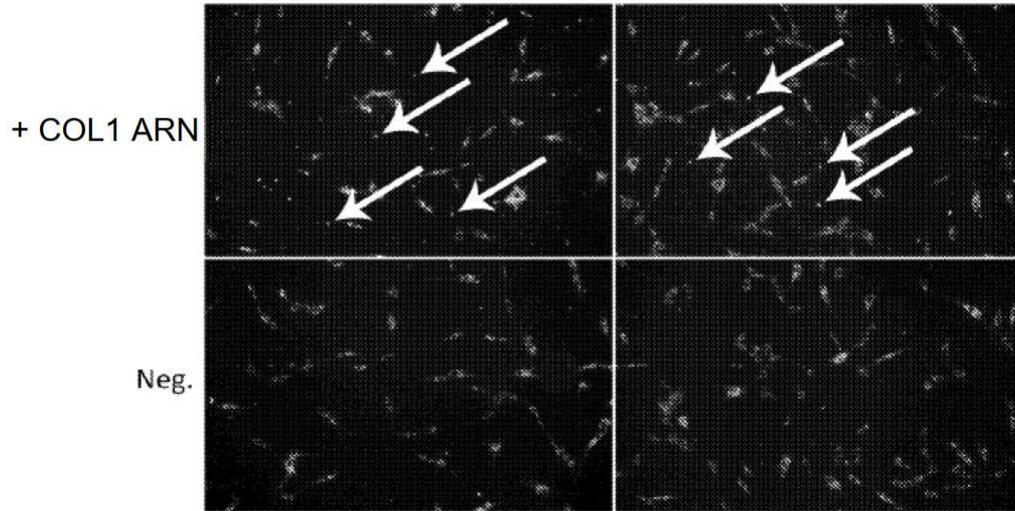


FIG. 18

