

REIVINDICACIONES

1. Un método de generación de una célula donante universal, comprendiendo el método modificar genéticamente una célula mediante:

(i) la introducción de una delección y/o inserción de al menos un par de bases en el genoma de la célula en un sitio dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más de entre antígenos leucocitarios humanos MHC-I o MHC-II, o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo de MHC-I o MHC-II; y

(ii) la introducción en el genoma de la célula de una inserción de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico, en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de (i), generando así la célula donante universal.

2. Un método de generación de una célula donante universal, comprendiendo el método modificar genéticamente una célula mediante:

(i) la introducción de una delección y/o inserción de al menos un par de bases en el genoma de la célula en un sitio dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más de entre antígenos leucocitarios humanos MHC-I o MHC-II, o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo de MHC-I o MHC-II; y

(ii) la introducción en el genoma de la célula de una inserción de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en un locus seguro, generando así la célula donante universal.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la célula donante universal tiene mayor evasión inmunitaria

y/o mayor supervivencia celular en comparación con una célula no modificada.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I o MHC-II, o el componente o el regulador de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II es un gen MHC-I seleccionado entre HLA-A, HLA-B o HLA-C, un gen MHC-II seleccionado entre HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ o HLA-DR, o un gen seleccionado entre B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP o RFXANK.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico es uno o más polinucleótidos que codifican uno o más de PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 o CD47.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico está unido operativamente a un promotor exógeno.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el promotor exógeno es un promotor constitutivo, inducible, temporal, específico del tejido o específico del tipo de célula, en donde, opcionalmente, el promotor exógeno es un promotor de CMV, EF1a, PGK, CAG o UBC.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la delección y/o inserción de (i) está dentro o cerca de B2M, y la inserción de (ii) es un polinucleótido que codifica PD-L1 o HLA-E.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el método comprende además introducir al menos una modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de al menos un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada.

10. El método de la reivindicación 9, en donde la al menos una modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de al menos un factor de supervivencia, es una inserción de un polinucleótido que codifica MANF, lo cual
5 aumenta la expresión de MANF en relación con la célula no modificada; o una delección y/o inserción de al menos un par de bases dentro o cerca de un gen que codifica ZNF143, TXNIP, FOXO1 o JNK, lo cual reduce o elimina la expresión de ZNF143, TXNIP, FOXO1 o JNK en relación con la célula no
10 modificada.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el polinucleótido que codifica MANF se inserta en un locus seguro o en un gen que pertenece a un MHC-I, MHC-II o regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1
15 a 11, en donde la modificación genética comprende administrar al menos un sistema de endonucleasa guiado por ARN a la célula.
13. El método de la reivindicación 12, en donde el al
20 menos un sistema de endonucleasa guiado por ARN, es un sistema CRISPR que comprende una nucleasa CRISPR y un ARN guía.
14. El método de la reivindicación 13, en donde la nucleasa CRISPR es Cas9, Cpf1, un homólogo de las mismas,
25 una versión modificada de las mismas, una versión con optimización de codones de las mismas o cualquier combinación de las mismas.
15. El método de la reivindicación 13 o 14, en donde la nucleasa CRISPR es una Cas9 de *S. pyogenes*.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13
30 a 15, en donde la nucleasa CRISPR comprende una señal de localización nuclear N-terminal (NLS) y/o una NLS C-terminal.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde la nucleasa CRISPR y el ARN guía están presentes en una proporción en peso de 1:1.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1
5 o 3 a 17, en donde la delección y/o inserción de (i) está dentro o cerca de un locus del gen B2M, y la inserción de (ii) es un polinucleótido que codifica PD-L1.
19. El método de la reivindicación 18, en donde el ARN
10 guía usado para (i) y (ii) comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos una de las SEQ ID NO: 1-3 o de las SEQ ID NO: 35-44.
20. El método de la reivindicación 18 o 19, en donde el polinucleótido que codifica PD-L1 está flanqueado por (a)
15 una secuencia de nucleótidos que tiene homología de secuencia con una región ubicada a la izquierda del sitio en (i) y (b) una secuencia de nucleótidos que tiene homología de secuencia con una región ubicada a la derecha del sitio en (i).
21. El método de la reivindicación 20, en donde el
20 polinucleótido que codifica PD-L1 se inserta en el locus del gen B2M dentro de 50 pares de bases del sitio en (i).
22. El método de la reivindicación 20 o 21, en donde (a) consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13, y (b) consiste esencialmente en una
25 secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19.
23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en donde el polinucleótido que codifica PD-L1 está unido operativamente a un promotor exógeno, opcionalmente, en donde el promotor exógeno es un promotor de CAG.
- 30 24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde la célula es una célula de mamífero, opcionalmente, en donde la célula es una célula humana.

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la célula es una célula madre.
26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde la célula es una célula madre pluripotente (PSC), una célula madre embrionaria (ESC), una célula madre adulta (ASC), una célula madre pluripotente inducida (iPSC) o una célula madre y progenitora hematopoyética (HSPC).
27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la célula es una célula diferenciada o una célula somática.
28. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la célula donante universal es capaz de diferenciarse en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas.
29. El método de la reivindicación 28, en donde las células progenitoras de linaje restringido son células progenitoras endodérmicas pancreáticas, células progenitoras endocrinas pancreáticas, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras musculares, blastocitos o células progenitoras neuronales.
30. El método de la reivindicación 28, en donde las células somáticas completamente diferenciadas son células secretoras endocrinas tales como células beta pancreáticas, células epiteliales, células endodérmicas, macrófagos, hepatocitos, adipocitos, células renales, células sanguíneas o células del sistema inmunitario.
31. Una pluralidad de células donantes universales generadas mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30.
32. La pluralidad de células donantes universales de la reivindicación 31, mantenidas durante un tiempo y en condiciones suficientes para que las células se sometan a diferenciación.

33. Una composición de células que comprenden:

(i) al menos una delección dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo de MHC-I o MHC-II; y

(ii) al menos una inserción de un polinucleótido que codifica al menos un factor tolerogénico en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de una delección genética de (i).

34. Un método que comprende administrar a un sujeto la pluralidad de células donantes universales de la reivindicación 31 o 32.

35. Un método para tratar a un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método:

(i) obtener o haber obtenido la pluralidad de células donantes universales de la reivindicación 31 o 32 después de la diferenciación en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas; y

(ii) administrar al sujeto las células progenitoras de linaje restringido o las células somáticas completamente diferenciadas.

36. Un método de obtención de células para su administración a un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método:

(i) obtener o haber obtenido las células donantes universales de la reivindicación 31 o 32; y

(ii) mantener las células donantes universales durante un tiempo y en condiciones suficientes para que las células se diferencien en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas.

37. El método de la reivindicación 35 o 36, en donde las células progenitoras de linaje restringido son células progenitoras endodérmicas pancreáticas, células progenitoras endocrinas pancreáticas, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras musculares, blastocitos o células progenitoras neuronales.

38. El método de la reivindicación 35 o 36, en donde las células somáticas completamente diferenciadas son células secretoras endocrinas tales como células beta pancreáticas, células epiteliales, células endodérmicas, macrófagos, hepatocitos, adipocitos, células renales, células sanguíneas o células del sistema inmunitario.

39. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 38, en donde el sujeto es un ser humano que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad.

40. El método de la reivindicación 39, en donde la enfermedad es una enfermedad genéticamente hereditaria.

20

25

30