

SE REIVINDICA LO SIGUIENTE:

1. Una composición para modificar un ácido nucleico diana, que comprende:
 - (a) una proteína nucleasa dirigible; y
 - (b) una plantilla donante de plásmido que comprende:
 - (i) una plantilla de reparación dirigida por homología (HDR);
 - (ii) una primera secuencia diana de linealización de coadministración (CDL), en donde la primera secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 5' de la plantilla de HDR; y
 - (iii) una segunda secuencia diana de CDL, en donde la segunda secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 3' de la plantilla de HDR; yen donde cada una de las secuencias diana de CDL primera y segunda son capaces de escindirse mediante la proteína nucleasa dirigible o un complejo que comprende la proteína nucleasa dirigible, y en donde la composición está formulada para administración no viral a una célula.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la proteína nucleasa dirigible es una nucleasa guiada por ARN.
3. La composición de la reivindicación 2, en donde la composición comprende además un ARN que comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a la secuencia diana de CDL.
4. La composición de la reivindicación 2 o 3, en donde la nucleasa guiada por ARN es una proteína Cas.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde la composición comprende además un ARN guía (ARNg) donante configurado para formar el complejo que comprende la proteína nucleasa dirigible, y en donde (1) el ARNg donante comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL, y (2) cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL están unidas operativamente a un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) de 3 pares de bases ubicado hacia 3' de las secuencias diana de CDL.

6. La composición de la reivindicación 4, en donde la composición comprende además un primer ARN guía (ARNg) donante que comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a la primera secuencia diana de CDL, un segundo ARNg donante que comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a la segunda secuencia diana de CDL, en donde cada ARNg donante se configura para formar un complejo distinto que comprende la proteína nucleasa dirigible, y en donde cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL están unidas operativamente a un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) de 3 pares de bases ubicado hacia 3' de las secuencias diana de CDL.
7. La composición de la reivindicación 5 o 6, en donde uno o más de los ARNg donantes comprenden al menos 17 nucleótidos que son complementarios a una secuencia diana genómica de la célula.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde la plantilla de HDR comprende brazos de homología que son complementarios a secuencias de ácido nucleico que flanquean la secuencia diana genómica de la célula.
9. La composición de la reivindicación 8, en donde los brazos de homología se seleccionan cada uno independientemente de una longitud de al menos 400 pb, al menos 500 pb, al menos 600 pb, al menos 700 pb, al menos 800 pb, al menos 900 pb, 1000 pb, al menos 1100 pb, al menos 1200 pb, al menos 1300 pb, 1400 pb, al menos 1500 pb, al menos 1600 pb, al menos 1700 pb, al menos 1800 pb, al menos 1900 pb o al menos 2000 pb de longitud.
10. La composición de la reivindicación 1, en donde:
- (a) la nucleasa dirigible comprende una nucleasa guiada por ARN, en donde la nucleasa guiada por ARN comprende CRISPR-CAS;
 - (b) la composición comprende además un ARN guía (ARNg) donante configurado para formar el complejo que comprende la proteína nucleasa dirigible, y
 - (c) en donde (1) el ARNg donante comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL, y (2) cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL están unidas operativamente a un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) de 3 pares de bases ubicado hacia 3' de

las secuencias diana de CDL.

11. Una composición para modificar un ácido nucleico diana, que comprende:

(a) una nucleasa guiada por ARN CRISPR-CAS;

(b) un ARN guía (ARNg) donante; y

5 (c) una plantilla donante de plásmido que comprende:

(i) una plantilla de reparación dirigida por homología (HDR);

(ii) una primera secuencia diana de linealización de coadministración (CDL), en donde la primera secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 5' de la plantilla de HDR; y

10 (iii) una segunda secuencia diana de CDL, en donde la segunda secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 3' de la plantilla de HDR; y

en donde (1) el ARNg donante comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL, y (2) cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL están unidas operativamente a un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) de 3 pares de bases ubicado hacia 3' de las secuencias diana de CDL y

15 en donde la composición está formulada para administración no viral a una célula.

12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la composición comprende además una segunda proteína nucleasa dirigible, en donde la segunda proteína nucleasa dirigible o un complejo que comprende la segunda proteína nucleasa dirigible es capaz de escindir una secuencia diana genómica de la célula.

20

13. La composición de la reivindicación 12, en donde la segunda proteína nucleasa dirigible es una nucleasa guiada por ARN.

14. La composición de la reivindicación 13, en donde la composición comprende además un segundo ARN que comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a la secuencia diana genómica.

25

15. La composición de la reivindicación 13 o 14, en donde la nucleasa guiada por ARN es una proteína Cas.

16. La composición de la reivindicación 15, en donde la composición comprende además un ARN guía (ARNg) diana configurado para formar el complejo que comprende la segunda proteína nucleasa dirigible, y en donde (1) el ARNg diana comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a la secuencia diana genómica, y (2) la secuencia diana genómica está unida operativamente a un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) de 3 pares de bases ubicado hacia 3' de la secuencia diana genómica.
17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-16, en donde la primera secuencia diana de CDL, la segunda secuencia diana de CDL y la secuencia diana genómica comprenden la misma secuencia de ácido nucleico.
18. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en donde la secuencia diana genómica comprende una secuencia de ácido nucleico de puerto seguro.
19. La composición de la reivindicación 18, en donde la secuencia de ácido nucleico de puerto seguro comprende la secuencia de ácido nucleico GAGCCATGCTTGGCTTACGA.
20. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 5-19, en donde una, ambas o ninguna de las secuencias PAM están codificadas entre las secuencias diana de CDL y la plantilla de HDR.
21. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la nucleasa dirigible y cada uno de los ARNg están en una relación molar de entre 1:10 y 2:1, respectivamente.
22. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la nucleasa dirigible y la plantilla donante están en una relación molar de entre: 10:1 y 1000:1, respectivamente.
23. La composición de la reivindicación 1 o 12, en donde la proteína nucleasa dirigible y/o la segunda proteína nucleasa dirigible comprende una proteína efectora de unión al ADN de tipo activador de la transcripción (TAL) y una nucleasa.
24. La composición de la reivindicación 1 o 12, en donde la proteína nucleasa dirigible y/o la segunda proteína nucleasa dirigible comprenden una proteína de unión al ADN con dedos de cinc y una nucleasa.

25. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína nucleasa dirigible y/o la segunda proteína nucleasa dirigible se fusiona a una secuencia de señal de localización nuclear (NLS).
26. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína nucleasa dirigible y/o la segunda proteína nucleasa dirigible es una proteína Cas9.
27. Un método para modificar el ácido nucleico diana en la célula, que comprende introducir o haber introducido de forma no viral en la célula la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde la plantilla de HDR se integra en el ácido nucleico diana.
28. El método de la reivindicación 27, en donde la introducción comprende electroporación.
29. El método de la reivindicación 27 o 28, en donde la célula es una célula primaria.
30. El método de la reivindicación 29, en donde la célula primaria es un linfocito T primario.
31. Un complejo de ribonucleoproteína para modificar un ácido nucleico diana, que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.
32. Un complejo de ribonucleoproteína para modificar un ácido nucleico diana,
(a) una nucleasa guiada por ARN CRISPR-CAS; y
(b) un ARN guía donante (ARNg), en donde el ARNg donante comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a una secuencia diana de linealización de coadministración (CDL), y
en donde la composición está formulada para administración no viral a una célula.
33. La composición de la reivindicación 32, en donde la composición comprende además una plantilla donante de plásmido que comprende:
(i) una plantilla de reparación dirigida por homología (HDR);
(ii) una primera secuencia diana de linealización de coadministración (CDL), en donde la primera secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 5' de la plantilla de HDR; y

(iii) una segunda secuencia diana de CDL, en donde la segunda secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 3' de la plantilla de HDR; y

en donde (1) el ARNg donante comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL, y (2) cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL están unidas operativamente a un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) de 3 pares de bases ubicado hacia 3' de las secuencias diana de CDL.

34. Un método para modificar el ácido nucleico diana en la célula, que comprende introducir en la célula una composición de cualquiera de las reivindicaciones 32 o 33.

35. El método de la reivindicación 34, en donde la introducción comprende electroporación.

36. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35, en donde la célula es una célula primaria.

37. El método de la reivindicación 36, en donde la célula primaria es un linfocito T primario.

38. Cualquiera de las reivindicaciones de método anteriores, en donde el método se lleva a cabo in vivo, in vitro o ex vivo.

39. Un método para formar un complejo de ribonucleoproteína (RNP), que comprende incubar o haber incubado (a) una nucleasa guiada por ARN CRISPR-CAS; y (b) un ARN guía (ARNg) donante, en donde el ARNg donante comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a una secuencia diana de linealización de coadministración (CDL).

40. El método de la reivindicación 39, en donde la proteína Cas y el ARNg se incuban juntos a 37 °C durante al menos 17 minutos.

41. El método de la reivindicación 39 o 40, en donde la relación molar de ARNg:proteína Cas es entre 0,25:1 y 4:1.

42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 39-41, en donde el complejo RNP tiene un tamaño que es inferior a 100 nm.

43. El método de la reivindicación 42, en donde el complejo RNP tiene un tamaño de entre 20 nm y 90 nm.
44. Una composición que comprende una plantilla donante de plásmido que comprende:
- (i) una plantilla de reparación dirigida por homología (HDR);
 - 5 (ii) una primera secuencia diana de linealización de coadministración (CDL), en donde la primera secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 5' de la plantilla de HDR; y
 - (iii) una segunda secuencia diana de CDL, en donde la segunda secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 3' de la plantilla de HDR; y
- 10 en donde cada una de las secuencias diana de CDL primera y segunda son capaces de escindirse mediante una proteína nucleasa dirigible o un complejo que comprende la proteína nucleasa dirigible.
45. La composición de la reivindicación 44, en donde la composición comprende además un ARN guía (ARNg) donante configurado para formar el complejo que comprende la proteína nucleasa dirigible.
- 15 46. La composición de la reivindicación 44 o 45, en donde la composición comprende la proteína nucleasa dirigible.
47. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 44-46, en donde la plantilla donante comprende de 5' a 3' la secuencia: P1a-N1-P2b-H-P3c-N2-P4d, y en donde:
- (1) P1, P2, P3 y P4 son secuencias PAM;
 - 20 (2) N1 es la primera secuencia diana de CDL y N2 es la segunda secuencia diana de CDL;
 - (3) H es la plantilla de HDR;
 - (4) a es 0 y b es 1, o a es 1 y b es 0; y
 - (5) c es 0 y d es 1; o c es 1 y d es 0.
48. Un método para modificar un ácido nucleico diana de una célula, el método comprende:
- 25 - proporcionar la célula, y

- introducir o haber introducido en la célula una composición formulada para administración no viral, la composición comprende:

(a) una proteína nucleasa dirigible; y

(b) una plantilla donante de plásmido que comprende:

5 (i) una plantilla de reparación dirigida por homología (HDR);

(ii) una primera secuencia diana de linealización de coadministración (CDL), en donde la primera secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 5' de la plantilla de HDR; y

10 (iii) una segunda secuencia diana de CDL, en donde la segunda secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 3' de la plantilla de HDR; y

en donde cada una de las secuencias diana de CDL primera y segunda son capaces de escindirse mediante la proteína nucleasa dirigible o un complejo que comprende la proteína nucleasa dirigible.

15 49. Un método para modificar un ácido nucleico diana de una célula, el método comprende:

- proporcionar la célula, y

- introducir o haber introducido en la célula una composición formulada para administración no viral, la composición comprende:

(a) una nucleasa guiada por ARN CRISPR-CAS;

20 (b) un ARN guía (ARNg) donante; y

(c) una plantilla donante de plásmido que comprende:

(i) una plantilla de reparación dirigida por homología (HDR);

(ii) una primera secuencia diana de linealización de coadministración (CDL), en donde la primera secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 5' de la plantilla de HDR; y

25 (iii) una segunda secuencia diana de CDL, en donde la segunda secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 3' de la plantilla de HDR; y

en donde (1) el ARNg donante comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL, y (2)

cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL están unidas operativamente a un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) de 3 pares de bases ubicado hacia 3' de las secuencias diana de CDL.

50. Un método para modificar una secuencia diana genómica de una célula, el método comprende:

- 5 - proporcionar la célula, y
- introducir o haber introducido en la célula una composición formulada para administración no viral, la composición comprende:
 - (a) una nucleasa guiada por ARN CRISPR-CAS;
 - (b) un ARN guía (ARNg) donante; y
 - 10 (c) una plantilla donante de plásmido que comprende:
 - (i) una plantilla de reparación dirigida por homología (HDR) que comprende un ácido nucleico para inserción flanqueado por brazos de homología;
 - (ii) una primera secuencia diana de linealización de coadministración (CDL), en donde la primera secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 5' de la plantilla de HDR; y
 - 15 (iii) una segunda secuencia diana de CDL, en donde la segunda secuencia diana de CDL está operativamente unida hacia 3' de la plantilla de HDR; y
- 20 en donde (1) el ARNg donante comprende al menos 17 nucleótidos que son complementarios a cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL (2) cada una de la primera y la segunda secuencias diana de CDL están unidas operativamente a un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) de 3 pares de bases ubicado hacia 3' de las secuencias diana de CDL
- en donde el ARNg donante comprenden al menos 17 nucleótidos que son complementarios a la secuencia diana genómica de la célula, y
- 25 en donde los brazos de homología son complementarios a las secuencias de ácido nucleico que flanquean la secuencia diana genómica de la célula, en donde el ácido nucleico para la inserción se configura para su inserción en la secuencia diana genómica de la célula.

51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 48-50, en donde la célula es una célula humana.
52. El método de cualquiera de las reivindicaciones 48-51, en donde la célula es una célula inmunitaria.
53. El método de la reivindicación 52, en donde la célula inmunitaria es un linfocito T.
- 5 54. El método de la reivindicación 53, en donde el linfocito T es un linfocito T primario.
55. El método de cualquiera de las reivindicaciones 48-54, en donde la introducción de la composición formulada para administración no viral comprende electroporación.
56. El método de cualquiera de las reivindicaciones 48-55, en donde la cantidad de plantilla donante es al menos alrededor de 80, 10-120, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 100, 110 o 120 μg .
- 10 57. El método de cualquiera de las reivindicaciones 55, en donde el número de células para una reacción de electroporación individual es al menos alrededor de 5, 1-10, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 o 10^7 .
- 15 58. El método de la reivindicación 57, en donde el número total de células proporcionadas es al menos superior a 10^7 y se realiza más de una reacción de electroporación.
59. El método de cualquiera de las reivindicaciones 48-58, en donde el volumen total de suspensión celular es alrededor de 1 mL.
- 20 60. El método de cualquiera de las reivindicaciones 48-59, en donde el método da como resultado una mayor inserción de plantilla en la secuencia diana genómica de las células con respecto a una composición de control por lo demás idéntica pero que carece de las secuencias diana de CDL, opcionalmente en donde la inserción de plantilla aumenta en al menos alrededor de 1-5, 1, 2, 3, 4
- 25 o 5 veces con respecto al control.