

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

Se reivindica:

1. Una composición o conjunto de composiciones que comprende:

(i) una nucleasa o secuencia de polinucleótidos que codifica una nucleasa, en donde la nucleasa se selecciona de una enzima (Cas) asociada a repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas agrupadas (CRISPR), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN), una nicasa TALE, una nucleasa de dedos de zinc (ZFN), una nicasa de ZF o una meganucleasa, y

(ii) un casete polinucleotídico que comprende:

un casete de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la primera secuencia de ácido nucleico codifica un transgén; y la segunda secuencia de ácido nucleico se sitúa en posición 5' o 3' en la primera secuencia de ácido nucleico y promueve la producción de dos productos génicos independientes al integrarse en un sitio de integración diana en el genoma de una célula humana;

una tercera secuencia de ácido nucleico situada en posición 5' en el casete de expresión y que comprende una secuencia que es sustancialmente homóloga a una secuencia genómica humana en posición 5' del sitio de integración diana en un genoma de una célula humana; y

una cuarta secuencia de ácido nucleico situada en posición 3' en el casete de expresión y que comprende una secuencia que es sustancialmente homóloga a una secuencia genómica humana en posición 3' del sitio de integración diana en el genoma de la célula humana;

en donde:

el casete polinucleotídico no incluye una secuencia promotora; y

la nucleasa es capaz de inducir una rotura bicatenaria y/o una rotura monocatenaria en un sitio de corte en el genoma de la célula humana.

2. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 1, en donde el sitio de integración diana es un locus de albúmina que comprende un promotor endógeno de albúmina y un gen endógeno de albúmina.

3. Una composición o conjunto de composiciones que comprende:

(i) una nucleasa o secuencia de polinucleótidos que codifica una nucleasa; y

(ii) un casete polinucleotídico que comprende:

un casete de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la primera secuencia de ácido nucleico codifica un transgén; y la segunda secuencia de ácido nucleico se sitúa en posición 5' o 3' en la primera secuencia de ácido nucleico y promueve la producción de dos productos génicos independientes al integrarse en un sitio de integración diana en el genoma de una célula humana, en donde el sitio de integración diana es un locus de albúmina que comprende un promotor endógeno de albúmina y un gen endógeno de albúmina;

una tercera secuencia de ácido nucleico situada en posición 5' en el casete de expresión y que comprende una secuencia que es sustancialmente homóloga a una secuencia genómica humana en posición 5' del sitio de integración diana en un genoma de una célula humana; y

una cuarta secuencia de ácido nucleico situada en posición 3' en el casete de expresión y que comprende una secuencia que es sustancialmente homóloga a una secuencia genómica humana en posición 3' del sitio de integración diana en el genoma de la célula humana;

en donde:

el casete polinucleotídico no incluye una secuencia promotora; y

la nucleasa es capaz de inducir una rotura bicatenaria y/o una rotura monocatenaria en un sitio de corte en el genoma de la célula humana.

4. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además un vector vírico recombinante.

5. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 4, en donde el vector vírico recombinante es un vector de AAV recombinante.

6. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 5, en donde el vector vírico recombinante es o comprende un polipéptido de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos de sL65, LK03, AAV8, AAV-DJ; AAV-LK03; o AAVNP59.

7. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 6, en donde el vector vírico recombinante comprende el polipéptido de la cápside y la secuencia de polinucleótidos que codifica una nucleasa y/o el casete polinucleotídico se encapsida en el vector vírico recombinante.

8. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 6, en donde el casete polinucleotídico se encapsida en el vector vírico recombinante.

9. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV2.

10. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 9, en donde las secuencias de ITR de AAV2 flanquean los extremos 5' y 3' de la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa y/o el casete polinucleotídico.

11. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde cada una de la tercera y cuarta secuencia de ácido nucleico tiene una longitud de entre 50 y 1600 nt.

12. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la tercera y cuarta secuencia de ácido nucleico tienen la misma longitud.

13. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la tercera y cuarta secuencia de ácido nucleico tienen diferentes longitudes.

14. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde después de la integración del casete polinucleotídico en el sitio de integración diana en el genoma de la célula, el transgén se expresa bajo el control de un promotor endógeno en el sitio de integración diana.

15. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 2-14, en donde el sitio de integración diana se encuentra dentro de una secuencia codificante del locus de albúmina y adyacente en posición 5' a un codón finalizador.

16. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 15, en donde el sitio de integración diana es adyacente en posición 5' a un codón finalizador en el exón 14 del locus de albúmina.

17. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el sitio de corte se encuentra dentro una secuencia no codificante del locus de albúmina.

18. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 17, en donde el sitio de corte se encuentra dentro de un intrón, una región no traducida, un potenciador, un promotor, un silenciador o un aislante del locus de albúmina.

19. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 18, en donde el sitio de corte se encuentra dentro del intrón 12, 13 o 14 del locus de albúmina.

20. La composición o el conjunto de composiciones de cualquiera de 3-18, en donde la nucleasa se selecciona de una enzima Cas, una TALEN, una nicasa TALE, una ZFN, una nicasa de ZF o una meganucleasa.

21. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la nucleasa es una enzima Cas o una TALEN.

22. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde la nucleasa es una enzima Cas.

23. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde la enzima Cas se selecciona de Cas9 de

Staphylococcus aureus (saCas9), *Streptococcus pyogenes* (spCas9), Nucleasa de AZ, HF1-Cas9, HF2-Cas9 o HiFi-Cas9.

24. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 22 o 23, que comprende además un ARN guía (ARNg).

25. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 24, en donde el ARNg comprende una secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-45, 71-86 o 93-98, o una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-45, 71-86 o 93-98.

26. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 24 o 25, en donde la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa y el ARNg se formulan conjuntamente.

27. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 24 o 25, en donde la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa y el ARNg se formulan por separado.

28. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico es o comprende:

- a) una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido 2A;
- b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES);
- c) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de corte y empalme aminoterminal de inteína y una región de corte y empalme carboxiterminal de inteína; o
- d) una secuencia de ácido nucleico que codifica un donante de corte y empalme y un aceptor de corte y empalme.

29. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico es o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido 2A.

30. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 29, en donde el segundo ácido nucleico es o comprende una secuencia de ácido

nucleico que codifica un péptido 2A seleccionado del grupo que consiste en P2A, T2A, E2A y F2A.

31. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 1 o 3, en donde el sitio de corte se encuentra a una distancia de entre 1 y 2000 pb del sitio de integración diana.

32. La composición o el conjunto de composiciones de la reivindicación 31, en donde el sitio de corte se encuentra a una distancia de hasta 100 pb del sitio de integración diana.

33. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde el transgén se selecciona de CBS, UGT1A1, MUT, FAH, ATP7B, A1AT, ASL, LIPA, PAH, G6PC, Factor IX, o una variante de los mismos.

34. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-33, que es un conjunto de composiciones, en donde la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) y el casete polinucleotídico se encapsida en un vector de AAV recombinante.

35. Un método de integración de un transgén en el genoma de una célula humana, comprendiendo dicho método

administrar a un sujeto una composición o conjunto de composiciones que comprende:

(i) una nucleasa o una secuencia de polinucleótidos que codifica una nucleasa, en donde la nucleasa se selecciona de una enzima Cas, una TALEN, una nicasa TALE, una ZFN, una nicasa de ZF o una meganucleasa; y

(ii) un casete polinucleotídico que comprende:

un casete de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la primera secuencia de ácido nucleico codifica un transgén; y la segunda secuencia de ácido nucleico se sitúa en posición 5' o 3' en la primera secuencia de ácido nucleico y promueve la producción de

dos productos génicos independientes al integrarse en un sitio de integración diana en el genoma de una célula humana;

una tercera secuencia de ácido nucleico situada en posición 5' en el casete de expresión y que comprende una secuencia que es sustancialmente homóloga a una secuencia genómica humana en posición 5' del sitio de integración diana en un genoma de una célula humana; y

una cuarta secuencia de ácido nucleico situada en posición 3' en el casete de expresión y que comprende una secuencia que es sustancialmente homóloga a una secuencia genómica humana en posición 3' del sitio de integración diana en el genoma de la célula humana;

en donde:

el casete polinucleotídico no incluye una secuencia promotora;

y

la nucleasa es capaz de inducir una rotura bicatenaria y/o una rotura monocatenaria en un sitio de corte en el genoma de la célula;

en donde, después de administrar la composición o el conjunto de composiciones, el transgén se integra en el genoma de la célula humana.

36. El método de la reivindicación 35, en donde el sitio de integración diana es un locus de albúmina que comprende un promotor de albúmina endógeno y un gen de albúmina endógeno.

37. Un método de integración de un transgén en el genoma de una célula humana, comprendiendo dicho método

administrar a un sujeto una composición o conjunto de composiciones que comprende:

(i) una nucleasa o una secuencia de polinucleótidos que codifica una nucleasa; y

(ii) un casete polinucleotídico que comprende:

un casete de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico, en

donde la primera secuencia de ácido nucleico codifica un transgén; y la segunda secuencia de ácido nucleico se sitúa en posición 5' o 3' en la primera secuencia de ácido nucleico y promueve la producción de dos productos génicos independientes al integrarse en un sitio de integración diana en el genoma de una célula humana, en donde el sitio de integración diana es un locus de albúmina que comprende un promotor endógeno de albúmina y un gen endógeno de albúmina;

una tercera secuencia de ácido nucleico situada en posición 5' en el casete de expresión y que comprende una secuencia que es sustancialmente homóloga a una secuencia genómica humana en posición 5' de un sitio de integración diana en un genoma de una célula humana; y

una cuarta secuencia de ácido nucleico situada en posición 3' en el casete de expresión y que comprende una secuencia que es sustancialmente homóloga a una secuencia genómica humana en posición 3' de un sitio de integración diana en el genoma de la célula humana;

en donde:

el casete polinucleotídico no incluye una secuencia promotora;

y

la nucleasa es capaz de inducir una rotura bicatenaria y/o una rotura monocatenaria en un sitio de corte en el genoma de la célula;

en donde, después de administrar la composición o el conjunto de composiciones, el transgén se integra en el genoma de la célula humana.

38. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-37, en donde la composición o el conjunto de composiciones comprende además un vector vírico recombinante.

39. El método de la reivindicación 38, en donde el vector vírico recombinante es un vector de AAV recombinante.

40. El método de la reivindicación 39, en donde el vector vírico recombinante es o comprende un polipéptido de la cápside que comprende una

secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos de LK03, AAV8, AAV-DJ; AAV-LK03; o AAVNP59.

41. El método de la reivindicación 40, en donde el vector vírico recombinante comprende el polipéptido de la cápside y la secuencia de polinucleótidos que codifica una nucleasa y/o el casete polinucleotídico se encapsida en el vector vírico recombinante.

42. El método de la reivindicación 41, en donde el casete polinucleotídico se encapsida en el vector vírico recombinante.

43. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-42, en donde la composición o el conjunto de composiciones comprende además secuencias de ITR de AAV2.

44. El método de la reivindicación 43, en donde las secuencias de ITR de AAV2 flanquean los extremos 5' y 3' de la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa y/o el casete polinucleotídico.

45. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-44, en donde la tercera y cuarta secuencia de ácido nucleico tienen una longitud de entre 50 nt y 1600 nt.

46. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-45, en donde la tercera y cuarta secuencia de ácido nucleico tienen la misma longitud.

47. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-45, en donde la tercera y cuarta secuencia de ácido nucleico tienen diferentes longitudes.

48. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-47, en donde después de la integración del casete polinucleotídico en el sitio de integración diana en el genoma de la célula, el transgén se expresa bajo el control de un promotor endógeno en el sitio de integración diana.

49. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-48, en donde el sitio de integración diana está dentro de una secuencia codificante del locus de albúmina y adyacente en posición 5' a un codón finalizador.

50. El método de la reivindicación 49, en donde el sitio de integración diana es adyacente en posición 5' a un codón finalizador en el exón 14 del locus de albúmina.

51. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-50, en donde el sitio de corte se encuentra dentro de una secuencia no codificante del locus de albúmina.

52. El método de la reivindicación 51, en donde el sitio de corte se encuentra dentro de un intrón, una región no traducida, un potenciador, un promotor, un silenciador o un aislante del locus de albúmina.

53. El método de la reivindicación 52, en donde el sitio de corte se encuentra dentro del intrón 12, 13 o 14 del locus de albúmina.

54. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 37-53, en donde la nucleasa se selecciona de una enzima Cas, una TALEN, una nicasa TALE, una ZFN, una nicasa de ZF o una meganucleasa.

55. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-54, en donde la nucleasa es una enzima Cas o una TALEN.

56. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-55, en donde la nucleasa es una enzima Cas.

57. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-56, en donde la enzima Cas se selecciona de Cas9 de *Staphylococcus aureus* (saCas9), *Streptococcus pyogenes* (spCas9), Nucleasa de AZ, HF1-Cas9, HF2-Cas9 o HiFi-Cas9.

58. El método de la reivindicación 56 o 57, que comprende además un ARN guía (ARNg).

59. El método de la reivindicación 58, en donde el ARNg comprende una secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-45, 71-86 o 93-98, o una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-45, 71-86 o 93-98.

60. El método de la reivindicación 58 o 59, en donde la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa y el ARNg se formulan conjuntamente.

61. El método de la reivindicación 58 o 59, en donde la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa y el ARNg se formulan por separado.

62. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-61, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico es o comprende:

- a) una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido 2A;
- b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES);
- c) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de corte y empalme aminoterminal de inteína y una región de corte y empalme carboxiterminal de inteína; o
- d) una secuencia de ácido nucleico que codifica un donante de corte y empalme y un aceptor de corte y empalme.

63. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-62, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico es o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido 2A.

64. El método de la reivindicación 63, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico es o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido 2A seleccionado del grupo que consiste en P2A, T2A, E2A y F2A.

65. El método de la reivindicación 35 o 37, en donde el sitio de corte se encuentra a una distancia de entre 1 y 1000 pb del sitio de integración diana.

66. El método de la reivindicación 65, en donde el sitio de corte se encuentra a una distancia de hasta 100 pb del sitio de integración diana.

67. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-66, en donde el transgén se selecciona de CBS, UGT1A1, MUT, FAH, ATP7B, A1AT, ASL, LIPA, PAH, G6PC, Factor IX, o una variante de los mismos.

68. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-67, que es un conjunto de composiciones, en donde la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa se formula en una nanopartícula lipídica y el casete polinucleotídico se encapsida en un vector de AAV recombinante.

69. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-68, en donde la célula se edita *in vivo*.

70. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-69, en donde el método de integración de un transgén se lleva a cabo *ex vivo*.

71. El método de la reivindicación 69 o 70, en donde la célula es una célula sanguínea, hepática, muscular o del SNC.

72. El método de la reivindicación 70, en donde la célula se administra en un trasplante autólogo después de la integración del transgén.

73. El método de la reivindicación 70, en donde la célula se administra en un trasplante alogénico después de la integración del transgén.

74. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-73, en donde (i) la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa y (ii) el casete polinucleotídico se administran al sujeto el mismo día.

75. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-73, en donde (i) la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa y (ii) el casete polinucleotídico se administran al sujeto en días diferentes.

76. El método de la reivindicación 75, en donde la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa se administra al sujeto entre 1 hora y 3 días después del casete polinucleotídico.

77. El método de la reivindicación 76, en donde la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa se administra al sujeto entre 1 hora y 24 horas después del casete polinucleotídico.

78. El método de la reivindicación 75, en donde la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa se administra al sujeto entre 1 hora y 3 días antes del casete polinucleotídico.

79. El método de la reivindicación 76, en donde la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa se administra al sujeto entre 1 hora y 4 horas antes del casete polinucleotídico.

80. El método de la reivindicación 79, en donde la nucleasa o la secuencia de polinucleótidos que codifica la nucleasa se administra al sujeto 4 horas antes que el casete polinucleotídico.

81. La composición o el conjunto de composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-34, en donde el sitio de corte es distal con respecto al sitio de integración diana.

82. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35-80, en donde el sitio de corte es distal con respecto al sitio de integración diana.