(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 835 861**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA TRAS OPOSICIÓN T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2016 PCT/US2016/031224**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16182917**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2016 E 16793259 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **18.09.2024 EP 3294873**

(54) Título: **Direccionamiento de regiones funcionales del potenciador de BCL11A para la reinducción de hemoglobina fetal**

(30) Prioridad:

08.05.2015 US 201562158882 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
18.02.2025

(73) Titular/es:

THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION (33.33%)
55 Shattuck Street
Boston, Massachusetts 02115, US;
THE BROAD INSTITUTE, INC. (33.33%) y
MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY (33.33%)

(72) Inventor/es:

BAUER, DANIEL E.;
ORKIN, STUART H.;
SANJANA, NEVILLE;
SHALEM, OPHIR y
ZHANG, FENG

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

DESCRIPCIÓN

Direccionamiento de regiones funcionales del potenciador de BCL11A para la reinducción de hemoglobina fetal

Antecedentes

La hemoglobina adulta normal comprende cuatro proteínas de globina, dos de las cuales son proteínas alfa (α) y dos de las cuales son proteínas beta (β). Durante el desarrollo fetal de los mamíferos, particularmente en seres humanos, el feto produce hemoglobina fetal, que comprende dos proteínas gamma (γ)-globina en lugar de las dos proteínas β-globina. Durante el período neonatal, ocurre un cambio de globina, conocido como el "cambio fetal", momento en el cual, los precursores de eritroides pasan de producir predominantemente γ-globina a producir predominantemente β-globina. El cambio en el desarrollo de la producción de hemoglobina predominantemente fetal o HbF ($\alpha_2\gamma_2$) a la producción de hemoglobina adulta o HbA ($\alpha_2\beta_2$) comienza alrededor de las 28 a 34 semanas de gestación y continúa poco después del nacimiento hasta que la HbA se vuelve predominante. Este cambio se debe principalmente a la disminución de la transcripción de los genes de la gamma-globina y al aumento de la transcripción de genes de la beta-globina. De media, la sangre de un adulto normal contiene menos de un 1 % de HbF, aunque los niveles residuales de HbF tienen una variación de más de 20 veces en adultos sanos y están controlados genéticamente.

Las hemoglobinopatías abarcan una serie de anemias de origen genético en las que hay una producción disminuida y/o una destrucción aumentada (hemólisis) de glóbulos rojos (RBC, por sus siglas en inglés). Estas también incluyen defectos genéticos que dan como resultado la producción de hemoglobinas anormales con un deterioro simultáneo de la capacidad para mantener la concentración de oxígeno. Algunos de estos trastornos implican la imposibilidad de producir β-globina normal en cantidades suficientes, mientras que otros implican la imposibilidad de producir completamente la β-globina normal. Estos trastornos asociados con la proteína β-globina se denominan generalmente hemoglobinopatías β. Por ejemplo, las talasemias β son el resultado de un defecto parcial o completo en la expresión del gen de la β-globina, que conduce a una HbA deficiente o ausente. La anemia de células falciformes es el resultado de una mutación puntual en el gen estructural de la β-globina, que conduce a la producción de una hemoglobina anormal (falciforme) (HbS). La HbS es propensa a la polimerización, particularmente en condiciones desoxigenadas. Los glóbulos rojos con HbS son más frágiles que los glóbulos rojos normales y se someten a hemólisis más fácilmente, conduciendo eventualmente a anemia.

Recientemente, la búsqueda de un tratamiento dirigido a la reducción del desequilibrio de la cadena de globina o predisposición a la polimerización de la hemoglobina en pacientes con hemoglobinopatías β se ha centrado en la manipulación farmacológica de la hemoglobina fetal (α2γ2; HbF). El potencial terapéutico de dichos enfoques está indicado por observaciones del fenotipo leve de individuos con herencia conjunta tanto de talasemia β homocigótica como de persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH, por sus siglas en inglés), así como por aquellos pacientes con talasemia β homocigótica que no sintetizan hemoglobina adulta, pero en quienes se observa una necesidad reducida de transfusiones en presencia de concentraciones aumentadas de hemoglobina fetal. Adicionalmente, se ha observado que determinadas poblaciones de pacientes adultos con anomalías de la cadena β tienen niveles de hemoglobina fetal (HbF) superiores a los normales y se ha observado que tienen un curso clínico más leve de enfermedad que los pacientes con niveles de HbF normales en adultos. Por ejemplo, un grupo de pacientes de Arabia Saudita con anemia de células falciformes que expresan un 20-30 % de HbF tiene sólo manifestaciones clínicas leves de la enfermedad. Ahora se acepta que trastornos de la hemoglobina, tales como la anemia de células falciformes y las talasemias β, se mejoran mediante el aumento de la producción de HbF.

El cambio de hemoglobina fetal a hemoglobina adulta (α2γ2; HbA) generalmente avanza dentro de los seis meses posteriores al parto. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con hemoglobinopatías β, los genes de globina γ cadena arriba están inalterados y completamente funcionales, de modo que si estos genes se reactivan, la síntesis funcional de hemoglobina podría mantenerse durante la edad adulta y, por lo tanto, mejorar la gravedad de la enfermedad. Desafortunadamente, los mecanismos moleculares *in vivo* que subyacen al cambio de globina no se comprenden bien.

La evidencia que respalda la viabilidad de la reactivación de la producción de hemoglobina fetal proviene de experimentos en los que se demostró que la sangre periférica, que contiene células clonogénicas, cuando se le administra la combinación apropiada de factores de crecimiento, produce colonias eritroides y estallidos en cultivo semisólido. Las células individuales en dichas colonias pueden acumular hemoglobina fetal (HbF), hemoglobina adulta (HbA) o una combinación de ambas. En cultivos de sangre adulta, los glóbulos rojos nucleados acumulan HbA (F-A+) solamente o una combinación de HbF y HbA (F+A+). De manera importante, las colonias individuales contienen células F+ y F-, lo que indica que ambos tipos son progenie de las mismas células madre circulantes. Por tanto, durante las primeras etapas de desarrollo en cultivo, las células ejecutan una opción, a través de mecanismos actualmente desconocidos, de expresar o no HbF. La proporción de células F+ adultas que se desarrollan en cultivo no parece estar programada previamente *in vivo*, pero parece depender de las condiciones de cultivo: Un cambio en la ruta de expresión combinada de HbF y HbA puede, por ejemplo, lograrse *in vitro* mediante altas concentraciones séricas, debido a la actividad de un compuesto no identificado que se puede absorber en carbón activado.

Recientemente se descubrió una región reguladora distal cadena arriba del gen BCL11A que puede regular la

expresión de la proteína BCL11A. La proteína BCL11A actúa como un regulador específico de etapa de la expresión de hemoglobina fetal mediante la represión de la inducción de γ-globina. Esta región reguladora distal cadena arriba se mapeó en el cromosoma 2 humano en la ubicación 60.716.189-60.728.612 en el ADN genómico humano de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19. Evidentemente, esta región reguladora distal cadena arriba contiene consecuentemente tres sitios de hipersensibilidad a la desoxirribonucleasa 1 (DHS, por sus siglas en inglés) +62, +58 y +55. La identificación de regiones funcionales específicas dentro de estas moléculas de ~ 12 kb que desempeñan un papel en el cambio de globina es importante para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que interfieren con la hemoglobina adulta e inducen la síntesis de hemoglobina fetal. Dichas regiones funcionales proporcionarían nuevas dianas para el desarrollo de procedimientos terapéuticos para una variedad de hemoglobinopatías en las que la reactivación de la síntesis de hemoglobina fetal mejoraría significativamente la intensidad y la morbilidad de enfermedades.

Sumario

La presente invención se refiere al vector, métodos, células aisladas modificadas por ingeniería genética y composiciones descritas en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención. Se entenderá que cualquier referencia en la descripción a "realizaciones" o "aspectos" se refiere únicamente a la presente invención si están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las células aisladas a las que se hace referencia en el presente documento no son células germinales humanas ni embriones humanos.

Las realizaciones descritas en el presente documento se basan en parte en el descubrimiento de regiones funcionales definidas dentro de la región del potenciador de BCL11A de -12 kb que regula la expresión de la proteína BCL11A. Estas regiones funcionales se mapean en los tres sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 (DHS) +62, +58 y +55 previamente identificados. Específicamente, las regiones funcionales se encuentran en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); y en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) del cromosoma 2 humano. La alteración de la edición del genoma en estas regiones se verificó funcionalmente para la expresión del ARNm de BCL11A, expresión de la proteína BCL11A y, en última instancia, para el enriquecimiento de la hemoglobina fetal (HbF) producida. Se diseñaron pequeñas secuencias de ARN guía único (ARNgu) para dirigirse a estas regiones funcionales utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 y la alteración dio como resultado al menos un enriquecimiento de HbF normalizado mayor que o igual de 0,259. En particular, el direccionamiento y la alteración de la región funcional +58 produjeron un sobreenriquecimiento de HbF mientras que el direccionamiento y la alteración de las regiones funcionales +55 o +62 produjeron enriquecimientos moderados de HbF. Por lo tanto, el direccionamiento a estas tres regiones funcionales +62, +58 y +55, solas o en combinación, utilizando tecnología CRISPR y ARNgu específicamente diseñado, puede proporcionar estrategias terapéuticas que interfieren con la hemoglobina adulta e inducen la síntesis de hemoglobina fetal.

En el presente documento se proporcionan moléculas de ácido nucleico que se dirigen a las tres regiones funcionales del potenciador de BCL11A, estas tres +62, +58 y +55, composiciones que comprenden las moléculas de ácido nucleico y métodos para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula mediante la alteración de la expresión de BCL11A a nivel genómico. También se proporcionan en el presente documento métodos y composiciones relacionados con el tratamiento de hemoglobinopatías mediante la reinducción de niveles de hemoglobina fetal. En particular, las moléculas de ácido nucleico se dirigen a las regiones funcionales del potenciador +62, +58 y/o +55.

En consecuencia, en una realización, se proporciona en el presente documento una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

En una realización, se proporciona en el presente documento una molécula de ácido nucleico que consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

En una realización, esta divulgación proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que es: (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62); en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

En una realización, esta divulgación proporciona un vector que consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es: (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62); en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

En algunas realizaciones, esta divulgación proporciona composiciones que comprenden las moléculas de ácido nucleico descritas *supra* y/o los vectores descritos *supra*. En una realización, las composiciones se utilizan en métodos *in vitro* para producir una célula genomodificada (por ejemplo, transfección con el ácido nucleico y/o vector descrito, o modificación genética descrita en el presente documento) de modo que la célula tenga ARNm o expresión proteica de BCL11A reducida o disminuida en comparación con una célula similar que no haya pasado el proceso de genomanipulación.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula, comprendiendo el método las etapas de: poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicha célula, o su progenie, con respecto a dicha célula antes de dicho contacto, y en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19. En una realización, el método es un método *in vitro* o *ex vivo*.

En una realización, esta divulgación proporciona una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de acuerdo con un método descrito en el presente documento. En una realización, la célula humana aislada modificada por ingeniería genética tiene ARNm o expresión proteica de BCL11A reducida o disminuida en comparación con una célula de control que no tiene ninguna modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para producir una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética que comprende poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), causando al menos una modificación genética en la misma, en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para producir una célula progenitora que tiene una expresión disminuida de ARNm o proteína de BCL11A, comprendiendo el método poner en contacto una célula progenitora aislada con una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para producir una célula progenitora que tiene una expresión disminuida de ARNm de BCL11A o proteína BCL11A, comprendiendo el método poner en contacto una célula progenitora aislada con un agente que se une a las regiones funcionales del potenciador de BCL11A humanas ubicadas en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y / o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), donde el agente se une a (a) la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688

(región funcional +55); (b) la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62); en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética aislada en dicho mamífero con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicho mamífero, con respecto a la expresión antes de dicho contacto, y en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método trasplantar una célula humana aislada modificada por ingeniería genética descrita en el presente documento o una composición descrita en el presente documento en el mamífero.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un uso de una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de acuerdo con un método descrito en el presente documento con el propósito de aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un uso de una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de acuerdo con un método descrito en el presente documento para el tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un uso de una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de acuerdo con un método descrito en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero de modo que aumentan los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero.

Otro aspecto descrito en el presente documento es una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de acuerdo con un método descrito en el presente documento. En una realización, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un uso de una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de acuerdo con un método descrito en el presente documento con el propósito de aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un uso de una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de acuerdo con un método descrito en el presente documento para el tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un uso de una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de acuerdo con un método descrito en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero de modo que aumentan los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero.

Otro aspecto descrito en el presente documento es una composición que comprende una molécula de ácido nucleico

descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de una célula humana en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma. En una realización, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un uso de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de una célula humana en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma con el propósito de aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un uso de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de una célula humana en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma para el tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un uso de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de una célula humana en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero de modo que aumentan los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612, para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o la expresión de BCL11A, en donde se reduce el ARNm o expresión proteica de BCL11A.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o la expresión de BCL11A, de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de una célula humana en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una enzima dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una enzima dirigida al ADN para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o la expresión de BCL11A, en donde la enzima dirigida al ADN produce al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de una célula humana en el cromosoma 2, afectando así al ARNm o expresión de BCL11A. En una realización, la al menos una modificación epigenética se encuentra en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55) y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62). En otra realización, el efecto de la modificación epigenética es reducir el ARNm o expresión proteica de BCL11A. En una realización, la al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 afecta indirecta o directamente a la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58)

y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) del cromosoma 2.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de cualquier célula aislada descrita en el presente documento para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero, en donde las células tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (funcional región +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) realizada mediante el proceso de poner en contacto las células con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) causando al menos una modificación genética en las mismas.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero, en donde las células tienen al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2. En una realización, la al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2 está en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19). En otra realización, al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2 se realiza mediante el proceso de poner en contacto las células con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una enzima dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una enzima dirigida al ADN de modo que la enzima dirigida al ADN produce al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 que afecta a la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o a la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o a la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) causando en la misma.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de cualquier célula aislada descrita en el presente documento o una cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento para la fabricación de un medicamento para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesite o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero.

Otro aspecto descrito en el presente documento es un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula, comprendiendo el método las etapas de: poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicha célula, o su progenie, en relación con la célula antes del contacto.

Otro aspecto descrito en el presente documento es un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesite, comprendiendo el método las etapas de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética aislada en dicho mamífero con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicho mamífero, en relación con la expresión antes de dicho contacto.

Otro aspecto descrito en el presente documento es un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesite, comprendiendo el método el trasplante de una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación

60718042 a 60718186 (región funcional +62) en el mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de proporcionar una población aislada de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero en *ex vivo,* y poner en contacto la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de aislar una población de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero y poner en contacto *ex vivo* la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar el aislamiento de una población de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero y (b) eliminar/añadir/sustituir el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de aislar una población de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero y eliminar *ex vivo* el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero que comprende las etapas de: (a) proporcionar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas o iPSC; (b) poner en contacto las células *ex vivo* o *in vitro* con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto; y (c) administrar las células de la etapa (b) al mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero que comprende las etapas de: (a) aislar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero; (b) poner en contacto las células *ex vivo* o *in vitro* con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto; y (c) administrar las células de la etapa (b) al mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero que comprende las etapas de: (a) proporcionar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas o iPSC; (b) eliminar *ex vivo* el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en

la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto; y (c) administrar las células de la etapa (b) al mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero que comprende las etapas de: (a) aislar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero; (b) eliminar *ex vivo* el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto; y (c) administrar las células de la etapa (b) al mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que comprende la introducción de una composición descrita en el presente documento que comprende células aisladas modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que comprende aumentar la expresión de hemoglobina fetal en el mamífero mediante el método descrito en el presente documento.

En una realización, esta divulgación proporciona una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico excluye las regiones funcionales del potenciador de BCL11A completas.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico excluye las SEQ. ID. NO: 136, 137 y/o 138 completas identificadas en la Tabla 8.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico es corta y es mayor o igual a 13 pares de bases (pb). En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es corta y es mayor o igual a 15 pb, es mayor o igual a 16 pb, es mayor o igual a 17 pb, es mayor o igual a 18 pb, es mayor o igual a 19 pb, es mayor o igual a 20 pb, es mayor o igual a 21 pb, es mayor o igual a 22 pb, es mayor o igual a 23 pb, es mayor o igual a 24 pb, es mayor o igual a 25 pb, es mayor o igual a 26 pb, es mayor o igual a 27 pb, o es mayor o igual a 28 pb.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico es de aproximadamente 13-30 pb. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de aproximadamente 13-20 pb, 13-21 pb, 13-22 pb, 13-23 pb, 13-24 pb, 13-25 pb, 13-26 pb, 13-27 pb, 13-28 pb, 13-29 pb, 14-20 pb, 14-21 pb, 14-22 pb, 14-23 pb, 14-24 pb, 14-25 pb, 14-26 pb, 14-27 pb, 14-28 pb, 14-29 pb, 15-20 pb, 15-21 pb, 15-22 pb, 15-23 pb, 15-24 pb, 15-25 pb, 15-26 pb, 15-27 pb, 15-28 pb, 15-29 pb, 16-20 pb, 16-21 pb, 16-22 pb, 16-23 pb, 16-24 pb, 16-25 pb, 16-26 pb, 16-27 pb, 16-28 pb, 16-29 pb, 17-20 pb, 17-21 pb, 17-22 pb, 17-23 pb, 17-24 pb, 17-25 pb, 17-26 pb, 17-27 pb, 17-28 pb, 17-29 pb, 18-20 pb, 18-21 pb, 18-22 pb, 18-23 pb, 18-24 pb, 18-25 pb, 18-26 pb, 18-27 pb, 18-28 pb, 18-29 pb, 19-21 pb, 19-22 pb, 19-23 pb, 19-24 pb, 19-25 pb, 19-26 pb, 19-27 pb, 19-28 pb, 19-29 pb, 20-22 pb, 20-23 pb, 20-24 pb, 20-25 pb, 20-26 pb, 20-27 pb, 20-28 pb, 20-29 pb, 21-23 pb, 21-24 pb, 21-25 pb, 21-26 pb, 21-27 pb, 21-28 pb, 21-29 pb, 22-24 pb, 22-25 pb, 22-26 pb, 22-27 pb, 22-28 pb, 22-29 pb, 23-25 pb, 23-26 pb, 23-27 pb, 23-28 pb, 23-29 pb, 24-26 pb, 24-27 pb, 24-28 pb, 24-29 pb, 25-27 pb, 25-28 pb, 25-29 pb, 26-28 pb, 26-29 pb, 27-29 pb, 14-30 pb, 15-30 pb, 16-30 pb, 17-30 pb, 18-30 pb, 19-30 pb, 20-30 pb, 21-30 pb, 22-30 pb, 23-30 pb, 24-30 pb, 25-30 pb, 26-30 pb, 27-30 pb o 28-30 pb.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico es de aproximadamente 20 pb. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de aproximadamente 13 pb, es de aproximadamente 14 pb, es de aproximadamente 15 pb, es de aproximadamente 16 pb, es de aproximadamente 17 pb, es de aproximadamente 18 pb, es de aproximadamente 19 pb, es de aproximadamente 20 pb, es de aproximadamente 21 pb, es de aproximadamente 22 pb, es de aproximadamente 23 pb, es de aproximadamente 24 pb, es de aproximadamente 25 pb, es de aproximadamente 26 pb, es de aproximadamente 27 pb, es de aproximadamente 28 pb, es de aproximadamente 29 pb, o es de aproximadamente 30 pb.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de

ácido nucleico consiste esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico comprende además una secuencia de ARN CRISPR transactivador (ARNcrtra).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico es un ARN guía único (ARNgu).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico comprende un vector.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, el vector es un vector vírico, tal como un vector lentivírico.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, el vector es un vector de expresión de ARNgu.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, el método comprende además poner en contacto la misma célula progenitora aislada con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la al menos una endonucleasa dirigida al ADN es una proteína Cas (asociada a CRISPR).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la proteína Cas es Cas9.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula progenitora aislada o célula aislada es una célula progenitora hematopoyética o una célula madre hematopoyética.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la progenitora hematopoyética es una célula del linaje eritroide.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula progenitora aislada o célula aislada es una célula madre pluripotente inducida.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula progenitora aislada o célula aislada se pone en contacto *ex vivo* o *in vitro.*

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula progenitora puesta en contacto o célula puesta en contacto adquiere al menos una modificación genética.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la al menos una modificación genética es una eliminación, inserción o sustitución de la secuencia de ácido nucleico.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la al menos una modificación genética se encuentra entre la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula progenitora puesta en contacto o célula puesta en contacto adquiere al menos una modificación epigenética en la región funcional potenciadora de BCL11A.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la al menos una modificación epigenética se selecciona del grupo que consiste en alteración de la metilación del ADN, modificación de la cola de histonas, composición de subunidades de histonas y posicionamiento de nucleosomas.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la al menos una

modificación epigenética se encuentra entre la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula aislada o población aislada de células es/son célula(s) humana(s).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula aislada o población aislada de células es/son célula(s) progenitora(s).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula humana es una célula progenitora hematopoyética.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula humana es una célula madre pluripotente inducida.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula madre pluripotente inducida es una célula progenitora hematopoyética.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la progenitora hematopoyética es una célula del linaje eritroide.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula progenitora hematopoyética o aislada se pone en contacto *ex vivo* o *in vitro* o *in vivo.*

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la al menos una modificación genética es una eliminación.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico consiste esencialmente en una o más de las secuencias descritas en la Tabla 7 o SEQ ID NO: 1-94.

En una realización adicional de cualquier método de tratamiento, el método comprende quimioterapia y/o radioterapia para eliminar o reducir las células progenitoras o madre hematopoyéticas endógenas en el mamífero.

En una realización de cualquier método, las células puestas en contacto que tienen al menos una modificación genética se pueden crioconservar y almacenar hasta que las células sean necesarias para la administración a un mamífero.

En una realización de cualquier método descrito, las células progenitoras o madre hematopoyéticas o células aisladas se pueden sustituir por una iPSC descrita en el presente documento.

En una realización de cualquier método descrito, las células progenitoras o madre hematopoyéticas o iPSC o células aisladas son autólogas del mamífero, lo que significa que las células proceden del mismo mamífero. En otra de las realizaciones del método descrito, las células progenitoras o madre hematopoyéticas o iPSC o células aisladas no son autólogas del mamífero, lo que significa que las células no proceden del mismo mamífero, sino de otro mamífero de la misma especie. Por ejemplo, el mamífero es un ser humano.

En una realización de cualquier método de tratamiento, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite una mayor expresión de hemoglobina fetal.

En una realización de cualquier método de tratamiento, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite tratamiento de una hemoglobinopatía.

En cualquier realización de cualquier método de tratamiento descrito, la hemoglobinopatía es α-hemoglobinopatía.

En cualquier realización de cualquier método de tratamiento descrito, la hemoglobinopatía es talasemia β.

En cualquier realización de cualquier método de tratamiento descrito, la hemoglobinopatía es anemia de células falciformes.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1E muestran el requisito de potenciador eritroide humano para expresión de *BCL11A* y represión de HbF.

La Figura 1A muestra una representación esquemática del locus *BCL11A* humano (transcripción de derecha a izquierda) con marcas de cromatina eritroide y haplotipo asociado a rasgos indicado.

La Figura 1B muestra los potenciadores clasificados en precursores eritroides adultos humanos primarios mediante

la intensidad de señal de H3K27ac, con superpotenciadores sombreados.

Las Figuras 1C-1E muestran que la eliminación del potenciador compuesto de *BCL11A* humano en células HUDEP-2 demuestra la necesidad del potenciador para expresión de *BCL11A* normalizada a GAPDH, represión del ARNm de γ-globina y represión de HbF. Las barras de error reflejan el error estándar de la media (EEM).

Las Figuras 2A-2H muestran los datos representativos de una selección CRISPR-Cas9 del potenciador de BCL11A agrupado en mosaico *in situ*. La Figura 2A es un diagrama esquemático del flujo de trabajo de la selección CRISPR-Cas9 del potenciador que muestra la síntesis, administración y análisis de la biblioteca.

La Figura 2B muestra la composición de la biblioteca de ARNgu mediante secuencias diana y restricción de PAM.

La Figura 2C muestra la distribución de ARNgu de PAM NGG mapeados a la posición de escisión genómica.

La Figura 2D muestra la distancia a la posición de escisión genómica adyacente para los ARNgu de PAM NGG.

La Figura 2E muestra la clasificación de HbF de células transducidas de la biblioteca.

La Figura 2F muestra el efecto de los ARNgu de control sobre el enriquecimiento de HbF. Las cajas demuestran los percentiles 25, mediana y 75 y valores mínimos y máximos de bigotes. **** $P < 0,0001$, ns: no significativo.

La Figura 2G muestra la representación de ARNgu en el grupo de plásmidos y células al final del experimento (izquierda), y en grupos de HbF alta y HbF baja (derecha), con líneas de puntos en $x = y$ y $x = 8y$.

La Figura 2H muestra los gráficos de cuantiles-cuantiles de las puntuaciones de enriquecimiento de ARNgu.

Las Figuras 3A-3I muestran el mapeo funcional del potenciador de *BCL11A* humano.

La Figura 3A muestra las puntuaciones de enriquecimiento de ARNgu de mapeo relativas a las posiciones de escisión genómica. ARNgu no dirigidos seudomapeados con un espaciado de 5 pb.

La Figura 3B muestra la correlación entre la puntuación de errores y de enriquecimiento.

Las Figuras 3C-3E muestra que la expresión de BCL11A se normalizó a GAPDH, expresión de globina de tipo β y fracción de HbF+ en células HUDEP-2 con eliminación o inversión de DHS individuales.

La Figura 3F muestra la correlación entre la puntuación de enriquecimiento de HbF de la selección de ARNgu agrupado y la fracción de HbF+ mediante la validación ordenada de ARNgu individuales en células HUDEP-2.

Las Figuras 3G-3I muestran la expresión de *BCL11A* normalizada a GAPDH, expresión de globina de tipo β y fracción de HbF+ en células HUDEP-2 de precursores eritroides humanos primarios transducidos con Cas9 y ARNgu individuales. Las barras de error representan el EEM. Un filtrado de la puntuación de enriquecimiento de ARNgu de direccionamiento de la biblioteca humana para un enriquecimiento > 0,259 y para ARNgu de NGG RC y NGG dio las 135 secuencias de direccionamiento que se muestran en la Tabla 7. Estos son el ARNgu que se dirige a las regiones funcionales +62, +58 y +55 en el potenciador de *BCL11A* así como un conjunto de ARNgu que se dirigen al exón 2 de *BCL11A*.

Las Figuras 4A-4C muestran los estados funcionales del potenciador inferidos en relación con las características genómicas. Segmentación del modelo oculto de Markov (HMM, por sus siglas en inglés) de estados funcionales del potenciador. Puntuaciones de enriquecimiento de HbF mostradas a lo largo de DHS +55, +58, +62 mediante líneas grises y círculos con una línea de gráfico curva que representa una puntuación de enriquecimiento suavizada. Secuenciación de desoxirribonucleasa I de eritroblastos humanos primarios[42]. Estimaciones PhyloP (escala de -4,5 a 4,88) y PhastCons (de 0 a 1) de conservación evolutiva entre 100 vertebrados.

Las Figuras 5A-5F muestran el requisito de secuencia funcional en el potenciador eritroide de *BCL11A* de ratón para cambio de hemoglobina *in vivo*.

La Figura 5A muestra el mapeo de las puntuaciones de enriquecimiento de ARNgu εy:mCherry a posiciones de escisión genómica. ARNgu no dirigidos seudomapeados con un espaciado de 5 pb.

La Figura 5B muestra la expresión de *BCL11A* en clones eritroides de ratón con eliminación o inversión de DHS individuales normalizadas a controles establecidos como 1.

La Figura 5C muestra la segmentación del HMM de estados funcionales activos en el ortólogo +62. Las puntuaciones de enriquecimiento se muestran como líneas grises y círculos; el gráfico de curva en el mismo es la puntuación de enriquecimiento suavizada. Secuenciación de desoxirribonucleasa I de precursores eritroides de hígado fetal de ratón[42]. Expresión de BCL11A determinada mediante RT-qPCR mostrada como una matriz cromática en 108 clones con eliminación de ortólogos hemicigóticos +62 enumerados de arriba a abajo mediante posición genómica del punto medio de eliminación. Estimaciones PhyloP (escala de -3,3 a 2,1) y PhastCons (de 0 a 1) de conservación evolutiva entre 30 vertebrados. La Figura 5D muestra la expresión de globina humana transgénica en hígados fetales eliminados de ratones E16.5 quiméricos β-YAC/+62. Las Figuras 5E-5F muestran la expresión de *BCL11A*, número de linfocitos B y expresión de globina tipo β humana transgénica en ratones con eliminación de β-YAC/+62. * $P < 0,05$ Las barras de error representan EEM.

Las Figuras 6A-6F muestran colectivamente los datos representativos de una selección CRISPR-Cas9 del potenciador de *BCL11A* agrupado en mosaico *in situ*. Distribución de ARNgu de PAM NAG mapeados a la posición de escisión genómica. Las líneas verticales representan sitios de escisión de ARNgu para ARNgu mapeados en hebras positivas y negativas. Distancia a la posición de escisión genómica adyacente para los ARNgu de PAM NAG. La secuenciación profunda de la biblioteca de plásmidos lentivíricos demostró que 1.337 de 1.338 ARNgu (99,9 %) se clonaron con éxito. La representación de ARNgu dentro de la biblioteca mostró una distribución relativamente estrecha, con una mediana de 718 y los percentiles del 10 % y el 90 % que varían desde 337 a 1.205 lecturas normalizadas como se indica mediante las líneas de puntos verticales. Distribución de HbF en células HUDEP-2 transducidas con Cas9 y ARNgu individuales, ya sean no dirigidos o dirigidos al exón 2 de BCL11A. Puntuaciones de enriquecimiento de ARNgu de NGG entre seis copias biológicas. Mapeo de puntuaciones de errores de ARNgu de ARNgu de NGG en relación con posiciones de escisión genómica y elementos repetidos. ARNgu no dirigidos seudomapeados con un espaciado de 5 pb.

Las Figuras 7A-7B muestran la validación de los ARNgu seleccionados identificados en la detección del

potenciador descrita.

La Figura 7A muestra la fracción de HbF+ en células HUDEP-2 transducidas en formato de matriz con 24 ARNgu de las 5 categorías de mapeo con puntuaciones de enriquecimiento que varían de la más alta a la más baja en la selección.

La Figura 7B muestra la expresión génica de la globina tipo β normalizada al gen de referencia (GAPDH) en precursores eritroides humanos primarios transducidos con Cas9 y ARNgu individuales. Diferenciación de eritroides de precursores de eritroides humanos primarios evaluados mediante marcadores de superficie CD71 y CD235a, frecuencia de desnucleación (CD235a+ Hoescht33342-) y morfología mediante tinción de May-Grünwald-Giemsa.

Las Figuras 8A-8B muestran la evaluación funcional de secuencias del potenciador.

La Figura 8A muestra la topología del modelo oculto de Markov (HMM) utilizado para inferir los tres estados funcionales del potenciador (activo, represivo y neutro) y basado en la emisión gaussiana de puntuaciones de enriquecimiento de ARNgu. Se permiten todas las posibles transiciones entre estados.

La Figura 8B muestra la distribución de frecuencia de indel a partir de células HUDEP-2 expuestas a Cas9 y ARNgu individuales, clasificados en grupos de HbF alta y baja, y sometidos a secuenciación profunda del sitio diana. Indel calculadas por nucleótido a lo largo de un amplicón que rodea los sitios de escisión del ARNgu-1617 y -1621 (líneas de puntos). Se calculó una relación de enriquecimiento de indel dividiendo las frecuencias de indel normalizadas en HbF alta por el conjunto de HbF baja.

Las Figuras 9A-9K muestran los datos representativos de una selección CRISPR-Cas9 del potenciador de BCL11A agrupado en mosaico *in situ*. La Figura 9A muestra una representación esquemática del locus *BCL11A* de ratón (transcripción de izquierda a derecha) con marcas de cromatina eritroide y regiones de homología de secuencia primaria con los DHS humanos mostrados.

La Figura 9B muestra los potenciadores clasificados en precursores eritroides de hígado fetal de ratón mediante intensidad de señal de H3K27ac, con superpotenciadores sombreados.

La Figura 9C muestra la expresión de mCherry tras la exposición a Cas9 y un ARNgu individual dirigido al exón 2 de Bell la en células informadoras MEL εy:mCherry.

La Figura 9D muestra una estrategia representativa para la inserción génica mediante reparación dirigida por homología de la proteína fluorescente mCherry en el locus *Hbb-y* de la globina embrionaria de ratón (que codifica la cadena de globina embrionaria εy).

La Figura 9E muestra la composición de la biblioteca de ARNgu por secuencia diana y restricción de PAM.

Las Figuras 9F-9G muestran la distribución de los ARNgu de PAM NGG (parte superior izquierda) y NAG (parte superior derecha) mapeados en la posición de escisión genómica. Las líneas verticales representan sitios de escisión de ARNgu para ARNgu mapeados en hebras positivas y negativas. Distancia a la posición de escisión genómica adyacente para los ARNgu de PAM NGG (parte inferior izquierda) y NAG (parte inferior derecha).

La Figura 9I muestra que la secuenciación profunda de la biblioteca de plásmidos lentivíricos demostró que 1.271 de 1.271 ARNgu (100 %) se clonaron con éxito. La representación de ARNgu dentro de la biblioteca mostró una distribución relativamente estrecha, con una mediana de 735 y los percentiles del 10 % y el 90 % que varían desde 393 a 1.240 lecturas normalizadas como se indica mediante las líneas de puntos verticales.

La Figura 9J muestra la variedad de εy:mCherry de células transducidas de biblioteca.

La Figura 9K muestra el enriquecimiento de ARNgu de control. Las cajas demuestran los percentiles 25, mediana y 75 y valores mínimos y máximos de bigotes. **** $P < 0,0001$.

Las Figuras 10A-10D muestran el análisis de selección del potenciador de *BCL11A*.

La Figura 10A muestra la representación de ARNgu en el grupo de plásmidos y las células al final del experimento (izquierda), y en los grupos εy:mCherry-alta y εy:mCherry-baja (derecha), con líneas de puntos en x = y y x = 8y.

La Figura 10B muestra los gráficos de cuantiles-cuantiles de las puntuaciones de enriquecimiento de ARNgu.

La Figura 10C muestra el mapeo de las puntuaciones de errores de ARNgu de ARNgu de NGG en relación con las posiciones de escisión genómica y elementos repetidos. ARNgu no dirigidos seudomapeados con un espaciado de 5 pb.

La Figura 10D muestra la correlación entre la puntuación de errores y de enriquecimiento.

Las Figuras 11A-11D muestran el requisito de potenciador de eritroides de *BCL11A* durante la ontogenia murina.

La Figura 11A muestra la expresión de *BCL11A* determinada mediante RT-qPCR en 108 clones con eliminación de ortólogos hemicigotos +62. El tamaño del efecto medio por nucleótido se calculó como el cambio de veces medio de la expresión de *BCL11A* de todos los clones en los que se eliminó ese nucleótido. El sombreado gris representa una desviación estándar.

La Figura 11B muestra el esquema para el análisis de la expresión del gen de la globina tipo β humana transgénica (β-YAC) durante el desarrollo en hígado fetal quimérico. El panel derecho muestra datos del hígado fetal quimérico de β-YAC de control que demuestra que la represión de γ-globina se produce por E16.5.

La Figura 11C muestra la progenie de entrecruzamientos con eliminación del ortólogo +62 de *BCL11A* heterocigoto en comparación con la proporción mendeliana esperada.

La Figura 11D muestra la expresión de *BCL11A* en relación con GAPDH en cerebro de ratón E16.5 de varios genotipos. Fracción de hígado fetal compuesta por linfocitos B progenitores en E16.5 de varios genotipos. Análisis de sangre periférica de ratones de 4 semanas de edad para examinar la frecuencia de varios linajes hematopoyéticos circulantes en ratones de tipo silvestre, heterocigotos y homocigotos con eliminación del ortólogo +62 de *BCL11A*.

La Figura 12 muestra que las células HUDEP-2 que expresan dCas9-KRAB más el ARNgu indicado se analizaron para determinar la expresión génica. BCL11A se representa en relación con GAPDH. HBG se representa en

relación con la globina de tipo beta total. Dos ARNgu diferentes dirigidos a +58 de *BCL11A* (BCL 01617 y BCL_01621) conducen a la represión transcripcional de BCL11A y desrepresión de HBG (gamma-globina). ND, control no dirigido.

Breve listado de tablas

Tabla 1. Secuencias de ARNgu.
Tabla 2. Cebadores oligonucleotídicos para selección de clones por eliminación.
Tabla 3. Cebadores oligonucleotídicos para selección de clones por inversión.
Tabla 4. Cebadores oligonucleotídicos para análisis de eliminación de +62 en ratón.
Tabla 5. Oligonucleótidos para RT-qPCR.
Tabla 6. Ubicación de la región potenciadora de BCL11A para direccionamiento para lograr atenuación de *BCL11A*.
Tabla 7. Secuencias de ARNgu que produjeron enriquecimiento de HbF superior a 0,259.
Tabla 8. Secuencias de las regiones funcionales +62, +58 y +55 del potenciador de *BCL11A*.
Tabla 9: Secuencias de ARNgu restringidas por NGA que produjeron un enriquecimiento de HbF superior a 0,259.

Descripción detallada

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento se refieren, en parte, al descubrimiento de regiones funcionales más definidas dentro de la región del potenciador de *BCL11A* de ~ 12 kb que regula la expresión de la proteína BCL11A. Las regiones funcionales son la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) en el cromosoma 2 humano de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19. La proteína BCL11A actúa como un regulador específico de etapa de la expresión de hemoglobina fetal mediante la represión de la inducción de γ-globina.

La alteración de la edición del genoma en estas regiones se verificó funcionalmente para la expresión del ARNm de *BCL11A*, expresión de la proteína BCL11A y, en última instancia, para el enriquecimiento de la hemoglobina fetal (HbF) producida. Se diseñaron pequeñas secuencias de RNA guía único (ARNgu) para dirigirse a estas regiones funcionales utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 para reducir la expresión de *BCL11A* y aumentar la expresión de HbF. Las secuencias de ARNgu que muestran alteraciones que son al menos un enriquecimiento de HbF normalizado mayor o igual a 0,259 se muestran en la Tabla 7 y se identifican como las SEQ ID NO: 1-94. La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención.

En particular, el direccionamiento y la alteración de la región funcional +58 produjeron un sobreenriquecimiento de HbF mientras que el direccionamiento y la alteración de las regiones funcionales +55 o +62 produjeron enriquecimientos moderados de HbF. Por lo tanto, el direccionamiento a estas tres regiones funcionales +62, +58 y +55, solas o en combinación, utilizando tecnología CRISPR y ARNgu específicamente diseñado, puede proporcionar estrategias terapéuticas que interfieren con la hemoglobina adulta e inducen la síntesis de hemoglobina fetal.

En el presente documento se proporcionan moléculas de ácido nucleico que se dirigen a las tres regiones funcionales del potenciador de *BCL11A*, estas tres +62, +58 y +55, composiciones que comprenden las moléculas de ácido nucleico y métodos para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula mediante la alteración de la expresión de *BCL11A* a nivel genómico. También se proporcionan en el presente documento métodos y composiciones relacionados con el tratamiento de hemoglobinopatías mediante la reinducción de niveles de hemoglobina fetal. En particular, las moléculas de ácido nucleico se dirigen a las regiones funcionales del potenciador +62, +58 y/o +55.

En consecuencia, los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento son métodos nuevos para la regulación de la expresión de γ-globina en células eritroides. Más específicamente, estas actividades pueden aprovecharse en métodos para el tratamiento de hemoglobinopatías β mediante la inducción de γ-globina mediante la inhibición del producto del gen BCL11A.

La divulgación descrita en el presente documento, en una realización, no se refiere a un proceso de clonación de seres humanos, procesos para modificar la identidad genética de la línea germinal de seres humanos, usos de embriones humanos con fines industriales o comerciales o procesos para modificar la identidad genética de animales que puedan causarles sufrimiento sin ningún beneficio médico sustancial para el ser humano o el animal, y también para animales resultantes de dichos procesos.

En consecuencia, en una realización, se proporciona en el presente documento una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome

Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

Adicionalmente, se diseñaron pequeñas secuencias de ARN guía único (ARNgu) para dirigirse al exón 2 que codifica *BCL11A* utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 que también mostró una alteración eficaz de la expresión de BCL11A. Las secuencias de ARNgu que muestran alteraciones que son al menos un enriquecimiento de HbF normalizado mayor o igual a 0,259 se muestran en la Tabla 7 y se identifican como las SEQ ID NO: 95-135.

En una realización, en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la hebra positiva o negativa del exón 2 de *BCL11A* humano, en donde la secuencia de ácido nucleico excluye la secuencia completa del exón 2 de *BCL11A* humano. En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende las SEQ ID NO: 94-135.

En una realización, en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico que consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la hebra positiva o negativa del exón 2 de *BCL11A* humano, en donde la secuencia de ácido nucleico excluye la secuencia completa del exón 2 de *BCL11A* humano. En una realización, la secuencia de ácido nucleico consiste esencialmente en las SEQ ID NO: 94-135.

En una realización, en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la hebra positiva o negativa del exón 2 de *BCL11A* humano, en donde la secuencia de ácido nucleico excluye la secuencia completa del exón 2 de *BCL11A* humano. En una realización, la secuencia de ácido nucleico consiste en las SEQ ID NO: 94-135.

En una realización, se proporciona en el presente documento una molécula de ácido nucleico que consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

En una realización, esta divulgación proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que es: (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62); en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

En una realización, esta divulgación proporciona un vector que consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es: (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62); en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

En una realización, esta divulgación proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la hebra positiva o negativa del exón 2 de *BCL11A* humano, en donde la secuencia de ácido nucleico excluye la secuencia completa del exón 2 de *BCL11A* humano.

Un aspecto descrito en el presente documento se refiere a un método para producir una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector que comprende la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) causando al menos una modificación genética en la misma.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula aislada, comprendiendo el método disminuir el ARNm o la expresión proteica de BCL11A en la célula. En un aspecto, la disminución del ARNm o expresión proteica de BCL11A se logra causando al menos una modificación genética en el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (ubicación +58 funcional región), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19). En otro aspecto, la disminución del ARNm o expresión proteica de BCL11A se logra causando al menos una modificación genética en el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (ubicación +58 funcional región), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) que da como resultado una modificación epigenética de la función genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62). En este aspecto, la actividad potenciadora de BCL11A ubicada dentro de esta ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) se reduce.

Al disminuir en este aspecto, la actividad potenciadora para mejorar la expresión de ARNm o proteína de BCL11A en la célula es al menos un 5 % menor, es al menos un 10 % menor, al menos un 20 % menor, al menos un 30 % menor, al menos un 40 % menor, al menos un 50 % menor, al menos un 60 % menor, al menos un 70 % menor, al menos un 80 % menor, al menos un 90 % menor, al menos 1 vez menor, al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor, o más en comparación con una célula de control que no se trata en ningún método divulgado en el presente documento. Por disminución del ARNm o expresión de proteínas de BCL11A en la célula significa que la expresión de proteínas es al menos un 5 % menor, es al menos un 10 % menor, al menos un 20 % menor, al menos un 30 % menor, al menos un 40 % menor, al menos un 50 % menor, al menos un 60 % menor, al menos un 70 % menor, al menos un 80 % menor, al menos un 90 % menor, al menos 1 vez menor, al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor, o más en comparación con una célula de control que no se trata en ningún método divulgado en el presente documento.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula aislada, comprendiendo el método proporcionar una célula humana aislada o una célula progenitora y disminuir el ARNm o la expresión proteica de BCL11A en la célula.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a un método *ex vivo* o *in vitro* para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula aislada, comprendiendo el método proporcionar una célula humana aislada o una célula progenitora y disminuir el ARNm o la expresión proteica de BCL11A en la célula.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a un método *ex vivo* o *in vitro* para producir una célula progenitora que tiene una expresión disminuida de ARNm o proteína de BCL11A, comprendiendo el método poner en contacto una célula progenitora aislada con una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612, reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a un método *ex vivo* o *in vitro* para producir una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética que comprende poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612, provocando al menos una modificación genética en la misma.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a un método *ex vivo* o *in vitro* para producir una célula progenitora que tiene una expresión disminuida de ARNm o proteína de BCL11A, comprendiendo el método poner en contacto una célula progenitora aislada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la

hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612, reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a un método *ex vivo* o *in vitro* para producir una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética que comprende poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612, provocando al menos una modificación genética en la misma.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a un método *ex vivo* o *in vitro* para producir una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética que comprende poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico descrito en el presente documento.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a un método *ex vivo* o *in vitro* para producir una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética que comprende poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de una composición que comprende un vector descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos *ex vivo* o *in vitro* descritos en el presente documento, la célula progenitora aislada o la célula aislada es una célula progenitora hematopoyética.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos *ex vivo* o *in vitro* descritos en el presente documento, la progenitora hematopoyética es una célula del linaje eritroide.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos *ex vivo* o *in vitro* descritos en el presente documento, la célula progenitora aislada o la célula aislada es una célula madre pluripotente inducida.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método disminuir el ARNm o la expresión de proteínas de BCL11A en una célula progenitora hematopoyética en el mamífero. En un aspecto, la disminución del ARNm o expresión proteica de BCL11A se logra causando al menos una modificación genética en el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (ubicación +58 funcional región), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19). En otro aspecto, la disminución del ARNm o de la expresión de proteínas de BCL11A se logra causando al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2. En otro aspecto, la disminución del ARNm o la expresión proteica de BCL11A se logra causando al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62).

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método trasplantar una célula humana modificada por ingeniería genética como se describe en el presente documento en el mamífero.

En una realización, se proporciona en el presente documento una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

En una realización, se proporciona en el presente documento una molécula de ácido nucleico que consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del

cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

En una realización, esta divulgación proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que es: (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62); en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

En una realización, esta divulgación proporciona un vector que consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que es: (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62); en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula, comprendiendo el método las etapas de: poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicha célula, o su progenie, con respecto a dicha célula antes de dicho contacto, y en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19.

En una realización, esta divulgación proporciona una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de acuerdo con un método descrito en el presente documento. En una realización, la célula humana aislada modificada por ingeniería genética tiene ARNm o expresión proteica de BCL11A reducida o disminuida en comparación con una célula de control que no tiene ninguna modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para producir una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética que comprende poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), causando al menos una modificación genética en la misma, en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para producir una célula progenitora que tiene una expresión disminuida de ARNm o proteína de BCL11A, comprendiendo el método poner en contacto una célula progenitora aislada con una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para producir una célula progenitora que tiene una expresión disminuida de ARNm de BCL11A o proteína BCL11A, comprendiendo el método poner en contacto una célula progenitora aislada con un agente que se une a las regiones funcionales del potenciador de BCL11A humanas ubicadas en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y / o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), donde el agente se une a (a) la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688

(región funcional +55); (b) la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62); en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética aislada en dicho mamífero con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicho mamífero, con respecto a la expresión antes de dicho contacto, y en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método trasplantar una célula humana aislada modificada por ingeniería genética descrita en el presente documento o una composición descrita en el presente documento en el mamífero.

Otro aspecto descrito en el presente documento es una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de acuerdo con un método descrito en el presente documento. En una realización, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto descrito en el presente documento es una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de una célula humana en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma. En una realización, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto descrito en el presente documento es un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula, comprendiendo el método las etapas de: poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicha célula, o su progenie, en relación con la célula antes del contacto.

Otro aspecto descrito en el presente documento es un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesite, comprendiendo el método las etapas de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética aislada en dicho mamífero con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicho mamífero, en relación con la expresión antes de dicho contacto.

Otro aspecto descrito en el presente documento es un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesite, comprendiendo el método el trasplante de una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) en el mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de proporcionar una población aislada de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero en *ex vivo,* y poner en contacto la

población de células madre o progenitoras hematopoyéticas con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de aislar una población de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero y poner en contacto *ex vivo* la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar el aislamiento de una población de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero y (b) eliminar/añadir/sustituir el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de aislar una población de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero y eliminar *ex vivo* el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero que comprende las etapas de: (a) proporcionar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas o iPSC; (b) poner en contacto las células *ex vivo* o *in vitro* con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto; y (c) administrar las células de la etapa (b) al mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero que comprende las etapas de: (a) aislar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero; (b) poner en contacto las células *ex vivo* o *in vitro* con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto; y (c) administrar la célula de la etapa (b) al mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero que comprende las etapas de: (a) proporcionar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas o iPSC; (b) eliminar *ex vivo* el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto; y (c) administrar las células de la etapa (b) al mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero

que comprende las etapas de: (a) aislar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero; (b) eliminar *ex vivo* el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto; y (c) administrar las células de la etapa (b) al mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que comprende introducir una composición descrita en el presente documento que comprende células aisladas modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que comprende aumentar la expresión de hemoglobina fetal en el mamífero mediante el método descrito en el presente documento.

En una realización, esta divulgación proporciona una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite aumentar los niveles de hemoglobina fetal en el mismo.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico excluye las regiones funcionales del potenciador de *BCL11A* completas.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico excluye las SEQ. ID. NO: 136, 137 y/o 138 completas identificadas en la Tabla 8.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico es corta y es mayor o igual a 13 pares de bases (pb). En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es corta y es mayor o igual a 15 pb, es mayor o igual a 16 pb, es mayor o igual a 17 pb, es mayor o igual a 18 pb, es mayor o igual a 19 pb, es mayor o igual a 20 pb, es mayor o igual a 21 pb, es mayor o igual a 22 pb, es mayor o igual a 23 pb, es mayor o igual a 24 pb, es mayor o igual a 25 pb, es mayor o igual a 26 pb, es mayor o igual a 27 pb, o es mayor o igual a 28 pb.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico es de aproximadamente 13-30 pb. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de aproximadamente 13-20 pb, 13-21 pb, 13-22 pb, 13-23 pb, 13-24 pb, 13-25 pb, 13-26 pb, 13-27 pb, 13-28 pb, 13-29 pb, 14-20 pb, 14-21 pb, 14-22 pb, 14-23 pb, 14-24 pb, 14-25 pb, 14-26 pb, 14-27 pb, 14-28 pb, 14-29 pb, 15-20 pb, 15-21 pb, 15-22 pb, 15-23 pb, 15-24 pb, 15-25 pb, 15-26 pb, 15-27 pb, 15-28 pb, 15-29 pb, 16-20 pb, 16-21 pb, 16-22 pb, 16-23 pb, 16-24 pb, 16-25 pb, 16-26 pb, 16-27 pb, 16-28 pb, 16-29 pb, 17-20 pb, 17-21 pb, 17-22 pb, 17-23 pb, 17-24 pb, 17-25 pb, 17-26 pb, 17-27 pb, 17-28 pb, 17-29 pb, 18-20 pb, 18-21 pb, 18-22 pb, 18-23 pb, 18-24 pb, 18-25 pb, 18-26 pb, 18-27 pb, 18-28 pb, 18-29 pb, 19-21 pb, 19-22 pb, 19-23 pb, 19-24 pb, 19-25 pb, 19-26 pb, 19-27 pb, 19-28 pb, 19-29 pb, 20-22 pb, 20-23 pb, 20-24 pb, 20-25 pb, 20-26 pb, 20-27 pb, 20-28 pb, 20-29 pb, 21-23 pb, 21-24 pb, 21-25 pb, 21-26 pb, 21-27 pb, 21-28 pb, 21-29 pb, 22-24 pb, 22-25 pb, 22-26 pb, 22-27 pb, 22-28 pb, 22-29 pb, 23-25 pb, 23-26 pb, 23-27 pb, 23-28 pb, 23-29 pb, 24-26 pb, 24-27 pb, 24-28 pb, 24-29 pb, 25-27 pb, 25-28 pb, 25-29 pb, 26-28 pb, 26-29 pb, 27-29 pb, 14-30 pb, 15-30 pb, 16-30 pb, 17-30 pb, 18-30 pb, 19-30 pb, 20-30 pb, 21-30 pb, 22-30 pb, 23-30 pb, 24-30 pb, 25-30 pb, 26-30 pb, 27-30 pb o 28-30 pb.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico es de aproximadamente 20 pb. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de aproximadamente 13 pb, es de aproximadamente 14 pb, es de aproximadamente 15 pb, es de aproximadamente 16 pb, es de aproximadamente 17 pb, es de aproximadamente 18 pb, es de aproximadamente 19 pb, es de aproximadamente 20 pb, es de aproximadamente 21 pb, es de aproximadamente 22 pb, es de aproximadamente 23 pb, es de aproximadamente 24 pb, es de aproximadamente 25 pb, es de aproximadamente 26 pb, es de aproximadamente 27 pb, es de aproximadamente 28 pb, es de aproximadamente 29 pb, o es de aproximadamente 30 pb.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico consiste esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico comprende además una secuencia de ARN CRISPR transactivador (ARNcrtra).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico es un ARN guía único (ARNgu).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico comprende un vector.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, el vector es un vector vírico, tal como un vector lentivírico.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, el vector es un vector de expresión de ARNgu.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, el método comprende además poner en contacto la misma célula progenitora aislada con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la al menos una endonucleasa dirigida al ADN es una proteína Cas (asociada a CRISPR).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la proteína Cas es Cas9.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, el método comprende además proporcionar una célula aislada o una célula progenitora aislada o una población aislada de células que pueden ser células progenitoras o células progenitoras hematopoyéticas.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula aislada es una célula progenitora aislada.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula progenitora aislada es una célula humana aislada.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula humana aislada es una célula progenitora hematopoyética o una célula madre hematopoyética. En otra realización, la célula humana aislada es una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora o una célula de la médula ósea.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, el método descrito en el presente documento comprende poner en contacto una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de la médula ósea, una célula madre hematopoyética, o una célula progenitora hematopoyética con una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento o una cantidad eficaz de al menos una molécula de ácido nucleico aislada descrita en el presente documento.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula hematopoyética es una célula del linaje eritroide. Los métodos para aislar células progenitoras hematopoyéticas son bien conocidos en la materia, por ejemplo, mediante purificación por citometría de flujo de células CD34+ o CD133+, microperlas conjugadas con anticuerpos contra CD34 o CD133, marcadores de células progenitoras hematopoyéticas. También hay disponibles kits comerciales, por ejemplo, kit de microperlas CD34 con tecnología MACS® humano y kit MultiSort CD34 humano y el kit de enriquecimiento de células progenitoras hematopoyéticas de ratón EasySep™ con tecnología STEMCELL™.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, las células madre hematopoyéticas, células progenitoras hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre somáticas o células progenitoras se obtienen de sangre periférica, sangre de cordón umbilical, vellosidades coriónicas, líquido amniótico, sangre de placenta o médula ósea.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula humana

es una célula madre pluripotente inducida (iPSC, por sus siglas en inglés).

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la puesta en contacto de cualquier célula descrita en el presente documento puede ser *ex vivo* o *in vitro* o *in vivo.*

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos o composiciones descritas en el presente documento, la célula progenitora aislada o la célula aislada es una célula progenitora hematopoyética.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos o composiciones descritas en el presente documento, la progenitora hematopoyética es una célula del linaje eritroide.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos o composiciones descritas en el presente documento, la célula progenitora aislada o la célula aislada es una célula madre pluripotente inducida.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la puesta en contacto de cualquier célula descrita en el presente documento comprende poner en contacto con un agente que se une al ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 y que produce una modificación epigenética en el genoma de la célula en el cromosoma 2, reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A. En una realización, la modificación epigenética está en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 afecta indirecta o directamente la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) del cromosoma 2.

Como se usa en el presente documento, "afecta indirectamente la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) del cromosoma 2" se refiere a los efectos a largo plazo de la modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) del cromosoma 2.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la puesta en contacto de cualquier célula descrita en el presente documento comprende poner en contacto con un agente que une el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19), y que produce una modificación epigenética en el cromosoma 2, reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la puesta en contacto de cualquier célula descrita en el presente documento comprende poner en contacto con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una enzima dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una enzima dirigida al ADN de modo que la enzima dirigida al ADN produce una modificación epigenética en el cromosoma 2, reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la puesta en contacto de cualquier célula descrita en el presente documento comprende poner en contacto con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una enzima dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una enzima dirigida al ADN de modo que la enzima dirigida al ADN produce una modificación epigenética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A. En un aspecto, la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula progenitora hematopoyética, la célula humana aislada, o la célula aislada se pone en contacto *ex vivo* o *in vitro.*

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la al menos una modificación genética es una eliminación. En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la al menos una modificación epigenética.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la eliminación comprende uno o más de los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 (DHS) +62, +58 y +55 como se describe en el presente documento en la sección de Ejemplos. En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la eliminación consiste esencialmente en uno o más de los sitios hipersensibles

a la desoxirribonucleasa 1 (DHS) +62, +58 y +55 como se describe en el presente documento en la sección de Ejemplos. En otra realización, la eliminación consiste en uno o más de los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 (DHS) +62, +58 y +55 como se describe en el presente documento en la sección de Ejemplos.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la modificación epigenética comprende o afecta a uno o más de los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 (DHS) +62, +58 y +55 como se describe en el presente documento en la sección de Ejemplos. Como se usa en el presente documento, la expresión "afecta a uno o más de los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1" significa que la función natural de estos sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 (DHS) +62, +58 y +55 se reducen, por ejemplo, el acceso a factores de transcripción o enzimas de degradación del ADN tales como desoxirribonucleasa I. En general, los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa I (DHS) son regiones de cromatina que son sensibles a la escisión mediante la enzima desoxirribonucleasa I. En estas regiones específicas del genoma, la cromatina ha perdido su estructura condensada, exponiendo el ADN y haciéndolo accesible. Esto aumenta la disponibilidad del ADN a la degradación mediante enzimas, como la desoxirribonucleasa I. Estas zonas de cromatina accesibles están relacionadas funcionalmente con la actividad transcripcional, ya que este estado remodelado es necesario para la unión de proteínas tales como factores de transcripción. En consecuencia, la modificación epigenética contemplada en el presente documento da como resultado un acceso reducido a las enzimas de degradación del ADN que es al menos un 5 % menor, es al menos un 10 % menor, al menos un 20 % menor, al menos un 30 % menor, al menos un 40 % menor, al menos un 50 % menor, al menos un 60 % menor, al menos un 70 % menor, al menos un 80 % menor, al menos un 90 % menor, al menos 1 vez menor, al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor, o más en comparación con una célula de control que no se trata en ningún método divulgado en el presente documento.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la modificación epigenética es de 60.716.189 a 60.728.612, de 60.716.189 a 60.723.870, de 60.722.992 a 60.728.612, de 60.717.236 a 60.719.036, de 60.722.006 a 60.723.058, de 60.724.917 a 60.726.282, de 60.616.396 a 60.618.032, de 60.623.536 a 60.624.989, de 60.626.565 a 60.628.177, de 60.717.236 a 60.719.036, de 60.721.212 a 60.722.958, de 60.724.780 a 60.726.471, de 60.739.075 a 60.740.154, de 60.748.003 a 60.749.009, de 60.826.438 a 60.827.601 o de 60.831.589 a 60.833.556.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la eliminación elimina la región completa entre la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), elimina una porción de la región que da como resultado una alteración de uno o más sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 (DHS). Como se usa en el presente documento, el término "alteración" se refiere a una disminución en la transcripción eritroide de BCL1 1A en una célula que comprende una alteración de uno o más sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 en al menos un 10 % (por ejemplo, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o incluso el 100 % (es decir, sin transcripción eritroide detectable)) en comparación con una célula que no tiene dicha alteración. En una realización, la alteración comprende la incapacidad de un sitio hipersensible a la desoxirribonucleasa 1 modificado para unirse a sus factores de transcripción nativos (por ejemplo, GATA1 y TALI).

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la modificación epigenética interfiere con el establecimiento y/o mantenimiento del distintivo epigenético en la región potenciadora en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19), lo que conduce a una expresión reducida de ARNm o proteína de BCL11A y aumenta la expresión de hemoglobina fetal en el mamífero.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la modificación epigenética que interfiere con el establecimiento y/o mantenimiento del distintivo epigenético en la región potenciadora en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) incluye, pero no se limita a, modificaciones epigenéticas que afectan la sensibilidad de la desoxirribonucleasa I, modificaciones epigenéticas que afectan a modificaciones de histonas, modificaciones epigenéticas que afectan a la unión de GATA1/TAL1 y modificaciones epigenéticas que afectan a la interacción promotora de largo alcance del promotor de BCL11A.

Por ejemplo, una modificación epigenética que interfiere con el establecimiento y/o mantenimiento del distintivo epigenético en la región potenciadora en la ubicación de las regiones funcionales del cromosoma 2 descritas incluyen, pero sin limitación, al menos una eliminación dentro de la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 de manera que la función general de esta región se ve afectada de modo que el ARNm y la expresión de BCL11A se reducen o disminuyen. Por ejemplo, la eliminación se encuentra en la ubicación de las regiones de sensibilidad a la desoxirribonucleasa I del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612, por ejemplo, +62, +58 y +55. La eliminación podría estar en +62 o +58 o +55 o una combinación de las mismas. Como ejemplos, en +62 y +58, +58 y +55, +62 y +55, o

en los tres +62, +58 y +55.

Como otro ejemplo, una modificación epigenética que interfiere con el establecimiento y/o mantenimiento del distintivo epigenético en la región potenciadora en la ubicación de las regiones funcionales del cromosoma 2 +55, +58 y +62 incluye, pero sin limitación, cambios en las modificaciones de histonas en el cromosoma 2 que no se encuentran en la ubicación de las regiones funcionales o cambios en las modificaciones de histonas en el cromosoma 2 en ubicaciones de las regiones funcionales, o modificaciones de histonas en el cromosoma 2 ni en la ubicación 60.716.189-60.728.612 ni en la ubicación 60.716.189-60.728.612 de manera que la función general de esta región se ve afectada de modo que el ARNm y la expresión de BCL11A se reducen o disminuyen.

En otra realización, una modificación epigenética que interfiere con el establecimiento y/o mantenimiento del distintivo epigenético en la región potenciadora en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 incluye, pero sin limitación, una inserción de al menos una secuencia represora específica genomodificada que cambia las características epigenéticas de elementos no codificantes en las regiones funcionales +55, +58 y +62 del cromosoma 2 y, por tanto, da como resultado una represión de la expresión del gen diana. La primera se centra específicamente en reprimir epigenéticamente potenciadores individuales. En otras palabras, la inserción de secuencias represoras específicas genomodificadas en el cromosoma 2 interferiría anticipadamente con la modificación epigenética en el potenciador eritroide de BCL11A que eventualmente conduce a una expresión reducida del gen BCL11A.

Se puede usar cualquier método conocido en la materia para producir la modificación epigenética contemplada. Por ejemplo, como se describe en Mendenhall E. M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 08 de septiembre de 2013 y en Maeder ML *et al.*, Nat Biotechnol. 09 de octubre de 2013.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la inserción de al menos una secuencia represora específica genomodificada en cualquier ubicación del cromosoma 2 da como resultado, pero sin limitación, regiones de sensibilidad a la desoxirribonucleasa I reducidas en la ubicación de las regiones funcionales +55, +58 y +62 del cromosoma 2; aumento de modificaciones de histonas en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 o en las regiones funcionales +55, +58 y +62; factores de transcripción reducidos que se unen a GATA1/TAL1 de la región potenciadora en las regiones funcionales +55, +58 y +62 del cromosoma 2; e interacción reducida o debilitada entre la ubicación de las regiones funcionales +55, +58 y +62 del cromosoma 2 con el promotor de BCL11A.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, los efectos generales de la inserción de al menos una secuencia represora específica genomodificada en cualquier ubicación del cromosoma 2 reducen o disminuyen el ARNm y la expresión de BCL11A.

En algunas realizaciones, como se usa en el contexto de ARNm y expresión de BCL11A, la interacción entre la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612, en las regiones funcionales +55, +58 y +62, o potenciador de BCL11A con el promotor de BCL11A, y factores de transcripción que se unen a GATA1/TAL1 de la región potenciadora, el término "reducido" o "disminuido" se refiere a al menos un 5 % menor, al menos un 10 % menor, al menos un 20 % menor, al menos un 30 % menor, al menos un 40 % menor, al menos un 50 % menor, al menos un 60 % menor, al menos un 70 % menor, al menos un 80 % menor, al menos un 90 % menor, al menos 1 vez menor, al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor, o más en comparación con la situación de control que es en ausencia de la inserción o modificación epigenética de secuencias genomodificadas divulgadas en el presente documento. Por disminución del ARNm o expresión de proteínas de BCL11A en la célula significa que la expresión de proteínas es al menos un 5 % menor, es al menos un 10 % menor, al menos un 20 % menor, al menos un 30 % menor, al menos un 40 % menor, al menos un 50 % menor, al menos un 60 % menor, al menos un 70 % menor, al menos un 80 % menor, al menos un 90 % menor, al menos 1 vez menor, al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor, o más en comparación con una célula de control que no tiene la inserción o modificación epigenética de secuencias modificadas divulgadas en el presente documento.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la inserción de al menos una secuencia represora específica genomodificada se produce dentro de las regiones de sensibilidad a la desoxirribonucleasa I de la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 o en las regiones funcionales +55, +58 y +62. La inserción puede ser en el extremo 5' de +62 o +58 o +55 o en el extremo 3' de +62 o +58 o +55, o entre +62 y +58, o entre +58 y +55, o entre +55 y +62.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la inserción de al menos una secuencia represora específica genomodificada cambia las regiones de sensibilidad a la desoxirribonucleasa I de las regiones funcionales del cromosoma 2 en las ubicaciones +55, +58 y +62.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, las modificaciones epigenéticas cambian las regiones de sensibilidad a la desoxirribonucleasa I de la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 o en las regiones funcionales +55, +58 y +62.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, las modificaciones epigenéticas cambian las modificaciones de histonas en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 o en las regiones funcionales +55, +58 y +62.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la inserción de al menos una secuencia represora específica genomodificada cambia las modificaciones de histonas en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 o en las regiones funcionales +55, +58 y +62.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, las modificaciones epigenéticas cambian la unión a GATA1/TAL1 de la región potenciadora en las regiones funcionales del cromosoma +55, +58 y +62, de manera que la función general de esta región se ve afectada de modo que el ARNm y la expresión de BCL11A se reducen o disminuyen. Por ejemplo, la unión de factores de transcripción a GATA1/TAL1.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la inserción de al menos una secuencia represora específica genomodificada se produce dentro de GATA1/TAL1 como se describe en el presente documento. La inserción puede estar en el extremo 5' o en el extremo 3' de GATA1 o TALl. La inserción puede estar entre GATA1 y TAL1. La inserción cambia la unión a GATA1/TAL1 de la región potenciadora en las regiones funcionales del cromosoma 2 +55, +58 y +62, de manera que la función general de esta región se ve afectada de modo que el ARNm y la expresión de BCL11A se reducen o disminuyen. Por ejemplo, la unión de factores de transcripción a GATA1/TAL1.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la modificación epigenética cambia la interacción entre el potenciador de BCL11A y el promotor de BCL11A. En una realización, la interacción se reduce o debilita de manera que la función general de esta región se ve afectada de modo que el ARNm y la expresión de BCL11A se reducen o disminuyen.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, las modificaciones epigenéticas cambian la interacción entre la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 y/o las regiones funcionales +55, +58 y +62 con el promotor de BCL11A. En una realización, la interacción se reduce o debilita de manera que la función general de esta región se ve afectada de modo que el ARNm y la expresión de BCL11A se reducen o disminuyen.

También se proporciona en el presente documento, en otro aspecto, una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) elaborada mediante el proceso de poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55) y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) o en el exón 2 de BCL11A provocando al menos una modificación genética en la misma.

En otro aspecto, es una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) para usar en el aumento de los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesite, en donde la al menos una modificación genética se realiza mediante el proceso de poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55) y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) o en el exón 2 de BCL11A provocando al menos una modificación genética en la misma.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula humana aislada modificada por ingeniería genética tiene al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2. En otro de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula humana aislada modificada por ingeniería genética tiene al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) o en el exón 2 de BCL11A.

En algunos aspectos de cualquiera de estas células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una modificación epigenética, las células se trasplantan a un mamífero para usar en el aumento de la hemoglobina fetal en el mamífero.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) o en el exón 2 de BCL11A se trasplanta a un mamífero para usar en el aumento de la hemoglobina fetal en el mamífero.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) o en el exón 2 de BCL11A se almacena para usar más tarde mediante crioconservación.

En algunos aspectos de cualquiera de esas células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una modificación epigenética, las células se almacenan para usar más tarde mediante crioconservación.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética en el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) o en el exón 2 de BCL11A se crioconserva, descongela y trasplanta en mamíferos para usar en el aumento de la hemoglobina fetal en el mamífero.

En algunos aspectos de cualquiera de esas células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una modificación epigenética, se crioconservan, descongelan y trasplantan en mamíferos para usar en el aumento de la hemoglobina fetal en el mamífero.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética, en donde las células tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (+55 región funcional), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (+58 región funcional), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (funcional región +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) realizada mediante el proceso de poner en contacto las células con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico o un vector que lleva la molécula de ácido nucleico, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) causando al menos una modificación genética en la misma.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética para usar en el aumento de los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesite, en donde las células tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (+55 región funcional), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (+58 región funcional), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (funcional región +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) realizada mediante el proceso de poner en contacto las células con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico o un vector que lleva la molécula de ácido nucleico, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) causando al menos una modificación genética en la misma.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética, en donde las células tienen al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2. En una realización, la al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2 está en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19). En otra realización, al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2 se realiza mediante el proceso de poner en contacto las células con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico o un vector que lleva la molécula de ácido nucleico, junto con al menos una enzima dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una enzima dirigida al ADN de modo que la enzima dirigida al ADN produce al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 que afecta la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) causando en la misma.

Otro aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética para usar en el aumento de los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesite, en donde las células tienen al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2. En una realización, la al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2 está en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la composición provoca un aumento en la expresión proteica o ARNm de hemoglobina fetal en la célula de contacto.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, las células de cualquier composición descrita son autólogas, del mamífero que es el receptor de las células en un procedimiento de trasplante, es decir, las células de la composición proceden o se recolectan del mamífero antes de cualquier modificación descrita.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, las células de cualquier composición descrita no son autólogas del mamífero que es el receptor de las células en un procedimiento de trasplante, es decir, las células de la composición no proceden ni se recolectan del mamífero antes de cualquier modificación descrita.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, las células de cualquier composición descrita son como mínimo el tipo HLA compatibles con los del mamífero que es el receptor de las células en un procedimiento de trasplante.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, las células de cualquier composición descrita son células progenitoras aisladas antes de cualquier modificación descrita.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, las células de cualquier composición descrita son células progenitoras hematopoyéticas aisladas antes de cualquier modificación descrita.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, las células de cualquier composición descrita son células madre pluripotentes inducidas aisladas antes de cualquier modificación descrita.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la eliminación comprende uno o más de los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 (DHS) +62, +58 y +55 como se describe en el presente documento en la sección de Ejemplos. En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la eliminación consiste esencialmente en uno o más de los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 (DHS) +62, +58 y +55 como se describe en el presente documento en la sección de Ejemplos. En otra realización, la eliminación consiste en uno o más de los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 (DHS) +62, +58 y +55 como se describe en el presente documento en la sección de Ejemplos. En una realización, como se usa en el presente documento, el término "porción" en el contexto de eliminación genómica es al menos de un 10 % a aproximadamente el 100 % de la región especificada. En otras realizaciones, la porción eliminada es al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o incluso el 100% de la región especificada.

En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la eliminación elimina la región completa entre la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) o elimina una porción de la región que da como resultado la alteración de uno o más sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 (DHS).

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite aumentar la hemoglobina fetal.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, al mamífero se le ha diagnosticado una hemoglobinopatía.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, el mamífero que necesita aumentar la hemoglobina fetal ha sido diagnosticado con una hemoglobinopatía.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la hemoglobinopatía es una hemoglobinopatía β.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la hemoglobinopatía es la anemia de células falciformes.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la hemoglobinopatía es talasemia β.

En una realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la célula puesta en contacto, célula humana, célula progenitora hematopoyética o su progenie se administra al mamífero.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de proporcionar una población aislada de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero en *ex vivo,* y poner en contacto la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto. En una realización adicional de este método, la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas puesta en contacto que tiene una expresión de hemoglobina fetal aumentada se crioconserva y almacena o reintroduce en el mamífero. En otra realización, la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas crioconservada que tiene una expresión de hemoglobina fetal aumentada se descongela y luego se reintroduce en el mamífero. En una realización adicional de este método, el método comprende quimioterapia y/o radioterapia para eliminar o reducir las células progenitoras o madre hematopoyéticas endógenas en el mamífero. En cualquiera de las realizaciones del método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas pueden sustituirse por una iPSC descrita en el presente documento.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de aislar una población de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero y poner en contacto *ex vivo* la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto. En una realización adicional de este método, la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas puesta en contacto *ex vivo* que tiene una expresión de hemoglobina fetal aumentada se crioconserva y almacena o reintroduce en el mamífero. En otra realización, la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas crioconservada que tiene una expresión de hemoglobina fetal aumentada se descongela y luego se reintroduce en el mamífero. En una realización adicional de este método, el método comprende quimioterapia y/o radioterapia para eliminar o reducir las células progenitoras o madre hematopoyéticas endógenas en el mamífero. En cualquiera de las realizaciones del método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas pueden sustituirse por una iPSC procedente del mamífero. En cualquier realización del método, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite una mayor expresión de hemoglobina fetal.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de proporcionar el aislamiento de una población de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero y eliminar el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicho mamífero, en relación con la expresión antes de dicho contacto. En una realización adicional de este método, la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas con ADN genómico eliminado y que tiene una expresión de hemoglobina fetal aumentada se crioconserva y almacena o reintroduce en el mamífero. En otra realización, la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas con ADN genómico eliminado y que tiene una expresión de hemoglobina fetal aumentada se descongela y luego se reintroduce en el mamífero. En una realización adicional de este método, el método comprende quimioterapia y/o radioterapia para eliminar o reducir las células progenitoras o madre hematopoyéticas endógenas en el mamífero. En cualquiera de las realizaciones del método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas pueden sustituirse por una iPSC descrita en el presente documento. En cualquiera de las realizaciones del método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas o iPSC son análogos al mamífero, lo que significa que las células proceden del mismo mamífero. En otra de las formas de realización del método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas o iPSC no son análogos al mamífero, lo que significa que las células no proceden del mismo mamífero, sino de otro mamífero de la misma

especie. Por ejemplo, el mamífero es un ser humano. En cualquier realización del método, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite una mayor expresión de hemoglobina fetal.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de aislar una población de células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero y eliminar *ex vivo* el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicho mamífero, en relación con la expresión antes de dicho contacto. En una realización adicional de este método, la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas con ADN genómico eliminado y que tiene una expresión de hemoglobina fetal aumentada se crioconserva y almacena o reintroduce en el mamífero. En otra realización, la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas crioconservada que tiene una expresión de hemoglobina fetal aumentada se descongela y luego se reintroduce en el mamífero. En una realización adicional de este método, el método comprende quimioterapia y/o radioterapia para eliminar o reducir las células progenitoras o madre hematopoyéticas endógenas en el mamífero. En cualquiera de las realizaciones del método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas pueden sustituirse por una iPSC procedente del mamífero. En cualquier realización del método, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite una mayor expresión de hemoglobina fetal.

En una realización de cualquier método descrito, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite una mayor expresión de hemoglobina fetal. Un mamífero ilustrativo que necesita una expresión de hemoglobina fetal aumentada es uno que ha sido diagnosticado con una hemoglobinopatía.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero que comprende las etapas de: (a) proporcionar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas o iPSC; (b) poner en contacto las células *ex vivo* o *in vitro* con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 provocando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicho mamífero, en relación con la expresión antes de dicho contacto; y (c) administrar las células de la etapa (b) al mamífero.

En una realización de cualquier método, las células después de la etapa (b) se pueden crioconservar hasta que se necesiten para la administración al mamífero. En una realización adicional de este método, el método comprende quimioterapia y/o radioterapia para eliminar o reducir las células progenitoras o madre hematopoyéticas endógenas en el mamífero. En cualquiera de las realizaciones del método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas o iPSC son autólogas del mamífero, lo que significa que las células proceden del mismo mamífero. En otra de las formas de realización del método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas o iPSC no son autólogas del mamífero, lo que significa que las células no proceden del mismo mamífero, sino de otro mamífero de la misma especie. Por ejemplo, el mamífero es un ser humano.

En una realización de cualquier método descrito, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite tratamiento de una hemoglobinopatía.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero que comprende las etapas de: (a) aislar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero; (b) poner en contacto las células *ex vivo* o *in vitro* con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes de dicho contacto; y (c) administrar las células de la etapa (b) al mamífero.

En una realización, las células después de la etapa (b) se pueden crioconservar hasta que se necesiten para la administración al mamífero. En cualquier realización del método, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite tratamiento de una hemoglobinopatía.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero que comprende las etapas celulares de: (a) proporcionar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas o iPSC; (b) eliminar *ex vivo* el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas,

de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicho mamífero, en relación con la expresión antes de dicho contacto; y (c) administrar las células de la etapa (b) al mamífero.

En una realización, las células después de la etapa (b) se pueden crioconservar hasta que se necesiten para la administración al mamífero. En una realización adicional de este método, el método comprende quimioterapia y/o radioterapia para eliminar o reducir las células progenitoras o madre hematopoyéticas endógenas en el mamífero. En cualquiera de las realizaciones del método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas o iPSC son análogos al mamífero, lo que significa que las células proceden del mismo mamífero. En otra de las realizaciones del método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas o iPSC no son análogos al mamífero, lo que significa que las células no proceden del mismo mamífero, sino de otro mamífero de la misma especie. Por ejemplo, el mamífero es un ser humano. En cualquier realización del método, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite tratamiento de una hemoglobinopatía.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero que comprende las etapas de: (a) aislar células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas del mamífero; (b) eliminar *ex vivo* el ADN genómico de las células en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) causando al menos una modificación genética en las mismas, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes de dicho contacto; y (c) administrar las células de la etapa (b) al mamífero.

En una realización, las células después de la etapa (b) se pueden crioconservar hasta que se necesiten para la administración al mamífero. En una realización adicional de este método, el método comprende quimioterapia y/o radioterapia para eliminar o reducir las células progenitoras o madre hematopoyéticas endógenas en el mamífero. En cualquier realización del método, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite tratamiento de una hemoglobinopatía.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que comprende la introducción de una composición descrita en el presente documento que comprende células aisladas modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero. En una realización adicional de este método, el método comprende quimioterapia y/o radioterapia para eliminar o reducir las células progenitoras o madre hematopoyéticas endógenas en el mamífero. En cualquier realización del método, el método comprende además seleccionar un mamífero que necesite tratamiento de una hemoglobinopatía.

En una realización, esta divulgación proporciona un método de tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que comprende aumentar la expresión de hemoglobina fetal en el mamífero mediante el método descrito en el presente documento.

En un aspecto de cualquier método, el método comprende además seleccionar un sujeto diagnosticado con una hemoglobinopatía o un sujeto con riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía.

En un aspecto de cualquier método, la hemoglobinopatía es la anemia de células falciformes (SCD, por sus siglas en inglés) o talasemia (THAL, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, talasemias β.

En un aspecto del método, el método comprende además administrar al sujeto una terapia que comprende oxígeno, hidroxiurea, ácido fólico o una transfusión de sangre.

En un aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona un método para tratar o reducir un riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto.

En cualquier realización de cualquier método de tratamiento descrito, la hemoglobinopatía es una hemoglobinopatía β.

En cualquier realización de cualquier método de tratamiento descrito, la hemoglobinopatía es talasemia β.

En cualquier realización de cualquier método de tratamiento descrito, la hemoglobinopatía es anemia de células falciformes.

En una realización de cualquier método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas o iPSC son autólogas del mamífero, lo que significa que las células proceden del mismo mamífero. En otra de las realizaciones de cualquier método descrito, las células madre o progenitoras hematopoyéticas o iPSC no son autólogas del mamífero, lo que significa que las células no proceden del mismo mamífero, sino de otro mamífero de la misma especie. Por ejemplo, el mamífero es un ser humano.

En una realización de cualquier método descrito, la puesta en contacto de cualquier célula descrita en el presente documento puede ser *ex vivo* o *in vitro* o *in vivo.*

En otra realización de cualquier método descrito, la puesta en contacto de cualquier célula descrita en el presente documento comprende poner en contacto con un agente que se une al ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 y producir una modificación epigenética en el genoma de la célula en el cromosoma 2, reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A. En una realización, la modificación epigenética está en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19).

En otra realización de cualquier método descrito, la puesta en contacto de cualquier célula descrita en el presente documento comprende poner en contacto con un agente que se une al ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19), y producir una modificación epigenética en el cromosoma 2, reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A.

En otra realización de cualquier método descrito, la puesta en contacto de cualquier célula descrita en el presente documento comprende poner en contacto con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una enzima dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una enzima dirigida al ADN de modo que la enzima dirigida al ADN produce una modificación epigenética en el cromosoma 2, reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A.

En otra realización de cualquier método descrito, la puesta en contacto de cualquier célula descrita en el presente documento comprende poner en contacto con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una enzima dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una enzima dirigida al ADN de modo que la enzima dirigida al ADN produce una modificación epigenética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) reduciendo así la expresión proteica o ARNm de BCL11A. En un aspecto, la expresión de hemoglobina fetal aumenta en el mamífero, en relación con la expresión antes del contacto.

En otra realización de cualquier método descrito, la célula progenitora hematopoyética, la célula humana aislada, o la célula aislada se pone en contacto *ex vivo* o *in vitro.*

En otra realización de cualquier método descrito, la al menos una modificación genética es una eliminación. En otra realización de este aspecto y todos los demás aspectos descritos en el presente documento, la al menos una modificación epigenética.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de un agente que se une al ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o la expresión de BCL11A, en donde se reduce el ARNm o expresión proteica de BCL11A. En una realización, el agente es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62).

En una realización, se proporciona en el presente documento un agente que se une al ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (Región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) para usar en un método para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o la expresión de BCL11A, en donde se reduce el ARNm o expresión proteica de BCL11A. En una realización, el agente es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62).

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de una cantidad eficaz de una composición que

comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento en un método para aumentar la hemoglobina fetal en una célula o en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o la expresión de BCL11A en una célula o en un mamífero. En un aspecto, el método comprende trasplantar las células con la al menos una modificación epigenética al mamífero, habiéndose puesto en contacto las células con la composición descrita que comprende un ácido nucleico descrito.

En una realización, se proporciona en el presente documento una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento que se utiliza en un método para aumentar la hemoglobina fetal en una célula o en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o expresión de BCL11A en una célula o en un mamífero. En un aspecto, el método comprende trasplantar las células con la al menos una modificación epigenética al mamífero, habiéndose puesto en contacto las células con la composición descrita que comprende un ácido nucleico descrito.

La molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62). En una realización, la composición comprende además al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o la expresión de BCL11A, en donde la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) provocando al menos una modificación genética en la misma. En un aspecto, el método comprende trasplantar las células con la al menos una modificación epigenética al mamífero, habiéndose puesto en contacto las células con la composición descrita que comprende un ácido nucleico descrito.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una enzima dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una enzima dirigida al ADN, siendo el uso en un método para aumentar la hemoglobina fetal en una célula o un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o la expresión de BCL11A en una célula o en un mamífero, en donde la enzima dirigida al ADN produce al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2, afectando así al ARNm o expresión de BCL11A. En una realización, la al menos una modificación epigenética se encuentra en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55) y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62). En otra realización, el efecto de la modificación epigenética es reducir el ARNm o expresión proteica de BCL11A. En un aspecto, el método comprende trasplantar las células con al menos una modificación epigenética al mamífero.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, siendo el uso en un método para aumentar la hemoglobina fetal en una célula o un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o la expresión de BCL11A en una célula o en un mamífero, en donde la enzima dirigida al ADN produce al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2, afectando así al ARNm o expresión de BCL11A.

En una realización, se proporciona en el presente documento una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, para usar en un método para aumentar la hemoglobina fetal en una célula o un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o expresión de BCL11A en una célula o en un mamífero, en donde la enzima dirigida al ADN produce al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2, afectando así al ARNm o expresión de BCL11A.

En una realización, se proporciona en el presente documento una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una enzima dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una enzima dirigida al ADN, para usar en un método para aumentar la hemoglobina fetal en una célula o un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero o para reducir el ARNm o expresión de BCL11A en una célula o en un mamífero, en donde la enzima dirigida al ADN produce al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2, afectando así al ARNm o expresión de BCL11A. En una realización, la al menos una modificación epigenética se encuentra en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55) y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62). En otra realización, el efecto de la modificación epigenética es reducir el ARNm o expresión proteica de BCL11A. En un aspecto, el método comprende trasplantar las células con al menos una modificación epigenética al mamífero.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de cualquier célula aislada descrita en el presente documento en un método para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero. En un aspecto, el método comprende el trasplante de las células genomodificadas aisladas descritas al mamífero.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de una composición que comprende células humanas aisladas genomodificadas para un método para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero, en donde las células tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (funcional región +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) realizada mediante el proceso de poner en contacto las células con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) provocando al menos una modificación genética en las mismas. En un aspecto, el método comprende trasplantar la composición descrita que comprende las células genomodificadas aisladas descritas en el mamífero.

En una realización, se proporciona en el presente documento una composición que comprende células humanas genomodificadas aisladas para un uso en un método de aumento de la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero, en donde las células tienen al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (funcional región +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) realizada mediante el proceso de poner en contacto las células con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) provocando al menos una modificación genética en las mismas. En un aspecto, el método comprende trasplantar la composición descrita que comprende las células genomodificadas aisladas descritas en el mamífero.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de una composición que comprende células humanas genomodificadas aisladas en un método para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero, en donde las células tienen al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2. En una realización, la al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2 está en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19). En otra realización, al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2 se realiza mediante el proceso de poner en contacto las células con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una enzima dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una enzima dirigida al ADN de modo que la enzima dirigida al ADN produce al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 que afecta a la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o a la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o a la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) causando en la misma. En un aspecto, el método comprende trasplantar la composición descrita de células genomodificadas aisladas al mamífero.

En una realización, se proporciona en el presente documento una composición que comprende células humanas genomodificadas aisladas que se utilizan en un método para aumentar la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero, en donde las células tienen al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2. En una realización, la al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2 está en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19). En otra realización, al menos una modificación epigenética en el cromosoma 2 se realiza mediante el proceso de poner en contacto las células con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento o un vector descrito en el presente documento, junto con al menos una enzima dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una enzima dirigida al ADN de modo que la enzima dirigida al ADN produce al menos una modificación epigenética en el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 que afecta a la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), y/o a la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o a la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62) (de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19) causando en la misma. En un aspecto, el método comprende trasplantar la composición descrita de células genomodificadas aisladas

al mamífero.

En una realización, se proporciona en el presente documento un uso de cualquier célula aislada descrita en el presente documento o una cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento para la fabricación de un medicamento para usar en el aumento de la hemoglobina fetal en un mamífero o para el tratamiento de una hemoglobinopatía en el mamífero.

En una realización de uso de la composición descrita en el presente documento, la composición provoca un aumento en la expresión proteica o ARNm de hemoglobina fetal en la célula de contacto.

En una realización de uso de la composición descrita en el presente documento, las células de cualquier composición descrita son autólogas, del mamífero que es el receptor de las células en un procedimiento de trasplante, es decir, las células de la composición proceden o se recolectan del mamífero antes de cualquier modificación descrita.

En una realización de uso de la composición descrita en el presente documento, las células de cualquier composición descrita no son autólogas del mamífero que es el receptor de las células en un procedimiento de trasplante, es decir, las células de la composición no proceden ni se recolectan del mamífero antes de cualquier modificación descrita.

En una realización de uso de la composición descrita en el presente documento, las células de cualquier composición descrita son como mínimo el tipo HLA compatibles con los del mamífero que es el receptor de las células en un procedimiento de trasplante.

En una realización de uso de la composición descrita en el presente documento, las células de cualquier composición descrita son células progenitoras aisladas antes de cualquier modificación descrita.

En una realización de uso de la composición descrita en el presente documento, las células de cualquier composición descrita son células progenitoras hematopoyéticas aisladas antes de cualquier modificación descrita.

En una realización de uso de la composición descrita en el presente documento, las células de cualquier composición descrita son células madre pluripotentes inducidas aisladas antes de cualquier modificación descrita.

En una realización de uso de la composición descrita en el presente documento, las células de cualquier composición descrita se crioconservan antes de su uso.

En una realización de uno cualquiera de los métodos descritos, el método se usa para tratar, prevenir o mejorar una hemoglobinopatía seleccionada del grupo que consiste en: enfermedad de la hemoglobina C, anemia de células falciformes de la hemoglobina (SCD), anemia de células falciformes, anemia hereditaria, talasemia, talasemia β, talasemia mayor, talasemia intermedia, talasemia α y enfermedad de la hemoglobina H.

En varias realizaciones de uno cualquiera de los métodos descritos, los vectores se administran mediante inyección directa a una célula, tejido u órgano de un sujeto que necesita terapia génica, *in vivo*. En varias otras realizaciones de uno cualquiera de los métodos descritos, las células se transducen *in vitro* o *ex vivo* con los vectores y, opcionalmente, se amplían *ex vivo*. Las células transducidas se administran luego a un sujeto que necesita terapia génica.

En una realización de uno cualquiera de los métodos descritos, el método comprende además seleccionar un sujeto que necesite la terapia génica descrita. Por ejemplo, un sujeto que presenta síntomas o citología de una hemoglobinopatía seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de la hemoglobina C, anemia de células falciformes de la hemoglobina (SCD), anemia de células falciformes, anemia hereditaria, talasemia, talasemia β, talasemia mayor, talasemia intermedia, talasemia α y enfermedad de la hemoglobina H. Alternativamente, el sujeto lleva una mutación genética que está asociada con una hemoglobinopatía, una mutación genética descrita en el presente documento. Por ejemplo, un sujeto diagnosticado con SCD con genotipo HbSS, talasemia HbS/β0, HbSD, o HbSO, y/o con HbF < 10 % mediante electroforesis.

En una realización, esta divulgación proporciona un método para proporcionar una célula transducida o genomanipulada/modificada genéticamente a un sujeto que comprende administrar, por ejemplo, por vía parenteral, una o más células transducidas con un vector contemplado en el presente documento al sujeto. En una realización, el vector es uno que lleva una o más de las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano 52 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612. En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94. En una realización, la molécula de ácido nucleico

consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94. En una realización, la molécula de ácido nucleico consiste esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94.

En una realización particular, se proporciona un método para prevenir, mejorar o tratar una hemoglobinopatía en un sujeto. El método comprende administrar una población de células que comprende células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas genomanipuladas/modificadas genéticamente transducidas con un vector contemplado en el presente documento. En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94. En una realización, la molécula de ácido nucleico consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94. En una realización, la molécula de ácido nucleico consiste esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94.

En realizaciones particulares de cualquier método descrito, una población de células genomanipuladas/modificadas genéticamente administradas a un sujeto comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas, proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos, eritroblastos ortocromáticos, eritrocitos policromáticos y eritrocitos (RBC), o cualquier combinación de los mismos, y cualquier proporción de los cuales puede ser modificada genéticamente mediante los vectores contemplados en el presente documento.

En algunas realizaciones de cualquier método descrito, la población de células genomanipuladas/modificadas genéticamente se puede expandir en cultivo *in vitro* o *ex vivo* antes de la implantación/injerto en un sujeto o antes de la crioconservación para su almacenamiento.

En algunas realizaciones de cualquier método descrito, la población de células genomanipuladas/modificadas genéticamente se puede expandir en cultivo *in vitro* o *ex vivo* después de la crioconservación antes de la implantación/injerto en un sujeto.

En algunas realizaciones de cualquier método descrito, la población de células genomanipuladas/modificadas genéticamente se puede diferenciar *in vitro* o *ex vivo* antes de la implantación en un sujeto.

Las células modificadas genéticamente pueden administrarse como parte de un trasplante de médula ósea o de sangre de cordón en un individuo que se ha sometido o no a una terapia ablativa de médula ósea. En una realización, las células modificadas genéticamente contempladas en el presente documento se administran en un trasplante de médula ósea a un individuo que se ha sometido a terapia de médula ósea quimioablativa o radioablativa.

En una realización de cualquier método descrito, se administra una dosis de células genéticamente modificadas a un sujeto por vía intravenosa. En una realización, se administran células hematopoyéticas modificadas genéticamente por vía intravenosa a un sujeto.

En realizaciones particulares, los pacientes reciben una dosis de células modificadas genéticamente, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, de aproximadamente 1×10^5 células/kg, aproximadamente 5×10^5 células/kg, aproximadamente 1×10^6 células/kg, aproximadamente 2×10^6 células/kg, aproximadamente 3×10^6 células/kg, aproximadamente 4×10^6 células/kg, aproximadamente 5×10^6 células/kg, aproximadamente 6×10^6 células/kg, aproximadamente 7×10^6 células/kg, aproximadamente 8×10^6 células/kg, aproximadamente 9×10^6 células/kg, aproximadamente 1×10^7 células/kg, aproximadamente 5×10^7 células/kg, aproximadamente 1×10^8 células/kg, o más en una sola dosis intravenosa. En determinadas realizaciones, los pacientes reciben una dosis de células modificadas genéticamente, por ejemplo, células madre hematopoyéticas descritas en el presente documento o células genomanipuladas descritas en el presente documento o su progenie, de al menos 1×10^5 células/kg, al menos 5×10^5 células/kg, al menos 1×10^6 células/kg, al menos 2×10^6 células/kg, al menos 3×10^6 células/kg, al menos 4×10^6 células/kg, al menos 5×10^6 células/kg, al menos 6×10^6 células/kg, al menos 7×10^6 células/kg, al menos 8×10^6 células/kg, al menos 9×10^6 células/kg, al menos 1×10^7 células/kg, al menos 5×10^7 células/kg, al menos 1×10^8 células/kg, o más en una sola dosis intravenosa.

En una realización adicional, los pacientes reciben una dosis de células modificadas genéticamente, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, de aproximadamente 1×10^5 células/kg a aproximadamente 1×10^8 células/kg, aproximadamente 1×10^6 células/kg a aproximadamente 1×10^8 células/kg, aproximadamente 1×10^6 células/kg a aproximadamente 9×10^6 células/kg, aproximadamente 2×10^6 células/kg a aproximadamente 8×10^6 células/kg, aproximadamente 2×10^6 células/kg a aproximadamente 8×10^6 células/kg, aproximadamente 2×10^6 células/kg a aproximadamente 5×10^6 células/kg, aproximadamente 3×10^6 células/kg a aproximadamente 5×10^6 células/kg, aproximadamente 3×10^6 células/kg a aproximadamente 4×10^8 células/kg, o cualquier dosis intermedia de células/kg.

En diversas realizaciones, los métodos proporcionan una terapia génica más sólida y segura que los métodos existentes y comprenden la administración de una población o dosis de células que comprenden aproximadamente un 5 % de células transducidas/modificadas genéticamente, aproximadamente un 10 % de células transducidas/modificadas genéticamente, aproximadamente un 15 % de células transducidas/modificadas genéticamente, aproximadamente un 20 % de células transducidas/modificadas genéticamente, aproximadamente un

25 % de células transducidas/modificadas genéticamente, aproximadamente un 30 % de células transducidas/modificadas genéticamente, aproximadamente un 35 % de células transducidas/modificadas genéticamente, aproximadamente un 40 % de células transducidas/modificadas genéticamente, aproximadamente un 45 % de células transducidas/modificadas genéticamente, o aproximadamente un 50 % de células transducidas/modificadas genéticamente, a un sujeto.

En una realización, la invención proporciona células genéticamente modificadas, tal como una célula madre, por ejemplo, célula madre hematopoyética, con la posibilidad de expandir o aumentar una población de células eritroides. En realizaciones particulares, se transducen células madre hematopoyéticas con un vector de la invención y se administran a un individuo que necesita terapia para una hemoglobinopatía. Las células madre hematopoyéticas son el origen de las células eritroides y, por tanto, son las preferidas. En una realización, el vector es uno que lleva una o más de las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es (a) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55); o (b) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58); o (c) complementaria a la hebra positiva o negativa del cromosoma 2 humano en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62), en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, y en donde la secuencia de ácido nucleico excluye el cromosoma 2 humano completo y también excluye la secuencia de ADN genómico completa en el cromosoma 2 humano desde la ubicación 60.716.189 a 60.728.612. En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94. En una realización, la molécula de ácido nucleico consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94. En una realización, la molécula de ácido nucleico consiste esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-94.

En una realización, las células modificadas genéticamente se transducen adicionalmente con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62).

En una realización, las células madre hematopoyéticas puestas en contacto descritas en el presente documento o las células modificadas genéticamente descritas en el presente documento o las células progenie descendientes de las mismas se implantan con prostaglandina E2 y/o N-acetil-L-cisteína (NAC) antioxidante para promover los injertos de las células respectivas.

En una realización adicional de cualquier método descrito en el presente documento, la célula madre hematopoyética o célula progenitora hematopoyética que se pone en contacto es de linaje eritroide.

En una realización de cualquier método descrito en el presente documento, la célula madre hematopoyética o célula progenitora hematopoyética se extrae de sangre periférica, sangre de cordón umbilical, vellosidades coriónicas, líquido amniótico, sangre de placenta o médula ósea.

En una realización adicional de cualquier método descrito en el presente documento, el sujeto receptor se trata con quimioterapia y/o radiación antes de la implantación de las células puestas en contacto o transfectadas (es decir, las células madre hematopoyéticas puestas en contacto descritas en el presente documento o las células modificadas genéticamente descritas en el presente documento o las células de la progenie de las mismas).

En una realización, la quimioterapia y/o radiación es para reducir las células madre endógenas para facilitar el injerto de las células implantadas.

En un aspecto de cualquier método, se tratan *ex vivo* las células madre hematopoyéticas puestas en contacto descritas en el presente documento o células modificadas genéticamente descritas en el presente documento o las células de la progenie de las mismas con prostaglandina E2 y/o N-acetil-L-cisteína (NAC) antioxidante para promover el injerto posterior en un sujeto receptor.

El análisis del injerto se realizó 4, 8 y 12 semanas después del trasplante en sangre periférica y médula ósea. Por ejemplo, recolectar una muestra de sangre de estos lugares y determinar la expresión de *BCL11A* mediante cualquier método conocido en la materia.

En un aspecto de uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el método comprende obtener una muestra o una población de células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de la médula ósea, células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas del sujeto.

En una realización de uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las células que se ponen en contacto con una molécula de ácido nucleico descritas en el presente documento, o un vector descrito en el presente documento, o una composición descrita en el presente documento que comprende una molécula de ácido

nucleico o un vector proceden de células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de la médula ósea, células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas.

En una realización, las células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de la médula ósea, células madre hematopoyéticas, células progenitoras hematopoyéticas se aíslan del sujeto hospedador, se transfectan, se cultivan (opcional) y se trasplantan de nuevo al mismo hospedador, es decir, un autotrasplante de células. En otra realización, las células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de la médula ósea, células madre hematopoyéticas, o células progenitoras hematopoyéticas, se aíslan de un donante que es de tipo HLA compatible con un hospedador (receptor) al que se le ha diagnosticado o está en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía. La compatibilidad de tipo de antígeno donante-receptor es bien conocida en la materia. Los tipos de HLA incluyen HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-D. Estos representan el número mínimo de antígenos de la superficie celular que tienen la compatibilidad necesaria para el trasplante. Es decir, las células transfectadas se trasplantan a un hospedador diferente, es decir, alogénico al sujeto anfitrión receptor. Las células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de la médula ósea, células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas del donante o del sujeto se pueden transfectar con un vector o ácido nucleico que comprende la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, las células transfectadas se expanden en cultivo y luego se trasplantan al sujeto hospedador. En una realización, las células trasplantadas se injertan en el sujeto hospedador. Las células transfectadas también se pueden crioconservar después de transfectarse y almacenarse, o crioconservar después de la expansión celular y almacenaje.

En un aspecto de cualquier método, la célula madre embrionaria, célula madre somática, célula progenitora, célula de la médula ósea, célula madre hematopoyética o la célula progenitora hematopoyética es autóloga o alogénica del sujeto.

Definiciones

Por conveniencia, determinados términos empleados en toda la solicitud (incluyendo la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas) se recopilan aquí. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente que se une al ADN genómico de la célula en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62)" se refiere a moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos u oligonucleótidos que pueden unirse a la ubicación dentro del ADN genómico (p. ej., ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62)) y reprimir el ARNm o la expresión proteica de BCL11A en una célula en al menos un 20 % en comparación con el nivel de ARNm o proteína de BCL11A en una célula no tratada con dicho agente. En una realización, el agente "interfiere con interacciones de BCL11A con los compañeros de unión a BCL11A", según se usa la expresión en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula pequeña" se refiere a un agente químico que incluye, pero sin limitación, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, aptámeros, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluyendo compuestos heteroorgánicos y organometálicos) que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

Un "ácido nucleico", como se describe en el presente documento, puede ser ARN o ADN, y puede ser monocatenario o bicatenario, y puede seleccionarse, por ejemplo, de un grupo que incluye: ácido nucleico que codifica una proteína de interés, oligonucleótidos, análogos de ácido nucleico, por ejemplo péptido-ácido nucleico (PNA, por sus siglas en inglés), PNA seudocomplementario (pc-PNA, por sus siglas en inglés), ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés), etc. Dichas secuencias de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas, por ejemplo, que actúan como represores transcripcionales, moléculas de sentido contrario, ribozimas, pequeñas secuencias de ácido nucleico inhibidoras, por ejemplo, pero sin limitación, iARN, iARNhc, ARNip, micro iARN (iARNm), oligonucleótidos antisentido, etc.

Por "interfiere con interacciones de BCL11A con los compañeros de unión a BCL11A" se entiende que la cantidad de interacción de BCL11A con el compañero de unión a BCL11A es al menos un 5 % menor en poblaciones tratadas con un inhibidor de BCL11A, que una población de control comparable, en donde no está presente ningún inhibidor de BCL11A. Se prefiere que la cantidad de interacción de BCL11A con el compañero de unión a BCL11A en una población tratada con inhibidor de BCL1 1A sea al menos un 10 % menor, al menos un 20 % menor, al menos un 30 % menor, al menos un 40 % menor, al menos un 50 % menor, al menos un 60 % menor, al menos un 70 % menor, al menos un 80 % menor, al menos un 90 % menor, al menos 1 vez menor, al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al

menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor, o más que una población tratada de control comparable en la que no se añade inhibidor de BCL11A. Como mínimo, la interacción de BCL11A se puede ensayar mediante la determinación de la cantidad de BCL11A que se une a la pareja de unión a BCL11A utilizando técnicas estándar en la materia, incluyendo, pero sin limitación, espectrometría de masas, inmunoprecipitación o ensayos de filtración en gel. Como alternativa, o además, la actividad de BCL11A puede ensayarse mediante la medición de la expresión de hemoglobina fetal a nivel de ARNm o proteína después del tratamiento con un inhibidor de BCL11A candidato.

En una realización, la actividad de BCL11A es la interacción de BCL11A con sus compañeros de unión: GATA-1, FOG-1, componentes del complejo NuRD, matrin-3, MTA2 y RBBP7. En consecuencia, cualquier anticuerpo o fragmento del mismo, molécula pequeña, sustancia química o compuesto que puede bloquear esta interacción se considera un inhibidor de la actividad de BCL11A.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula genomodificada" se refiere a una célula que comprende al menos una modificación genética, según se usa esta expresión en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "modificación genética" se refiere a una alteración a nivel genómico que da como resultado una disminución en la expresión o actividad de BCL11A en una célula. Modificaciones genéticas ilustrativas pueden incluir eliminaciones, mutaciones de desplazamiento del marco, mutaciones puntuales, eliminación de exón, eliminación de uno o más sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa 1 (DHS) (por ejemplo, 2, 3, 4 o más regiones DHS), etc.

Por "inhibe la expresión de BCL11A" se quiere decir que la cantidad de expresión de BCL11A es al menos un 5 % menor en una célula o población celular tratada con una endonucleasa dirigida al ADN, que una célula o población celular de control comparable, en donde no está presente ninguna endonucleasa dirigida al ADN. Se prefiere que el porcentaje de expresión de BCL11A en una población tratada sea al menos un 10 % menor, al menos un 20 % menor, al menos un 30 % menor, al menos un 40 % menor, al menos un 50 % menor, al menos un 60 % menor, al menos un 70 % menor, al menos un 80 % menor, al menos un 90 % menor, al menos 1 vez menor, al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor, o más que una población tratada de control comparable en la que no se añade ninguna endonucleasa dirigida al ADN.

Por "inhibe la actividad de BCL11A" se entiende que la cantidad de actividad funcional de BCL11A es al menos un 5 % menor en una célula o población de células tratada con los métodos descritos en el presente documento, que una célula o población de control comparable, en donde no está presente ninguna endonucleasa dirigida al ADN. Se prefiere que el porcentaje de actividad de BCL11A en una población tratada con inhibidor de BCL1 1A sea al menos un 10 % menor, al menos un 20 % menor, al menos un 30 % menor, al menos un 40 % menor, al menos un 50 % menor, al menos un 60 % menor, al menos un 70 % menor, al menos un 80 % menor, al menos un 90 % menor, al menos 1 vez menor, al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor, o más que una población tratada de control comparable en la que no se añade ninguna endonucleasa dirigida al ADN. Como mínimo, la actividad de BCL11A se puede analizar mediante la determinación de la cantidad de expresión de BCL11A en los niveles de proteína o ARNm, utilizando técnicas estándar en la materia. Como alternativa, o además, la actividad de BCL11A se puede determinar utilizando una construcción informadora, en donde la construcción informadora es sensible a la actividad de BCL11A. La secuencia del locus de γ-globina es reconocible por el motivo de unión al ácido nucleico de la construcción de BCL11A.

En una realización, como se usa en el presente documento, la expresión "endonucleasa dirigida al ADN" se refiere a una endonucleasa que genera una rotura bicatenaria en una posición deseada en el genoma (por ejemplo, ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612) sin producir roturas bicatenarias no deseadas fuera de la diana. La endonucleasa dirigida al ADN puede ser una endonucleasa de origen natural (por ejemplo, una meganucleasa bacteriana) o puede generarse artificialmente (por ejemplo, meganucleasas genomodificadas, TALEN, o ZFN, entre otros).

En otra realización, como se usa en el presente documento, la expresión "endonucleasa dirigida al ADN" se refiere a una endonucleasa que genera una rotura monocatenaria o una "muesca" o rotura en una hebra de la cadena principal de azúcar fosfato del ADN en una posición deseada en el genoma (por ejemplo, ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55), en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), y/o en la ubicación 60718042 a 60718186 (región funcional +62)) sin producir roturas no deseadas de la cadena de ADN fuera de la diana.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ácido nucleico. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde se pueden ligar segmentos de ácido nucleico adicionales al genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y, de este modo, se replican junto con el genoma del hospedador. Por

otra parte, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se citan en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" o más simplemente "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectuosos para la replicación, lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados), que tienen funciones equivalentes.

Dentro de un vector de expresión, "operativamente unido" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés se une al (a las) secuencia(s) regulador(as) de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula diana cuando se introduce el vector en la célula diana). La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solamente en determinadas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Adicionalmente, la endonucleasa dirigida al ADN puede administrarse mediante un vector que comprende una secuencia reguladora para dirigir la síntesis de la endonucleasa dirigida al ADN a intervalos específicos o durante un período de tiempo específico. Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula diana, del nivel de expresión deseado, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "escinde" se refiere generalmente a la generación de una ruptura bicatenaria en el genoma del ADN en una ubicación deseada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una endonucleasa dirigida al ADN" se refiere a una cantidad de endonucleasa dirigida al ADN que produce suficiente actividad endonucleasa para generar una rotura bicatenaria en la ubicación deseada del genoma. En una realización, la cantidad eficaz de una endonucleasa dirigida al ADN genera una rotura bicatenaria en el locus genético deseado en al menos un 20 % de las células en una población puesta en contacto con la composición (por ejemplo, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, o incluso el 100 % de las células en la población comprenden una modificación genética producida por la composición de endonucleasa dirigida al ADN).

Como se usa en el presente documento, la expresión "aumentar los niveles de hemoglobina fetal" en una célula indica que la hemoglobina fetal es al menos un 5 % mayor en poblaciones tratadas con un agente que altera la expresión de ARNm o proteína de BCL11A (por ejemplo, una endonucleasa dirigida al ADN) mediante la unión al ADN genómico en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612, que en una población de control comparable, en donde no está presente el agente. Se prefiere que el porcentaje de expresión de hemoglobina fetal en una población tratada con dicho agente que se une al ADN genómico en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612 sea al menos un 10 % mayor, al menos un 20 % mayor, al menos un 30 % mayor, al menos un 40 % mayor, al menos un 50 % mayor, al menos un 60 % mayor, al menos un 70 % mayor, al menos un 80 % mayor, al menos un 90 % mayor, al menos 1 vez mayor, al menos 2 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 100 veces mayor, al menos 1000 veces mayor, o más que una población de control tratada de tamaño y condiciones de cultivo comparables. La expresión "población de control tratada" se usa en el presente documento para describir una población de células que se ha tratado con medios, inducción vírica, secuencias de ácido nucleico, temperatura, confluencia, tamaño del matraz, pH, etc. idénticos, con la excepción de la adición del agente que se une al ADN genómico en la ubicación del cromosoma 2 60.716.189-60.728.612. En una realización, cualquier método conocido en la materia puede usarse para medir un aumento en la expresión de hemoglobina fetal, por ejemplo, análisis de transferencia Western de la proteína γ-globina fetal y cuantificación del ARNm de la γ-globina fetal.

La expresión "célula aislada", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que se ha eliminado de un organismo en el que se encontraba originalmente, o un descendiente de dicha célula. Opcionalmente, la célula se ha cultivado *in vitro*, por ejemplo, en presencia de otras células. Opcionalmente, la célula se introduce posteriormente en un segundo organismo o se reintroduce en el organismo del que se aisló (o la célula de la que desciende).

La expresión "población aislada" con respecto a una población aislada de células como se usa en el presente documento se refiere a una población de células que se ha eliminado y separado de una población mixta o heterogénea de células. En algunas realizaciones, una población aislada es una población sustancialmente pura de células en comparación con la población heterogénea de la que se aislaron o enriquecieron las células. En algunas realizaciones, la población aislada es una población aislada de células progenitoras hematopoyéticas humanas, por ejemplo, una población sustancialmente pura de células progenitoras hematopoyéticas humanas en comparación con una población heterogénea de células que comprenden células progenitoras hematopoyéticas humanas y células de las que proceden las células progenitoras hematopoyéticas humanas.

La expresión "sustancialmente pura", con respecto a una población celular particular, se refiere a una población de células que es al menos aproximadamente un 75 %, preferentemente al menos aproximadamente un 85 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, y lo más preferentemente, al menos aproximadamente un 95 % pura, con respecto a las células que componen una población celular total. Es decir, las expresiones "sustancialmente pura" o "esencialmente purificada", con respecto a una población de células progenitoras hematopoyéticas, se refiere a una población de células que contienen menos de aproximadamente un 20 %, más preferentemente menos de aproximadamente un 15 %, 10 %, 8 %, 7 %, lo más preferentemente menos de aproximadamente un 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos de un 1 %, de células que no son células progenitoras hematopoyéticas como se definen en los términos en el presente documento.

Un "sujeto", como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que presente un síntoma de una enfermedad, trastorno o afección monogénica que puede tratarse con los vectores de terapia génica, tratamientos basados en células y métodos divulgados en otra parte del presente documento. En realizaciones preferidas, un sujeto incluye cualquier animal que presente síntomas de una enfermedad, trastorno o condición del sistema hematopoyético, por ejemplo, una hemoglobinopatía, que se puede tratar con los vectores de terapia génica, tratamientos basados en células y métodos contemplados en el presente documento. Sujetos adecuados (por ejemplo, pacientes) incluyen animales de laboratorio (tal como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tal como un gato o un perro). Primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos, están incluidos. Los sujetos normales incluyen animales que presentan cantidades anormales (cantidades menores o mayores que un sujeto "normal" o "sano") de una o más actividades fisiológicas que pueden ser moduladas mediante terapia génica.

En una realización, como se usa en el presente documento, "prevenir", y palabras similares como "prevenido", "que previene" etc., indican un enfoque para prevenir, inhibir o reducir la probabilidad de que ocurra o reaparezca, una enfermedad o afección. En otra realización, el término se refiere a retrasar la aparición o recaída de una enfermedad o afección o retrasar la aparición o recaída de los síntomas de una enfermedad o afección. En otra realización, como se usa en el presente documento, "prevención" y palabras similares incluyen reducir la intensidad, efecto, síntomas y/o carga de una enfermedad o afección antes de la aparición o recaída de la enfermedad o afección.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una afección, enfermedad o trastorno. Por ejemplo, el término "tratar" y "tratamiento" se refiere a administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición, por ejemplo, una cantidad eficaz de una composición que comprende una población de células progenitoras hematopoyéticas para que el sujeto tenga una reducción de al menos un síntoma de la enfermedad o una mejora de la enfermedad, por ejemplo, resultados clínicos beneficiosos o deseados. A efectos de la presente divulgación, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de uno o más síntomas, reducción del alcance de la enfermedad, estabilización de la enfermedad (por ejemplo, sin empeoramiento), retraso o freno de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. En algunas realizaciones, tratamiento puede referirse a prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Por tanto, un experto en la materia se da cuenta de que un tratamiento puede mejorar el estado de la enfermedad, pero puede que no sea una cura completa para la enfermedad. En algunas realizaciones, el tratamiento puede incluir profilaxis. Sin embargo, en realizaciones alternativas, el tratamiento no incluye profilaxis.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o posología que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramaticales de las mismas, que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales tienen capacidad de administración en o sobre un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos indeseables tales como náuseas, mareos, molestias gástricas y similares. Un vehículo farmacéuticamente aceptable no promoverá la aparición de una respuesta inmunitaria a un agente con el que se mezcla, a menos que se desee. La preparación de una composición farmacológica que contiene principios activos disueltos o dispersos en la misma es bien conocida en la materia y no necesita limitarse a la formulación. Normalmente, dichas composiciones se preparan como inyectable en forma de soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución o suspensiones, en líquido antes de su uso. La preparación también se puede emulsionar o presentar como una composición de liposomas. El principio activo puede mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo y en cantidades adecuadas para usar en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Son excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades mínimas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y similares, que potencian la eficacia del principio activo. La composición terapéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes en la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos, tales como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con

los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares. Los vehículos fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de vehículos líquidos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los principios activos y agua, o contienen un tampón tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina tamponada con fosfato. Es más, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tamponante, así como sales tales como cloruro de sodio y de potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y excluyendo el agua. Ejemplos de dichas fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón y emulsiones de agua y aceite. La cantidad de un agente activo utilizado con los métodos descritos en el presente documento que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar.

Como se usa en el presente documento, "prevención" o "prevenir", cuando se usa en referencia a una enfermedad, trastorno o síntomas de la misma, se refiere a una reducción en la probabilidad de que un individuo desarrolle una enfermedad o trastorno, por ejemplo, una hemoglobinopatía. Se reduce la probabilidad de desarrollar una enfermedad o trastorno, por ejemplo, cuando un individuo que tiene uno o más factores de riesgo de una enfermedad o trastorno no logra desarrollar el trastorno o desarrolla dicha enfermedad o trastorno en un momento posterior o con menos intensidad, estadísticamente hablando, en relación con una población que tiene los mismos factores de riesgo y que no recibe el tratamiento que se describe en el presente documento. La imposibilidad de desarrollar síntomas de una enfermedad, o el desarrollo de síntomas reducidos (por ejemplo, en al menos un 10 % en una escala clínicamente aceptada para esa enfermedad o trastorno) o retrasados (por ejemplo, por días, semanas, meses o años) se considera una prevención eficaz.

En relación con la puesta en contracto de una célula con una endonucleasa dirigida al ADN para disminuir la expresión de BCL11A, la expresión "aumento de los niveles de hemoglobina fetal en una célula" indica que la hemoglobina fetal en una célula o población de células es al menos un 5 % mayor en la célula o población de células tratadas con la endonucleasa dirigida al ADN, que una población de control comparable, en donde no está presente ninguna endonucleasa dirigida al ADN. Se prefiere que la expresión de hemoglobina fetal en una célula tratada con endonucleasa dirigida al ADN sea al menos un 10 % mayor, al menos un 20 % mayor, al menos un 30 % mayor, al menos un 40 % mayor, al menos un 50 % mayor, al menos un 60 % mayor, al menos un 70 % mayor, al menos un 80 % mayor, al menos un 90 % mayor, al menos 1 vez mayor, al menos 2 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 100 veces mayor, al menos 1000 veces mayor, o más que una población de control tratada comparable. La expresión "población de control tratada" se usa en el presente documento para describir una población de células que se ha tratado con idénticos medios, inducción vírica, secuencias de ácido nucleico, temperatura, confluencia, tamaño del matraz, pH, etc., con la excepción de la adición del inhibidor BCL11A.

El término "mamífero" pretende abarcar un "mamífero" en singular y "mamíferos" en plural, e incluye, pero sin limitación, seres humanos; primates tales como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; félidos tales como gatos, leones y tigres; équidos tales como caballos, burros y cebras; animales comestibles tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados tales como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; y osos. En algunas realizaciones preferidas, un mamífero es un ser humano.

En consecuencia, en una realización, al mamífero se le ha diagnosticado una hemoglobinopatía. En una realización adicional, la hemoglobinopatía es una hemoglobinopatía β. En una realización preferida, la hemoglobinopatía es una anemia de células falciformes. Como se usa en el presente documento, "anemia de células falciformes" puede ser anemia de células falciformes, enfermedad de la hemoglobina C drepanocítica (HbSC), talasemia falciforme beta más (HbS/β+), o talasemia falciforme beta cero (HbS/β0). En otra realización preferida, la hemoglobinopatía es una talasemia β.

Como se usa en el presente documento, el término "hemoglobinopatía" significa cualquier defecto en la estructura o función de cualquier hemoglobina de un individuo, e incluye defectos en la estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la hemoglobina causada por cualquier mutación, tales como mutaciones por eliminación o mutaciones por sustitución en las regiones codificantes del gen de la β-globina, o mutaciones en, o eliminaciones de, los promotores o potenciadores de dichos genes que provocan una reducción en la cantidad de hemoglobina producida en comparación con una afección normal o estándar. El término incluye además cualquier disminución en la cantidad o eficacia de la hemoglobina, ya sea normal o anormal, causada por factores externos tales como enfermedades, quimioterapia, toxinas, venenos o similares.

En una realización, la expresión "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una composición celular que es segura y suficiente para tratar, enseñar la probabilidad de, o retrasar el desarrollo de una hemoglobinopatía. Por tanto, la cantidad puede curar o mejorar los síntomas de la hemoglobinopatía, retrasar el curso de la progresión de la enfermedad de la hemoglobinopatía, retardar o inhibir un síntoma de una hemoglobinopatía, retardar o inhibir el establecimiento de síntomas secundarios de una hemoglobinopatía o inhibir el desarrollo de un síntoma secundario de una hemoglobinopatía. La cantidad eficaz para el tratamiento de la hemoglobinopatía depende del tipo de hemoglobinopatía a tratar, la intensidad de los síntomas, del sujeto que se está

tratando, la edad y el estado general del sujeto, el modo de administración y similares. Por tanto, no es posible ni prudente especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, en cualquier caso, puede determinarse una "cantidad eficaz" adecuada por un experto habitual en la materia usando únicamente experimentación rutinaria.

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" o "comprende" se usa en referencia a composiciones, métodos y respectivos componentes de los mismos, que son esenciales para la invención, pero abiertos a la inclusión de elementos no especificados, ya sean esencial o no.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a los elementos requeridos para una realización dada. La expresión permite la presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas o funcionales de esa realización de la invención.

El término "que consiste en" se refiere a composiciones, métodos, y componentes respectivos de los mismos como se describe en el presente documento, que son exclusivos de cualquier elemento no mencionado en esa descripción de la realización.

Como se usan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/una", y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo que se describe en el presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la materia después de leer esta divulgación y así sucesivamente. Se entiende que la descripción detallada anterior y los siguientes ejemplos son solo ilustrativos y no deben tomarse como limitaciones del alcance de la invención.

Hemoglobinopatías

La hemoglobina fetal (HbF) es un tetrámero de dos polipéptidos de α-globina adulta y dos polipéptidos de γ-globina fetal similares a β. Durante la gestación, los genes de la γ-globina duplicados constituyen los genes predominantes transcritos del locus de β-globina. Después del nacimiento, la γ-globina se reemplaza progresivamente por β-globina adulta, un proceso denominado "cambio fetal" (3). Los mecanismos moleculares subyacentes a este cambio han permanecido en gran parte indefinidos y han sido objeto de intensa investigación. El cambio en el desarrollo de la producción de hemoglobina predominantemente fetal o HbF ($\alpha 2\gamma 2$) a la producción de hemoglobina adulta o HbA ($\alpha 2\beta 2$) comienza alrededor de las 28 a 34 semanas de gestación y continúa poco después del nacimiento, momento en el que la HbA se vuelve predominante. Este cambio se debe principalmente a la disminución de la transcripción de los genes de la gamma-globina y al aumento de la transcripción de genes de la beta-globina. De media, la sangre de un adulto normal contiene solo alrededor de un 2 % de HbF, aunque los niveles residuales de HbF tienen una variación de más de 20 veces en adultos sanos (Atweh, Semin. Hematol. 38(4):367-73 (2001)).

Las hemoglobinopatías abarcan una serie de anemias de origen genético en las que hay una producción disminuida y/o una destrucción aumentada (hemólisis) de glóbulos rojos (RBC, por sus siglas en inglés). Estos trastornos también incluyen defectos genéticos que dan como resultado la producción de hemoglobinas anormales con un deterioro simultáneo de la capacidad para mantener la concentración de oxígeno. Algunos de estos trastornos implican la imposibilidad de producir β-globina normal en cantidades suficientes, mientras que otros implican la imposibilidad de producir completamente la β-globina normal. Estos trastornos asociados específicamente con la proteína β-globina se denominan generalmente hemoglobinopatías β. Por ejemplo, las talasemias β son el resultado de un defecto parcial o completo en la expresión del gen de la β-globina, que conduce a una HbA deficiente o ausente. La anemia de células falciformes es el resultado de una mutación puntual en el gen estructural de la β-globina, que conduce a la producción de una hemoglobina anormal (falciforme) (HbS). Los glóbulos rojos con HbS son más frágiles que los glóbulos rojos normales y se someten a hemólisis más fácilmente, conduciendo finalmente a anemia (Atweh, Semin. Hematol. 38(4):367-73 (2001)). Por otra parte, la presencia de una variante genética de BCL11A, variación HBS1L-MYB, mejora la intensidad clínica de la talasemia beta. Se ha demostrado que esta variante está asociada con los niveles de HbF. Se ha demostrado que existe una razón de probabilidades de 5 para tener una forma menos intensa de talasemia beta con la variante de HbF alta (Galanello S. *et al.*, 2009, Blood, en prensa).

La búsqueda de tratamientos dirigidos a la reducción del desequilibrio de la cadena de globina en pacientes con hemoglobinopatías β se ha centrado en la manipulación farmacológica de la hemoglobina fetal ($\alpha 2\gamma 2$; HbF). El importante potencial terapéutico de dichos enfoques está indicado por observaciones del fenotipo leve de individuos con herencia conjunta tanto de talasemia β homocigótica como de persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH), así como por aquellos pacientes con talasemia β homocigótica que no sintetizan hemoglobina adulta, pero en quienes se observa una necesidad reducida de transfusiones en presencia de concentraciones aumentadas de hemoglobina fetal. Adicionalmente, se ha observado que determinadas poblaciones de pacientes adultos con anomalías de la cadena β tienen niveles de hemoglobina fetal (HbF) superiores a los normales y se ha observado que tienen un curso clínico más leve de enfermedad que los pacientes con niveles de HbF normales en adultos. Por ejemplo, un grupo de pacientes de Arabia Saudita con anemia de células falciformes que expresan un 20-30 % de HbF tienen solo manifestaciones clínicas leves de la enfermedad (Pembrey, *et al.*, Br. J. Haematol. 40: 415-429 (1978)). Ahora se acepta que las hemoglobinopatías β, tales como la anemia de células falciformes y las talasemias β, se mejoran mediante el aumento de la producción de HbF. (Revisado en Jane y Cunningham Br. J. Haematol. 102:

415-422 (1998) y Bunn, N. Engl. J. Med. 328: 129-131 (1993)).

Mientras que actualmente se desconocen los mecanismos moleculares que controlan el cambio de desarrollo *in vivo* de la expresión génica de γ a β-globina, existe una evidencia acumulada de que factores externos pueden influir en la expresión del gen de la γ-globina. El primer grupo de compuestos que se descubrió que tenían actividad de reactivación de HbF fueron los fármacos citotóxicos. La capacidad de provocar la síntesis de nuevo de HbF mediante manipulación farmacológica se demostró por primera vez utilizando 5-azacitidina en animales de experimentación (DeSimone, Proc Natl Acad Sci USA. 79(14):4428-31 (1982)). Estudios posteriores confirmaron la capacidad de la 5-azacitidina para aumentar la HbF en pacientes con talasemia β y anemia de células falciformes (Ley, *et al.*, N. Engl. J. Medicine, 307: 1469-1475 (1982), y Ley, *et al.*, Blood 62: 370-380 (1983)). Experimentos adicionales demostraron que los babuinos tratados con dosis citotóxicas de arabinosilcitosina (ara-C) respondieron con elevaciones sorprendentes de reticulocitos F (Papayannopoulou *et al.*, Science. 224(4649):617-9 (1984)), y que el tratamiento con hidroxiurea condujo a la inducción de γ-globina en monos o babuinos (Letvin et al., N Engl J Med. 310(14):869-73 (1984)).

El segundo grupo de compuestos investigados para determinar la capacidad de provocar la actividad de reactivación de HbF fueron los ácidos grasos de cadena corta. La observación inicial en las células progenitoras de la sangre del cordón fetal condujo al descubrimiento de que el ácido γ-aminobutírico puede actuar como inductor de hemoglobina fetal (Perrine *et al.*, Biochem Biophys Res Commun.148(2):694-700 (1987)). Estudios posteriores demostraron que el butirato estimulaba la producción de globina en babuinos adultos (Constantoulakis *et al.*, Blood. Dec; 72(6):1961-7 (1988)), e indujo γ-globina en progenitores eritroides en animales o pacientes adultos con anemia de células falciformes (Perrine *et al.*, Blood. 74(1):454-9 (1989)). Derivados de ácidos grasos de cadena corta tales como fenilbutirato (Dover *et al.*, Br J Haematol. 88(3):555-61 (1994)) y ácido valproico (Liakopoulou *et al.*, 1: Blood. 186(8):3227-35 (1995)) también han demostrado inducir HbF *in vivo*. Dado el gran número de análogos o derivados de ácidos grasos de cadena corta de esta familia, hay varios posibles compuestos de esta familia más potentes que el butirato. Los ácidos fenilacético y fenilalquilo (Torkelson *et al.*, Blood Cells Mol Dis. 22(2): 150-8. (1996)), que fueron descubiertos durante estudios posteriores, se consideraron posibles inductores de HbF ya que pertenecían a esta familia de compuestos. En la actualidad, sin embargo, el uso de butirato o sus análogos en la anemia de células falciformes y la talasemia β sigue siendo experimental y no se puede recomendar para el tratamiento fuera de los ensayos clínicos.

Los ensayos clínicos destinados a la reactivación de la síntesis de hemoglobina fetal en la anemia de células falciformes y la talasemia β han incluido la administración a corto y largo plazo de dichos compuestos tales como 5-azacitidina, hidroxiurea, eritropoyetina humana recombinante y análogos del ácido butírico, así como combinaciones de estos agentes. Siguiendo estos estudios, la hidroxiurea se utilizó para la inducción de la HbF en seres humanos y más tarde se convirtió en el primer y único fármaco aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de hemoglobinopatías. Sin embargo, diversos inconvenientes han contraindicado el uso a largo plazo de dichos agentes o terapias, incluyendo los efectos secundarios no deseados y la variabilidad en las respuestas de los pacientes. Por ejemplo, mientras que la hidroxiurea estimula la producción de HbF y se ha demostrado que reduce clínicamente la crisis falciforme, está posiblemente limitada por la mielotoxicidad y el riesgo de carcinogénesis. También existiría una posible carcinogenicidad a largo plazo en las terapias basadas en 5-azacitidina. Las terapias basadas en eritropoyetina no han demostrado ser consistentes entre una variedad de poblaciones de pacientes. La corta semivida del ácido butírico *in vivo* se ha considerado un posible obstáculo en la adaptación de estos compuestos para usar en intervenciones terapéuticas. Adicionalmente, son necesarias dosis muy altas de ácido butírico para inducir la expresión del gen de la γ-globina, requiriendo cateterismo para la infusión continua del compuesto. Por otra parte, estas altas dosis de ácido butírico pueden estar asociadas con neurotoxicidad y daño multiorgánico (Blau, *et al.*, Blood 81: 529-537 (1993)). Aunque incluso los aumentos mínimos en los niveles de HbF son útiles en la anemia de células falciformes, las talasemias β requieren un aumento mucho mayor que no se logra de manera fiable o segura mediante ninguno de los agentes utilizados actualmente (Olivieri, Seminars in Hematology 33: 24-42 (1996)).

La identificación de reguladores naturales de la inducción y producción de HbF podría proporcionar un medio para inventar intervenciones terapéuticas que superen los diversos inconvenientes de los compuestos descritos anteriormente. Estudios recientes de asociación de todo el genoma han aportado conocimientos sobre la base genética de numerosas enfermedades y rasgos complejos (McCarthy *et al.*, Nat Rev Genet 9, 356 (2008) y Manolio et. al. J Clin Invest 118, 1590 (2008)). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos, el vínculo funcional entre una asociación genética y la fisiopatología subyacente aún no se ha descubierto. El nivel de hemoglobina fetal (HbF) se hereda como un rasgo cuantitativo y clínicamente importante, dado su papel antes mencionado y bien caracterizado en la mejora de la intensidad de las principales hemoglobinopatías β, anemia de células falciformes y talasemia β (Nathan et. al., Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood, 6ª edición, págs. 2 v. (xiv, 1864, xli p.) 2003)). Dos estudios de asociación de todo el genoma han identificado tres loci principales que contienen un conjunto de cinco polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) comunes que explican el -20 % de la variación en los niveles de HbF (Lettre *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (2008); Uda *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 105, 1620 (2008); Menzel *et al.*, Nat Genet 39, 1197 (2007)). Por otra parte, varias de estas variantes parecen predecir la intensidad clínica de la anemia de células falciformes (Lettre *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (2008)) y al menos uno de estos SNP también puede afectar el resultado clínico en la talasemia β (Uda *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 105, 1620 (2008)). El SNP con el mayor tamaño de efecto, que explica más de un 10 % de la variación en HbF, se encuentra en el segundo intrón de un gen en el cromosoma 2, BCL11A. Mientras que BCL11A, un factor de transcripción de dedos de zinc de

tipo C2H2, se ha investigado por su papel en el desarrollo de linfocitos (Liu *et al.*, Nat Immunol 4, 525 (2003) y Liu *et al.*, Mol Cancer 5, 18 (2006)), su papel en la producción de glóbulos rojos o la regulación del gen de la globina no se ha evaluado previamente.

Al comienzo de la era del ADN recombinante, estudios de la estructura del gen de la globina proporcionaron una base molecular sólida para plantear el cambio de globina fetal. Se ha centrado un esfuerzo considerable en delimitar los elementos en cis dentro del locus de la β-globina necesarios para la regulación adecuada de los genes dentro del grupo de globina tipo β. Estos estudios se basaron en mutaciones y eliminaciones de origen natural que influyen considerablemente en los niveles de HbF en adultos, y se han complementado con la generación de ratones transgénicos que albergan partes del grupo (Nathan et. al., Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood, 6ª edición, págs. 2 v. (xiv, 1864, xli p.) 2003) y G. Stamatoyannopoulos, Exp Hematol 33, 259 (2005)). Aunque los elementos en cis precisos necesarios para el cambio de globina siguen estando mal definidos, los hallazgos en ratones transgénicos han indicado claramente que los genes de la γ-globina se silencian de forma autónoma en la etapa adulta, un hallazgo que es más compatible con la ausencia de activadores específicos de la etapa fetal o la presencia de un represor específico de etapa. Los resultados de estudios recientes de asociación genética proporcionan genes candidatos para interrogar sobre su participación en el control de los genes de la γ-globina, tal como *BCL11A*.

Como se usa en el presente documento, tratar o reducir un riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto significa mejorar al menos un síntoma de hemoglobinopatía. En el presente documento se describen métodos para tratar, por ejemplo, reducir la intensidad o progresión de, una hemoglobinopatía en un sujeto. En otro aspecto, los métodos también se pueden utilizar para reducir un riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, retrasar la aparición de síntomas de una hemoglobinopatía en un sujeto, o aumentar la longevidad de un sujeto que tiene una hemoglobinopatía. En un aspecto, los métodos pueden incluir la selección de un sujeto sobre la base de que tiene, o está en riesgo de desarrollar, una hemoglobinopatía, pero aún no tiene una hemoglobinopatía o un sujeto con una hemoglobinopatía subyacente. La selección de un sujeto puede incluir la detección de síntomas de hemoglobinopatía, un análisis de sangre, pruebas genéticas o registros clínicos. Si los resultados de la(s) prueba(s) indican que el sujeto tiene una hemoglobinopatía, los métodos también incluyen la administración de las composiciones descritas en el presente documento, tratando de ese modo, o reduciendo el riesgo de desarrollar, una hemoglobinopatía en el sujeto. Por ejemplo, un sujeto al que se le ha diagnosticado SCD con genotipo HbSS, talasemia HbS/β0, HbSD, o HbSO y/o HbF < 10 % mediante electroforesis.

Como se usa en el presente documento, el término "hemoglobinopatía" se refiere a una afección que implica la presencia de una molécula de hemoglobina anormal en la sangre. Ejemplos de hemoglobinopatías incluyen, pero sin limitación, SCD y THAL. También se incluyen hemoglobinopatías en las que está presente una combinación de hemoglobinas anormales en la sangre (por ejemplo, anemia de células falciformes/Hb-C). Un ejemplo ilustrativo de dicha enfermedad incluye, pero sin limitación, SCD y THAL. La SCD y THAL y sus síntomas son bien conocidos en la materia y se describen con más detalle a continuación. Los sujetos se pueden diagnosticar con hemoglobinopatía por un profesional sanitario, cuidador médico, médico, enfermera, miembro de la familia o conocido, quien reconoce, aprecia, confirma, determina, concluye, opina, o decide que el sujeto tiene una hemoglobinopatía.

El término "SCD" se define en el presente documento para incluir cualquier afección anémica sintomática que resulte de la falciformación de glóbulos rojos. Las manifestaciones de la SCD incluyen: anemia; dolor; y/o disfunción de órganos, tales como insuficiencia renal, retinopatía, síndrome de tórax agudo, isquemia, priapismo y accidente cerebrovascular. Como se usa en el presente documento, el término "SCD" se refiere a una variedad de problemas clínicos que acompañan a la SCD, especialmente en aquellos sujetos que son homocigotos para la sustitución de células falciformes en HbS. Entre las manifestaciones constitucionales a las que se hace referencia en el presente documento mediante el uso del término SCD se encuentran el retraso del crecimiento y el desarrollo, una mayor tendencia a desarrollar infecciones graves, particularmente debido al neumococo, marcado deterioro de la función esplénica, prevención de la eliminación eficaz de bacterias circulantes, con infartos recurrentes y eventual destrucción del tejido esplénico. También se incluyen en el término "SCD" los episodios agudos de dolor musculoesquelético, que afectan principalmente a la columna lumbar, abdomen y diáfisis femoral, y que son similares en mecanismo e intensidad. En adultos, dichos ataques comúnmente se manifiestan como episodios leves o moderados de corta duración cada pocas semanas o meses intercalados con ataques agonizantes que duran de 5 a 7 días que ocurren en promedio una vez al año. Entre los eventos que se sabe que desencadenan dichas crisis se encuentran la acidosis, hipoxia y deshidratación, todos los cuales potencian la polimerización intracelular de HbS (J.H. Jandl, Blood: Textbook of Hematology, 2ª Ed., Little, Brown and Company, Boston, 1996, páginas 544-545).

Como se usa en el presente documento, "THAL" se refiere a un trastorno hereditario caracterizado por una producción defectuosa de hemoglobina. En una realización, el término engloba anemias hereditarias que ocurren debido a mutaciones que afectan la síntesis de hemoglobinas. En otras realizaciones, el término incluye cualquier anemia sintomática resultante de afecciones talasémicas tales como talasemia severa o β, talasemia mayor, talasemia intermedia, talasemias α tales como la enfermedad de la hemoglobina H, Las talasemias β se producen por una mutación en la cadena de β-globina y pueden ocurrir en forma mayor o menor. En la forma principal de talasemia β, los niños son normales al nacer, pero desarrollan anemia durante el primer año de vida. La forma leve de talasemia β produce pequeños glóbulos rojos. Las talasemias alfa se producen por la eliminación de un gen o genes de la cadena de globina.

Por la expresión "riesgo de desarrollar enfermedad" se entiende la probabilidad relativa de que un sujeto desarrolle una hemoglobinopatía en el futuro en comparación con un sujeto o población de control (por ejemplo, un sujeto o población sana). Por ejemplo, un individuo que lleva la mutación genética asociada con SCD, una mutación A a T del gen de la β-globina, y si el individuo en heterocigoto u homocigoto para esa mutación aumenta el riesgo de ese individuo.

Células progenitoras hematopoyéticas

En una realización, se pone en contacto la célula progenitora hematopoyética *ex vivo* o *in vitro.* En una realización específica, la célula que se pone en contacto es una célula del linaje eritroide. En una realización, la composición celular comprende células que tienen una expresión de BCL11A disminuida.

"Célula progenitora hematopoyética" como se usa la expresión en el presente documento, se refiere a células de un linaje de células madre que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas, incluyendo los mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y los linajes linfoides (linfocitos T, linfocitos B, células NK). Una "célula del linaje eritroide" indica que la célula que se pone en contacto es una célula que sufre eritropoyesis de manera que tras la diferenciación final forma un eritrocito o glóbulo rojo (RBC). Dichas células pertenecen a uno de los tres linajes, eritroide, linfoide y mieloide, procedente de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea. Tras la exposición a factores de crecimiento específicos y otros componentes del microambiente hematopoyético, las células progenitoras hematopoyéticas pueden madurar a través de una serie de tipos celulares de diferenciación intermedia, todos intermediarios del linaje eritroide, en glóbulos rojos. Por tanto, células del "linaje eritroide", como se usa la expresión en el presente documento, comprenden células progenitoras hematopoyéticas, rubriblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos, eritroblastos acidófilos, reticulocitos y eritrocitos.

En alguna realización, la célula progenitora hematopoyética tiene al menos uno de los marcadores de superficie celular característicos de las células progenitoras hematopoyéticas: CD34+, CD59+, Thy1/CD90+, Cd381o/- y C-kit/CD1 17+. Preferentemente, las células progenitoras hematopoyéticas tienen varios de estos marcadores.

En algunas realizaciones, las células progenitoras hematopoyéticas del linaje eritroide tienen el marcador de superficie celular característico del linaje eritroide: CD71 y Ter119.

Las células madre, tales como las células progenitoras hematopoyéticas, son capaces de proliferar y dar lugar a más células progenitoras que tienen la capacidad de generar un gran número de células madre que a su vez pueden dar lugar a células hijas diferenciadas o diferenciables. Las propias células hijas se pueden inducir para proliferar y producir una progenie que posteriormente se diferencia en uno o más tipos de células maduras, mientras que también conservan una o más células con posible desarrollo parental. La expresión "célula madre" se refiere entonces, a una célula con capacidad o posibilidad, en circunstancias particulares, para diferenciarse a un fenotipo más especializado o diferenciado, y que conserva la capacidad, en determinadas circunstancias, de proliferar sin diferenciarse sustancialmente. En una realización, el término célula progenitora o madre se refiere a una célula original generalizada cuyos descendientes (progenie) se especializan, a menudo en diferentes direcciones, mediante diferenciación, por ejemplo, mediante la adquisición de caracteres completamente individuales, como ocurre en la diversificación progresiva de células y tejidos embrionarios. La diferenciación celular es un proceso complejo que ocurre normalmente a través de muchas divisiones celulares. Una célula diferenciada puede proceder de una célula multipotente que a su vez procede de una célula multipotente, y así sucesivamente. Si bien cada una de estas células multipotentes puede considerarse célula madre, el intervalo de tipos de células que cada una puede dar lugar puede variar considerablemente. Algunas células diferenciadas también tienen la capacidad de dar lugar a células de mayor potencial de desarrollo. Tal capacidad puede ser natural o puede inducirse artificialmente tras el tratamiento con varios factores. En muchos casos biológicos, las células madre también son "multipotentes" porque pueden producir progenie de más de un tipo celular distinto, pero esto no es necesario para la "pluripontencialidad". La autorrenovación es la otra parte clásica de la definición de célula madre, y es esencial como se usa en el presente documento. En teoría, la autorrenovación puede ocurrir por cualquiera de dos mecanismos principales. Las células madre pueden dividirse asimétricamente, con una hija conservando el estado de madre y la otra hija expresando alguna otra función específica y fenotipo distintos. Alternativamente, algunas de las células madre de una población pueden dividirse simétricamente en dos madres, manteniendo así algunas células madre en la población en su conjunto, mientras que otras células de la población dan lugar únicamente a una progenie diferenciada. En general, las "células progenitoras" tienen un fenotipo celular que es más primitivo (es decir, se encuentra en una etapa anterior a lo largo de una ruta de desarrollo o progresión que una célula completamente diferenciada). Con frecuencia, las células progenitoras también tienen un potencial proliferativo significativo o muy alto. Las células progenitoras pueden dar lugar a múltiples tipos de células diferenciadas distintas o a un solo tipo de célula diferenciada, dependiendo de la ruta de desarrollo y del entorno en el que las células se desarrollan y se diferencian.

En el contexto de la ontogenia celular, el adjetivo "diferenciada" o "en diferenciación" es un término relativo. Una "célula diferenciada" es una célula que ha progresado adicionalmente en la vía de desarrollo que la célula con la que se está comparando. Por tanto, las células madre pueden diferenciarse en células precursoras de linaje restringido (tal como

una célula progenitora hematopoyética), que a su vez pueden diferenciarse en otros tipos de células precursoras más adelante en la ruta (como un precursor de eritrocitos), y luego a una célula diferenciada en etapa terminal, tal como un eritrocito, que desempeña un papel característico en un tipo tisular determinado y pueden conservar o no la capacidad de proliferar adicionalmente.

Células madre pluripotentes inducidas

En algunas realizaciones, las células humanas modificadas genéticamente descritas en el presente documento proceden de células madre pluripotentes aisladas. Una ventaja de usar iPSC es que las células pueden proceder del mismo sujeto al que se van a administrar las células progenitoras. Es decir, se puede obtener una célula somática de un sujeto, reprogramarla a una célula madre pluripotente inducida, y luego volver a diferenciarla en una célula progenitora hematopoyética para ser administrada al sujeto (por ejemplo, células autólogas). Dado que las progenitoras proceden esencialmente de una fuente autóloga, el riesgo de rechazo del injerto o de respuestas alérgicas se reduce en comparación con el uso de células de otro sujeto o grupo de sujetos. En algunas realizaciones, las progenitoras hematopoyéticas proceden de fuentes no autólogas. Además, el uso de iPSC niega la necesidad de células obtenidas de una fuente embrionaria. Por tanto, en una realización, las células madre utilizadas en los métodos divulgados no son células madre embrionarias.

Aunque la diferenciación es generalmente irreversible en contextos fisiológicos, se han desarrollado recientemente varios métodos para reprogramar células somáticas a células madre pluripotentes inducidas. Los expertos en la materia conocen métodos ilustrativos y se describen brevemente a continuación en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "reprogramación" se refiere a un proceso que altera o invierte el estado de diferenciación de una célula diferenciada (por ejemplo, una célula somática). Dicho de otra manera, la reprogramación se refiere a un proceso de conducir la diferenciación de una célula hacia atrás a un tipo de célula más indiferenciada o más primitiva. Cabe señalar que la colocación de muchas células primarias en cultivo puede conducir a cierta pérdida de características completamente diferenciadas. Por tanto, simplemente cultivar dichas células incluidas en el término células diferenciadas no convierte estas células en células no diferenciadas (por ejemplo, células indiferenciadas) o células pluripotentes. La transición de una célula diferenciada a la pluripotencia requiere un estímulo de reprogramación más allá de los estímulos que conducen a la pérdida parcial del carácter diferenciado en cultivo. Las células reprogramadas también tienen la característica de la capacidad de realizar pases prolongados sin pérdida de potencial de crecimiento, en relación con las células progenitoras primarias, que generalmente tienen capacidad para un número limitado de divisiones en cultivo.

La célula que se va a reprogramar puede diferenciarse parcial o terminalmente antes de la reprogramación. En algunas realizaciones, la reprogramación abarca inversión completa del estado de diferenciación de una célula diferenciada (por ejemplo, una célula somática) a un estado pluripotente o multipotente. En algunas realizaciones, la reprogramación abarca inversión completa o parcial del estado de diferenciación de una célula diferenciada (por ejemplo, una célula somática) a una célula indiferenciada (por ejemplo, una célula de tipo embrionario). La reprogramación puede dar como resultado la expresión de genes particulares por parte de las células, cuya expresión contribuye aún más a la reprogramación. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, la reprogramación de una célula diferenciada (por ejemplo, una célula somática) hace que la célula diferenciada asuma un estado indiferenciado (por ejemplo, es una célula indiferenciada). Las células resultantes se denominan "células reprogramadas", o "células madre pluripotentes inducidas (iPSC o células iPS)".

La reprogramación puede implicar alteraciones, por ejemplo, inversión, de al menos algunos de los patrones hereditarios de modificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, metilación), condensación de cromatina, cambios epigenéticos, huella genética, etc., que ocurren durante la diferenciación celular. La reprogramación es diferente de simplemente mantener el estado indiferenciado existente de una célula que ya es pluripotente o mantener el estado existente menos que completamente diferenciado de una célula que ya es una célula multipotente (por ejemplo, una célula madre hematopoyética). La reprogramación también es distinta de promover la autorrenovación o la proliferación de células que ya son pluripotentes o multipotentes, aunque las composiciones y métodos descritos en el presente documento también pueden ser útiles para dichos fines, en algunas realizaciones.

El enfoque o método específico utilizado para generar células madre pluripotentes a partir de células somáticas (en términos generales, "reprogramación") no es esencial para la invención reivindicada. Por tanto, cualquier método que reprograme una célula somática al fenotipo pluripotente sería apropiado para usar en los métodos descritos en el presente documento.

Se han descrito metodologías de reprogramación para generar células pluripotentes utilizando combinaciones definidas de factores de transcripción de células madre pluripotentes inducidas. Yamanaka y Takahashi convirtieron células somáticas de ratón en células tipo células madre embrionarias con potencial de desarrollo ampliado mediante la transducción directa de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (Takahashi y Yamanaka, 2006). Las iPSC se asemejan a células madre embrionarias, ya que restauran los circuitos transcripcionales asociados a la pluripotencia y muc del panorama epigenético. Además, las iPSC de ratón satisfacen todos los ensayos estándar de pluripotencia: específicamente, la diferenciación *in vitro* en tipos celulares de las tres capas germinales, formación de teratoma, contribución a las

quimeras, transmisión de la línea germinal (Maherali y Hochedlinger, 2008) y complementación tetraploide (Woltjen *et al.*, 2009).

Estudios posteriores han demostrado que se pueden obtener células iPS humanas utilizando métodos de transducción similares (Lowry *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007b), y el trío de factores de transcripción, OCT4, SOX2 y NANOG, se ha establecido como el conjunto central de factores de transcripción que gobiernan la pluripotencia (Jaenisch y Young, 2008). La producción de células iPS se puede lograr mediante la introducción de secuencias de ácido nucleico que codifican genes asociados a células madre en una célula somática adulta, históricamente utilizando vectores víricos.

Las células iPS se pueden generar o proceder de células somáticas terminalmente diferenciadas, así como de células madre adultas o células madre somáticas. Es decir, una célula progenitora no pluripotente puede volverse pluripotente o multipotente mediante reprogramación. En dichos casos, puede que no sea necesario incluir tantos factores de reprogramación como se requiere para reprogramar una célula terminalmente diferenciada. Además, la reprogramación se puede inducir mediante la introducción no vírica de factores de reprogramación, por ejemplo, mediante la introducción de las proteínas mismas, mediante la introducción de ácidos nucleicos que codifican los factores de reprogramación, o mediante la introducción de ARN mensajeros que, tras la traducción, producen los factores de reprogramación (véase, por ejemplo, Warren *et al.*, Cell Stem Cell, 5 de noviembre de 2010;7(5):618-30). La reprogramación se puede lograr mediante la introducción de una combinación de ácidos nucleicos que codifican genes asociados con células madre, que incluyen, por ejemplo, Oct-4 (también conocido como Oct-3/4 o Pouf51), Sox1, Sox2, Sox3, Sox 15, Sox 18, NANOG, K1f1, Klf2, Klf4, Klf5, NR5A2, c-Myc, 1-Myc, n-Myc, Rem2, *Tert* y LIN28. En una realización, la reprogramación usando los métodos y composiciones descritos en el presente documento puede comprender además la introducción de uno o más de Oct-3/4, un miembro de la familia Sox, un miembro de la familia Klf y un miembro de la familia Myc a una célula somática. En una realización, los métodos y composiciones descritos en el presente documento comprenden además la introducción de uno o más de cada Oct 4, Sox2, Nanog, c-MYC y Klf4 para reprogramación. Como se señala anteriormente, el método exacto utilizado para la reprogramación no es necesariamente esencial para los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Sin embargo, donde se utilizarán células diferenciadas de las células reprogramadas, por ejemplo, terapia humana, en una realización, la reprogramación no se efectúa mediante un método que altere el genoma. Por tanto, en dichas realizaciones, se logra la reprogramación, por ejemplo, sin el uso de vectores víricos o plásmidos.

La eficacia de la reprogramación (es decir, el número de células reprogramadas) procedente de una población de células iniciales se puede mejorar mediante la adición de varias moléculas pequeñas como lo muestra Shi, Y., et al (2008) Cell-Stem Cell 2:525-528, Huangfu, D., et al (2008) Nature Biotechnology 26(7):795-797, and Marson, A., et al (2008) Cell-Stem Cell 3:132-135. Por tanto, se puede usar un agente o combinación de agentes que mejoran la eficacia o velocidad de producción de células madre pluripotentes inducidas en la producción de iPSC específicas del paciente o de la enfermedad. Algunos ejemplos no limitantes de agentes que mejoran la eficacia de la reprogramación incluyen Wnt soluble, medios condicionados con Wnt, BIX-01294 (una histona metiltransferasa G9a), PD0325901 (un inhibidor de MEK), inhibidores de ADN metiltransferasa, inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC), ácido valproico, 5'-azacitidina, dexametasona, suberoilanilida, ácido hidroxámico (SAHA), vitamina C y tricostatina (TSA), entre otros.

Otros ejemplos no limitantes de agentes potenciadores de la reprogramación incluyen: ácido hidroxámico de suberoilanilida (SAHA (por ejemplo, MK0683, vorinostat) y otros ácidos hidroxámicos), BML-210, depudecina (por ejemplo, (-)-depudecina), toxina HC, Nullscript (4-(1,3-Dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-N-hidroxibutanamida), fenilbutirato (por ejemplo, fenilbutirato de sodio) y ácido valproico ((VPA) y otros ácidos grasos de cadena corta), Scriptaid, suramina de sodio, tricostatina A (TSA), compuesto APHA 8, apicidina, butirato de sodio, butirato de pivaloiloximetilo (Pivanex, AN-9), Trapoxina B, clamidocina, depsipéptido (también conocido como FR901228 o FK228), benzamidas (por ejemplo, CI-994 (por ejemplo, N-acetil dinalina) y MS-27-275), MGCD0103, NVP-LAQ-824, CBHA (ácido bishidroxámico de ácido m-carboxicinamínico), JNJ16241199, tubacina, A-161906, proxamida, oxamflatina, 3-Cl-UCHA (por ejemplo, ácido 6-(3-clorofenilureido)caproico hidroxámico), AOE (ácido 2-amino-8-oxo-9,10-epoxidecanoico), CHAP31 y CHAP 50. Otros agentes potenciadores de la reprogramación incluyen, por ejemplo, formas negativas dominantes de las HDAC (por ejemplo, formas catalíticamente inactivas), inhibidores de ARNip de las HDAC y anticuerpos que se unen específicamente a las HDAC. Dichos inhibidores están disponibles, por ejemplo, de BIOMOL International, Fukasawa, Merck Biosciences, Novartis, Gloucester Pharmaceuticals, Aton Pharma, Titan Pharmaceuticals, Schering AG, Pharmion, MethylGene y Sigma Aldrich.

Para confirmar la inducción de células madre pluripotentes para usar con los métodos descritos en el presente documento, los clones aislados pueden probarse para la expresión de un marcador de células madre. Dicha expresión en una célula procedente de una célula somática identifica las células como células madre pluripotentes inducidas. Los marcadores de células madre se pueden seleccionar del grupo no limitante que incluye SSEA3, SSEA4, CD9, Nanog, Fbx15, Ecat1, Esg1, Eras, Gdf3, Fgf4, Cripto, Dax1, Zpf296, Slc2a3, Rex1, Utf1 y Natl. En una realización, una célula que expresa Oct4 o Nanog se identifica como pluripotente. Los métodos para detectar la expresión de dichos marcadores pueden incluir, por ejemplo, RT-PCR y métodos inmunológicos que detectan la presencia de los polipéptidos codificados, tales como transferencias Western o análisis de citometría de flujo. En algunas realizaciones, la detección no implica solo RT-PCR, sino que también incluye la detección de marcadores proteicos. Los marcadores intracelulares pueden identificarse mejor mediante RT-PCR, mientras que los marcadores de la superficie celular se

identifican fácilmente, por ejemplo, mediante inmunocitoquímica.

El carácter de células madre pluripotentes de células aisladas se puede confirmar mediante pruebas que evalúan la capacidad de las iPSC para diferenciarse en células de cada una de las tres capas germinales. Como ejemplo, la formación de teratomas en ratones desnudos puede usarse para evaluar el carácter pluripotente de los clones aislados. Las células se introducen en ratones desnudos y se realiza histología y/o inmunohistoquímica en un tumor que surge de las células. El crecimiento de un tumor que comprende células de las tres capas germinales, por ejemplo, indica además que las células son células madre pluripotentes.

Células somáticas para reprogramación

Las células somáticas, como se usa esta expresión en el presente documento, se refiere cualquier célula que forma el cuerpo de un organismo, excluyendo las células de la línea germinal. Cada tipo de célula del cuerpo de los mamíferos, excepto los espermatozoides y los óvulos, las células de las que están hechas (gametocitos) y las células madre indiferenciadas, es una célula somática diferenciada. Por ejemplo, los órganos internos, la piel, los huesos, la sangre y el tejido conectivo están formados por células somáticas diferenciadas.

Los tipos de células somáticas adicionales para usar con las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen: un fibroblasto (por ejemplo, un fibroblasto primario), una célula muscular (por ejemplo, un miocito), una célula de cúmulo, una célula neural, una célula mamaria, un hepatocito y una célula del islote de Langerhans. En algunas realizaciones, la célula somática es una línea celular primaria o es la progenie de una línea celular primaria o secundaria. En algunas realizaciones, la célula somática se obtiene de una muestra humana, por ejemplo, un folículo piloso, una muestra de sangre, una biopsia (por ejemplo, una biopsia de piel o una biopsia de tejido adiposo), una muestra de hisopo (por ejemplo, una muestra de hisopo oral) y, por lo tanto, es una célula somática humana.

Algunos ejemplos no limitantes de células somáticas diferenciadas incluyen, pero sin limitación, epiteliales, endoteliales, neuronales, adiposas, cardíacas, del músculo esquelético, células inmunitarias, hepáticas, esplénicas, del pulmón, células sanguíneas circulantes, gastrointestinales, renales, de la médula ósea y células pancreáticas. En algunas realizaciones, una célula somática puede ser una célula primaria aislada de cualquier tejido somático, incluyendo, pero sin limitación el cerebro, hígado, tubo digestivo, estómago, intestino, grasa, músculo, útero, piel, bazo, órgano endocrino, hueso, etc. Además, la célula somática puede ser de cualquier especie de mamífero, con ejemplos no limitantes que incluyen una célula murina, bovina, de simio, porcina, equina, ovina o humana. En algunas realizaciones, la célula somática es una célula somática humana.

Cuando se utilizan células reprogramadas para la generación de células progenitoras hematopoyéticas que se utilizarán en el tratamiento terapéutico de enfermedades, es deseable, pero no se requiere, utilizar células somáticas aisladas del paciente que se va a tratar. Por ejemplo, se pueden utilizar células somáticas implicadas en enfermedades y células somáticas que participan en el tratamiento terapéutico de enfermedades y similares. En algunas realizaciones, un método para seleccionar las células reprogramadas de una población heterogénea que comprende células reprogramadas y células somáticas de las que proceden o de las que se generaron se puede realizar mediante cualquier medio conocido. Por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos o similar, tal como un gen marcador seleccionable se puede utilizar para aislar las células reprogramadas utilizando el marcador seleccionable como índice.

Las células somáticas reprogramadas como se divulga en el presente documento pueden expresar cualquier número de marcadores de células pluripotentes, que incluyen: fosfatasa alcalina (FAL); ABCG2; antígeno-1 embrionario específico de etapa (SSEA-1); SSEA-3; SSEA-4; TRA-1-60; TRA-1-81; Tra-2-49/6E; ERas/ECAT5, E-cadherina; □ □III-tubulina; □-actina de músculo liso (a-SMA); factor de crecimiento de fibroblastos 4 (Fgf4), Cripto, Dax1; proteína de dedo de zinc 296 (Zfp296); N-acetiltransferasa-1 (Natl); (Transcripción 1 asociada a células madre embrionarias (ECAT1); ESG1/DPPA5/ECAT2; ECAT3; ECAT6; ECAT7; ECAT8; ECAT9; ECAT10; ECAT15-1; ECAT15-2; Fth117; Sal14; factor de transcripción de células embrionarias indiferenciadas (Utf1); Rex1; p53; G3PDH; telomerasa, incluyendo *TERT*; genes del cromosoma X inactivos; Dnmt3a; Dnmt3b; TRIM28; F-box que contiene proteína 15 (Fbx15); Nanog/ECAT4; Oct3/4; Sox2; Klf4; c-Myc; Esrrb; TDGF1; GABRB3; Zfp42, FoxD3; GDF3; CYP25A1; proteína 2 asociada al desarrollo de la pluripotencia (DPPA2); punto de corte 1 del linfoma de células T (Tcl1); DPPA3/Stella; DPPA4; otros marcadores generales de pluripotencia, etc. Otros marcadores pueden incluir Dnmt3L; Sox15; Stat3; Grb2; β-catenina y Bmil. Dichas células también pueden caracterizarse por la disminución de marcadores característicos de la célula somática de la que procede la célula madre pluripotente inducida.

Edición del genoma y endonucleasas dirigidas al ADN

Como se usa en el presente documento, la expresión "edición del genoma" se refiere a un método de genética inversa que utiliza nucleasas genomanipuladas artificialmente para cortar y crear roturas específicas de doble hebra en una ubicación o ubicaciones deseadas en el genoma, que luego se reparan mediante procesos endógenos celulares tales como, recombinación homóloga (HR, por sus siglas en inglés), reparación dirigida por homología (HDR, por sus siglas en inglés) y unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés). La NHEJ une directamente los extremos del ADN en una rotura de doble hebra, mientras que la HDR utiliza una secuencia homóloga como plantilla para

regenerar la secuencia de ADN ausente en el punto de rotura.

La edición del genoma no se puede realizar utilizando endonucleasas de restricción tradicionales, ya que la mayoría de las enzimas de restricción reconocen algunos pares de bases en el ADN como su diana y la probabilidad es muy alta de que la combinación de pares de bases reconocida se encuentre en muchas ubicaciones a lo largo del genoma dando como resultado cortes múltiples (es decir, no se limita a una ubicación deseada). Para superar este problema y crear roturas de doble cadena específicas del sitio, hasta la fecha se han descubierto y genomodificado varias clases distintas de nucleasas. Estas son las meganucleasas, las nucleasas de dedo de zinc (ZFN), el sistema Cas9/CRISPR y las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés).

Las meganucleasas se agrupan comúnmente en cuatro familias: la familia LAGLIDADG ("LAGLIDADG" divulgada como SEQ ID NO: 144), la familia GIY-YIG, la familia de cajas His-Cys y la familia HNH. Estas familias se caracterizan por motivos estructurales, que afectan la actividad catalítica y la secuencia de reconocimiento. Por ejemplo, los miembros de la familia LAGLIDADG ("LAGLIDADG" divulgada como SEQ ID NO: 144) se caracterizan por tener una o dos copias del motivo LAGLIDADG conservado (véase Chevalier *et al.* (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774). Las meganucleasas LAGLIDADG ("LAGLIDADG" divulgadas como SEQ ID NO: 144) con una única copia del motivo LAGLIDADG (SEQ ID NO: 144) forman homodímeros, mientras que los miembros con dos copias de LAGLIDADG (SEQ ID NO: 144) se encuentran como monómeros. De manera similar, los miembros de la familia GIY-YIG tienen un módulo GIY-YIG, que tiene 70-100 restos de longitud e incluye cuatro o cinco motivos de secuencia conservados con cuatro restos invariantes, dos de los cuales son necesarios para la actividad (véase Van Roey *et al.* (2002), Nature Struct. Biol. 9: 806-811). Las meganucleasas de caja His-Cys se caracterizan por una serie altamente conservada de histidinas y cisteínas en una región que abarca varios cientos de restos de aminoácidos (véase Chevalier *et al.* (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774). En el caso de la familia NHN, los miembros se definen por motivos que contienen dos pares de histidinas conservadas rodeadas por restos de asparagina (véase Chevalier *et al.* (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774). Las cuatro familias de meganucleasas están ampliamente separadas entre sí con respecto a los elementos estructurales conservados y, en consecuencia, la especificidad de la secuencia de reconocimiento de ADN y la actividad catalítica.

Las meganucleasas se encuentran comúnmente en especies microbianas y tienen la propiedad única de tener secuencias de reconocimiento muy largas (> 14 pb), lo que las hace naturalmente muy específicas para cortar en una ubicación deseada. Esto se puede aprovechar para realizar roturas de doble cadena específicas del sitio en la edición del genoma. Un experto en la materia puede usar estas meganucleasas de origen natural, sin embargo, el número de dichas meganucleasas de origen natural es limitado. Para superar este problema, se han utilizado métodos de detección de alto rendimiento y mutagénesis para crear variantes de meganucleasa que reconocen secuencias únicas. Por ejemplo, se han fusionado varias meganucleasas para crear enzimas híbridas que reconocen una nueva secuencia. Alternativamente, los aminoácidos de la meganucleasa que interactúan con el ADN se pueden alterar para diseñar meganucleasas específicas de secuencia (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 8.021.867). Las meganucleasas se pueden diseñar usando los métodos descritos en, por ejemplo, Certo, MT *et al.* Nature Methods (2012) 9:073-975; las patentes de Estados Unidos N.º 8.304.222; 8.021.867; 8.119.381; 8.124.369; 8.129.134; 8.133.697; 8.143.015; 8.143.016; 8.148.098; u 8.163.514. Alternativamente, las meganucleasas con características de corte específicas del sitio se pueden obtener utilizando tecnologías disponibles comercialmente, por ejemplo, Tecnología de edición del genoma Directed Nuclease Editor™ de Precision BioSciences.

La tecnología de endonucleasas de restricción ZFN y TALEN utiliza una enzima de corte de ADN no específica que está unida a una secuencia de ADN específica que reconoce péptidos tales como dedos de zinc y efectores de tipo activador de la transcripción (TALE). Normalmente se selecciona una endonucleasa cuyo sitio de reconocimiento de ADN y sitio de escisión están separados entre sí y su parte de escisión se separa y luego se une a una secuencia que reconoce el péptido, produciendo así una endonucleasa con una especificidad muy alta para una secuencia deseada. Una enzima de restricción ilustrativa con dichas propiedades es FokI. Además, FokI tiene la ventaja de requerir dimerización para tener actividad nucleasa y esto significa que la especificidad aumenta considerablemente a medida que cada pareja de nucleasa reconoce una secuencia de ADN única. Para potenciar este efecto, se han genomodificado nucleasas FokI que solo pueden funcionar como heterodímeros y tienen una mayor actividad catalítica. Las nucleasas que funcionan como heterodímeros evitan la posibilidad de actividad homodímera no deseada y, por tanto, aumentan la especificidad de la rotura de doble hebra.

Aunque las porciones de nucleasa tanto de ZFN como de TALEN tienen propiedades similares, la diferencia entre estas nucleasas genomodificadas está en su péptido de reconocimiento de ADN. Las ZFN se basan en dedos de zinc Cys2-His2 y las TALEN en los TALE. Ambos dominios peptídicos que reconocen ADN tienen la característica de que se encuentran naturalmente en combinaciones en sus proteínas. Los dedos de zinc Cys2-His2 ocurren normalmente en repeticiones que están separadas por 3 pb y se encuentran en diversas combinaciones en una variedad de proteínas que interactúan con ácidos nucleicos, tales como factores de transcripción. Los TALE, por otro lado, se encuentran en repeticiones con una relación de reconocimiento uno a uno entre los aminoácidos y los pares de nucleótidos reconocidos. Debido a que tanto los dedos de zinc como los TALE ocurren en patrones repetidos, se pueden probar diferentes combinaciones para crear una amplia variedad de especificidades de secuencia. Los enfoques para fabricar endonucleasas de dedos de zinc específicas para del sitio incluyen, por ejemplo, ensamblaje modular (donde los dedos de zinc correlacionados con una secuencia de triplete se unen en una fila para cubrir la

secuencia requerida), OPEN (selección de dominios peptídicos de baja rigurosidad frente a triplete de nucleótidos seguida de selecciones de alta rigurosidad de una combinación de péptidos frente a la diana final en sistemas bacterianos) y selección bacteriana de un híbrido de bibliotecas de dedos de zinc, entre otros. Las ZFN para usar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden obtener comercialmente de, por ejemplo, Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA).

En el presente documento se contempla que el sistema Cas9/CRISPR de edición del genoma se emplee con los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Los sistemas de grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR)/asociados a CRISPR (Cas) son útiles para la edición del genoma programable por ARN (véase, por ejemplo, Jinek, M. *et al.* Science (2012) 337(6096):816-821).

El ARNcr transactivador (ARNcrtra) es un pequeño RNA codificado en trans. Se descubrió por primera vez en el patógeno humano *Streptococcus pyogenes*. (véase Deltcheva E, *et al.* (2011). Nature 471 (7340): 602-7). En bacterias y arqueas, CRISPR/Cas (agrupaciones de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares/proteínas asociadas a CRISPR) constituye un sistema de defensa mediado por ARN que protege contra virus y plásmidos. Esta ruta defensiva tiene tres etapas. Primero se integra una copia del ácido nucleico invasor en el locus CRISPR. A continuación, los ARN CRISPR (ARNcr) se transcriben a partir de este locus CRISPR. Los ARNcr se incorporan luego en complejos efectores, donde el ARNcr guía al complejo hacia el ácido nucleico invasor y las proteínas Cas degradan este ácido nucleico. (Véase Terns MP y Terns RM (2011). Curr Opin Microbiol 14 (3): 321-7). Existen varias rutas de activación de CRISPR, una de las cuales requiere un ARNcrtra que juega un papel en la maduración del ARNcr. El ARNcrtra es complementario y se empareja con un pre-ARNcr que forma un dúplex de ARN. Este se escinde mediante ribonucleasa III, una ribonucleasa específica de ARN, para formar un híbrido ARNcr/ARNcrtra. Este híbrido actúa como guía para la endonucleasa Cas9, que escinde el ácido nucleico invasor. (véase Deltcheva E, *et al.* mencionado anteriormente; Jinek M, *et al.* (2012), Science 337 (6096): 816-21; y Brouns SJ (2012), Science 337 (6096): 808-9).

Alternativamente, la edición del genoma se puede realizar utilizando genomodificación del genoma basada en virus adenoasociado recombinante (rAAV, por sus siglas en inglés), que es una plataforma de edición del genoma centrada en el uso de vectores rAAV que permiten la inserción, eliminación o sustitución de secuencias de ADN en los genomas de células de mamíferos vivos. El genoma de rAAV es una molécula de ácido desoxirribonucleico monocatenario (ADNmc), ya sea positivo o negativo, que tiene aproximadamente 4,7 kilobases de largo. Estos vectores víricos de ADN monocatenario tienen altas tasas de transducción y tienen la propiedad única de estimular la recombinación homóloga endógena en ausencia de causar roturas del ADN bicatenario en el genoma. Un experto en la materia puede diseñar un vector rAAV para dirigirse a un locus genómico deseado y realizar alteraciones génicas endógenas tanto visibles como sutiles en una célula, tales como una eliminación. La edición del genoma con rAAV tiene la ventaja de que se dirige a un solo alelo y no da como resultado alteraciones genómicas fuera de la diana. La tecnología de edición del genoma con rAAV está disponible comercialmente, por ejemplo, el sistema rAAV GENESIS™ de Horizon™ (Cambridge, Reino Unido).

Vehículos farmacéuticamente aceptables

Los métodos de administración de células progenitoras hematopoyéticas humanas o células genomodificadas descritas en el presente documento o su progenie a un sujeto como se describe en el presente documento implican el uso de composiciones terapéuticas que comprenden células progenitoras hematopoyéticas. Las composiciones terapéuticas contienen un vehículo fisiológicamente tolerable junto con la composición celular y, opcionalmente, al menos un agente bioactivo adicional como se describe en el presente documento, disuelto o dispersado en la misma como principio activo. En una realización preferida, la composición terapéutica no es sustancialmente inmunogénica cuando se administra a un mamífero o paciente humano con fines terapéuticos, a menos que se desee.

En general, las células progenitoras hematopoyéticas descritas en el presente documento o las células genomodificadas descritas en el presente documento o su progenie se administran como una suspensión con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un experto en la materia reconocerá que un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en una composición celular no incluirá tampones, compuestos, agentes de crioconservación, conservantes u otros agentes en cantidades que interfieran sustancialmente con la viabilidad de las células que se van a administrar al sujeto. Una formulación que comprende células puede incluir, por ejemplo, tampones osmóticos que permiten mantener la integridad de la membrana celular y, opcionalmente, nutrientes para mantener la viabilidad celular o mejorar el injerto tras la administración. Dichas formulaciones y suspensiones son conocidas por los expertos en la materia y/o pueden adaptarse para usar con las células progenitoras hematopoyéticas como se describe en el presente documento usando experimentación rutinaria.

Una composición celular también se puede emulsionar o presentar como una composición de liposomas, siempre que el procedimiento de emulsificación no afecte negativamente a la viabilidad celular. Las células y cualquier otro principio activo puede mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo y en cantidades adecuadas para usar en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento.

Los agentes adicionales incluidos en una composición celular como se describe en el presente documento pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes de la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables

incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos, tales como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares. Los vehículos fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de vehículos líquidos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los principios activos y agua, o contienen un tampón tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina tamponada con fosfato. Es más, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tamponante, así como sales tales como cloruro de sodio y de potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y excluyendo el agua. Ejemplos de dichas fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón y emulsiones de agua y aceite. La cantidad de un compuesto activo usado en las composiciones celulares como se describe en el presente documento que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar.

En algunas realizaciones, las composiciones de células aisladas modificadas por ingeniería genética descritas comprenden además un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable no incluye medios de cultivo celular o tisular.

En algunas realizaciones, las composiciones de moléculas de ácido nucleico descritas comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable no incluye medios de cultivo celular o tisular.

En algunas realizaciones, las composiciones de vector que comprenden las moléculas de ácido nucleico descritas comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable no incluye medios de cultivo celular o tisular.

Administración y eficacia

Como se usa en el presente documento, los términos "administración", "introducción" y "trasplante" se usan indistintamente en el contexto de la colocación de células, por ejemplo, una célula progenitora hematopoyética, como se describe en el presente documento en un sujeto, mediante un método o ruta que da como resultado la ubicación al menos parcial de las células introducidas en un sitio deseado, tal como un lugar de lesión o reparación, de manera que se produzcan los efectos deseados. Las células, por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas, o su progenie diferenciada, pueden administrarse mediante cualquier ruta apropiada que dé como resultado la administración a una ubicación deseada en el sujeto donde al menos una parte de las células implantadas o componentes de las células permanecen viables. El período de viabilidad de las células después de la administración a un sujeto puede ser tan breve como unas pocas horas, por ejemplo, veinticuatro horas, a unos días, hasta varios años, es decir, injerto a largo plazo. Por ejemplo, en algunas realizaciones de los aspectos que se describen en el presente documento, se administra una cantidad eficaz de células progenitoras hematopoyéticas o células genomodificadas con expresión reducida de BCL11A a través de una vía de administración sistémica, tal como una vía intraperitoneal o intravenosa.

Cuando se proporcionan de manera profiláctica, las células progenitoras hematopoyéticas o las células genomodificadas con expresión reducida de BCL11A descritas en el presente documento se pueden administrar a un sujeto antes de cualquier síntoma de hemoglobinopatía, por ejemplo, antes del cambio de γ-globina fetal a predominantemente β-globina. En consecuencia, la administración profiláctica de una población de células progenitoras hematopoyéticas sirve para prevenir una hemoglobinopatía, como se divulga en el presente documento.

Cuando se proporcionan de manera terapéutica, las células progenitoras hematopoyéticas se proporcionan en (o después de) el inicio de un síntoma o indicación de una hemoglobinopatía, por ejemplo, tras la aparición de anemia de células falciformes.

En algunas realizaciones de los aspectos que se describen en el presente documento, la población de células progenitoras hematopoyéticas o células genomodificadas con expresión reducida de *BCL11A* que se administra de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento comprende células progenitoras hematopoyéticas alogénicas obtenidas de uno o más donantes. Como se usa en el presente documento, "alogénico" se refiere a una célula progenitora hematopoyética o muestras biológicas que comprenden células progenitoras hematopoyéticas obtenidas de uno o más donantes diferentes de la misma especie, donde los genes en uno o más loci no son idénticos. Por ejemplo, una población de células progenitoras hematopoyéticas o células genomodificadas con expresión reducida de *BCL11A* que se administra a un sujeto puede proceder de la sangre del cordón umbilical obtenida de uno más sujetos donantes no emparentados, o de uno o más hermanos no idénticos. En algunas realizaciones, se pueden utilizar poblaciones de células progenitoras hematopoyéticas singénicas, tales como las obtenidas de animales genéticamente idénticos o de gemelos idénticos. En otras realizaciones de este aspecto, las células progenitoras hematopoyéticas son células autólogas; es decir, las células progenitoras hematopoyéticas se obtienen o se aíslan de un sujeto y se administran al mismo sujeto, es decir, el donante y el receptor son el mismo.

Para usar en los diversos aspectos descritos en el presente documento, una cantidad eficaz de células progenitoras hematopoyéticas o células genomodificadas con expresión reducida de BCL11A, comprende al menos 10^2 células, al menos 5 x 10^2 células, al menos 10^3 células, al menos 5 x 10^3 células, al menos 10^4 células, al menos 5 x 10^4 células, al menos 10^5 células, al menos 2 x 10^5 células, al menos 3 x 10^5 células, al menos 4 x 10^5 células, al menos 5 x 10^5 células, al menos 6 X 10^5 células progenitoras hematopoyéticas, al menos 7 x 10^5 células, al menos 8 x 10^5 células, al menos 9 x 10^5 células, al menos 1 x 10^6 células, al menos 2 x 10^6 células, al menos 3 x 10^6 células, al menos 4 x 10^6 células, al menos 5 x 10^6 células, al menos 6 x 10^6 células, al menos 7 x 10^6 células, al menos 8 x 10^6 células, al menos 9 X 10^6 células, o múltiplos de las mismas. Las células progenitoras hematopoyéticas o las células genomodificadas con expresión reducida de *BCL11A* pueden proceder de uno o más donantes, o pueden obtenerse de una fuente autóloga. En algunas realizaciones de los aspectos que se describen en el presente documento, las células progenitoras hematopoyéticas se expanden en cultivo antes de la administración a un sujeto que lo necesite.

En una realización, la expresión "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una población de células progenitoras hematopoyéticas humanas o su progenie necesaria para aliviar al menos uno o más síntomas de una hemoglobinopatía, y se refiere a una cantidad suficiente de una composición para proporcionar el efecto deseado, por ejemplo, tratar a un sujeto que tenga una hemoglobinopatía. Por tanto, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de células progenitoras hematopoyéticas, o células genomodificadas descritas en el presente documento o su progenie o una composición que comprende células progenitoras hematopoyéticas, o células genomodificadas descritas en el presente documento o su progenie que es suficiente para promover un determinado efecto cuando se administra a un sujeto normal, tal como alguien que tiene o está en riesgo de tener una hemoglobinopatía. Una cantidad eficaz como se usa en el presente documento también incluiría una cantidad suficiente para prevenir o retrasar el desarrollo de un síntoma de la enfermedad, alterar el curso de un síntoma de la enfermedad (por ejemplo, pero sin limitación, retardar la progresión de un síntoma de la enfermedad) o invertir un síntoma de la enfermedad. Se entiende que para cualquier caso dado, puede determinarse una "cantidad eficaz" adecuada por un experto habitual en la materia usando experimentación rutinaria.

Como se usa en el presente documento, "administrado" se refiere a la administración de una composición de células madre hematopoyéticas como se describe en el presente documento a un sujeto mediante un método o vía que da como resultado la localización al menos parcial de la composición celular en un sitio deseado. Una composición celular puede administrarse mediante cualquier vía apropiada que dé como resultado un tratamiento eficaz en el sujeto, es decir, la administración da como resultado la administración a una ubicación deseada en el sujeto donde se administra al menos una parte de la composición, es decir, al menos 1 x 10^4 células se administran al sitio deseado durante un período de tiempo. Los modos de administración incluyen inyección, infusión, instilación o ingestión. "Inyección" incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebroespinal e inyección e infusión intraesternal. Para la administración de células, se prefiere generalmente la administración mediante inyección o infusión.

En una realización, las células descritas en el presente documento se administran por vía sistémica. Las expresiones "administración sistémica", "administrado/a por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado/a periféricamente", como se usa en el presente documento, se refieren a la administración de una población de células progenitoras hematopoyéticas distintas de las directamente en un sitio, tejido u órgano diana, tal que entra, en cambio, al sistema circulatorio del sujeto y, por tanto, se somete al metabolismo y otros procesos similares.

La eficacia de un tratamiento que comprende una composición como se describe en el presente documento para el tratamiento de una hemoglobinopatía se puede determinar por un médico experto. Sin embargo, un tratamiento se considera "tratamiento eficaz", como se usa la expresión en el presente documento, si alguno o todos los signos o síntomas de, como un solo ejemplo, los niveles de β-globina fetal se alteran de manera beneficiosa, otros síntomas o marcadores de enfermedad clínicamente aceptados favorecen o mejoran, por ejemplo, en al menos un 10 % después del tratamiento con un inhibidor. La eficacia también puede medirse mediante la incapacidad de un individuo para empeorar según la evaluación de la hospitalización o la necesidad de intervenciones médicas (por ejemplo, la progresión de la enfermedad se detiene o al menos se ralentiza). Los expertos en la materia conocen métodos para medir estos indicadores y/o se describen en el presente documento. El tratamiento incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en un individuo o un animal (algunos ejemplos no limitantes incluyen un ser humano o un mamífero) e incluye: (1) inhibir la enfermedad, por ejemplo, detener o ralentizar la progresión de la sepsis; o (2) aliviar la enfermedad, por ejemplo, provocando regresión de los síntomas; y (3) prevenir o reducir la probabilidad de desarrollo de infección o sepsis.

El tratamiento de acuerdo con la presente invención mejora uno o más síntomas asociados con un trastorno de la β-globina mediante el aumento de la cantidad de hemoglobina fetal en el individuo. Los síntomas normalmente asociados con una hemoglobinopatía, incluyen, por ejemplo, anemia, hipoxia tisular, disfunción de órganos, valores anormales de hematocrito, eritropoyesis ineficaz, recuento anormal de reticulocitos (eritrocitos), carga anormal de hierro, la presencia de sideroblastos anulares, esplenomegalia, hepatomegalia, alteración del flujo sanguíneo periférico, disnea, aumento de la hemólisis, ictericia, crisis de dolor anémico, síndrome torácico agudo, secuestro esplénico, priapismo, ictus, síndrome mano-pie y dolor tal como angina de pecho.

En una realización, la célula progenitora hematopoyética se pone en contacto *ex vivo* o *in vitro* con una endonucleasa dirigida al ADN, y la célula o su progenie se administra al mamífero (por ejemplo, un ser humano). En una realización adicional, la célula progenitora hematopoyética es una célula del linaje eritroide. En una realización, una composición comprende una célula progenitora hematopoyética que se puso previamente en contacto con una endonucleasa dirigida al ADN y un vehículo farmacéuticamente aceptable y se administra a un mamífero.

En una realización, cualquier método conocido en la materia puede usarse para medir un aumento en la expresión de hemoglobina fetal, por ejemplo, análisis de transferencia Western de proteína de hemoglobina fetal y cuantificación de ARNm de γ-globina fetal.

En una realización, la célula progenitora hematopoyética se pone en contacto con una endonucleasa dirigida al ADN *in vitro,* o *ex vivo.* En una realización, la célula es de origen humano (por ejemplo, una célula autóloga o heteróloga). En una realización, la composición provoca un aumento en la expresión de hemoglobina fetal.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo que no debe interpretarse como limitantes.

EJEMPLO 1

Los inventores han descubierto y caracterizado elementos reguladores del gen *BCL11A* que son esenciales para su expresión en células de linaje eritroide. Las variantes genéticas comunes dentro de estas secuencias están asociadas con el nivel de hemoglobina fetal y la intensidad del trastorno de beta-globina. Estas secuencias comprenden elementos reguladores distales con un distintivo de cromatina potenciadora, que poseen cromatina accesible, marcas de histonas activas y ocupación por factores de transcripción eritroides. Estos elementos interactúan con el promotor de *BCL11A* y promueven la expresión génica en células eritroides, pero no en otros linajes que expresan BCL11A tales como linfocitos β. Estos elementos reguladores pueden dirigirse con fines terapéuticos para lograr la inhibición de BCL11A y la reinducción de hemoglobina fetal. Esto se puede lograr mediante mecanismos que no se limitan a la edición del genoma, unión a ácidos nucleicos o proteínas, y modificación epigenética. Las ventajas de este método incluyen: alteración de un regulador fisiológico del nivel de hemoglobina fetal que da como resultado un aumento de la producción de gamma-globina y una reducción de la producción de beta-globina; efecto mínimo sobre la producción total de globina o sobre la producción o función de glóbulos rojos; limitación del impacto en células fuera del linaje eritroide, reduciendo así la posible toxicidad.

Los potenciadores se describen clásicamente como elementos genéticos distales capaces de regular positivamente la expresión génica de una manera independiente de la orientación en experimentos de expresión de ganancia de función ectópica heteróloga[1]. Estos elementos coordinan cuándo, dónde y cómo se expresan los genes. Las secuencias del potenciador se unen a factores de transcripción y reguladores de cromatina y se correlacionan con características específicas de la cromatina, incluyendo la metilación reducida del ADN, modificaciones características de las histonas, mayor accesibilidad a la cromatina, interacciones promotoras de largo alcance y transcripción bidireccional. El mapeo de cromatina reciente ha demostrado la abundancia de elementos reguladores distales que llevan un distintivo de cromatina potenciadora[2-8].

La importancia biológica de los potenciadores se subraya mediante estudios de expresión génica que muestran el poder predictivo del perfil del potenciador en programas específicos de linaje[9-12]. Potenciadores muy marcados y agrupados (por ejemplo, los denominados potenciadores fuertes, potenciadores de estiramiento, o superpotenciadores) son particularmente indicativos de identidad celular y pueden ayudar a inferir factores reguladores específicos de linaje[13-15]. Los estudios de asociación de todo el genoma revelan un enriquecimiento de variantes asociadas a rasgos en secuencias que llevan distintivos de potenciadores restringidos por linaje[7,13,16-19]. Los potenciadores muestran signos de restricción evolutiva, así como una mayor rotación con evidencia de selección positiva[20-25].

A pesar de su importancia, los potenciadores se definen normalmente por criterios no relacionados con los requisitos funcionales *in situ*. Los avances en el mapeo de presuntos potenciadores, así como de síntesis de oligonucleótidos a gran escala, facilitan ensayos de indicadores de potenciadores en una escala masivamente paralela, permitiendo una evaluación sistemática de la importancia funcional de las secuencias potenciadoras[26-30]. Sin embargo, los ensayos de potenciadores heterólogos ectópicos no pueden abordar la necesidad de un elemento en su entorno de cromatina nativa. La creciente apreciación de la distribución no aleatoria de elementos distales tanto con respecto al genoma lineal (por ejemplo, en grupos de superpotenciadores) como dentro del entorno nuclear tridimensional enfatiza la importancia de estudiar los potenciadores mediante la perturbación de su condición endógena[15,31].

Se han realizado observaciones perspicaces mediante la mutagenización de potenciadores utilizando enfoques genéticos moleculares tradicionales[32,33]. Sin embargo, el bajo rendimiento de estos métodos clásicos limita su aplicación generalizada. Además, el elevado recambio de muchas secuencias potenciadoras entre especies puede limitar la capacidad de derivar conclusiones de organismos no humanos con respecto a la regulación de genes humanos. Los avances en la tecnología de edición del genoma hacen práctica la fácil modificación del genoma

humano[34,35]. Los estudios de grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR)-Cas9 de alto rendimiento han revelado nuevos genes necesarios para varios procesos biológicos[36-41]. La edición del genoma también es adecuada para el estudio de elementos genéticos no codificantes, tales como potenciadores, aunque estos experimentos se han realizado previamente a bajo rendimiento[42-44].

Materiales y métodos

Diseño y síntesis de bibliotecas de ARNgu lentivíricos humanos y de ratón. Cada secuencia de 20 meros cadena arriba de una secuencia PAM NGG o NAG en la hebra de sentido o de antisentido se identificó tanto para el sitio hipersensible a la desoxirribonucleasa (DHS) ortólogo +55, +58 y +62 humano y de ratón, así como para el exón 2 de *BCL11A/Bcl11a* (Figuras 6-11). En relación con el genoma de referencia humano de hg19, se usó una referencia con las siguientes sustituciones para aproximar un haplotipo común asociado con HbF baja: rs1427407-G, rs1896293-T, rs6706648-T, rs6738440-G, rs7606173-C. Cada uno de los oligonucleótidos de ARNgu se sintetizó como se describió previamente 37, 41, 64 y se clonó usando una mezcla maestra de ensamblaje Gibson (New England Biolabs) en lentiGuide-Puro (plásmido Addgene ID 52963) digerido con BsmBI, purificado por PCR y desfosforilado. Los productos de ensamblaje Gibson se transformaron en células E. cloni® (Lucigen) electrocompetentes. Se aislaron suficientes colonias para asegurar una cobertura de biblioteca de ~ 90X para bibliotecas de seres humanos y ratones. Las bibliotecas de plásmidos se secuenciaron en profundidad (descritas a continuación) para confirmar la representación.

Para hacer lentivirus, se cultivaron células HEK293T con medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Life Technologies) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % (Omega Scientific) y penicilina-estreptomicina al 2 % (Life Technologies) en placas de Petri tratadas con cultivo de tejido de 15 cm. Se transfectaron HEK293T al 80 % de confluencia en 12 ml de medio con 13,3 µg de psPAX2, 6,7 µg de VSV-G y 20 µg del plásmido de construcción lentivírico de interés utilizando 180 µg de polietilenimina ramificada (Sigma). El medio se cambió 16-24 horas después de la transfección. El sobrenadante lentivírico se recogió a las 48 y 72 horas después de la transfección y posteriormente se concentró por ultracentrifugación (24.000 rpm durante 2 horas a 4 °C con rotor Beckman Coulter SW 32 Ti).

Selección CRISPR-Cas9 agrupada en mosaico para el mapeo funcional in situ del potenciador eritroide de BCL11A humano. El clon 2 de HUDEP (HUDEP-2) se utilizó como lo describieron previamente Nakamura y sus colegas[49]. Las células HUDEP-2 se expandieron en StemSpan SFEM (Stem Cell Technologies) complementado con dexametasona 10^{-6} M (Sigma), 100 ng/ml de factor de células madre humanas (SCF) (R&D), 3 UI/ml de eritropoyetina (Amgen), L-glutamina al 1 % (Life Technologies) y penicilina/estreptomicina al 2 % (Life Technologies). Se incluyó 1 µg/ml de doxiciclina (Sigma) en el cultivo para inducir la expresión de los genes E6/E7 del virus del papiloma humano tipo 16[49]. Las células HUDEP-2 se diferenciaron en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) complementado con 330 µg/ml de holo-transferrina (Sigma), 10 µg/ml de insulina humana recombinante (Sigma), 2 UI/ml de heparina (Sigma), plasma AB combinado con detergente solvente humano al 5% (Rhode Island Blood Center), 3 UI/ml de eritropoyetina (Amgen), 100 ng/ml de factor de células madre humanas (SCF) (R&D), 1 µg/ml de doxiciclina (Sigma), L-glutamina al 1 % (Life Technologies) y penicilina/estreptomicina al 2 % (Life Technologies).

Las células HUDEP-2 con expresión de Cas9 estable se transdujeron a baja multiplicidad con el grupo de lentivirus de la biblioteca de ARNgu humano mientras estaban en medio de expansión. Se realizaron transducciones de control para asegurar que la tasa de transducción no excediera un 50 %. El número de células se mantuvo durante todo el experimento a niveles adecuados para superar la representación 1000X de la biblioteca. Se añadieron 10 µg/ml de blasticidina (Sigma) y 1 µg/ml de puromicina (Sigma) 24 horas después de la transducción para seleccionar los integrantes de la biblioteca lentivírica en las células con Cas9. Se cultivaron las células en medio de expansión durante una semana seguido de medio de diferenciación durante una semana adicional.

Se realizó tinción intracelular mediante la fijación de las células con glutaraldehído al 0,05 % (grado II) (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 350 g y luego se resuspendieron en Triton-X 100 al 0,1 % (Life Technologies) durante 5 minutos a temperatura ambiente para la permeabilización. Triton X-100 se diluyó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se centrifugó a 350 g durante 15 minutos. Las células se tiñeron con anticuerpos antihumanos para HbF (clon HbF-1 con conjugación con FITC o APC; Life Technologies) y anticuerpo de β-hemoglobina (clon 37-8 con conjugación con PerCP-Cy5 o PE; Santa Cruz) durante 20 minutos en oscuridad. Las células se lavaron para eliminar el anticuerpo no unido antes del análisis FACS. Se utilizaron 0,2 µg de HbF y 2 µg de anticuerpos de HbA (β-hemoglobina) por 5 millones de células. Las células de control expuestas a una muestra de ARNgu no dirigida y al exón 2 de BCL11A se utilizaron como controles negativo y positivo, respectivamente, para establecer las condiciones de citometría de flujo. Las poblaciones de células con un 10 % superior e inferior de expresión de HbF se clasificaron mediante FACS.

Después de clasificar los grupos de HbF-alta y HbF-baja, la preparación de la biblioteca y la secuenciación profunda se realizaron como se describió anteriormente[37]. En resumen, se extrajo ADN genómico utilizando el kit Qiagen Blood and Tissue. La reacción de PCR de Herculase (Agilent) utilizando cebadores específicos de lentiGuide-Puro, incluyendo una secuencia de manejo, se realizó de la siguiente manera: tampón de reacción Herculase II (1x), cebadores directos e inversos (0,5 µM cada uno), dimetilsulfóxido (DMSO) (8 %), trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) (0,25 mM cada uno), Herculase II Fusion ADN polimerasa (0,5 reacciones) usando las siguientes condiciones

de ciclo: 95 °C durante 2 minutos; 20 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 20 segundos, 72 °C durante 30 segundos; 72 °C durante 5 minutos. Se utilizaron múltiples reacciones de no más de 200 ng cada una para amplificar a partir de 6,6 µg de ADNg (~ 10e6 genomas de células) por grupo. Las muestras se sometieron a una segunda PCR utilizando cebadores específicos de manejo para añadir adaptadores e índices a cada muestra utilizando las siguientes condiciones: tampón de reacción Herculase II (1x), cebadores directos e inversos (0,5 µM cada uno), trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) (0,25 mM cada uno), Herculase II Fusion ADN polimerasa (0,5 reacciones) con las siguientes condiciones de ciclo: 95 °C durante 2 minutos; 25 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 20 segundos, 72 °C durante 30 segundos; 72 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR se procesaron en un gel de agarosa y la banda del tamaño esperado se purificó en gel. Se realizó la secuenciación de extremos emparejados Illumina MiSeq de 150 pb.

Se enumeraron las secuencias de ARNgu presentes en el conjunto de plásmidos, así como en los conjuntos de HbF alta y HbF baja. Las lecturas se normalizaron a la profundidad de secuenciación por biblioteca. La puntuación de errores se determinó mediante el cálculo de (1) la proporción de lecturas normalizadas en los grupos de HbF-alta en comparación con los grupos de HbF-baja; (2) transformación $\log_2$; y (3) mediana de copias biológicas. La puntuación de enriquecimiento de HbF se determinó mediante el cálculo de (1) la proporción de lecturas normalizadas en los grupos de HbF alta en comparación con los grupos de HbF baja; (2) transformación $\log_2$; y (3) mediana de copias biológicas. Después de la exclusión de ARNgu con puntuaciones de errores < 2^{-3} y ARNgu de PAM NAG, se hizo un gráfico QQ con una línea ajustada a través del primer y tercer cuantiles utilizando el programa informático R. Las secuencias de ARNgu se mapearon en el genoma humano (hg19) con posiciones de escisión establecidas entre las posiciones 17 y 18 dadas las posiciones de PAM[21-23]. Para comparaciones visuales con los ARNgu dirigidos, los ARNgu no dirigidos se seudomapearon cada uno separado por 5 pb.

Validación en células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) CD34+ humanas primarias. Las HSPC CD34+ humanas primarias de donantes adultos sanos movilizados con G-CSF se obtuvieron del Center of Excellence in Molecular Hematology en el Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington. Las HSPC CD34+ se sometieron a cultivo líquido de diferenciación eritroide como se describió anteriormente[65]. En resumen, las HSPC se descongelaron el día 0 en un medio de diferenciación eritroide (EDM) que consistía en IMDM complementado con 330 µg/ml de transferrina holohumana (Sigma), 10 µg/ml de insulina humana recombinante (Sigma), 2 UI/ml de heparina (Sigma), plasma AB combinado con detergente solvente humano al 5% (Rhode Island Blood Center), 3 UI/ml de eritropoyetina (Amgen), L-glutamina al 1 % (Life Technologies) y penicilina/estreptomicina al 2 % (Life Technologies). Durante los días 0-7 de cultivo, el EDM se complementó aún más con hidrocortisona 10^{-6} M (Sigma), 100 ng/ml de SCF humano (R&D) e IL-3 humana (R&D). Durante los días 7-11 de cultivo, el EDM se complementó solo con 100 ng/ml de SCF. Durante los días 11-18 de cultivo, el EDM no tuvo complementos adicionales.

Las HSPC se transdujeron con LentiCas9-Blast (plásmido Addgene ID 52962) 24 horas después de la descongelación en presencia de prostaglandina E2 (PGE2) 10 µM (Cayman Chemical). A las 48 horas posteriores a la descongelación, se cambió el medio y las células se transdujeron con LentiGuide-Puro o LentiGuide-Crimson clonadas con la secuencia de ARNgu relevante en presencia de PGE2 10 µM. A las 72 horas posteriores a la descongelación, se cambió el medio y se seleccionaron las HSPC con 10 µg/ml de blasticidina (Sigma) y 1 µg/ml de puromicina (Sigma) o 10 µg/ml de blasticidina seguido de clasificación para células LentiGuide-Crimson+ el día 16 de cultivo. La selección de blasticidina y/o puromicina se produjo entre los días 3 y 8 de cultivo.

La diferenciación se evaluó el día 18 de cultivo utilizando anticuerpos antihumanos contra el receptor de transferrina (CD71) [Clon OKT9 con conjugación con FITC; eBioscience] y glucoforina A (CD235a) [Clon HIR2 con conjugación con PE; eBioscience]. La desnucleación se evaluó usando 2 µg/ml del tinte de ADN permeable a las células Hoescht 33342 (Life Technologies). Se determinó que las células CD235a+Hoescht 33342 eran células eritroides desnucleadas. Las células se tiñeron intracelularmente para HbF y HbA el día 18 de cultivo como se describió anteriormente. Se centrifugaron 50.000-100.000 células en portaobjetos de microscopio a 350 rpm durante 4 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con tinción Harleco May-Grünwald (Millipore) durante dos minutos, Tinción de Giemsa (Sigma) durante 12 minutos y dos lavados con agua durante 30 segundos cada uno. Los portaobjetos se secaron al aire y luego se cubrieron con un medio de montaje Fisher Chemical Permount (Fisher).

Se diseñaron cebadores de PCR para amplificar el sitio de escisión genómica para un ARNgu dado. Los productos de PCR resultantes se sometieron a secuenciación de Sanger. Los indicios de secuenciación se utilizaron para editar la cuantificación mediante una herramienta disponible públicamente descrita anteriormente[66].

Generación de eliminaciones genómicas en células HUDEP-2. Se transdujeron lentivirus de ARNgu en tándem en HUDEP-2 con expresión de Cas9 estable (Tabla 1). Los cultivos a granel se incubaron durante 7-10 días con selección de blasticidina (Sigma) 10 µg/ml y puromicina (Sigma) 1 µg/ml para permitir la edición. Luego, los cultivos a granel se sembraron clonalmente en dilución limitante. Se excluyeron las placas de 96 pocillos con más de 30 clones por placa para evitar clones mixtos. Después de aproximadamente 14 días de expansión clonal, el ADN genómico se extrajo usando 50 µl de Solución de Extracción de ADN QuickExtract por pocillo (Epicenter). Los clones se seleccionaron para la eliminación mediante PCR convencional con una reacción de PCR interna al segmento que se eliminará ('banda de no eliminación') y una reacción de PCR con huecos a través de la unión de eliminación ('banda de eliminación') que solo se amplificaría en presencia de eliminación[50,67]. Los clones con eliminación bialélica se identificaron como la

ausencia de la banda de PCR de no eliminación y la presencia de la banda de PCR de eliminación. Los clones de inversión se identificaron como se describió previamente mediante PCR[50,67] (Tabla 3). Brevemente, los clones de inversión tenían un alelo invertido y un alelo eliminado sin la presencia de alelos sin eliminación. En la presente experiencia, los clones de inversión bialélica son eventos muy raros68. La PCR se realizó utilizando la mezcla maestra Qiagen HotStarTaq 2x y las siguientes condiciones de ciclo: 95 °C durante 15 minutos; 35 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1 minuto; 72 °C durante 10 minutos. Alternativamente, La PCR también se realizó usando 2x Accuprime Supermix II (Life Technologies) con las siguientes condiciones de ciclo: 94 °C durante 2 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 20 segundos, 68 ° C durante 1 min/kb de producto de PCR; 68 °C durante 5 minutos. Se extrajo ARN de cada clon positivo usando un kit (Qiagen) y se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real usando iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Los cebadores utilizados se encuentran en la Tabla 5.

Selección CRISPR/Cas9 agrupada para mapeo funcional de alta resolución del potenciador de BCL11A de ratón. Se cultivaron células de eritroleucemia murina (MEL, por sus siglas en inglés) en DMEM complementado con FBS al 10 % (Omega Scientific), L-glutamina al 1 % (Life Technologies) y penicilina-estreptomicina al 2 % (Life Technologies). Se transdujeron células MEL informadoras de εy:mCherry con expresión estable de Cas9 a baja multiplicidad con el grupo de lentivirus de la biblioteca de ARNgu de ratón. Se realizaron transducciones de control para asegurar que la tasa de transducción no excediera un 50 %. El número de células se mantuvo durante todo el experimento a niveles adecuados para superar la representación 1000X de la biblioteca. Se añadieron 10 µg/ml de blasticidina (Sigma) y 1 µg/ml de puromicina (Sigma) 24 horas después de la transducción para seleccionar los integrantes de la biblioteca lentivírica en las células con Cas9. Posteriormente, las células se cultivaron durante dos semanas. El 5 % superior e inferior de las células que expresan εy-mCherry expuestas a la biblioteca se clasificaron mediante FACS. Se utilizó una muestra de ARNgu no dirigida como control negativo y el exón 2 de *Bcl11a* como control positivo para establecer las condiciones de citometría de flujo. Después de la clasificación, la preparación de la biblioteca y la secuenciación profunda se realizaron como se describe para la biblioteca humana[37].

Se enumeraron secuencias de ARNgu presentes en los conjuntos Hbb-εy:mCherry-alto y Hbb-εy:mCherry-bajo. Las puntuaciones de error y enriquecimiento se calcularon como se describe para la selección humana. Las secuencias de ARNgu se mapearon luego al genoma de ratón (mm9).

Generación de eliminaciones genómicas en células MEL. Se generaron eliminaciones en células MEL usando dos ARNgu como se describió anteriormente[50,67]. En resumen, las secuencias de ARNgu se clonaron en pX330 (plásmido Addgene ID 42230) usando una estrategia de clonación de ensamblaje Golden Gate (Tabla 1 y 4). Las células MEL se sometieron a electroporación con 5 µg de cada plásmido pX330-ARNgu y 0,5 µg de pmax-GFP (Lonza) en tampón de electroporación BTX usando un electroporador BTX (Harvard Apparatus). Aproximadamente 48 horas después de la electroporación, el 1-3 % superior de las células GFP+ se clasificaron y se sembraron clonalmente en una dilución limitante. Se permitió que los clones crecieran durante 7-10 días. Los clones se seleccionaron para su eliminación mediante PCR convencional utilizando la misma estrategia que con las células HUDEP-2[50,67] (Tabla 2). Los clones de inversión se identificaron mediante PCR como se describió anteriormente[50,67] (Tabla 3).

Generación de eliminaciones genómicas en células madre embrionarias de ratón β-YAC (mESC). Las mESC se mantuvieron en fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (GlobalStem) y se cultivaron con DMEM con alto contenido de glucosa (Life Technologies) complementado con suero bovino fetal al 20 % (Omega Scientific), L-glutamina (Life Technologies), penicilina/estreptomicina (Life Technologies), aminoácidos no esenciales (Life Technologies), nucleósidos, β-mercaptoetanol (Sigma) y factor inhibidor de la leucemia (Millipore). Las células se pasaron usando tripsina al 0,25 % (Life Technologies).

La línea de ratón β-YAC (A20), descrita previamente como que contiene un transgén que abarca -150 kb del locus de β-globina humana[55], se utilizó para analizar la expresión de globina humana. La línea de ratón se mantuvo en un estado hemicigoto y se usó para la creación de una línea de mESC β-YAC o se crió con ratones con eliminación de *Bcl11a* en +62. Los ratones con eliminación de *Bcl11a* en +62 procedían de células ES CJ9 modificadas con CRISPR/Cas9. Usando reactivo de transfección de células ES de Amaxa (Lonza), se sometieron a electroporación dos millones de células CJ9 con 2 µg de cada vector de plásmido pX330 que contenía secuencias diana individuales que flanqueaban el sitio +62 junto con 0,5 µg de un plásmido GFP. Después 48 horas, se clasificó el 5 % superior de las células que expresan GFP, se colocaron en placas sobre fibroblastos irradiados y se mantuvieron. A continuación, se seleccionaron colonias de células ES individuales y se analizaron en busca de eliminación bialélica utilizando la misma estrategia que con las células HUDEP-2 y MEL[50,67]. El ADN para la selección de clones modificados con CRISPR/Cas9 se obtuvo a partir de clones de células ES adaptadas a gelatina para evitar la contaminación genómica de los fibroblastos.

Se usaron clones dirigidos correctamente con más de un 80 % de cariotipo normal para generar ratones. Se inyectaron clones en blastocistos C57B16 de 2,5 días y se implantaron en hembras seudoembarazadas. En días específicos de desarrollo, se tomaron embriones y se analizaron para determinar el quimerismo y la expresión de globina humana mediante qPCR. El análisis de la expresión génica de la globina humana del hígado fetal en los embriones quiméricos en desarrollo demostró un retraso de dos días en los patrones de cambio de globina en comparación con los embriones β-YAC no quiméricos con el punto temporal más temprano para una represión sólida de γ-globina en el día embrionario

16,5 $(E16.5)_{55}$. Adicionalmente, se utilizó citometría de flujo para analizar tanto el hígado fetal como el bazo de los embriones E18.5. Se prepararon suspensiones de células individuales mediante disociación mecánica y las células se tiñeron con IgM-FITC (Clon II-41; eBioscience, CD19-PerCP-Cy5.5 (Clon 1D3; eBioscience, CD43-PE (clon S7; eBioscience, AA4.1-PE-Cy7 (Clon AA4.1; BD Biosciences), B220-APC (RA3-6B2; Biolegend) y DAPI (Invitrogen).

Ensayos hematopoyéticos en ratones adultos. Se obtuvo sangre periférica de la vena de la cola de ratones de 4 semanas de edad. Se recogió sangre en tubos recubiertos de heparina, los glóbulos rojos se lisaron con dextrano al 2 % (Sigma) y se tiñeron con los siguientes anticuerpos antiratón: CD3e-FITC (Clon 145-2C11; Biolegend), CD19-PerCP-Cy5.5 (Clon 1D3; eBioscience, CD71-PE (clon C2; BD Biosciences), NK1.1-PE-Cy5 (Clon PK136; Biolegend), Ter119-APC (Clon TER-119; Biolegend), Gr-1-eF450 (Clon RB6-8C5; eBioscience, B220-BV605 (RA3-6B2; Biolegend), Mac-1-BV510 (Clon M1/70; Biolegend) y 7-AAD (BD Biosciences).

Análisis informático. ChIP-seq H3K27ac humano se obtuvo de Xu *et al.*[12] y ChIP-seq H3K27ac de ratón se obtuvo de Kowalczyk et al.[69]. El análisis de superpotenciadores se realizó utilizando el algoritmo ROSE disponible públicamente[15].

Se realizó la segmentación del modelo oculto de Markov (HMM) para segmentar automáticamente las señales de puntuación de enriquecimiento en regiones del potenciador con efecto activo, represivo y neutro. Se diseñó un HMM con 3 estados utilizando el paquete GHMM obtenido del sitio web sourceforge. La probabilidad de emisión para cada estado se modeló como una distribución gaussiana y se permitieron todas las posibles transiciones entre estados. Dado que la señal no se obtuvo con una resolución genómica constante, se interpoló y suavizó la señal usando un núcleo gaussiano de más de 12 pb. Para configurar los parámetros iniciales, usaron los percentiles 1 %, 50 % y 99 % de la señal suavizada para el previo de los medios de los estados represivo, neutro y activo respectivamente, mientras que el previo para la desviación estándar se estableció en 0,001 para los tres estados.

Se realizó un análisis de motivos para evaluar las regiones potenciadoras humanas y de ratón en busca de posibles sitios de unión para factores de transcripción conocidos. Se usó el programa informático FIMO con un umbral de valor de $p < 10^{-4}$ [70]. Para cada región se extrajeron secuencias utilizando los ensamblajes hg19 y mm9 respectivamente para seres humanos y ratones. La base de datos de motivos fue la última versión de la base de datos JASPAR[39].

Las lecturas de extremos emparejados de secuenciación profunda de los amplicones genómicos de los sitios diana de edición del genoma se filtraron primero para obtener lecturas con una puntuación de calidad PHRED < 30, se combinaron con el programa informático FLASH (Ajuste rápido de longitud de lecturas cortas) y, posteriormente, se alinearon con un amplicón de referencia utilizando el alineador de agujas del conjunto EMBOSS, obtenido del sitio web sourceforge, para cuantificar inserciones y eliminaciones. La frecuencia de eliminación por nucleótidos de una posición, la inserción directamente adyacente a la posición, o la ausencia de mutación en la posición se cuantificó utilizando CRISPResso, obtenido del sitio web github, bajo lucapinello y CRISPResso.

Clonación lentiCas9-Venus. Se amplificó la plantilla Venus[71] mediante PCR para añadir sitios de restricción BamHI-HF (en 5') y EcoRI-HF (en 3') con fines de clonación utilizando las siguientes condiciones: tampón KOD (1x), MgSO4 (1,5 mM), dNTP (0,2 mM cada uno), cebador directo (0,3 µM; GGCCGGCCGGATCCGGCGCAACAAACTTCTCTCTGCTGAAACAAGCCGGAGATGTCGAAGA GAATCCTGGACCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA; SEQ. ID. NO: 145), cebador inverso (0,3 µM; GGCCGGCCgaattcTTACTTGTACAGCTCGTCCA, SEQ. ID. NO: 146) y KOD Hot Start ADN polimerasa (0,02 U/µl) (Millipore). La reacción de KOD PCR utilizó las siguientes condiciones de ciclo: 95 °C durante 2 minutos; 50 ciclos de 95 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 20 segundos y 70 °C durante 30 segundos; 60 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR se purificaron (kit de purificación QIAquick PCR, Qiagen) y los extremos romos se clonaron con el kit de clonación Zero Blunt PCR (Invitrogen). Los productos clonados romos por PCR y lentiCas9-Blast (plásmido Addgene ID 52962) se digirieron por separado con *Bam*HI-HF y *Eco*RI-HF en tampón CutSmart 1x a 37 °C (New England Biolabs). Se realizó una digestión de lentiCas9-Blast para eliminar el casete de blasticidina. Luego, el producto de PCR digerido se ligó en la cadena principal de lentiCas9.

Clonación de lentiGuide-Crimson. La plantilla E2-Crimson (Clontech) se amplificó mediante PCR para añadir sitios de restricción BsiWI (en 5') y MluI (en 3') con fines de clonación utilizando las siguientes condiciones: tampón KOD (1x), MgSO4 (1,5 mM), dNTP (0,2 mM cada uno), cebador directo (0,3 µM; GGCCGGCCCGTACGCGTACGGCCACCATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTT, SEQ. ID. NO: 147), cebador inverso (0,3 µM; GGCCGGCCACGCGTCTACTGGAACAGGTGGTGGCGGGCCT, SEQ. ID. NO: 148) y KOD Hot Start ADN polimerasa (0,02 U/µl) (Millipore). La reacción de KOD PCR utilizó las siguientes condiciones de ciclo: 95 °C durante 2 minutos; 50 ciclos de 95 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 20 segundos y 70 °C durante 30 segundos; 60 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR se purificaron (kit de purificación QIAquick PCR, Qiagen) y se clonaron con el kit de clonación de PCR Zero Blunt (Invitrogen). Los productos clonados y lentiGuide-puro se digirieron por separado con BsiWI y MluI en 1x tampón 3.1 a 37 °C (New England Biolabs). Se realizó la digestión de lentiGuide-Puro (plásmido Addgene ID 52963) para eliminar el casete de puromicina. A continuación, el producto de PCR digerido se ligó en la cadena principal de lentiGuide.

Clonación de ARNgu. Se digirió lentiGuide-Puro (plásmido Addgene ID 52963) con BsmBI en IX tampón 3.1 a 37 °C

(New England Biolabs) para linealización. Se añadió una unidad de fosfatasa alcalina termosensible TSAP (Promega) durante 1 hora a 37 °C para desfosforilar la lentiGuide linealizada y luego se inactivó por calor TSAP a 74 °C durante 15 minutos. La lentiGuide linealizada y desfosforilada se corrió en un gel de agarosa y se purificó en gel. Los oligonucleótidos que especifican ARNgu se fosforilaron y se hibridaron utilizando las siguientes condiciones: oligonucleótido de secuencia de ARNgu (10 µM); oligonucleótido de complemento inverso de secuencia de ARNgu (10 µM); tampón de unión T4 (1x) (New England Biolabs); y polinucleótido cinasa T4 (5 unidades) (New England Biolabs) con las siguientes condiciones de temperatura: 37 °C durante 30 min; 95 °C durante 5 min; y luego bajar gradualmente a 25 °C a 5 °C/min. Los oligonucleótidos hibridados se unieron en lentiGuide en una proporción de 1:3 (vector:inserto) usando tampón de unión T4 (1X) y ADN ligasa T4 (750 unidades) (New England Biolabs. Los plásmidos se verificaron mediante secuenciación usando un cebador directo del promotor U6F CGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGC (SEQ. ID. NO: 149).

Se obtuvieron y clonaron oligonucleótidos que especificaban ARNgu usando secuencias de ARNgu de la biblioteca de selección (Datos extendidos) como se describe en lentiGuide-Puro o lentiGuide-Crimson. Se utilizaron construcciones de ARNgu para producir lentivirus y transducir HUDEP-2 con expresión estable de Cas9. Los cultivos a granel se incubaron durante 7-10 días con selección de blasticidina (Sigma) 10 µg/ml y puromicina (Sigma) 1 µg/ml para permitir la edición. A continuación, los cultivos a granel se sembraron clonalmente a dilución limitante sin selección de antibióticos. Los clones se dejaron crecer durante aproximadamente 14 días y luego se extrajo el ADN genómico usando 50 µl de Solución de Extracción de ADN QuickExtract por pocillo (Epicenter).

Clonación de lentiTandemGuide. lentiGuide-ARNgu1 fue digerido con *PspXI* y *XmaI* a 37 °C durante cuatro horas (New England Biolabs). Las digestiones se realizaron en un gel de agarosa y se purificaron en gel. lentiGuide-ARNgu2 se linealizó utilizando *NotI* (New England BioLabs). El promotor hU6 y la cadena principal quimérica de ARNgu para lentiGuide-ARNgu2 se amplificaron por PCR utilizando las siguientes condiciones: tampón KOD (1x), MgSO4 (1,5 mM), dNTP (0,2 mM cada uno), cebador directo (0,3 µM; GGCCGGCCgctcgaggGAGGGCCTATTTCC, SEQ. ID. NO: 150), cebador inverso (0,3 µM; CCGGCCGGcccgggTTGTGGATGAATACTGCCATTT, SEQ. ID. NO: 151) y KOD Hot Start ADN polimerasa (0,02 U/µl) (Millipore). La reacción de KOD PCR utilizó las siguientes condiciones de ciclo: 95 °C durante 2 minutos; 50 ciclos de 95 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 20 segundos y 70 °C durante 30 segundos; 60 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR se purificaron (kit de purificación QIAquick PCR, Qiagen) y los extremos romos se clonaron con el kit de clonación Zero Blunt PCR (Invitrogen) y se transformaron y sembraron. Las colonias se seleccionaron mediante la digestión de minipreparaciones con EcoRI. A continuación, se digirieron las minipreparaciones con PspXI y XmaI como se describió anteriormente, seguido de purificación por PCR. Después de la purificación por PCR, el ARNgu2 se unió en lentiGuide-ARNgu1 digerido. Secuencia verificada con los siguientes cebadores: GGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAA (SEQ. ID. NO: 152) y CCAATTCCCACTCCTTTCAA (SEQ. ID. NO: 153).

Generación de HUDEP-2 con Cas9 estable. Se produjeron LentiCas9-Blast (plásmido Addgene ID 52962) o LentiCas9-Venus como se describió anteriormente y se usaron para transducir células HUDEP-2. Las células transducidas se seleccionaron con 10 µg/ml de blasticidina (Sigma) o se clasificaron las células Venus+. El Cas9 funcional se confirmó usando el ensayo indicador de GFP pXPR-011 (plásmido de Addgene ID 59702) como se describió anteriormente[72].

Generación de células MEL informadoras de Hbb-εy:mCherry. Se creó una línea MEL informadoras en la que mCherry ha sido inactivado en el locus *Hbb*-y (véase la figura 9D). En resumen, se creó una DSB inducida por TALEN adyacente al sitio de inicio de la transcripción *Hbb*-y. Se introdujeron un vector de direccionamiento con mCherry y un casete de neomicina mediante reparación dirigida por homología. Se utilizó recombinación mediada por Cre para eliminar el casete de neomicina. Se utilizó PCR de largo alcance que abarca cada brazo de homología para asegurar la integración dirigida apropiada. Las células se probaron en la alteración de *Bcl11a* por RT-qPCR y citometría de flujo para confirmar los efectos esperados sobre la desrepresión de εy:mCherry. Posteriormente se usó CRISPR-Cas9 como se describió anteriormente para producir células con eliminación de potenciadores compuestos monoalélicos para maximizar la sensibilidad de selección.

Generación de células MEL con expresión de Cas9 estable. Se produjeron lentivirus LentiCas9-Blast (plásmido Addgene ID 52962) como se describió anteriormente y se usaron para transducir células MEL. Se seleccionaron células transducidas con 10 µg/ml de blasticidina (Sigma). El Cas9 funcional se confirmó usando el ensayo indicador de GFP pXPR-011 (plásmido de Addgene ID 59702) como se describió anteriormente[72].

Resultados

Potenciador compuesto humano

Recientemente, se observó que las variantes genéticas comunes asociadas con el nivel de HbF (α2γ2) y la intensidad clínica del trastorno de la β-hemoglobina marcan un potenciador de *BCL11A* intrónico específico de la etapa de desarrollo del adulto y del linaje eritroide[42], un represor validado de la HbF y una diana terapéutica para los trastornos de la β-hemoglobina[42,41-47]. Este potenciador compuesto se compone de tres sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa I (DHS), denominados +55, +58 y +62 según la distancia en kilobases desde el sitio de inicio de la transcripción (TSS)[42]. El haplotipo más asociado a rasgos está definido por dos SNP, rs1427407 dentro de +62 y

rs7606173 dentro de +55 (Figura 1A). De hecho, basado en ChIP-seq H3K27ac en precursores eritroides adultos humanos primarios, el potenciador compuesto de *BCL11A* se clasifica como el número 100 más intensamente decorado de los 503 superpotenciadores eritroides humanos totales (Figuras 1A y 1B). Anteriormente se mostró que este potenciador poseía eritroides ectópicos restringidos, actividad potenciadora específica de la etapa adulta[42]. Por otra parte, se demostró que el ortólogo de ratón del potenciador compuesto, definido por homología de secuencia primaria, distintivo de cromatina del potenciador eritroide compartido y la posición sinténica en relación con las secuencias codificantes, era necesario para la expresión de *BCL11A* y la represión del gen de la globina embrionaria en una línea celular eritroide de ratón, pero prescindible en una línea celular linfoide β de ratón[42]. Estos resultados sugieren la alteración del potenciador de eritroides *BCL11A* como una estrategia terapéutica prometedora para la reinducción de HbF para trastornos de la β-hemoglobina[48].

Para evaluar el requisito de secuencias del potenciador de *BCL11A* humanas, se utilizan células HUDEP-2, una línea de células precursoras eritroides procedentes de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) CD34+ humanas inmortalizadas que expresa BCL11A y predominantemente β- en lugar de γ-globina[49]. Se usó el sistema CRISPR-Cas9 nucleasa para generar un clon de células HUDEP-2 anuladoras para *BCL11A* mediante el direccionamiento de secuencias codificantes (Figura 1C). Estas células demostraron niveles elevados de ARNm de γ-globina y proteína HbF, coherente con el requisito funcional de BCL11A para la represión de HbF (Figuras ID, IE, y 6). La eliminación del potenciador compuesto de BCL11A de 12 kb con un par de ARNgu dio como resultado una pérdida casi completa de la expresión de BCL11A y la inducción de γ-globina y proteína HbF a niveles similares a los de las células con *BCL11A* inactivado (Figuras 1C-1E, y 6), análogo al requerimiento del potenciador compuesto de ratón ortólogo para la expresión de BCL11A eritroide[42]. La inducción significativa de HbF resultante de la eliminación del potenciador compuesto de eritroides *BCL11A* humano estimula el direccionamiento de estas secuencias para la edición terapéutica del genoma de las hemoglobinopatías β[48]. Aunque las eliminaciones dirigidas por rupturas de doble cadena (DSB) emparejadas se pueden lograr mediante la edición del genoma, los resultados genómicos en competencia incluyen la producción local de inserción/eliminación (indel) en cada sitio de escisión, así como la inversión del segmento intermedio[34,35,50-52].

Edición de potenciador agrupada en mosaico *in situ*

Se especuló que los potenciadores compuestos pueden estar compuestos por una jerarquía funcional con componentes constituyentes esenciales y prescindibles. Una jerarquía funcional podría permitir la alteración del potenciador por una sola DSB en una región esencial seguida de reparación mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) con indel. De hecho, la hipótesis de que un mecanismo predominante de asociaciones de rasgos es la variación del potenciador se basa en la premisa de que los propios cambios de un solo nucleótido pueden modular sustancialmente la función del potenciador. Por lo tanto, se razonó que un conjunto de ARNgu en mosaico podría descubrir regiones potenciadoras esenciales mediante la alteración de esencialmente todas las secuencias dentro de un potenciador dado el espectro indel normal de cada ARNgu de al menos 10 pb[34,35,50,52,53].

Se diseñaron todos los ARNgu posibles dentro de los DHS del potenciador compuesto de *BCL11A* (Figuras 2A-2D) restringidos solo por la presencia del motivo adyacente del protoespaciador (PAM) NGG SpCas9, que restringe la escisión a una frecuencia promedio de 1/8 en cada posición genómica (considerando la presencia en hebras positivas y negativas)[34,53]. Los ARNgu restringidos por PAM NGG tenían una distancia de escisión genómica adyacente mediana de 4 pb y un percentil 90 de 18 pb (Figura 2D), lo que indica que esta estrategia podría acercarse a la mutagénesis de saturación *in situ*. NAG puede actuar como un PAM alternativo para SpCas9, aunque con menor eficacia[53]. También se diseñaron ARNgu restringidos por PAM NAG (Figuras 2B y 7). Se incluyeron 120 ARNgu no dirigidos como controles negativos, así como 88 ARNgu que incluían el exón-2 de BCL11A como controles positivos. La biblioteca total incluyó 1.338 ARNgu.

Se sintetizaron oligonucleótidos para los ARNgu en una micromatriz y se clonaron los ARNgu como un conjunto de un vector lentivírico[37]. La secuenciación profunda de la biblioteca de plásmidos lentivíricos demostró que 1.337 de 1.338 ARNgu (99,9 %) se clonaron con éxito. La representación de ARNgu dentro de la biblioteca mostró una distribución relativamente estrecha, con una mediana de 718 y el percentil del 10% y el 90% que van desde 337 a 1.205 lecturas normalizadas. El esquema experimental básico fue transducir células con la biblioteca lentivírica a baja multiplicidad de modo que casi todas las células seleccionadas contuvieran un solo integrante (Figura 2A). La introducción de Cas9 y un ARNgu individual dirigido al exón 2 de *BCL11A* produjo células con expresión elevada de HbF, lo que indica la pérdida de la función de BCL11A y la desrepresión resultante de la γ-globina diana de BCL11A. Por lo tanto, se transdujeron células HUDEP-2 que expresan de manera estable SpCas9 con la biblioteca combinada de ARNgu dirigidos al potenciador de *BCL11A*. Inicialmente se expandieron las células durante una semana y posteriormente se transfirieron a condiciones de diferenciación eritroide, para un total de dos semanas de cultivo. Luego, se realizó tinción intracelular para HbF. Se empleó la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) para aislar grupos de HbF-alta y HbF-baja (consistente con actividad alta y baja de BCL11A respectivamente; Figuras 2A y 2E). Se enumeró la representación de la biblioteca en cada grupo mediante una secuenciación profunda. El enriquecimiento de cada ARNgu en los grupos de HbF-alta en comparación con los grupos de HbF-baja se calculó como el cociente $\log_2$ de lecturas normalizadas. Se comparó el enriquecimiento de HbF de los 120 ARNgu de control negativo no dirigidos y los 88 controles positivos dirigidos a la secuencia codificante para los ARNgu restringidos por PAM NGG y NAG. Se observó una representación equivalente de los ARNgu no dirigidos en los conjuntos de HbF alta

y HbF baja, pero un enriquecimiento muy significativo del ARNgu NGG dirigido al exón-2 de *BCL11A* en el grupo de HbF alta, coherente con una reducción de la actividad de BCL11A (Figuras 2F y 2G). Un ARNgu no dirigido (n.º 0548) tuvo una puntuación de enriquecimiento de 0,803, mientras que los 119/120 ARNgu no dirigidos restantes (99,2 %) mostraron puntuaciones de enriquecimiento por debajo de 0,259. Por el contrario, 40/48 ARNgu dirigidos al exón 2 de BCL11A (83,3 %) mostraron puntuaciones de enriquecimiento superiores a 0,259. Estos resultados indican que la gran mayoría de los ARNgu de la biblioteca eran competentes para producir indel. Sin embargo, los ARNgu dirigidos al exón-2 con restricción por PAM NAG no mostraron un enriquecimiento significativo, por lo que todos los ARNgu restringidos por NAG se excluyeron del análisis adicional (Figura 2F).

Se comparó la representación de ARNgu en el grupo de plásmidos inicial con la representación de ARNgu en las células al final del cultivo *in vitro*. Si bien la mayoría de la biblioteca mantuvo una representación neutral durante todo el experimento, se observó una fracción de ARNgu que se agotaron, principalmente entre los ARNgu +62 (Figuras 2G y 10A). Se observó que estos ARNgu de error se asignan a elementos repetidos dentro del genoma, en particular a un elemento SINE AluSq que aparece en el genoma casi 100.000 veces54. El diseño inicial de ARNgu no incluyó la predicción de la escisión fuera de diana para maximizar la resolución de la mutagénesis dirigida. Se eliminó del análisis posterior 35 de 582 (6,0 %) ARNgu PAM NGG con representación final $< 2^{-3}$ ya que estos indicaban probables efectos independientes de *BCL11A* de la alteración genómica (Figura 2G).

La mayoría de los ARNgu dirigidos a potenciadores no mostraron ningún enriquecimiento o agotamiento significativo del grupo de HbF alta (Figuras 2G y 2H). Se observaron varios ARNgu con enriquecimiento de HbF en cada uno de los DHS, así como algunos con agotamiento de HbF en +55 (Figura 2H). Se mapeó la puntuación de enriquecimiento de cada ARNgu en su posición prevista de escisión genómica (Figura 3A). Los ARNgu enriquecedores se ubican conjuntamente en posiciones genómicas discretas. Por ejemplo, se observó un grupo de ARNgu en +62 con un enriquecimiento modesto, un grupo en +55 con enriquecimiento moderado (así como grupos adyacentes con agotamiento) y un grupo en +58 con enriquecimiento marcado. Cabe destacar que, se observaron 10 ARNgu en +58 con posiciones de escisión dentro de 42 pb cada una con puntuaciones de enriquecimiento superiores a 0,99, la puntuación mediana de enriquecimiento de ARNgu dirigidos al exón-2 de *BCL11A*.

Los ARNgu dirigidos al exón-2 mostraron una correlación lineal entre el enriquecimiento y el error de la selección, lo que indica que los ARNgu que dan como resultado una inactivación completa de *BCL11A* conducen a una tasa reducida de acumulación celular inseparable de la magnitud de la desrepresión de HbF (Figura 3B). Por ejemplo, no se observó ningún ARNgu dirigido al exón-2 con un potente enriquecimiento de HbF que careciera de un error sustancial. Por el contrario, los ARNgu en +58 asociados con un marcado enriquecimiento de HbF mostraron un impacto atenuado sobre el error (Figura 3B). Este hallazgo podría ser coherente con un nivel residual bajo de BCL11A adecuado para promover la acumulación celular pero inadecuado para suprimir la HbF.

Para validar estos hallazgos, se generaron células con eliminación de cada DHS individual, +55, +58 y +62. La eliminación de +58 copió el fenotipo de la eliminación del potenciador compuesto, mientras que la eliminación de +55 y +62 tuvo efectos moderados y modestos respectivamente, coherente con la magnitud de los ARNgu de puntuación superior y ubicación conjunta de la selección (Figuras 3A, 3C-3E). La inversión de los sitios +58 o +55 no tuvo un efecto significativo sobre la expresión génica, demostrando que el potenciador de *BCL11A* funciona de manera independiente de la orientación *in situ,* coherente con la definición clásica de potenciador[1] (Figuras 3C-3E). En formato de matriz, se probaron 24 ARNgu con puntuaciones de enriquecimiento que van de la más alta a la más baja en la selección, y representan ARNgu de las 5 categorías de mapeo. Se observó una fuerte correlación entre la puntuación de enriquecimiento de HbF de la selección y la fracción de células HbF+ en formato de matriz ($r = 0,816$, $p < 0,0001$; Figura 3F. Estos resultados demuestran que un ARNgu dirigido a un único potenciador puede mediar en la inducción sólida de HbF (Figura 8).

Para validar los hallazgos de las células HUDEP-2, se probó el ARNgu dirigido al potenciador de puntuación más alta de la selección (n.º 1621 en +58) en eritroblastos humanos primarios mediante transducción lentivírica de HSPC CD34+ expuestas a condiciones de cultivo de eritroides *ex vivo*. De acuerdo con los resultados de la selección, el ARNgu-1621 dio como resultado una disminución de la expresión de *BCL11A* y un aumento correspondiente de la expresión de γ-globina y aumento en células HbF+ (Figuras 3G-3I y 8B). De manera destacable, el ARNgu-1621 no alteró el perfil del marcador de superficie, la frecuencia de desnucleación o la morfología celular. Juntos, estos resultados indican una viabilidad de un ARNgu individual que se dirige a un elemento no codificante para la edición terapéutica del genoma de trastornos de la β-hemoglobina.

Secuencias potenciadoras específicas de primates

Se aplicó un modelo oculto de Markov (HMM) a los datos de puntuación de enriquecimiento de ARNgu para inferir secuencias funcionalmente importantes dentro de cada DHS. Este modelo definió tres estados funcionales, activo, represivo y neutro, basados en la probabilidad de abarcar secuencias que regulen de forma positiva, negativa y neutra la expresión del gen diana, respectivamente. El modelo identificó estados funcionales dentro de cada DHS (Figuras 4A-4C). En cada uno de los tres DHS, los estados activo se ubicaron con precisión en las regiones con el mayor grado de sensibilidad a la desoxirribonucleasa I.

La región activa +62 contiene solo un SNP común (MAF > 1 %), la variante rs1427407, que fue identificado previamente mediante mapeo fino como el SNP más asociado a rasgos[42]. El alelo T de HbF alta es perturbador de un semimotivo compuesto aparente de E-box/GATA ($P = 9{,}74 \times 10^{-4}$ para el alelo T, $P = 1{,}69 \times 10^{-4}$ para el alelo G, aunque ninguno alcanzó el umbral predefinido para la significancia de $P < 10^{-4}$ y asociado con una ocupación reducida de GATA1 y TAL1 en la cromatina eritroide humana primaria[42]. Múltiples ARNgu con escisiones mapeadas directamente al motivo demostraron puntuaciones de enriquecimiento positivas (Figura 4C). Cabe destacar que, había una brecha de 88 nucleótidos entre las escisiones de ARNgu en el núcleo de la región activa debido a la falta de motivos PAM NGG. A pesar de esta limitación poco común de la resolución funcional por los ARNgu restringidos por SpCas9 y PAM NGG (Figura 2D), el modelo HMM todavía es capaz de identificar la región. Se observó una conservación sustancial entre especies evaluada por PhyloP y PhastCons (que modelan la conservación de nucleótidos individuales y elementos de bases múltiples, respectivamente) en esta región de estado activo +62 en comparación con las regiones flanqueantes (Figura 4C).

DHS +55 abarca el SNP rs7606173, que junto con rs1427407 define el haplotipo más asociado a rasgos. El mapeo fino anterior no fue capaz de encontrar SNP adicionales en BCL11A con poder predictivo para la asociación de rasgos más allá del haplotipo rs1427407-rs7606173 basado en análisis condicionales o de variantes raras. No se encontraron SNP comunes directamente dentro de las regiones del estado activo o represivo de +55, sin embargo, rs7606173 reside solo a 3 pb de la región represiva y 34 pb de la región activa. El siguiente SNP común más cercano a un estado activo o represivo dentro de +55 es rs62142646, que está a 739 pb de un estado activo. El alelo G ancestral principal en rs7606163 está asociado con HbF alta. Las células HUDEP-2 utilizadas en esta selección son homocigotas para esta variante G. Dado un modelo en el que el rasgo de HbF alta se debe a la alteración de las secuencias de unión a TF en el potenciador de BCL11A, no se puede esperar que la alteración del alelo rs7606173-G de HbF alta mediada por ARNgu produzca un mayor impacto funcional. Se observaron seis motivos previstos ($P < 10^{-4}$) que estarían afectados diferencialmente por el genotipo rs7606173. Los ARNgu de mayor puntuación en +55 agrupan 56-58 pb de rs7606173, en un sitio con un motivo TAL1::GATA1 previsto (P < 10-4). Este elemento de secuencia posee una alta conservación en vertebrados. La región completa que abarca los estados activo/represivo en +55 parece tener una conservación de secuencia elevada en comparación con las secuencias flanqueantes (Figura 4A).

La conservación general de la secuencia en la región activa +58 parece menos intensa y menos distinta de las secuencias flanqueantes en comparación con las de +62 y +55 (Figura 4A-C). Los ARNgu de puntuación superior en la selección se ubican conjuntamente hasta 42 pb dentro de +58 (Figura 4B). El tercer ARNgu dirigido por potenciador de puntuación más alta (ARNgu-1617) se mapeó directamente en un motivo GATA aparente (datos no mostrados). Este motivo estaba por debajo de un umbral de significación a escala del genoma ($P = 3{,}74 \times 10^{-4}$). Cabe destacar que, hay una inserción de 144 pb en el genoma de ratón con respecto a la referencia humana directamente adyacente a la posición ortóloga. La secuencia ortóloga de ratón tiene un valor P del motivo GATA1 solo modestamente más alto que el humano ($p = 4{,}33 \times 10^{-4}$). Este motivo GATA1 parece tener una conservación relativamente alta en vertebrados, con identidad humana exacta en conejos, cerdos, perros y elefantes.

El ARNgu de puntuación superior (ARNgu-1621) se mapeó en una posición a 15 pb de este motivo GATA1 (datos no mostrados). Un mapeo adicional de cuatro ARNgu entre ARNgu-1621 y 1617, incluyendo el segundo ARNgu de puntuación más alta en la selección, cada uno tenía puntuaciones de enriquecimiento de HbF sustancialmente elevadas. Detrás de estos ARNgu había motivos adicionales previstos (es decir, Rxra, EHF, ELF1 y STAT1). Aunque estas secuencias mostraron un alto nivel de conservación entre los primates, mostraron una alta degeneración entre vertebrados no primates (datos no mostrados).

Se probó el patrón de mutaciones observado en el tratamiento de células con ARNgu-1621 o ARNgu-1617 mediante secuenciación profunda. Cada uno de estos ARNgu es suficiente para inducir sustancialmente HbF en células eritroides humanas (Figura 3F-3I). Se clasificaron las células expuestas a Cas9 y estos ARNgu en grupos de HbF-alta y HbF-baja. Se determinó el espectro indel en cada población mediante secuenciación profunda. Como era de esperar, se observaron indel agrupados alrededor de las posiciones de escisión previstas. Al comparar la proporción de indel por nucleótido entre las células de los conjuntos de HbF alta y HbF baja, se pudo calcular un enriquecimiento relativo a través del amplicón utilizado para la secuenciación profunda. Notablemente, ambos ARNgu produjeron indel enriquecedores de HbF máximos no precisamente en la posición de escisión esperada sino compensados por aproximadamente 10 pb. En el caso de 1621, las posiciones de enriquecimiento de indel máximo de HbF fueron hacia el sitio de escisión 1617. En el caso de 1617, las posiciones de enriquecimiento de indel máximo de HbF fueron hacia el sitio de escisión 1621. Estos resultados indican que las secuencias que intervienen en estas dos escisiones son particularmente necesarias para la expresión de BCL11A. Estos sitios de enriquecimiento máximo de la mutación de HbF mapeados a 7 pb se superponen directamente a los motivos previstos que intervienen en las escisiones de ARNgu (datos no mostrados). Considerados en conjunto, estos datos indican que un motivo GATA1 conservado que puntúa por debajo del umbral de predicción rodeado por secuencias específicas de primates forma el núcleo de un potenciador esencial para la expresión de BCL11A en eritroides humanos y la represión de HbF.

Disección del potenciador de ratón

Para probar la conservación funcional del potenciador de BCL11A, se examinó el potenciador de *Bcl11a* de ratón ortólogo con mayor detalle. Aunque moderadamente marcado mediante H3K27ac, *Bcl11a* de ratón no cumple los

criterios para un elemento superpotenciador (Figuras 9A y 9B). La sensibilidad a la desoxirribonucleasa I eritroide sólo se observa en aquellas secuencias homólogas a +55 y +62 y no a +58 (Figura 9A), coherente con la homología de secuencia reducida dentro de la región activa +58 (Figura 4A-4C). Anteriormente se observó que la eliminación de todo el potenciador compuesto (que abarca las secuencias homólogas a DHS +55, +58 y +62) en células de eritroleucemia de ratón (MEL) dio como resultado una reducción considerable de la expresión de BCL11A[42]. Se generó una línea de células MEL informadora con el informador fluorescente mCherry insertado al locus de globina embrionaria *Hbb-y* (Figura 9C). La introducción de Cas9 y ARNgu dirigido al exón-2 de *Bcl11a* dio como resultado la aparición de células con expresión elevada de εy:mCherry, lo que indica desrepresión de BCL11A diana de la εy-globina (Figura 9D). Se diseñó una selección de mutagénesis de saturación de potenciador CRISPR agrupada en estas células informadoras εy:mCherry, similar a la selección humana descrita anteriormente (Figuras 9E-9K).

Se determinó la puntuación de enriquecimiento como el cociente-$\log_2$ entre la representación en los grupos de εy:mCherry alto en comparación con el εy:mCherry bajo (Figura 10A). Se notó que casi todos los ARNgu dirigidos al exón-2 demostraron tanto puntuaciones de enriquecimiento positivas como puntuaciones negativas de error con alta correlación (Figuras 10A, 10C y 10D). La mayoría de los ARNgu dirigidos a potenciadores no mostraron un enriquecimiento significativo (Figura 10B). Se detectaron ARNgu con enriquecimiento y agotamiento modestos de εy:mCherry alto en el ortólogo +55, similar a como se vio en +55 humano. Se detectó un conjunto de ARNgu con marcado enriquecimiento en el ortólogo +62, superando la potencia de aquellos que se enriquecen en +62 humano. En el ortólogo +58 no se observó ninguna evidencia de enriquecimiento o agotamiento de ARNgu (Figura 10B).

Al mapear las posiciones de escisión de ARNgu en el genoma, nuevamente se observó la ubicación conjunta de conjuntos de ARNgu (Figura 5A). Había un patrón complejo similar en el ortólogo +55 que en el +55 humano, con regiones adyacentes con ARNgu que se enriquecen y se agotan del grupo de εy:mCherry alto en el núcleo de DHS. En el ortólogo +62 había un máximo marcado, con cinco ARNgu con puntuaciones de enriquecimiento superiores a 1,30, la puntuación mediana de enriquecimiento de ARNgu dirigidos al exón-2 de *Bcl11a* (Figura 5A). Este potente impacto del ortólogo +62 contrastaba con el modesto impacto de la eliminación de DHS o ARNgu individuales en +62 humano.

Se usaron pares de ARNgu en presencia de Cas9 para producir clones de MEL con eliminaciones de varios elementos sustituyentes en el potenciador de BCL11A. Se comparó la expresión de clones con eliminaciones de los ortólogos +55, +58 y +62 (Figura 5B). La eliminación del ortólogo +58 insensible a desoxirribonucleasa no tuvo un efecto aparente sobre la expresión de BCL11A coherente con el resultado de la selección combinada. La eliminación del ortólogo +55 condujo a una reducción de aproximadamente el doble en la expresión de BCL11A (nivel residual medio 49 %, $p < 0{,}0001$), mientras que la eliminación del ortólogo +62 imitó la eliminación de todo el potenciador compuesto en términos de reducción en la expresión de BCL11A (niveles residuales medios de un 8 % ($p < 0{,}0001$) y un 6 % ($p < 0{,}0001$) respectivamente, Figura 5B). Además, se aislaron clones en los que se invirtió el ortólogo +62 en los que no hubo cambio en la expresión de BCL11A, lo que indica que el potenciador de ratón, como el humano, funciona independientemente de la orientación *in situ* (Figuras 3C-3E; 5B).

Se aplicó el mismo modelo HMM para inferir los estados activo, represivo y neutro en los ortólogos del potenciador de BCL11A de ratón (Figura 5C). Se identificó un estado activo en el ortólogo +62 y estados activo y represivo en el ortólogo +55. Solo se identificó el estado neutro en el ortólogo +58. Se infirió que las regiones de los DHS +55 y +62 con sensibilidad máxima a la desoxirribonucleasa I poseían estados activos (Figura 5C).

Se analizaron 108 clones en los que todo el potenciador compuesto se eliminó primero monoalélicamente y las mutaciones posteriores se produjeron mediante ARNgu individuales o en pares dirigidos al ortólogo +62 en el alelo restante. Se midió la expresión de BCL11A mediante RT-qPCR en cada uno de estos 108 clones normalizados a 25 clones de control no expuestos a los ARNgu dirigidos a +62. Este análisis clonal identificó una región central del ortólogo +62 que contenía secuencias funcionales requeridas para la expresión de BCL11A y la represión de εy-globina embrionaria (Figura 5C). La región es rica en motivos de unión a TF, particularmente los de factores clave implicados en la eritropoyesis y la regulación génica de la globina, incluyendo Gata1, K1f1 y Myb. Cabe destacar que, a pesar de la presencia de una conservación relativamente alta en vertebrados de todas las regiones de estado activo +62 de ratón y humanas (Figuras 4C, 5C), el potente impacto del ortólogo +62 de ratón sobre la regulación del gen BCL11A y de la globina superó en gran medida al de +62 humano (Figuras 3A, C-E, 5A-C).

Función del potenciador *in vivo*

Para fundamentar la importancia del ortólogo +62 de ratón en la expresión de BCL11A, así como para validar la alteración del potenciador de BCL11A como estrategia terapéutica, se generaron animales deficientes en ortólogos +62 de *Bcl11a* de ratón. Se generaron células madre embrionarias de ratón (mESC, por sus siglas en inglés) transgénicas para el grupo de β-globina humana (mESC β-YAC) para modelar el papel de BCL11A en el cambio de hemoglobina[55]. El ortólogo +62 se eliminó de estas mESC con la misma estrategia de Cas9 y ARNgu emparejado. Para determinar el papel del ortólogo +62 en la regulación del desarrollo de la expresión del gen de la globina *in vivo,* se inyectaron dos únicos clones de mESC β-YAC con eliminación bialélica del ortólogo +62 en blastocistos E3.5 no β-YAC) y se implantaron en hembras seudoembarazadas (Figura 11). En E16.5, el análisis reveló un aumento de 9,4 veces ($p < 0{,}0001$) y 11,4 veces ($p < 0{,}0001$) en la expresión del gen de γ-globina de quimeras con eliminación de +62

con contribuciones de los clones 1 y 2, respectivamente (FIG. 5D). Estos resultados indicaron que las células eritroides murinas tienen un requisito funcional intrínseco celular del ortólogo +62 de *Bcl11a* para la regulación adecuada del gen de la globina *in vivo.*

Los ratones con eliminación de la línea germinal +62 procedían de mESC CJ9 y se cruzaron con ratones β-YAC. Estudios previos han demostrado un papel esencial para *Bcl11a* en el desarrollo estructural del sistema nervioso central y en la ontogenia de los linfocitos β[56,57]. La expresión de BCL11A no se alteró en el cerebro o en los precursores de linfocitos B clasificados de embriones E16.5 (Figuras 5E y 11D). Por el contrario, hubo una reducción sustancial en los niveles de BCL11A en los precursores eritroides E16.5 clasificados (Figura 5E). Sorprendentemente, a diferencia de los *Bcl11a* inactivados convencionales que mueren pocas horas después del nacimiento, ratones con eliminación del ortólogo +62 nacieron sanos a las proporciones mendelianas esperadas (Figura 10C). *Bcl11a* es necesario para la producción de progenitores de linfocitos β durante la embriogénesis y la edad adulta[56,58]. Los ratones con eliminación bialélica del ortólogo +62 parecen tener un número normal de progenitores de células β en el hígado fetal (Figura 11). Adicionalmente, a las cuatro semanas de edad, estos animales mutantes demostraron frecuencias de linfocitos β en sangre periférica circulantes comparables a las de los compañeros de camada de tipo silvestre (Figura 5F). Otros linajes hematopoyéticos también aparecieron presentes en frecuencias similares a los de los compañeros de camada de tipo silvestre. La regulación del desarrollo de los genes de globina humana transgénica se produce en el hígado fetal de ratón de gestación media. Los hígados fetales se evaluaron cada dos días entre E12.5 y E18.5 para controlar el cambio de hemoglobina. La represión de la γ-globina humana y la activación de la β-globina humana se retrasaron notablemente en los ratones con eliminación del ortólogo +62. Estos resultados indican que la alteración del potenciador eritroide de BCL11A *in vivo* da como resultado una alteración específica de eritroides de la expresión de BCL11A y una represión relajada de la γ-globina, sin acompañamiento de las obvias toxicidades neurológicas o inmunológicas observadas en el contexto de la inactivación convencional de BCL11A.

Se ha empleado una nueva aplicación de edición del genoma CRISPR-Cas9, saturación de mutagénesis de elementos no codificantes in situ, para proporcionar información importante sobre la organización y función del potenciador de eritroides BCL11A. Las pruebas tradicionales de la función del potenciador se basan en ensayos informadores heterólogos ectópicos y/o características bioquímicas correlativas, tal como el patrón de decoración de la cromatina. La edición del genoma permite una evaluación sencilla del requisito de secuencias potenciadoras dentro de su contexto de cromatina endógena para una regulación genética adecuada. Como se muestra aquí, el ARNgu de mosaico agrupado de alta resolución y alto rendimiento revela los requisitos subyacentes de la secuencia del potenciador que se acercan a la resolución de nucleótidos. Aunque los potenciadores se componen de motivos de unión a factores de transcripción, la presencia de motivos por sí sola es inadecuada para predecir potenciadores. Las predicciones de motivos pueden ser demasiado sensibles, en que solo una pequeña fracción de los motivos previstos tienden a ser corroborados por estudios de ocupación ChIP-seq. Por otro lado, la predicción de motivos también puede ser insensible; por ejemplo, un informe reciente destaca la importancia de los motivos de baja afinidad para lograr la especificidad de la función del potenciador[59]. Anteriormente se mostró que GATA1 ocupa +58 en precursores eritroides primarios[42]. Sin embargo, esta región no posee ni sensibilidad a la desoxirribonucleasa ni requisitos funcionales en las células eritroides de ratón. A pesar de esta divergencia, el motivo GATA1 del núcleo humano tiene un valor P similar en el ortólogo de ratón no funcional. Estos resultados son coherentes con un modelo en el que el contexto del motivo es esencialmente importante en la actividad del potenciador. Las secuencias inmediatamente adyacentes al motivo GATA1, donde se enriquecen tanto los ARNgu asociados a HbF como las mutaciones, son candidatos para cumplir con este requisito contextual.

Los potenciadores demuestran, paradójicamente, tanto la conservación evolutiva como el aumento de la rotación. La variación del potenciador asociada a rasgos comunes indica la frecuente aparición de secuencias polimórficas intraespecies suficientes para modular la función del potenciador y, por lo tanto, producir nuevos fenotipos. En *BCL11A*, se describió anteriormente un haplotipo potenciador asociado a rasgos definido por dos SNP[42]. La selección de CRISPR agrupado reveló que cada uno de estos SNP reside cerca de estados del potenciador funcionales coherentes con sus papeles como variantes causales. La región potenciadora más potente, dentro de +58, no tiene variantes comunes cerca de su núcleo funcional. Este ejemplo demuestra cómo el mapeo fino de asociaciones de GWAS con SNP individuales puede subestimar sustancialmente la importancia biológica de los elementos subyacentes al rasgo asociado. Además, estos datos demuestran que la aparente conservación de la secuencia en el potenciador de BCL11A enmascara la divergencia funcional subyacente. Los potenciadores compuestos de eritroides de BCL11A de ratón y humanos comparten homología de secuencia primaria, un distintivo de cromatina potenciadora de eritroides y una posición intrónica sinténica en relación con las secuencias codificantes. Por otra parte, ambos son necesarios para la expresión eritroide de BCL11A y la represión de genes de globina embrionaria/fetal. Sin embargo, el análisis de mutagénesis CRISPR de alta resolución revela divergencias en la arquitectura de estos potenciadores. El potenciador de ratón se compone de dos DHS, de los cuales +62 tiene dominio funcional, como validado *in vivo.* Por el contrario, el potenciador humano tiene tres DHS, de los cuales +62 es de menor importancia y +58 de mayor importancia funcional. Cabe destacar que, el BCL11A humano refuerza el cambio de desarrollo de la γ a la β-globina alrededor del momento del nacimiento. El momento y la naturaleza de estos cambios y los genes de la globina en sí son distintos en primates en comparación con vertebrados no primates que solo exhiben un cambio de embrión a adulto en la mitad de la gestación[60-62]. Por lo tanto, parecería plausible que los mecanismos reguladores esenciales en BCL11A pudieran diferir entre especies.

La apreciación reciente de la amplia variación en la intensidad de las características bioquímicas asociadas con los elementos potenciadores ha llevado a un interés renovado en los elementos potenciadores agrupados y los llamados superpotenciadores. Aquí se muestra que uno de esos superpotenciadores está organizado como una jerarquía de DHS constituyentes, con algunos esenciales y otros mínimamente necesarios para la expresión génica. Además, incluso dentro de un DHS esencial tal como +58 de *BCL11A*, hay muchas secuencias prescindibles y sólo unas pocas esenciales. Estos experimentos muestran cómo un superpotenciador puede ser vulnerable a DSB individuales.

Los trastornos de la hemoglobina representan las afecciones humanas hereditarias mendelianas más comunes. El nivel de HbF es un modificador clave de la intensidad clínica de estas enfermedades y BCL11A es el principal regulador del nivel de HbF[63]. La variación genética de origen natural en el potenciador de BCL11A se tolera bien y se asocia con el nivel de HbF y la intensidad clínica del trastorno de la β-hemoglobina. El trabajo presentado aquí ofrece un marco para la edición terapéutica del genoma del potenciador de BCL11A para los trastornos de la β-hemoglobina. La alteración del potenciador mediante ARNgu individuales en los precursores eritroides primarios da como resultado una inducción sustancial de HbF. Este enfoque puede mitigar las desventajas de crecimiento específicas de eritroides de la pérdida completa de BCL11A. Además, puede evitar la expresión de BCL11A en contextos no eritroides. Por ejemplo, se observó linfopoyesis β normal en ratones deficientes para el ortólogo +62. Un problema para el campo es que aún no es posible modelar con precisión la represión de HbF de manera experimental. Sin embargo, los individuos haploinsuficientes para BCL11A debido a microeliminaciones exhiben deficiencias neurológicas marcadas y HbF elevada, mucho más allá de lo observado en homocigotos para los haplotipos de potenciadores comunes de HbF alta (Basak et al, JCI, en prensa). Considerados en conjunto, estos datos indican que la perturbación de las secuencias esenciales dentro del potenciador de BCL11A definido en el presente documento puede dar como resultado niveles de HbF que exceden un umbral clínico necesario para mejorar los trastornos de la β-hemoglobina.

SNP común en DHS +58 humano. El único SNP común dentro de la región activa es rs6738440 en el borde de la región de estado (cr2: 60722241), de 118 a 160 pb del grupo de ARNgu de puntuación superior (cr2: 60722359-60722401); el siguiente SNP común más cercano fue rs62142615 (cr2: 60722120), a 119 pb de distancia. En rs6738440 no se observaron ARNgu con enriquecimiento adyacente significativo ni motivos significativos superpuestos a escala del genoma con el alelo A principal o el alelo G menor. El análisis condicional previo del haplotipo rs1427407-rs7606173 no pudo demostrar una asociación de rasgos significativo residual para esta variante[42].

Homología de secuencia de DHS humana y de ratón. La homología de secuencia es detectable en una posición intrónica aproximadamente similar con respecto al TSS para cada una de las secuencias de ratón homólogas a los tres DHS humanos: +55 humano (longitud 1283 pb) tiene 402 posiciones de identidad nucleotídica (31,3 %) con el ortólogo +55 de ratón (longitud 1046 pb), +58 humano (1264 pb) tiene 367 posiciones de identidad nucleotídica (28,6 %) con el ortólogo +58 de ratón (longitud 1341 pb) y +62 humano (longitud 1369 pb) tiene 281 posiciones de identidad de nucleótidos (20,5 %) con el ortólogo +62 de ratón (longitud 1216 pb). En comparación, de los 2508 pb en la secuencia codificante de *BCL11A* humana, 2424 nucleótidos demuestran identidad (96,7 %) con la secuencia codificante de *Bcl11a* de ratón.

Selección combinada de mutagénesis de saturación del potenciador de CRISPR en estas células informadoras MEL εy:mCherry. La biblioteca de ARNgu de ratón estaba compuesta por ARNgu restringidos tanto por PAM NGG y NAG. Similar a la selección del potenciador humano, los ARNgu se distribuyeron en los sitios diana, con una distancia media al sitio de escisión adyacente de 4 pb y un 90 % de los sitios de escisión adyacentes cayendo dentro de los 18 pb para los ARNgu restringidos por PAM NGG (Figura 9F). Se clonaron con éxito en plásmidos lentivíricos todos los 1271 miembros de la biblioteca con una distribución de representación relativamente estrecha (mediana 735, percentil 10 393, percentil 90 1240 lecturas normalizadas (Figura 9G).

Aunque hubo un ligero enriquecimiento que alcanzó significación estadística, los ARNgu restringidos por PAM NAG mostraron una sobrerrepresentación sustancialmente reducida en relación con los potentes ARNgu restringidos por NGG, por tanto, el análisis adicional se limitó a los ARNgu restringidos por PAM NGG (Figura 9I).

La biblioteca incluía conjuntos de ARNgu que incluían ortólogos DHS +55, +58 y +62 de ratón, así como 120 controles negativos no dirigidos y 91 controles positivos dirigidos al exón-2 de *Bcl11a* (Figura 9E).

Después de la transducción a baja multiplicidad por la biblioteca lentivírica, y cultivo *in vitro* durante dos semanas, las células se clasificaron en grupos de εy:mCherry alto y bajo (Figura 9H). Se realizó una secuenciación profunda del ADN genómico para evaluar la representación de las bibliotecas de ARNgu en las agrupaciones. Los ARNgu de control negativo no dirigidos se representaron de manera uniforme en el grupo de εy:mCherry alto en comparación con el grupo de εy:mCherry bajo mientras que los ARNgu dirigidos al exón-2 de *Bcl11a* de control positivo con PAM NGG estaban significativamente sobrerrepresentados en el grupo εy:mCherry alto (Figura 9I). Se observó una fuerte correlación de las puntuaciones de enriquecimiento para ARNgu individuales entre las cuatro copias biológicas de la selección (Figura 9J).

Se analizó la representación de la biblioteca en células que habían completado dos semanas de cultivo *in vitro* (suma de los grupos de εy:mCherry alto y bajo) en comparación con el grupo inicial de plásmidos lentivíricos. La gran mayoría de los ARNgu mostraron una representación equivalente en el conjunto de plásmidos inicial y como integrantes en las

células al finalizar el experimento (Figura 10A). Un pequeño número de ARNgu (n = 8) mostró un error sustancial > 2^{-3} y se eliminaron del análisis de enriquecimiento posterior. Similar a la selección humana, estos se mapearon a elementos repetidos (Figura 10C).

EJEMPLO 2

Edición del genoma con ARNgu restringidos por NGA

En los estudios iniciales se utilizó SpCas9 para la edición del genoma del potenciador de eritroides *BCL11A*. Esta nucleasa se utiliza normalmente junto con ARNgu restringidos por la secuencia del motivo protoespaciador (PAM) NGG. Posteriormente se probó la capacidad de una nucleasa Cas9 alternativa junto con ARNgu adicionales dirigidos a las secuencias +58 del potenciador de eritroides *BCL11A* para dar como resultado la alteración de la expresión de BCL11A y la posterior inducción de hemoglobina fetal (HbF). Se transdujo de manera estable células HUDEP-2 con SpCas9-VQR[74], que a diferencia de SpCas9, está restringida por la secuencia del motivo adyacente protoespaciador (PAM) NGA en lugar de NGG. Se probó una biblioteca lentivírica de ARNgu restringidos por el PAM NGA dirigido a +58 del potenciador de *BCL11A*. Las células se transdujeron con la biblioteca lentivírica a baja multiplicidad, de modo que cada célula transducida portaba un solo integrante de ARNgu. Cada ARNgu se representó 1000 veces por célula. Las celdas se expandieron, diferenciaron y tiñeron para HbF. Las poblaciones con HbF alta y HbF baja se clasificaron mediante FACS. Se aisló el ADN genómico y los ARNgu se secuenciaron en profundidad para determinar el enriquecimiento en el grupo de HbF alta. Se identificaron 5 ARNgu restringidos por NGA dirigidos a +58 de *BCL11A* que se asociaron con un enriquecimiento significativo de HbF (véase la Tabla 9). El ARNgu restringido por NGA de mayor puntuación, BCL_NGA_00069, especifica una posición de escisión en hg19 cr2: 60.722.388 que está a solo 4 pb de la posición de escisión de BCL_01621, el ARNgu de mayor puntuación de la selección de ARNgu restringida por NGG. Estos resultados indican que la edición del genoma con la variante SpCas9-VQR y los ARNgu restringidos por NGA en secuencias potenciadoras +58 de *BCL11A* son suficientes para alterar la expresión de BCL11A y dar como resultado un nivel elevado de HbF.

Interferencia de CRISPR con dCas9-KRAB

Además de los usos de la edición del genoma con CRISPR mediante la producción de roturas de doble hebra específicas, Cas9 puede reutilizarse para regular la expresión génica mediante la edición del epigenoma. Un método es usar una versión catalítica inactiva de Cas9 (dCas9) acoplada a un dominio de represión transcripcional como el dominio de caja asociada de Kruppel (KRAB, por sus siglas en inglés)[73]. En este modo, los ARNgu pueden dirigir el represor transcripcional dCas9-KRAB a los loci genómicos específicos para dar como resultado la represión génica. Se probó la capacidad de dCas9-KRAB con ARNgu dirigidos al potenciador de *BCL11A* para mediar la represión genética de *BCL11A* y posterior inducción de HbF. Se observó reducción de la expresión de *BCL11A* e inducción de la expresión de gamma-globina con dos ARNgu dirigidos a +58 de *BCL11A* (BCL_01617 y BCL_01621, véase la Tabla 7) en comparación con un control no dirigido (ver FIG. 12). Estos resultados indican que la edición de epigenomas dirigida a secuencias esenciales en el potenciador de *BCL11A* es suficiente para alterar la expresión de *BCL11A* y dar como resultado un nivel elevado de HbF.

Bibliografía

1. Banerji, J., Rusconi, S. y Schaffner, W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. Cell 27, 299-308 (1981).

2. Visel, A. *et al.* ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. Nature 457, 854-858 (2009).

3. Thurman, R. E. *et al.* The accessible chromatin landscape of the human genome. Nature 489, 75-82 (2012).

4. Dunham, I. *et al.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature 489, 57-74 (2012).

5. Johnson, D. S., Mortazavi, A. y Myers, R. M. Genome-Wide Mapping of *in Vivo* Protein-DNA Interactions. Science, 316, 1497-1503 (2007).

6. Barski, A. *et al.* High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. Cell 129, 823-837 (2007).

7. Andersson, R. *et al.* An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. Nature 507, 455-61 (2014).

8. Consortium, R. E. *et al.* Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. Nature 518, 7539 (2015).

9. Heintzman, N. D. *et al.* Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. Nature 459, 108-112 (2009).

10. Creyghton, M. P. *et al.* Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 107, 21931-21936 (2010).

11. Rada-Iglesias, A. *et al.* A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. Nature 470, 279-283 (2011).

12. Xu, J. *et al.* Combinatorial assembly of developmental stage-specific enhancers controls gene expression programs during human erythropoiesis. Dev. Cell 23, 796-811 (2012).

13. Ernst, J. *et al.* Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. Nature 473, 43-49 (2011).

14. Parker, S. C. J. *et al.* Chromatin stretch enhancer states drive cell-specific gene regulation and harbor human disease risk variants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 110, 17921-6 (2013).

15. Whyte, W. A. *et al.* Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. Cell 153, 307-319 (2013).

16. Paul, D. S. *et al.* Maps of open chromatin guide the functional follow-up of genome-wide association signals: Application to hematological traits. PLoS Genet. 7, (2011).

17. Maurano, M. T. *et al.* Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. Science, 337, 1190-1195 (2012).

18. Hnisz, D. *et al.* Super-enhancers in the control of cell identity and disease. Cell 155, 934-47 (2013).

19. Farh, K. K.-H. *et al.* Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. Nature (2014). doi:10.1038/nature13835

20. Hardison, R. C. Variable evolutionary signatures at the heart of enhancers. Nat. Genet. 42, 734-735 (2010).

21. Blow, M. J. *et al.* ChIP-Seq identification of weakly conserved heart enhancers. Nat. Genet. 42, 806-810 (2010).

22. May, D. *et al.* Large-scale discovery of enhancers from human heart tissue. Nat. Genet. 44, 89-93 (2011).

23. Vierstra, J. *et al.* Mouse regulatory DNA landscapes reveal global principles of cis-regulatory evolution. Science 346, 1007-1012 (2014).

24. Villar, D. *et al.* Enhancer Evolution across 20 Mammalian Species. Cell 160, 554-566 (2015).

25. Pennacchio, L. *et al. In vivo* enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. Nature 444, 499-502 (2006).

26. Melnikov, A. *et al.* Systematic dissection and optimization of inducible enhancers in human cells using a massively parallel reporter assay. Nat. Biotechnol. 30, 271-277 (2012).

27. Patwardhan, R. P. *et al.* Massively parallel functional dissection of mammalian enhancers *in vivo*. Nat. Biotechnol. 30, 265-270 (2012).

28. Lieberman-Aiden, E. *et al.* Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. Science (80-.). 326, 289-294 (2009).

29. Dixon, J. R. *et al.* Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. Nature 485, 376-380 (2012).

30. Nord, A. S. *et al.* Rapid and pervasive changes in genome-wide enhancer usage during mammalian development. Cell 155, 1521-1531 (2013).

31. Sexton, T. y Cavalli, G. Review The Role of Chromosome Domains in Shaping the Functional Genome. Cell 160, 1049-1059 (2015).

32. Bender, M., Bulger, M., Close, J. y Groudine, M. Beta-globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous beta-globin locus in mice do not require the locus control region. Mol. Cell 5, 387-393 (2000).

33. Johnson, K. D. *et al.* Cis-element mutated in GATA2-dependent immunodeficiency governs hematopoiesis and vascular integrity. J. Clin. Invest. 122, 3692-3704 (2012).

34. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 339, 819-23 (2013).

35. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science, 339, 823-6 (2013).

36. Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M. y Lander, E. S. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. Science, 343, 80-4 (2014).

37. Shalem, O. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science, 343, 84-7 (2014).
38. Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E.-P., Del Castillo Velasco-Herrera, M. y Yusa, K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. Nat. Biotechnol. 1-10 (IAD).

39. Mathelier, A. *et al.* JASPAR 2014: An extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. Nucleic Acids Res. 42, 142-147 (2014).

40. Zhou, Y. *et al.* High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. Nature (2014).

41. Chen, S. *et al.* Genome-wide CRISPR Screen in a Mouse Model of Tumor Growth and Metastasis Resource Genome-wide CRISPR Screen in a Mouse Model of Tumor Growth and Metastasis. Cell 160, 1-15 (2015).

42. Bauer, D. E. *et al.* An Erythroid Enhancer of BCL11A Subject to Genetic Variation Determines Fetal Hemoglobin Level. Science, 342, 253-257 (2013).

43. Groschel, S. *et al.* A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in Leukemia. Cell 157, 369-381 (2014).

44. Mansour, M. R. *et al.* An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. Science, 10-15 (2014).

45. Sankaran, V. G. *et al.* Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. Science, 322, 1839-1842 (2008).

46. Sankaran, V. G. *et al.* Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. Nature 460, 1093-1097 (2009).

47. Xu, J. *et al.* Correction of sickle cell disease in adult mice by interference with fetal hemoglobin silencing. Science, 334, 993-996 (2011).

48. Hardison, R. C. y Blobel, G. A. GWAS to therapy by genome edits? Science, 342, 206-7 (2013).

49. Kurita, R. *et al.* Establishment of Immortalized Human Erythroid Progenitor Cell Lines Able to Produce Enucleated Red Blood Cells. PLoS One 8, e59890 (2013).

50. Canver, M. C. *et al.* Characterization of Genomic Deletion Efficiency Mediated by Clusted Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas9 Nuclease System in Mammalian Cells. J. Biol. Chem. 289, 21312-21324 (2014).

51. Mandal, P. K. *et al.* Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9. Cell Stem Cell 15, 643-652 (2014).

52. Ran, F. A. *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell 154, 1380-9 (2013).

53. Hsu, P. D. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat. Biotechnol. 31, 827-32 (2013).

54. Cui, F., Sirotin, M. V y Zhurkin, V. B. Impact of Alu repeats on the evolution of human p53 binding sites. Biol. Direct 6, 2 (2011).

55. Porcu, B. S. *et al.* The human β globin locus introduced by YAC transfer exhibits a specific and reproducible pattern of developmental regulation in transgenic mice. Blood 90, 4602-4609 (1997).

56. Liu, P. *et al.* Bcl11a is essential for normal lymphoid development. Nat. Immunol. 4, 525-532 (2003).

57. John, A. *et al.* Bcl11a is required for neuronal morphogenesis and sensory circuit formation in dorsal spinal cord development. Development 139, 1831-41 (2012).

58. Yu, Y. *et al.* Bcl11a is essential for lymphoid development and negatively regulates p53. J. Exp. Med. 209, 2467-83 (2012).

59. Crocker, J. *et al.* Low Affinity Binding Site Clusters Confer Hox Specificity and Regulatory Robustness. Cell 191-203 (2015).

60. Bauer, D. E. y Orkin, S. H. Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies. Curr. Opin. Pediatr. 23, 1-8 (2011).

61. Bauer, D. E., Kamran, S. C. y Orkin, S. H. Reawakening fetal hemoglobin: Prospects for new therapies for the beta-globin disorders. Blood 120, 2945-2953 (2012).

62. Sankaran, V. G. y Orkin, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 3, 1-14 (2013).

63. Bauer, D. E. E., Kamran, S. C. C. y Orkin, S. H. H. Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the β-globin disorders. Blood 120, 2945-2953 (2012).

64. Sanjana, N. E., Shalem, O. y Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. Nat. Methods 11, 783-784 (2014).

65. Giarratana, M. *et al.* Proof of principle for transfusion of *in vitro* generated red blood cells. Blood 118, 5071-5079 (2011).

66. Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M. y van Steensel, B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. Nucleic Acids Res. 1-8 (2014).

67. Bauer, D. E., Canver, M. C. y Orkin, S. H. Generation of Genomic Deletions in Mammalian Cell Lines via CRISPR/Cas9. J. Vis. Exp. 1-10 (2014).

68. Canver, M. C. *et al.* Characterization of Genomic Deletion Efficiency Mediated by CRISPR/Cas9 in Mammalian Cells. J. Biol. Chem. 289, 21312-21324 (2014).

69. Kowalczyk, M. S. *et al.* Intragenic Enhancers Act as Alternative Promoters. Mol. Cell 45, 447-458 (2012).

70. Grant, C. E., Bailey, T. L. y Noble, W. S. FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. Bioinformatics 27, 1017-1018 (2011).

71. Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C. y Fehse, B. A multicolor panel of novel lentiviral 'gene ontology' (LeGO) vectors for functional gene analysis. Mol. Ther. 16, 698-706 (2008).

72. Doench, J. G. *et al.* Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. Nat Biotechnol 32, (2014).

73. Gilbert, L. A, *et al.*. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. Cell 154(2): 442-451, (2013).

74. Kleinstiver, B. P., *et al.*. Engineered CRISPR-Cas9 Nucleases with Altered PAM Specificities. Nature 523 (7561): 481-85. (2015).

Tabla 1. Secuencias de ARNgu

SEQ. ID. NO:	Región o gen diana de ARNgu	Especie	Secuencia
154	Diana 1 Potenciador compuesto en 5'	Humana	TGGAAAGGAGAACGGCCCGG
155	Diana 2 Potenciador compuesto en 5'	Humana	TGAACACCCTCGTTAAAGGC
156	Diana 3 Potenciador compuesto en 5'	Humana	AACACTAGCCCACATGCCAA
157	Diana 1 Potenciador compuesto en 3'	Humana	GCCCACAGAGGCACGGTTAA
158	Diana 2 Potenciador compuesto en 3'	Humana	AGGCACGGTTAATGGTGGCG
159	Diana 3 Potenciador compuesto en 3'	Humana	CACAGGAAGCCATGGTCCTT
160	Diana 1 +55 en 5'	Humana	GCACTGACGTAGGTAGTGAC
161	Diana 2 +55 en 5'	Humana	ATAGGATATGGCACTGACGT
162	Diana 1 +55 en 3'	Humana	CATTATCTTCTCTGGTCTCG
163	Diana 2 +55 en 3'	Humana	ATACTGGGGAACACATTGTA
164	Diana 1 +58 en 5'	Humana	TGAGCACATTCTTACGCCTA
165	Diana 2 +58 en 5'	Humana	CTAGGCGTAAGAATGTGCTC
166	Diana 1 +58 en 3'	Humana	GAACCCCCTATAAACTAGTC
167	Diana 2 +58 en 3'	Humana	GGCAAACCAGACTAGTTTAT
168	Diana 1 +62 en 5'	Humana	CAGGGGAGAACTCGGCATGA
169	Diana 2 +62 en 5'	Humana	GATGGAGTTGGTTGACCGTA
170	Diana 1 +62 en 3'	Humana	GGTAGGACCCAACACTACGC
171	Diana 2 +62 en 3'	Humana	ATGCCTAGGGTGTTTTGACG
172	Diana 2 Exón 2 de *BCL11A*	Humana	TGAACCAGACCACGGCCCGT
173	Diana 3 Exón 2 de *BCL11A*	Humana	GCATCCAATCCCGTGGAGGT
174	Diana +55 en 5'	Ratón	CACTGGCTTCCTGTTCTTGT
175	Diana +55 en 3'	Ratón	AAGGTTTTCAAGGCAAATAA
176	Diana +58 en 5'	Ratón	GTAATGGAGCCCGCATGCTG
177	Diana +58 en 3'	Ratón	GCCAGTGTACAGGCAAGTAC
178	Diana +62 en 5'	Ratón	TCGCTGCCTTCAGTTCTGCT
179	Diana +62 en 3'	Ratón	TTATGGAACTCAGGAACTGC
180	Diana Exón 2 de *Bcl11a*	Ratón	GATGCCTTTTTCATCTCGAT
181	Diana 1 Matriz cromática de +62	Ratón	ATTCCTTGAGTGTCATATAT
182	Diana 2 Matriz cromática de +62	Ratón	TCTGGAATCACTATGTATAT

Tabla 2. Cebadores de oligonucleótidos para selección de clones por eliminación

SEQ. ID. NO:	Gen o región	Especie	No eliminación (NE) o eliminación (E)	Par CRISPR	Orientación	Secuencia
183	Potenciador compuesto	Humana	NE	Diana 3 en 5'	Directa	TGCTCCGAGCTTGTGAACTA
184				Diana 1 en 3'	Inversa	TATCACAGGCTCCAGGAAGG
185	Potenciador compuesto	Humana	E	Diana 3 en 5'	Directa	TAGTTTGCTTCCCCCAATGA
186				Diana 1 en 3'	Inversa	GCCAGGAAATTGGTGGTAGA
187	Potenciador compuesto	Humana	NE	Diana 2 en 5'	Directa	TGCTCCGAGCTTGTGAACTA
188				Diana 2 en 3'	Inversa	TATCACAGGCTCCAGGAAGG
189	Potenciador compuesto	Humana	E	Diana 2 en 5'	Directa	GTGGGCAGTTACGTTTTCGT
190				Diana 2 en 3'	Inversa	GCCAGGAAATTGGTGGTAGA
191	+55	Humana	NE	Diana 1 o 2 en 5'	Directa	GGTCAGGGTGTTGCAGAGAT
192				Diana 1 o 2 en 3'	Inversa	CACACCCTGTGATCTTGTGG
193	+55	Humana	E	Diana 1 o 2 en 5'	Directa	GACTTAAACTGCCGCTCCTG
194				Diana 1 o 2 en 3'	Inversa	GGGCCTCAGGCTCTTTATCT
195	+58	Humana	NE	Diana 1 o 2 en 5'	Directa	CCCAGAGCTCAGTGAGATGA
196				Diana 1 o 2 en 3'	Inversa	GGGAAAGGGCCTGATAACTT
197	+58	Humana	E	Diana 1 o 2 en 5'	Directa	GAACAGAGACCACTACTGGC AAT
198				Diana 1 o 2 en 3'	Inversa	CTCAGAAAAATGACAGCACC A
199	+62	Humana	NE	Diana 1 o 2 en 5'	Directa	TTTGAAAGTACCAGCACAGC A
200				Diana 1 o 2 en 3'	Inversa	CCCTCTGGCATCAAAATGAG
201	+62	Humana	E	Diana 1 o 2 en 5'	Directa	AACAGACCCATGTGCTAGGC
202				Diana 1 o 2 en 3'	Inversa	TGCTGAATTCCTGTAAAGTG AGG

(continuación)

SEQ. ID. NO:	Gen o región	Especie	No eliminación (NE) o eliminación (E)	Par CRISPR	Orientación	Secuencia
203	+55	Ratón	NE	Diana en 5'	Directa	GAGGTGACCAGGGTGTGAGT
204				Diana en 3'	Inversa	AAGAAGAGGCCCTGGACATT
205	+55	Ratón	E	Diana en 5'	Directa	CATCTTAAGGCAAGAATCACT
206				Diana en 3'	Inversa	CCAGTCAATCCAAACCCTGT
207	+58	Ratón	NE	Diana en 5'	Directa	TATTAATGCCCAGCCAGCTC
208				Diana en 3'	Inversa	GTGGTCCAGACCTAGCCAAG
209	+58	Ratón	E	Diana en 5'	Directa	TTTGAGCAGGAGGGAATTTG
210				Diana en 3'	Inversa	ATAGGTGGTTGGGCTTCTCC
211	+62	Ratón	NE	Diana en 5'	Directa	GGAGTGGCTGTTGAAAGAGG
212				Diana en 3'	Inversa	CACTCAAGGAATGCAAGCAA
213	+62	Ratón	E	Diana en 5'	Directa	TACTTGGTGGCTTTCCCAAC
214				Diana en 3'	Inversa	AGATGGTCCTCTGCATCCAC

Tabla 3. Cebadores de oligonucleótidos para selección de clones por inversión

SEQ. ID. NO:	Región invertida	Especie	Par CRISPR	Orientación	Secuencia
215	+55	Humana	Diana 1 o 2 en 5'	Directa	GACTTAAACTGCCGCTCCTG
216			Diana 1 o 2 en 3'	Directa	AGGCATCCAAAGGGAAGAAT
217	+55	Humana	Diana 1 o 2 en 5'	Inversa	ACTTCAGCCTCCAGCACTGT
218			Diana 1 o 2 en 3'	Inversa	CCACTGGAGTGGAACCAAGT
219	+58	Humana	Diana 1 o 2 en 5'	Directa	GGGATCAGAGGTGAACAGGA
220			Diana 1 o 2 en 3'	Directa	TGGACTTTGCACTGGAATCA
221	+58	Humana	Diana 1 o 2 en 5'	Inversa	TTGTTTACAGAGGGGCAACC
222			Diana 1 o 2 en 3'	Inversa	GGGGAAGGGGTATTGAATTG
223	+62	Ratón	Diana 1 o 2 en 5'	Directa	AACAGACCCATGTGCTAGGC
224			Diana 1 o 2 en 3'	Directa	GAACCTGGGAGGCAGAAGAT
225	+62	Ratón	Diana 1 o 2 en 5'	Inversa	TGTGTGGACTGCCTTTTCTG
226			Diana 1 o 2 en 3'	Inversa	TGTGGAGCTCTGGAATGATG

Tabla 4. Cebadores de oligonucleótidos para análisis de eliminación de +62 de ratón

SEQ. ID. NO:	Región	Especie	Par CRISPR	Orientación	Secuencia
227	+62	Ratón	Selección 0484	Directa	GGTAGTGTGGGGGTGGAGT
228			Selección 0475	Inversa	TCAGCCTGTTCCCTCAGTG
229	+62	Ratón	Selección 0484	Directa	GGTAGTGTGGGGGTGGAGT
230			Selección 2456	Inversa	TCAGCCTGTTCCCTCAGTG
231	+62	Ratón	Selección 0475	Directa	GGTAGTGTGGGGGTGGAGT
232			Selección 0490	Inversa	TCAGCCTGTTCCCTCAGTG
233	+62	Ratón	Selección 0490	Directa	GGTAGTGTGGGGGTGGAGT
234			Diana +62 en 3'	Inversa	AGATGGTCCTCTGCATCCAC
235	+62	Ratón	Selección 0490	Directa	GGTAGTGTGGGGGTGGAGT
236			Diana 1 Matriz cromática de +62	Inversa	TCAGCCTGTTCCCTCAGTG
237	+62	Ratón	Diana +62 en 5'		TACTTGGTGGCTTTCCCAAC
238			Selección 0475	Inversa	TCAGCCTGTTCCCTCAGTG
239	+62	Ratón	Diana 2 Matriz cromática de +62	Directa	ATGCTTGGTTGTCGCCTTAT
240			Selección 0475	Inversa	CACTCAAGGAATGCAAGCAA

Tabla 5. Oligonucleótidos para RT qPCR

SEQ. ID. NO:	Gen	Especie	Orientación	Secuencia
241	*GAPDH*	Humana		ACCCAGAAGACTGTGGATGG
242			Inversa	TTCAGCTCAGGGATGACCTT
243	*HBB*	Humana		CTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA
244			Inversa	AGCATCAGGAGTGGACAGAT
245	*HBG*	Humana		TGGATGATCTCAAGGGCAC
246			Inversa	TCAGTGGTATCTGGAGGACA
247	*HBE*	Humana		GCAAGAAGGTGCTGACTTCC
248			Inversa	ACCATCACGTTACCCAGGAG
249	*HBD*	Humana		GAGGAGAAGACTGCTGTCAATG
250			Inversa	AGGGTAGACCACCAGTAATCTG
251	*BCL11A*	Humana		AACCCCAGCACTTAAGCAAA
252			Inversa	GGAGGTCATGATCCCCTTCT
253	*Gapdh*	Ratón	Directa	TGGTGAAGGTCGGTGTGAAC
254			Inversa	CCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG
255	*β-Mayor*	Ratón		TTTAACGATGGCCTGAATCACTT
256			Inversa	CAGCACAATCACGATCATATTGC
257	*Hbb-εy*	Ratón	Directa	TGGCCTGTGGAGTAAGGTCAA
258			Inversa	GAAGCAGAGGACAAGTTCCCA
259	*Hbb-βh1*	Ratón	Directa	TGGACAACCTCAAGGAGACC
260			Inversa	ACCTCTGGGGTGAATTCCTT
261	*Bcl11a*	Ratón	Directa	AACCCCAGCACTTAAGCAAA
262			Inversa	ACAGGTGAGAAGGTCGTGGT

Tabla 6. Ubicación de la región potenciadora de *BCL11A* para direccionamiento para lograr atenuación de BCL11A

cromosoma	coordenada de inicio (hg19)	coordenada final (hg19)	nombre
cr2	60725424	60725688	región funcional +55
cr2	60722238	60722466	región funcional +58
cr2	60718042	60718186	región funcional +62

Tabla 7. Secuencias de ARNgu de direccionamiento que produjeron un enriqueciminento de HbF superior a 0,259

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención

SEQID NO:	Identificador	Secuencia de ARNgu	PAM	Sitio diana	Coordenada en relación con TSS	Coordenada genómica Cr2 (hg19)	Puntuación de enriquecimiento	Puntuación de error
1	BCL_00108_H_D55	TCTGAGGAGCTAGAGACTTG	NGG	DHS_55	54701	60725932	0,3065268	-0,64986
2	BCL_00096_H_D55	AGCAAATAGGCTTAGTGTGC	NGG	DHS_55	54874	60725759	0,35208854	-0,23956
3	BCL_01427_H_D55	GGCTAAATAATGAATGTCCC	NGGRC	DHS_55	54944	60725689	0,36697304	-0,27163
4	BCL_00093_H_D55	TCCCTTCCTAGAATTGGCCT	NGG	DHS_55	54950	60725683	0,52834198	-0,56164
5	BCL_00092_H_D55	TTCCCTTCCTAGAATTGGCC	NGG	DHS_55	54951	60725682	0,40353821	-0,43691
6	BCL_01428_H_D55	GAATGTCCCAGGCCAATTCT	NGGRC	DHS_55	54955	60725678	0,4298807	-0,54353
7	BCL_00091_H_D55	CCCACTTCCCTTCCTAGAAT	NGG	DHS_55	54956	60725677	1,16779598	-0,50425
8	BCL_00090_H_D55	CCTGGTACCAGGAAGGCAAT	NGG	DHS_55	54989	60725644	0,46505933	-0,52917
9	BCL_00089_H_D55	TCCTGGTACCAGGAAGGCAA	NGG	DHS_55	54990	60725643	0,35594471	-0,78622

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención								
SEQID NO:	**Identificador**	**Secuencia de ARNgu**	**PAM**	**Sitio diana**	**Coordenada en relación con TSS**	**Coordenada genómica Cr2 (hg19)**	**Puntuación de enriquecimiento**	**Puntuación de error**
10	BCL_ 00088_H_ D55	GCATCATCCTGGTACCAGGA	NGG	DHS_55	54996	60725637	0,43864112	-0,37134
11	BCL_ 00087_H_ D55	CATTGCATCATCCTGGTACC	NGG	DHS_55	55000	60725633	0,43801718	-0,22534
12	BCL_ 00086_H_ D55	CTCCAAGCATTGCATCATCC	NGG	DHS_55	55007	60725626	0,63433419	-0,27033
13	BCL_ 01438_H_ D55	TACCAGGATGATGCAATGCT	NGGRC	DHS_55	55016	60725617	0,91292075	-0,34122
14	BCL_ 00085_H_ D55	GGGTGTGCCCTGAGAAGGTG	NGG	DHS_55	55040	60725593	0,50114706	-0,6263
15	BCL_ 00084_H_ D55	AGGGTGTGCCCTGAGAAGGT	NGG	DHS_55	55041	60725592	0,31100243	-0,36912
16	BCL_ 00082_H_ D55	TCACAGGGTGTGCCCTGAGA	NGG	DHS_55	55045	60725588	0,41742767	-1,08709
17	BCL_ 01443_H_ D55	GGCACACCCTGTGATCTTGT	NGGRC	DHS_55	55065	60725568	0,41807361	0,257924
18	BCL_ 00073_H_ D55	AGCACACAAGATGCACACCC	NGG	DHS_55	55096	60725537	0,41986965	-0,83722

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención								
SEQID NO:	**Identificador**	**Secuencia de ARNgu**	**PAM**	**Sitio diana**	**Coordenada en relación con TSS**	**Coordenada genómica Cr2 (hg19)**	**Puntuación de enriquecimiento**	**Puntuación de error**
19	BCL_ 01448_H_ D55	TGTGCTTGGTCGGCACTGAT	NGGRC	DHS_55	55124	60725509	1,34772811	-0,49527
20	BCL_ 01449_H_ D55	GTGCTIGGTCGGCACTGATA	NGGRC	DHS_55	55125	60725508	1,13392025	-0,61013
21	BCL_ 01450_H_ D55	TGCTTGGTCGGCACTGATAG	NGGRC	DHS_55	55126	60725507	1,5783257	-0,31949
22	BCL_ 01454_H_ D55	GGGTCGCGGTAGGGAGTTGT	NGGRC	DHS_55	55146	60725487	0,35789318	-0,55774
23	BCL_ 00065_H_ D55	GCCAACAGTGATAACCAGCA	NGG	DHS_55	55235	60725398	0,48864454	-0,54147
24	BCL_ 00064_H_ D55	TGCCAACAGTGATAACCAGC	NGG	DHS_55	55236	60725397	0,51080164	-0,35814
25	BCL_ 01461_H_ D55	GCCCTGCTGGTTATCACTGT	NGGRC	DHS_55	55245	60725388	0,59624098	-0,51154
26	BCL_0O062 H D55	AGCAGCCCTGGGCACAGAAG	NGG	DHS_55	55272	60725361	0,32514466	-0,64013
27	BCL_ 00058_H_ D55	CCTCTATGTAGACGGGTGTG	NGG	DHS_55	55311	60725322	0,32368336	-0,4848

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención								
SEQID NO:	**Identificador**	**Secuencia de ARNgu**	**PAM**	**Sitio diana**	**Coordenada en relación con TSS**	**Coordenada genómica Cr2 (hg19)**	**Puntuación de enriquecimiento**	**Puntuación de error**
28	BCL_00057_H_D55	GGAAGGGCCTCTATGTAGAC	NGG	DHS_55	55318	60725315	0,45996809	-0,44507
29	BCL_00051_H_D55	GGAGGTGTGGAGGGGATAAC	NGG	DHS_55	55356	60725277	0,31408916	-0,16554
30	BCL_00031_H_D55	CTGGCAGACCCTCAAGAGCA	NGG	DHS_55	55444	60725189	0,32158621	-1,35414
31	BCL_00027_H_D55	CCCATGGAGGTGGGGAGATG	NGG	DHS_55	55474	60725159	0,28225491	-0,45625
32	BCL_01483_H_D55	GTCATCCTCGGCCAATGAAG	NGGRC	DHS_55	55559	60725074	0,43184473	-0,40557
33	BCL_00012_H_D55	AAGTGAGCCAGGTGATAGAA	NGG	DHS_55	55585	60725048	0,35107033	-0,01983
34	BCL_00008_H_D55	TGAAACCAAGCTTCCTCTGC	NGG	DHS_55	55612	60725021	0,27412127	-0,23029
35	BCL_01495_H_D55	AGGGAGAAATGAGACAAAAG	NGGRC	DHS_55	55700	60724933	0,26434414	-0,49318
36	BCL_01497_H_D55	AAGAGGCCACTGAGTCCTTT	NGGRC	DHS_55	55717	60724916	0,43002762	0,456237

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención								
SEQID NO:	**Identificador**	**Secuencia de ARNgu**	**PAM**	**Sitio diana**	**Coordenada en relación con TSS**	**Coordenada genómica Cr2 (hg19)**	**Puntuación de enriquecimiento**	**Puntuación de error**
37	BCL_01617_H_D58	CTAACAGITGCTTTTATCAC	NGGRC	DHS_58	58232	60722401	2,04948208	-0,71934
38	BCL_01618_H_D58	TTGCTTTTATCACAGGCTCC	NGGRC	DHS_58	58239	60722394	0,85613918	-0,81273
39	BCL_01619_H_D58	TTTTATCACAGGCTCCAGGA	NGGRC	DHS_58	58243	60722390	1,66244771	-0,31469
40	BCL_01620_H_D58	TTTATCACAGGCTCCAGGAA	NGGRC	DHS_58	58244	60722389	1,38026011	-0,94808
41	BCL_00187_H_D58	ATCAGAGGCCAAACCCTTCC	NGG	DHS_58	58246	60722387	2,12232899	-0,74438
42	BCL_01621_H_D58	CACAGGCTCCAGGAAGGGTT	NGGRC	DHS_58	58249	60722384	2,31905068	-0,60048
43	BCL_00186_H_D58	CACGCCCCCACCCTAATCAG	NGG	DHS_58	58261	60722372	0,89714161	-0,79647
44	BCL_01622_H_D58	GAAGGGTTTGGCCTCTGATT	NGGRC	DHS_58	58261	60722372	1,37845184	-0,66954
45	BCL_01623_H_D58	AAGGGTTTGGCCTCTGATTA	NGGRC	DHS_58	58262	60722371	1,28521056	-0,26686

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención								
SEQID NO:	**Identificador**	**Secuencia de ARNgu**	**PAM**	**Sitio diana**	**Coordenada en relación con TSS**	**Coordenada genómica Cr2 (hg19)**	**Puntuación de enriquecimiento**	**Puntuación de error**
46	BCL_01624_H_D58	GGTTTGGCCTCTGATTAGGG	NGGRC	DHS_58	58265	60722368	1,47218462	-0,77128
47	BCL_01625_H_D58	GTTTGGCCTCTGATTAGGGT	NGGRC	DHS_58	58266	60722367	0,37182118	-0,94511
48	BCL_01626_H_D58	TTTGGCCTCTGATTAGGGTG	NGGRC	DHS_58	58267	60722366	1,33557005	-0,27239
49	BCL_01627_H_D58	TTGGCCTCTGATTAGGGTGG	NGGRC	DHS_58	58268	60722365	0,30537167	-0,2564
50	BCL_01629_H_D58	TCTGATTAGGGTGGGGGCGT	NGGRC	DHS_58	58274	60722359	1,10417515	0,18067
51	BCL_01631_H_D58	ATTAGGGTGGGGGCGTGGGT	NGGRC	DHS_58	58278	60722355	0,40981324	-0,16153
52	BCL_01634_H_D58	TGGGTGGGGTAGAAGAGGAC	NGGRC	DHS_58	58293	60722340	0,41467523	-1,07834
53	BCL_00185_H_D58	GCAAACGGCCACCGATGGAG	NGG	DHS_58	58309	60722324	0,3196407	-0,51601
54	BCL_00184_H_D58	CCTGGGCAAACGGCCACCGA	NGG	DHS_58	58314	60722319	0,31547607	-0,54143

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 78. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención

SEQID NO:	Identificador	Secuencia de ARNgu	PAM	Sitio diana	Coordenada en relación con TSS	Coordenada genómica Cr2 (hg19)	Puntuación de enriquecimiento	Puntuación de error
55	BCL_ 00183_H_ D58	AAGAGGCCCCCCTGGGCAAA	NGG	DHS_58	58324	60722309	0,78527241	-0,59129
56	BCL_ 01637_H_ D58	CCATCGGTGGCCGTTTGCCC	NGGRC	DHS_58	58325	60722308	0,66904064	-0,50156
57	BCL_ 01638_H_ D58	CATCGGTGGCCGTTTGCCCA	NGGRC	DHS_58	58326	60722307	0,63502753	-0,59285
58	BCL_ 01639_H_ D58	ATCGGTGGCCGTTTGCCCAG	NGGRC	DHS_58	58327	60722306	0,82185918	-0,89805
59	BCL_ 01640_H_ D58	TCGGTGGCCGTTTGCCCAGG	NGGRC	DHS_58	58328	60722305	0,36580154	-1,01297
60	BCL_ 01641_H_ D58	CGGTGGCCGTTTGCCCAGGG	NGGRC	DHS_58	58329	60722304	0,28196886	-0,46328
61	BCL_ 00182_H_ D58	CTTCCGAAAGAGGCCCCCCT	NGG	DHS_58	58331	60722302	0,29420004	0,023956
62	BCL_ 00181_H_ D58	CCTTCCGAAAGAGGCCCCCC	NGG	DHS_58	58332	60722301	0,33994629	0,262073
63	BCL_ 00160_H_ D58	TCAGGGGGAGGCAAGTCAGT	NGG	DHS_58	58575	60722058	0,32935479	-0,31801

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención

SEQID NO:	Identificador	Secuencia de ARNgu	PAM	Sitio diana	Coordenada en relación con TSS	Coordenada genómica Cr2 (hg19)	Puntuación de enriquecimiento	Puntuación de error
64	BCL_ 00154_H_ D58	AGGGAAAAGGGAGAGGAAAA	NGG	DHS_58	58612	60722021	0,4446489	-0,39917
65	BCL_ 01665_H_ D58	TGTAACTAATAAATACCAGG	NGGRC	DHS_58	58706	60721927	0,44183247	-0,65165
66	BCL_ 01669_H_ D58	CCAGCTGAAGAAAGAACATT	NGGRC	DHS_58	58870	60721763	0,31959971	-0,00075
67	BCL_ 00135_H_ D58	CCATCTCCCTAATCTCCAAT	NGG	DHS_58	58958	60721675	0,29845544	-0,04502
68	BCL_ 00131_H_ D58	TGGGGAGAGAAGAGTGGAAA	NGG	DHS_58	59030	60721603	0,26979883	-0,3654
69	BCL_ 00130_H_ D58	GGAGTATGGGGAGAGAAGAG	NGG	DHS_58	59036	60721597	0,37521645	-2,21246
70	BCL_ 01684_H_ D58	ACAACCTCCTTGTTTACAGA	NGGRC	DHS_58	59129	60721504	0,49451625	0,36739
71	BCL_ 01788_H_ D62	GAGATTTACTCTTGTTGCCC	NGGRC	DHS_62	61848	60718785	1,29003182	-5,46287
72	BCL_ 01790_H_ D62	TTGCCCGGGCTGGAATGCAA	NGGRC	DHS_62	61862	60718771	0,46730546	-8,12292

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 78. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención

SEQID NO:	Identificador	Secuencia de ARNgu	PAM	Sitio diana	Coordenada en relación con TSS	Coordenada genómica Cr2 (hg19)	Puntuación de enriquecimiento	Puntuación de error
73	BCL_00245_H_D62	GGAGATCGCTTGAACCTGGG	NGG	DHS_62	61901	60718732	0,47622708	-5,06663
74	BCL_00241_H_D62	CTCAGCTACTCGGGAGGCTG	NGG	DHS_62	61926	60718707	0,6113192	-9,05154
75	BCL_00240_H_D62	TGTAATCTCAGCTACTCGGG	NGG	DHS_62	61932	60718701	0,79003182	-8,69099
76	BCL_00239_H_D62	GCCTGTAATCTCAGCTACTC	NGG	DHS_62	61935	60718698	1,91594174	-6,03102
77	BCL_00238_H_D62	TGCCTGTAATCTCAGCTACT	NGG	DHS_62	61936	60718697	0,6113192	-8,92274
78	BCL_01794_H_D62	CAGGCATGTATTACCATGCC	NGGRC	DHS_62	61964	60718669	0,28012743	-1,01079
79	BCL_00233_H_D62	CAGGAGGATCACCTGAGGTC	NGG	DHS_62	62037	60718596	0,6113192	-9,20231
80	BCL_01799_H_D62	CTCAGGTGATCCTCCTGCCC	NGGRC	DHS_62	62054	60718579	0,91082485	-9,47845
81	BCL_00229_H_D62	CCCAGCACTTTGGGAGGCCG	NGG	DHS_62	62060	60718573	0,6113192	-8,71688

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención								
SEQID NO:	**Identificador**	**Secuencia de ARNgu**	**PAM**	**Sitio diana**	**Coordenada en relación con TSS**	**Coordenada genómica Cr2 (hg19)**	**Puntuación de enriquecimiento**	**Puntuación de error**
82	BCL_ 00228_H_ D62	TCCCAGCACTTTGGGAGGCC	NGG	DHS_62	62061	60718572	0,76104471	-5,65759
83	BCL_ 00227_H_ D62	ATCCCAGCACTTTGGGAGGC	NGG	DHS_62	62062	60718571	0,79003182	-8,09896
84	BCL_ 00225_H_ 062	ACCTGTAATCCCAGCACTTT	NGG	DHS_62	62069	60718564	0,33277348	-8,82052
85	BCL_ 01800_H_ D62	GCCCCGGCCTCCCAAAGTGC	NGGRC	DHS_62	62070	60718563	0,6113192	-7,64956
86	BCL_ 01801_H_ D62	CCCCGGCCTCCCAAAGTGCT	NGGRC	DHS_62	62071	60718562	0,6113192	-8,0566
87	BCL_ 01825_H_ D62	ATTTGCTCTTCTCCAGGGTG	NGGRC	DHS_62	62469	60718164	0,28180883	-0,39453
88	BCL_ 00210_H_ D62	TAAACAGCCACCCCACACCC	NGG	DHS_62	62470	60718163	0,70263344	-0,87051
89	BCL_ 01826_H_ D62	TTTGCTCTTCTCCAGGGTGT	NGGRC	DHS_62	62470	60718163	0,40028858	-0,33863
90	BCL_ 01828_H_ D62	CTCTTCTCCAGGGTGTGGGG	NGGRC	DHS_62	62474	60718159	0,34846068	-0,39104

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 38-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención

SEQID NO:	Identificador	Secuencia de ARNgu	PAM	Sitio diana	Coordenada en relación con TSS	Coordenada genómica Cr2 (hg19)	Puntuación de enriquecimiento	Puntuación de error
91	BCL_01829_H_D62	TGTGGGGTGGCTGTTTAAAG	NGGRC	DHS_62	62487	60718146	0,49598477	-0,14693
92	BCL_01831_H_D62	GGGTGGCTGTTTAAAGAGGG	NGGRC	DHS_62	62491	60718142	0,41044562	-0,14856
93	BCL_01833_H_D62	AGTTCAAGTAGATATCAGAA	NGGRC	DHS_62	62580	60718053	0,61158376	0,228869
94	BCL_01834_H_D62	TATCAGAAGGGAACTGTTTG	NGGRC	DHS_62	62592	60718041	0,40286685	0,023271
95	BCl_0201S_H_exón2	AAGAATGGCTTCAAGAGGCT	NGGRC	exón 2	7218	60773415	1,06436679	-1,34908
96	BCL_02014_H_exón2	TCTGTAAGAATGGCTTCAAG	NGGRC	exón 2	7223	60773410	0,99011778	-0,7711
97	8CL_00248_H_exón2	ACAGATGATGAACCAGACCA	NGG	exón 2	7224	60773409	1,60874074	-2,53181
98	BCL_00249_H_exón2	TGAACCAGACCACGGCCCGT	NGG	exón 2	7232	60773401	1,1752178	-0,82211
99	BCL_00250_H_exón2	GAACCAGACCACGGCCCGTT	NGG	exón 2	7233	60773400	1,58125311	-0,68474

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención								
SEQID NO:	**Identificador**	**Secuencia de ARNgu**	**PAM**	**Sitio diana**	**Coordenada en relación con TSS**	**Coordenada genómica Cr2 (hg19)**	**Puntuación de enriquecimiento**	**Puntuación de error**
100	BCL_ 00251_H_ exón2	GGCCCGTTGGGAGCTCCAGA	NGG	exón 2	7245	60773388	1,91082485	-1,23576
101	BCL_ 00252_H_ exón2	GCCCGTTGGGAGCTCCAGAA	NGG	exón 2	7246	60773387	0,54529072	0,092119
102	BCL_ 00253_H_ exón2	CCCGTTGGGAGCTCCAGAAG	NGG	exón 2	7247	60773386	1,20485173	-1,96839
103	BCL_ 02011_H_ exón2	CTGGAGCTCCCAACGGGCCG	NGGRC	exón 2	7258	60773375	0,6044195	0,791184
104	BCL_ 02010_H_ exón2	CCCCTTCTGGAGCTCCCAAC	NGGRC	exón 2	7264	60773369	0,50032578	-0,14628
105	BCL_ 02009_H_ exón2	TCCCCTTCTGGAGCTCCCAA	NGGRC	exón 2	7265	60773368	2,10774428	-1,69298
106	BCL_ 00254_H_ exón2	GATCATGACCTCCTCACCTG	NGG	exón 2	7269	60773364	2,19780485	-2,25564
107	BCL_ 00255_H_ exón2	ATCATGACCTCCTCACCTGT	NGG	exón 2	7270	60773363	1,70330708	-2,49715
108	BCL_ 02008_H_ exón 2	AGGAGGTCATGATCCCCTTC	NGGRC	exón 2	7277	60773356	0,34947658	-0,44825

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 78. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención

SEQID NO:	Identificador	Secuencia de ARNgu	PAM	Sitio diana	Coordenada en relación con TSS	Coordenada genómica Cr2 (hg19)	Puntuación de enriquecimiento	Puntuación de error
109	BCL_ 02007_H_ exón2	GGCACTGCCCACAGGTGAGG	NGGRC	exón 2	7294	60773339	3,35094127	-1,66199
110	BCL_ 00256_H_ exón2	GTGCCAGATGAACTTCCCAT	NGG	exón 2	7295	60773338	1,89017832	-1,76407
111	BCL_ 00257_H_ exón2	TGCCAGATGAACTTCCCATT	NGG	exón 2	7296	60773337	1,94508027	-1,9609
112	BCL_ 00258_H_ exón2	GCCAGATGAACTTCCGATTG	NGG	exón 2	7297	60773336	1,59275545	-1,89857
113	BCL_ 02006_H_ exón2	TCTGGCACTGCCCACAGGTG	NGGRC	exón 2	7297	60773336	1,48917633	-2,02947
114	BCL_ 00259_H_ exón2	CCAGATGAACTTCCCATTGG	NGG	exón 2	7298	60773335	3,26617426	-3,32127
115	BCL_ 02005_H_ exón2	GTTCATCTGGCACTGCCCAC	NGGRC	exón 2	7302	60773331	3,20226887	-1,83694
116	BCL_ 02004_H_ exón 2	CCCCCAATGGGAAGTTCATC	NGGRC	exón 2	7315	60773318	0,46854155	-0,11887
117	BCL_ 02003_H_ exón2	AAATAAGAATGTCCCCCAAT	NGGRC	exón 2	7327	60773306	1,08475851	-0,09695

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención

SEQID NO:	Identificador	Secuencia de ARNgu	PAM	Sitio diana	Coordenada en relación con TSS	Coordenada genómica Cr2 (hg19)	Puntuación de enriquecimiento	Puntuación de error
118	BCL_ 02002_H_ exón2	AAAATAAGAATGTCCCCCAA	NGGRC	exón 2	7328	60773305	0,50500271	-0,4259
119	BCL_ 00261_H_ exón2	CACAAACGGAAACAATGCAA	NGG	exón 2	7341	60773292	3,32908014	-2,54324
120	BCL_ 00262_H_ exón2	CCTCTGCTTAGAAAAAGCTG	NGG	exón 2	7367	60773266	1,00055405	-1,35239
121	BCL_ 02001_H_ exón2	CCACAGCTTTTTCTAAGCAG	NGGRC	exón 2	7384	60773249	0,49127532	-0,24954
122	BCL_ 02000_H_ exón2	TCGATTGGTGAAGGGGAAGG	NGGRC	exón 2	7412	60773221	0,46242001	-1,36477
123	BCL_ 01999_H_ exón2	ATCTCGATTGGTGAAGGGGA	NGGRC	exón 2	7415	60773218	0,62036667	-0,76015
124	BCL_ 01998_H_ exón2	TTTCATCTCGATTGGTGAAG	NGGRC	exón 2	7419	60773214	0,34887409	-0,14262
125	BCL_ 00263_H_ exón2	GAAAAAAGCATCCAATCCCG	NGG	exón 2	7421	60773212	0,6213377	-2,11505
126	BCL-00264-H-exón2	AAAAGCATCCAATCCCGTGG	NGG	exón 2	7424	60773209	0,55781702	-1,37569

(continuación)

La presente invención implica una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-48, 48, 50, 71 y 76. Otras secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento son útiles para comprender la invención								
SEQID NO:	**Identificador**	**Secuencia de ARNgu**	**PAM**	**Sitio diana**	**Coordenada en relación con TSS**	**Coordenada genómica Cr2 (hg19)**	**Puntuación de enriquecimiento**	**Puntuación de error**
127	BCL_ 00265_H_ exón2	GCATCCAATCCCGTGGAGGT	NGG	exón 2	7428	60773205	1,290845	-0,88953
128	BCL_ 00266_H_ exón2	TCCCGTGGAGGTTGGCATCC	NGG	exón 2	7436	60773197	0,58892468	-0,18023
129	BCL_ 00267_H_ exón2	TGGCATCCAGGTCACGCCAG	NGG	exón 2	7448	60773185	2,04934363	-2,00635
130	BCL_ 01994_H_ exón2	GATGCCAACCTCCACGGGAT	NGGRC	exón 2	7449	60773184	1,10977009	-0,99042
131	BCL_ 01993_H_ exón2	ACCTGGATGCCAACCTCCAC	NGGRC	exón 2	7454	60773179	1,97417272	-1,73599
132	BCL_ 01992_H_ exón2	GACCTGGATGCCAACCTCCA	NGGRC	exón 2	7455	60773178	1,23389832	-0,6955
133	BCL_ 01991_H_ exón2	CGTCATCCTCTGGCGTGACC	NGGRC	exón 2	7471	60773162	0,85232011	-0,71662
134	BCL_ 01990_H_ exón2	GATAAACAATCGTCATCCTC	NGGRC	exón 2	7481	60773152	0,84221705	-0,61283
135	BCL_ 01989_H_ exón2	CTGCTATGTGTTCCTGTTTG	NGGRC	exón 2	7525	60773108	0,62008756	0,033203

Tabla 8. Secuencias de las regiones funcionales +62, +58 y +55 del potenciador de BCL11A

SEQ ID NO:	cromosoma	coordenada de inicio (hg19)	coordenada final (hg19)	nombre	secuencia
136	cr2	60725424	60725688	región funcional +55	GACACTGAAGGCTGGGCACAGCCTTGGGGACCGCTCACAGGACATGCAGCAGTGTGTGC CGACAACTCCCTACCGCGACCCCTATCAGTGCCGACCAAGCACACAAGATGCACACCCAG GCTGGGCTGGACAGAGGGGTCCCACAAGATCACAGGGTGTGCCCTGAGAAGGTGGGGA GCTCACAGCCTCCAAGCATTGCATCATCCTGGTACCAGGAAGGCAATGGGCTGCCCCATA CCCACTTCCCTTCCTAGAATTGGCCTGG
137	cr2	60722238	60722466	región funcional +58	TTCATTCCCATTGAGAAATAAAATCCAATTCTCCATCACCAAGAGAGCCTTCCGAAAGAGG CCCCCCTGGGCAAACGGCCACCGATGGAGAGGTCTGCCAGTCCTCTTCTACCCCACCCACG CCCCCACCCTAATCAGAGGCCAAACCCTTCCTGGAGCCTGTGATAAAAGCAACTGTTAGCT TGCACTAGACTAGCTTCAAAGTTGTATTGACCCTGGTGTGTTATGT
138	cr2	60718042	60718186	región funcional +62	ATTTCCCTTCTGATATCTACTTGAACTTTCAGATAAAAAAAAAAAAGCAAGTTGCAGTAAC ATGTTATGCTACACAAAGATTAGCATGAATATCCACCCTCTTTAAACAGCCACCCCACACCC TGGAGAAGAGCAAATGTGAAGT

Tabla: Secuencias de ARNgu restringidas por NGA que produjeron un enriquecimiento de HbF superior a 0,259

SEQ ID NO:	Identificador	Secuencia de ARNgu	PAM	Sitio diana	Coordenada en relación con TSS	Coordenada genómica Cr2 (hg19)	Puntuación de enriquecimiento	Puntuación de error
139	BCL_NGA_00066	GGCGTGGGTGGGGTAGAAGA	GGA	DHS_58	58288	60722345	2,05370263	0,338399
140	BCL_NGA_00067	GGGGGCGTGGGTGGGGTAGA	AGA	DHS_58	58285	60722348	1,243740753	2,374513
141	BCL_NGA_00069	TCAGAGGCCAAACCCTTCCT	GGA	DHS_58	58245	60722388	2,585165023	0,387305
142	BCL_NGA_00062	CAAACCCTTCCTGGAGCCTG	TGA	DHS_58	58237	60722396	1,591649789	0,133042
143	BCL_NGA_00063	CACCAGGGTCAATACAACTT	TGA	DHS_58	58191	60722442	0,507770464	0,322734

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION

<120> DIRECCIONAMIENTO DE REGIONES FUNCIONALES DEL POTENCIADOR DE BCL11A PARA LA REINDUCCIÓN DE HEMOGLOBINA FETAL

<130> 701039-084941-PCT

<140>
<141>

<150> 62/158.882
<151> 08/05/2015

<160> 262

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 1
tctgaggagc tagagacttg ngg 23

<210> 2
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 2
agcaaatagg cttagtgtgc ngg 23

<210> 3
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 3
ggctaaataa tgaatgtccc nggrc 25

<210> 4
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 4
tcccttccta gaattggcct ngg 23

<210> 5
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 5
ttcccttcct agaattggcc ngg 23

<210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 6
gaatgtccca ggccaattct nggrc 25

<210> 7
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 7
gaatgtccca ggccaattct nggrc 25

<210> 8
<211> 23

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 8
cctggtacca ggaaggcaat ngg 23

<210> 9
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 9
tcctggtacc aggaaggcaa ngg 23

<210> 10
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 10
gcatcatcct ggtaccagga ngg 23

<210> 11
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 11
cattgcatca tcctggtacc ngg 23

<210> 12
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 12
ctccaagcat tgcatcatcc ngg 23

<210> 13
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 13
taccaggatg atgcaatgct nggrc 25

<210> 14
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 14
gggtgtgccc tgagaaggtg ngg 23

<210> 15
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 15
agggtgtgcc ctgagaaggt ngg 23

<210> 16
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 16
tcacagggtg tgccctgaga ngg 23

<210> 17
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 17
ggcacaccct gtgatcttgt nggrc 25

<210> 18
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 18
ggcacaccct gtgatcttgt nggrc 25

<210> 19
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 19
tgtgcttggt cggcactgat nggrc 25

<210> 20
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada

<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 20
gtgcttggtc ggcactgata nggrc 25

<210> 21
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 21
tgcttggtcg gcactgatag nggrc 25

<210> 22
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 22
gggtcgcggt agggagttgt nggrc 25

<210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 23
gccaacagtg ataaccagca ngg 23

<210> 24
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 24
tgccaacagt gataaccagc ngg 23

<210> 25
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 25
gccctgctgg ttatcactgt nggrc 25

<210> 26
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 26
agcagccctg ggcacagaag ngg 23

<210> 27
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 27
cctctatgta gacgggtgtg ngg 23

<210> 28
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 28
ggaagggcct ctatgtagac ngg 23

<210> 29
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 29
ggaggtgtgg aggggataac ngg 23

<210> 30
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 30
ctggcagacc ctcaagagca ngg 23

<210> 31
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 31
cccatggagg tggggagatg ngg 23

<210> 32
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 32
gtcatcctcg gccaatgaag nggrc 25

<210> 33
<211> 23

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 33
aagtgagcca ggtgatagaa ngg 23

<210> 34
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 34
tgaaaccaag cttcctctgc ngg 23

<210> 35
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 35
agggagaaat gagacaaaag nggrc 25

<210> 36
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 36
aagaggccac tgagtccttt nggrc 25

<210> 37
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 37
ctaacagttg cttttatcac nggrc 25

<210> 38
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 38
ttgcttttat cacaggctcc nggrc 25

<210> 39
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 39
ttttatcaca ggctccagga nggrc 25

<210> 40
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 40
tttatcacag gctccaggaa nggrc 25

<210> 41
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 41
atcagaggcc aaacccttcc ngg 23

<210> 42
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 42
cacaggctcc aggaagggtt nggrc 25

<210> 43
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 43
cacgccccca ccctaatcag ngg 23

<210> 44
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 44
gaagggtttg gcctctgatt nggrc 25

<210> 45
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada

<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 45
aagggtttgg cctctgatta nggrc 25

<210> 46
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 46
ggtttggcct ctgattaggg nggrc 25

<210> 47
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 47
gtttggcctc tgattagggt nggrc 25

<210> 48
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 48
tttggcctct gattagggtg nggrc 25

<210> 49
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 49
ttggcctctg attagggtgg nggrc 25

<210> 50
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 50
tctgattagg gtgggggcgt nggrc 25

<210> 51
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 51
attagggtgg gggcgtgggt nggrc 25

<210> 52
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 52
tgggtggggt agaagaggac nggrc 25

<210> 53
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 53
gcaaacggcc accgatggag ngg 23

<210> 54
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 54
cctgggcaaa cggccaccga ngg 23

<210> 55
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 55
aagaggcccc cctgggcaaa ngg 23

<210> 56
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 56
ccatcggtgg ccgtttgccc nggrc 25

<210> 57
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 57
catcggtggc cgtttgccca nggrc 25

<210> 58
<211> 25

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 58
atcggtggcc gtttgcccag nggrc 25

<210> 59
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 59
tcggtggccg tttgcccagg nggrc 25

<210> 60
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 60
cggtggccgt ttgcccaggg nggrc 25

<210> 61
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 61
cttccgaaag aggccccct ngg 23

<210> 62
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 62
ccttccgaaa gaggcccccc ngg 23

<210> 63
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 63
tcaggggggag gcaagtcagt ngg 23

<210> 64
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 64
agggaaaagg gagaggaaaa ngg 23

<210> 65
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 65
tgtaactaat aaataccagg nggrc 25

<210> 66
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 66
ccagctgaag aaagaacatt nggrc 25

<210> 67
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 67
ccatctccct aatctccaat ngg 23

<210> 68
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 68
tggggagaga agagtggaaa ngg 23

<210> 69
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 69
ggagtatggg gagagaagag ngg 23

<210> 70
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 70
acaacctcct tgtttacaga nggrc 25

<210> 71
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 71
gagatttact cttgttgccc nggrc 25

<210> 72
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 72
ttgcccgggc tggaatgcaa nggrc 25

<210> 73
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 73
ggagatcgct tgaacctggg ngg 23

<210> 74
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada

<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 74
ctcagctact cgggaggctg ngg 23

<210> 75
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 75
tgtaatctca gctactcggg ngg 23

<210> 76
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 76
gcctgtaatc tcagctactc ngg 23

<210> 77
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 77
tgcctgtaat ctcagctact ngg 23

<210> 78
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 78
caggcatgta ttaccatgcc nggrc 25

<210> 79
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 79
caggaggatc acctgaggtc ngg 23

<210> 80
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 80
ctcaggtgat cctcctgccc nggrc 25

<210> 81
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 81
cccagcactt tgggaggccg ngg 23

<210> 82
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 82

tcccagcact ttgggaggcc ngg 23

<210> 83
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 83
atcccagcac tttgggaggc ngg 23

<210> 84
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 84
acctgtaatc ccagcacttt ngg 23

<210> 85
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 85
gccccggcct cccaaagtgc nggrc 25

<210> 86
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 86
ccccggcctc ccaaagtgct nggrc 25

<210> 87
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 87
atttgctctt ctccagggtg nggrc 25

<210> 88
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 88
taaacagcca ccccacaccc ngg 23

<210> 89
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 89
tttgctcttc tccagggtgt nggrc 25

<210> 90
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 90
ctcttctcca gggtgtgggg nggrc 25

<210> 91
<211> 25

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 91
tgtggggtgg ctgtttaaag nggrc 25

<210> 92
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 92
gggtggctgt ttaaagaggg nggrc 25

<210> 93
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 93
agttcaagta gatatcagaa nggrc 25

<210> 94
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 94
tatcagaagg gaactgtttg nggrc 25

<210> 95
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 95
aagaatggct tcaagaggct nggrc 25

<210> 96
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 96
tctgtaagaa tggcttcaag nggrc 25

<210> 97
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 97
acagatgatg aaccagacca ngg 23

<210> 98
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 98
tgaaccagac cacggcccgt ngg 23

<210> 99
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 99
gaaccagacc acggcccgtt ngg 23

<210> 100
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 100
ggcccgttgg gagctccaga ngg 23

<210> 101
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 101
gcccgttggg agctccagaa ngg 23

<210> 102
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 102
cccgttggga gctccagaag ngg 23

<210> 103
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 103
ctggagctcc caacgggccg nggrc 25

<210> 104
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 104
ccccttctgg agctcccaac nggrc 25

<210> 105
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 105
tcccttctg gagctcccaa nggrc 25

<210> 106
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 106
gatcatgacc tcctcacctg ngg 23

<210> 107
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada

<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 107
atcatgacct cctcacctgt ngg 23

<210> 108
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 108
aggaggtcat gatccccttc nggrc 25

<210> 109
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 109
ggcactgccc acaggtgagg nggrc 25

<210> 110
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 110
gtgccagatg aacttcccat ngg 23

<210> 111
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 111
tgccagatga acttcccatt ngg 23

<210> 112
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 112
gccagatgaa cttcccattg ngg 23

<210> 113
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 113
tctggcactg cccacaggtg nggrc 25

<210> 114
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 114
ccagatgaac ttcccattgg ngg 23

<210> 115
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 115

gttcatctgg cactgcccac nggrc 25

<210> 116
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 116
cccccaatgg gaagttcatc nggrc 25

<210> 117
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 117
aaataagaat gtcccccaat nggrc 25

<210> 118
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 118
aaaataagaa tgtcccccaa nggrc 25

<210> 119
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 119
cacaaacgga aacaatgcaa ngg 23

<210> 120
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 120
cctctgctta gaaaaagctg ngg 23

<210> 121
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 121
ccacagcttt ttctaagcag nggrc 25

<210> 122
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 122
tcgattggtg aaggggaagg nggrc 25

<210> 123
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 123
atctcgattg gtgaagggga nggrc 25

<210> 124
<211> 25

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 124
tttcatctcg attggtgaag nggrc 25

<210> 125
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 125
gaaaaaagca tccaatcccg ngg 23

<210> 126
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 126
aaaagcatcc aatcccgtgg ngg 23

<210> 127
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 127
gcatccaatc ccgtggaggt ngg 23

<210> 128
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 128
tcccgtggag gttggcatcc ngg 23

<210> 129
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 129
tggcatccag gtcacgccag ngg 23

<210> 130
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 130
gatgccaacc tccacgggat nggrc 25

<210> 131
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 131
acctggatgc caacctccac nggrc 25

<210> 132
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 132
gacctggatg ccaacctcca nggrc 25

<210> 133
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 133
cgtcatcctc tggcgtgacc nggrc 25

<210> 134
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 134
gataaacaat cgtcatcctc nggrc 25

<210> 135
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base-modificada
<222> (21) .. (21)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 135
ctgctatgtg ttcctgtttg nggrc 25

<210> 136
<211> 265
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 136

gacactgaag gctgggcaca gccttgggga ccgctcacag gacatgcagc agtgtgtgcc 60

gacaactccc taccgcgacc cctatcagtg ccgaccaagc acacaagatg cacacccagg 120

ctgggctgga cagaggggtc ccacaagatc acagggtgtg ccctgagaag gtggggagct 180

cacagcctcc aagcattgca tcatcctggt accaggaagg caatgggctg ccccataccc 240

acttcccttc ctagaattgg cctgg 265

<210> 137
<211> 229
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 137

ttcattccca ttgagaaata aaatccaatt ctccatcacc aagagagcct tccgaaagag 60

gccccccctgg gcaaacggcc accgatggag aggtctgcca gtcctcttct accccaccca 120

cgcccccacc ctaatcagag gccaaaccct tcctggagcc tgtgataaaa gcaactgtta 180

gcttgcacta gactagcttc aaagttgtat tgaccctggt gtgttatgt 229

<210> 138
<211> 145
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 138

atttcccttc tgatatctac ttgaactttc agataaaaaa aaaaaagcaa gttgcagtaa 60

catgttatgc tacacaaaga ttagcatgaa tatccaccct ctttaaacag ccaccccaca 120

ccctggagaa gagcaaatgt gaagt 145

<210> 139
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 139
ggcgtgggtg gggtagaaga gga 23

<210> 140
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 140
gggggcgtgg gtggggtaga aga 23

<210> 141
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 141
tcagaggcca aacccttcct gga 23

<210> 142
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 142
caaacccttc ctggagcctg tga 23

<210> 143
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 143
caccagggtc aatacaactt tga 23

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Descripción de desconocido: Péptido de motivo familiar "LAGLIDADG"

<400> 144

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly
1 5

<210> 145
<211> 94
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 145

ggccggccgg atccggcgca acaaacttct ctctgctgaa acaagccgga gatgtcgaag 60

agaatcctgg accgatggtg agcaagggcg agga 94

<210> 146
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 146

ggccggccga attcttactt gtacagctcg tcca 34

<210> 147
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 147
ggccggcccg tacgcgtacg gccaccatgg atagcactga gaacgtcatc aagccctt 58

<210> 148
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 148
ggccggccac gcgtctactg gaacaggtgg tggcgggcct 40

<210> 149
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 149
cgtaacttga aagtatttcg atttcttggc 30

<210> 150
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 150
ggccggccgc tcgagggagg gcctatttcc 30

<210> 151
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 151
ccggccggcc cgggttgtgg atgaatactg ccattt 36

<210> 152
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 152

ggaggcttgg taggtttaag aa 22

<210> 153
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 153
ccaattccca ctcctttcaa 20

<210> 154
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 154
tggaaaggag aacggcccgg 20

<210> 155
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 155
tgaacaccct cgttaaaggc 20

<210> 156
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 156
aacactagcc cacatgccaa 20

<210> 157
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 157
gcccacagag gcacggttaa 20

<210> 158
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 158

aggcacggtt aatggtggcg 20

<210> 159
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 159
cacaggaagc catggtcctt 20

<210> 160
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 160
gcactgacgt aggtagtgac 20

<210> 161
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 161
ataggatatg gcactgacgt 20

<210> 162
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 162
cattatcttc tctggtctcg 20

<210> 163
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 163
atactgggga acacattgta 20

<210> 164
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 164

tgagcacatt cttacgccta 20

<210> 165
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 165
ctaggcgtaa gaatgtgctc 20

<210> 166
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 166
gaacccccta taaactagtc 20

<210> 167
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 167
ggcaaaccag actagtttat 20

<210> 168
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 168
caggggagaa ctcggcatga 20

<210> 169
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 169
gatggagttg gttgaccgta 20

<210> 170
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 170

ggtaggaccc aacactacgc 20

<210> 171
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 171
atgcctaggg tgttttgacg 20

<210> 172
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 172
tgaaccagac cacggcccgt 20

<210> 173
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 173
gcatccaatc ccgtggaggt 20

<210> 174
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 174
cactggcttc ctgttcttgt 20

<210> 175
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 175
aaggttttca aggcaaataa 20

<210> 176
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 176

gtaatggagc ccgcatgctg 20

<210> 177
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 177
gccagtgtac aggcaagtac 20

<210> 178
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 178
tcgctgcctt cagttctgct 20

<210> 179
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 179
ttatggaact caggaactgc 20

<210> 180
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 180
gatgcctttt tcatctcgat 20

<210> 181
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 181
attccttgag tgtcatatat 20

<210> 182
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 182

tctggaatca ctatgtatat 20

<210> 183
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 183
tgctccgagc ttgtgaacta 20

<210> 184
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 184
tatcacaggc tccaggaagg 20

<210> 185
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 185
tagtttgctt cccccaatga 20

<210> 186
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 186
gccaggaaat tggtggtaga 20

<210> 187
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 187
tgctccgagc ttgtgaacta 20

<210> 188
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 188

tatcacaggc tccaggaagg 20

<210> 189
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 189
gtgggcagtt acgttttcgt 20

<210> 190
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 190
gccaggaaat tggtggtaga 20

<210> 191
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 191
ggtcagggtg ttgcagagat 20

<210> 192
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 192
cacaccctgt gatcttgtgg 20

<210> 193
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 193
gacttaaact gccgctcctg 20

<210> 194
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 194

gggcctcagg ctctttatct 20

<210> 195
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 195
cccagagctc agtgagatga 20

<210> 196
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 196
gggaaagggc ctgataactt 20

<210> 197
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 197
gaacagagac cactactggc aat 23

<210> 198
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 198
ctcagaaaaa tgacagcacc a 21

<210> 199
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 199
tttgaaagta ccagcacagc a 21

<210> 200
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 200

ccctctggca tcaaaatgag 20

<210> 201
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 201
aacagaccca tgtgctaggc 20

<210> 202
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 202
tgctgaattc ctgtaaagtg agg 23

<210> 203
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 203
gaggtgacca gggtgtgagt 20

<210> 204
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 204
aagaagaggc cctggacatt 20

<210> 205
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 205
catcttaagg caagaatcac t 21

<210> 206
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 206

ccagtcaatc caaaccctgt 20

<210> 207
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 207
tattaatgcc cagccagctc 20

<210> 208
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 208
gtggtccaga cctagccaag 20

<210> 209
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 209
tttgagcagg agggaatttg 20

<210> 210
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 210
ataggtggtt gggcttctcc 20

<210> 211
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 211
ggagtggctg ttgaaagagg 20

<210> 212
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 212

cactcaagga atgcaagcaa 20

<210> 213
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 213
tacttggtgg ctttcccaac 20

<210> 214
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 214
agatggtcct ctgcatccac 20

<210> 215
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 215
gacttaaact gccgctcctg 20

<210> 216
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 216
aggcatccaa agggaagaat 20

<210> 217
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 217
acttcagcct ccagcactgt 20

<210> 218
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 218

ccactggagt ggaaccaagt 20

<210> 219
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 219
gggatcagag gtgaacagga 20

<210> 220
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 220
tggactttgc actggaatca 20

<210> 221
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 221
ttgtttacag aggggcaacc 20

<210> 222
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 222
ggggaagggg tattgaattg 20

<210> 223
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 223
aacagaccca tgtgctaggc 20

<210> 224
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 224

gaacctggga ggcagaagat 20

<210> 225
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 225
tgtgtggact gccttttctg 20

<210> 226
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 226
tgtggagctc tggaatgatg 20

<210> 227
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 227
ggtagtgtgg gggtggagt 19

<210> 228
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 228
tcagcctgtt ccctcagtg 19

<210> 229
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 229
ggtagtgtgg gggtggagt 19

<210> 230
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 230

tcagcctgtt ccctcagtg 19

<210> 231
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 231
ggtagtgtgg gggtggagt 19

<210> 232
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 232
tcagcctgtt ccctcagtg 19

<210> 233
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 233
ggtagtgtgg gggtggagt 19

<210> 234
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 234
agatggtcct ctgcatccac 20

<210> 235
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 235
ggtagtgtgg gggtggagt 19

<210> 236
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 236

tcagcctgtt ccctcagtg 19

<210> 237
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 237
tacttggtgg ctttcccaac 20

<210> 238
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 238
tcagcctgtt ccctcagtg 19

<210> 239
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 239
atgcttggtt gtcgccttat 20

<210> 240
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 240
cactcaagga atgcaagcaa 20

<210> 241
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 241
acccagaaga ctgtggatgg 20

<210> 242
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 242

ttcagctcag ggatgacctt 20

<210> 243
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 243
ctgaggagaa gtctgccgtt a 21

<210> 244
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 244
agcatcagga gtggacagat 20

<210> 245
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 245
tggatgatct caagggcac 19

<210> 246
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 246
tcagtggtat ctggaggaca 20

<210> 247
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 247
gcaagaaggt gctgacttcc 20

<210> 248
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 248

accatcacgt tacccaggag 20

<210> 249
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 249
gaggagaaga ctgctgtcaa tg 22

<210> 250
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 250
agggtagacc accagtaatc tg 22

<210> 251
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 251
aaccccagca cttaagcaaa 20

<210> 252
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 252
ggaggtcatg atccccttct 20

<210> 253
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 253
tggtgaaggt cggtgtgaac 20

<210> 254
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 254

ccatgtagtt gaggtcaatg aagg 24

<210> 255
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 255
tttaacgatg gcctgaatca ctt 23

<210> 256
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 256
cagcacaatc acgatcatat tgc 23

<210> 257
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 257
tggcctgtgg agtaaggtca a 21

<210> 258
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 258
gaagcagagg acaagttccc a 21

<210> 259
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 259
tggacaacct caaggagacc 20

<210> 260
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 260

acctctgggg tgaattcctt 20

<210> 261
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 261
aaccccagca cttaagcaaa 20

<210> 262
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 262
acaggtgaga aggtcgtggt 20

REIVINDICACIONES

1. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76, en donde

(i) la secuencia de ácido nucleico comprende además una secuencia de ARN CRISPR transactivador (ARNcrtra) o
(ii) el vector es un vector de expresión de ARNgu.

2. Un método *in vitro* para producir una célula progenitora que tiene una expresión disminuida de ARNm o proteína de BCL11A, comprendiendo el método poner en contacto una célula progenitora aislada con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7,19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76; en donde (i) la secuencia de ácido nucleico comprende además una secuencia de ARN CRISPR transactivador (ARNcrtra), o (ii) la molécula de ácido nucleico es un ARN guía único (ARNgu), o (iii) la molécula de ácido nucleico comprende un vector, opcionalmente en donde el vector es un vector de expresión de ARNgu; o un vector de la reivindicación 1,
en donde el método no es un proceso para modificar la identidad genética de la línea germinal de seres humanos.

3. El método de la reivindicación 2, que comprende además poner en contacto la misma célula progenitora aislada con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN.

4. Un método *in vitro* para producir una célula humana aislada modificada por ingeniería genética que tiene al menos una modificación genética que comprende poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76; en donde (i) la secuencia de ácido nucleico comprende además una secuencia de ARN CRISPR transactivador (ARNcrtra), o (ii) la molécula de ácido nucleico es un ARN guía único (ARNgu), o (iii) la molécula de ácido nucleico comprende un vector, opcionalmente en donde el vector es un vector de expresión de ARNgu, un vector de la reivindicación 1 junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN, de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55) y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), causando al menos una modificación genética en la misma, en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, en donde el método no es un proceso para modificar la identidad genética de la línea germinal de seres humanos.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde la al menos una endonucleasa dirigida al ADN es una proteína Cas (asociada a CRISPR), opcionalmente en donde, la proteína Cas es Cas9.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde

(i) la célula progenitora aislada es una célula progenitora hematopoyética o una célula madre hematopoyética, opcionalmente en donde la progenitora hematopoyética es una célula del linaje eritroide, o en donde la célula progenitora aislada o célula aislada es una célula madre pluripotente inducida, y/o
(ii) la célula progenitora puesta en contacto o célula puesta en contacto adquiere al menos una modificación genética, opcionalmente en donde la al menos una modificación genética es una eliminación, inserción o sustitución de la secuencia de ácido nucleico, y/o
(iii) la al menos una modificación genética se encuentra entre la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55) y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58) o en donde la célula progenitora puesta en contacto o célula puesta en contacto adquiere al menos una modificación epigenética en la región funcional del potenciador de BCL11A, opcionalmente en donde la al menos una modificación epigenética se selecciona del grupo que consiste en alteración de la metilación del ADN, modificación de la cola de histonas, composición de la subunidad de histonas y posicionamiento del nucleosoma, y/o en donde la al menos una modificación epigenética se encuentra entre la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55) y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58).

7. Una célula humana aislada modificada por ingeniería genética producida mediante un método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, que tiene al menos una modificación genética en la ubicación del cromosoma 2 60725424 a 60725688 (región funcional +55) y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), en donde la célula humana aislada genomodificada no es una célula germinal humana o embrión humano.

8. Una composición que comprende células humanas aisladas modificadas por ingeniería genética de la reivindicación 7.

9. Un método *in vitro* para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula, comprendiendo el método las etapas de: poner en contacto una célula aislada con una cantidad eficaz de una composición que comprende una

molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7,19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76; en donde (i) la secuencia de ácido nucleico comprende además una secuencia de ARN CRISPR transactivador (ARNcrtra), o (ii) la molécula de ácido nucleico es un ARN guía único (ARNgu), o (iii) la molécula de ácido nucleico comprende un vector, opcionalmente en donde el vector es un vector de expresión de ARNgu; o un vector de la reivindicación 1, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55) y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), causando al menos una modificación genética en la misma, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicha célula, o su progenie, con respecto a dicha célula antes de dicho contacto, y en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19, en donde el método no es un proceso para modificar la identidad genética de la línea germinal de seres humanos.

10. El método de la reivindicación 9, en donde

(i) la célula aislada es una célula progenitora hematopoyética o una célula madre hematopoyética, y/o en donde la progenitora hematopoyética es una célula del linaje eritroide, o
(ii) la célula aislada es una célula madre pluripotente inducida, y/o
(iii) la al menos una endonucleasa dirigida al ADN es una proteína Cas (asociada a CRISPR), opcionalmente en donde la proteína Cas es Cas9.

11. Una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19-21, 37, 39-42, 44-46, 48, 50, 71 y 76; en donde (i) la secuencia de ácido nucleico comprende además una secuencia de ARN CRISPR transactivador (ARNcrtra), o (ii) la molécula de ácido nucleico es un ARN guía único (ARNgu), o (iii) la molécula de ácido nucleico comprende un vector, opcionalmente en donde el vector es un vector de expresión de ARNgu; o un vector de la reivindicación 1, junto con al menos una endonucleasa dirigida al ADN o un vector que lleva la secuencia codificante de una endonucleasa dirigida al ADN de modo que la endonucleasa dirigida al ADN escinde el ADN genómico de la célula en el cromosoma 2 en la ubicación 60725424 a 60725688 (región funcional +55) y/o en la ubicación 60722238 a 60722466 (región funcional +58), causando al menos una modificación genética en la misma, dicha composición para usar en el tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero, comprendiendo dicho uso las etapas de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética aislada en dicho mamífero con una cantidad eficaz de la composición, de modo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicho mamífero, con respecto a la expresión antes de dicho contacto, y en donde el cromosoma 2 humano es aquel de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano UCSC Genome Browser hg 19.

12. Una composición para el uso de la reivindicación 11, en donde dicho uso comprende trasplantar una célula humana aislada modificada por ingeniería genética de la reivindicación 7 o una composición de la reivindicación 8 al mamífero.

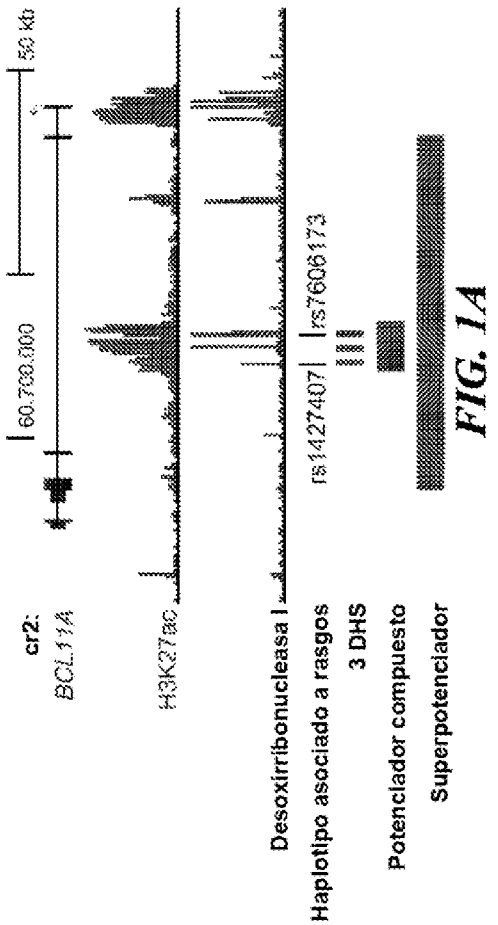

FIG. 1A

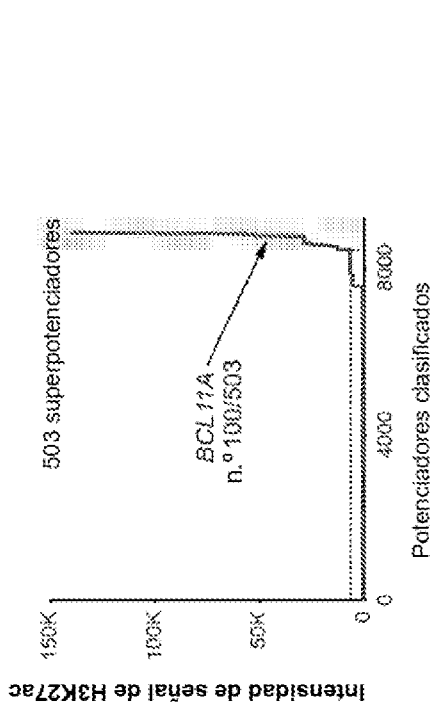

FIG. 1B

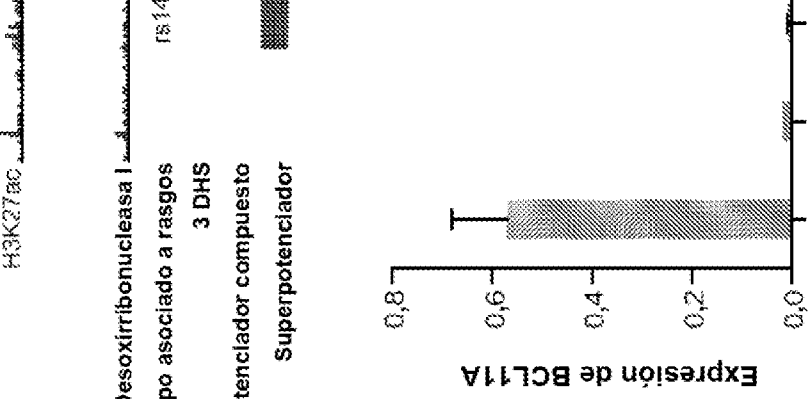

FIG. 1C

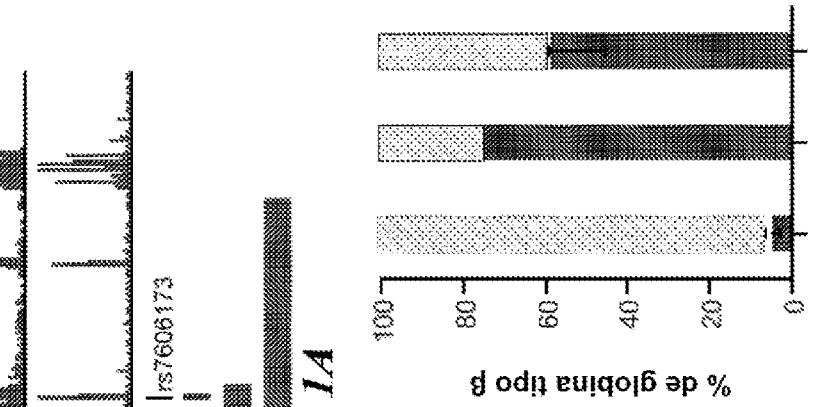

FIG. 1D

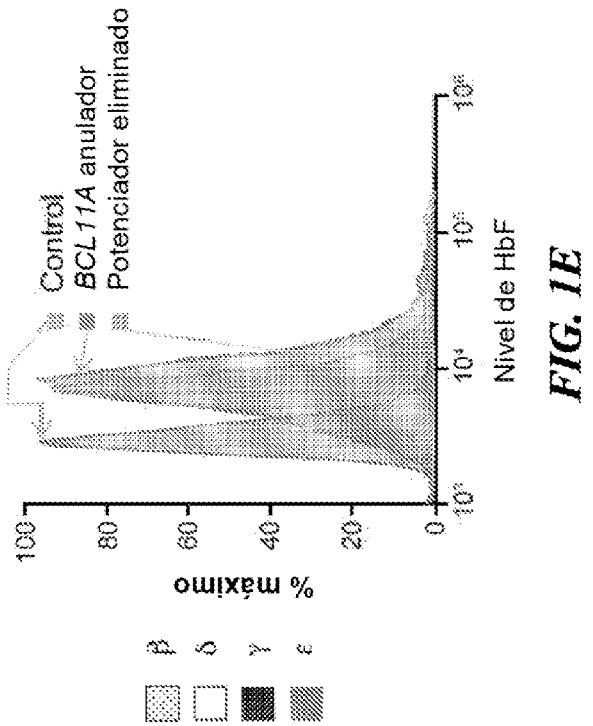

FIG. 1E

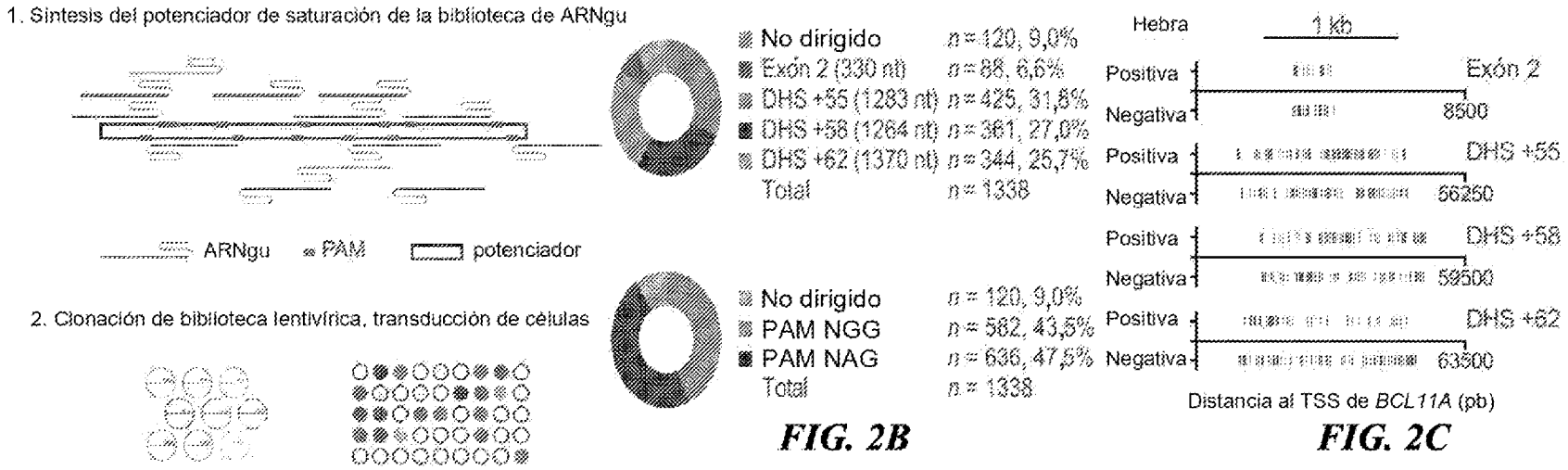

FIG. 2B

FIG. 2C

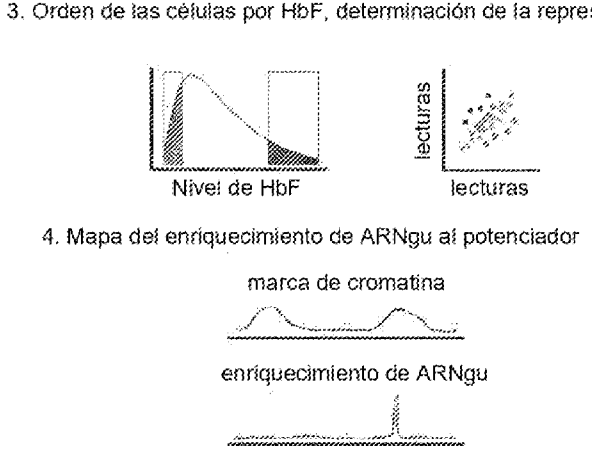

FIG. 2A

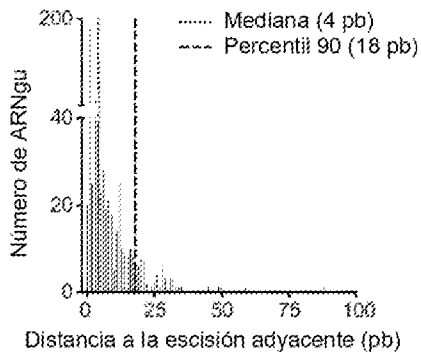

FIG. 2D

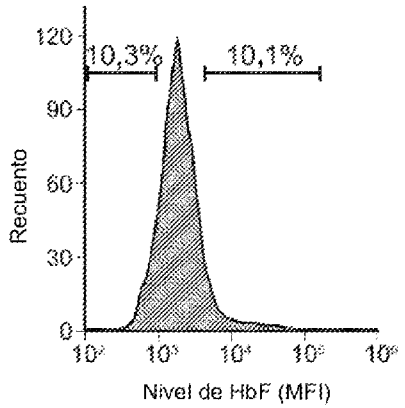

FIG. 2E

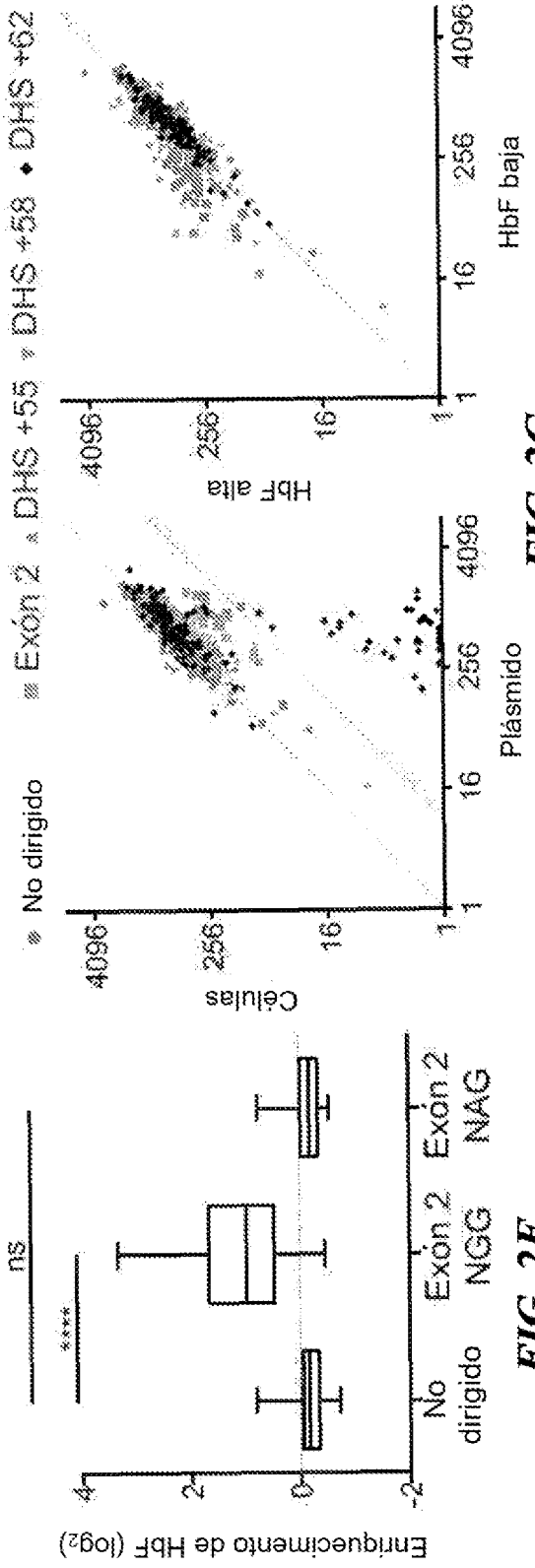

FIG. 2F

FIG. 2G

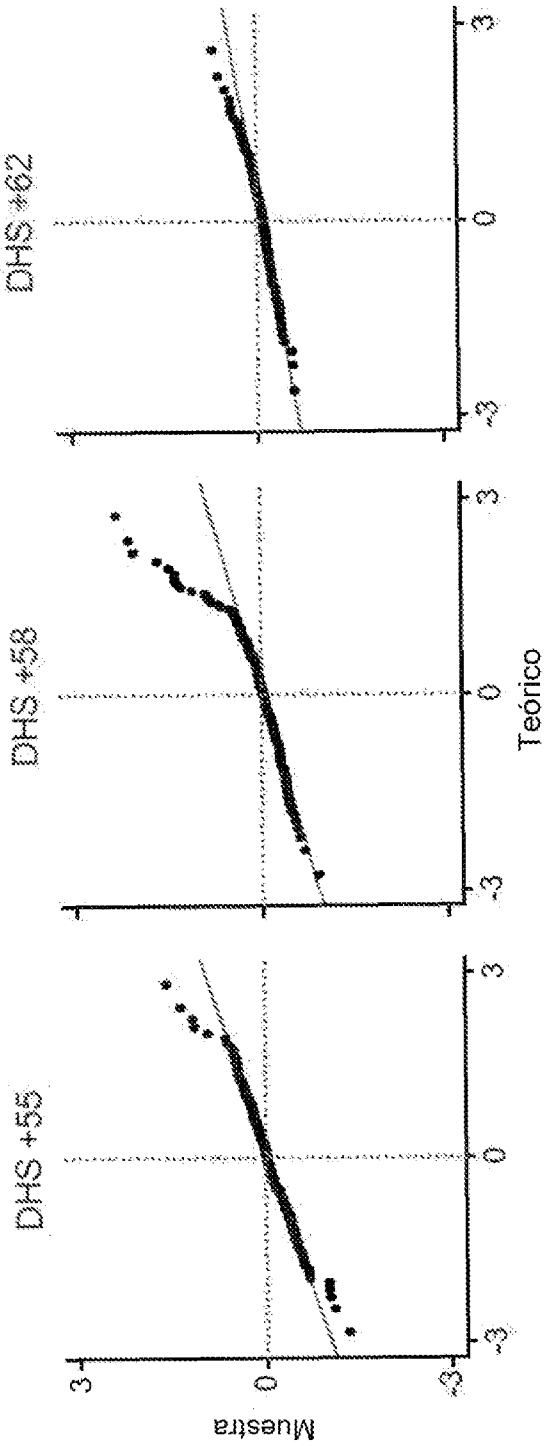

FIG. 2H

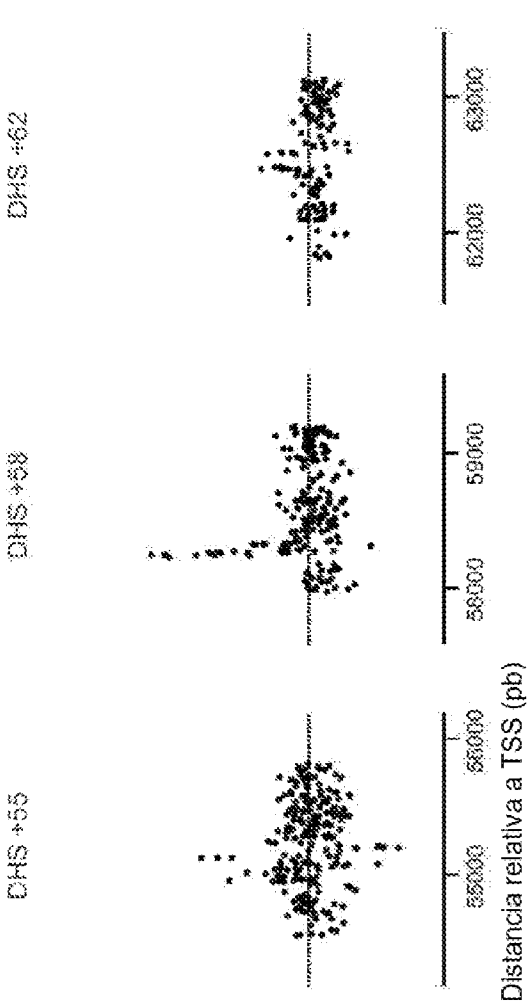
No dirigido
Exón 2
DHS +55
DHS +58
DHS +62
Enriquecimiento (log2)
Distancia relativa a TSS (pb)

FIG. 3A

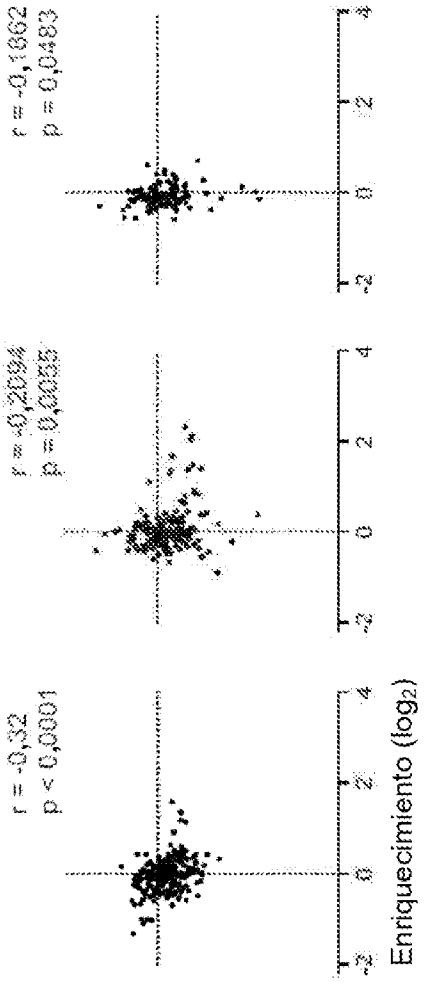
r = -0,03651
p = 0,2944
r = -0,7769
p < 0,0001
r = -0,32
p < 0,0001
r = -0,2094
p = 0,0035
r = -0,1662
p = 0,0483
Error (log2)
Enriquecimiento (log2)

FIG. 3B

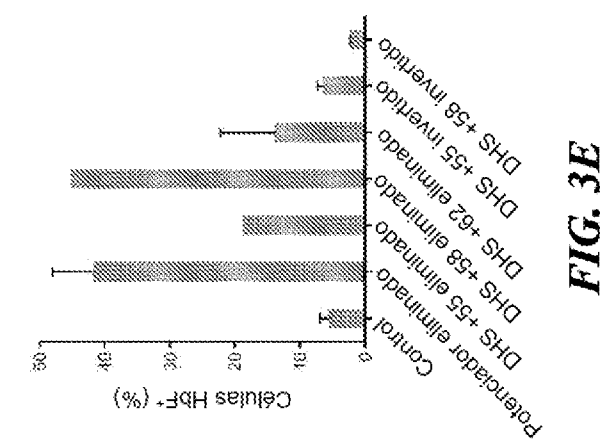

FIG. 3E

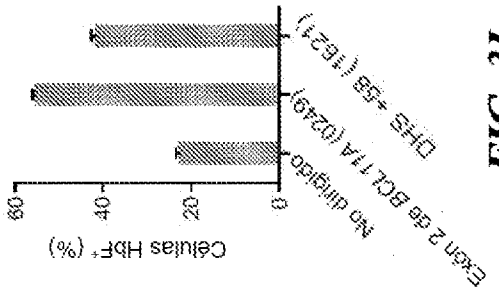

FIG. 3I

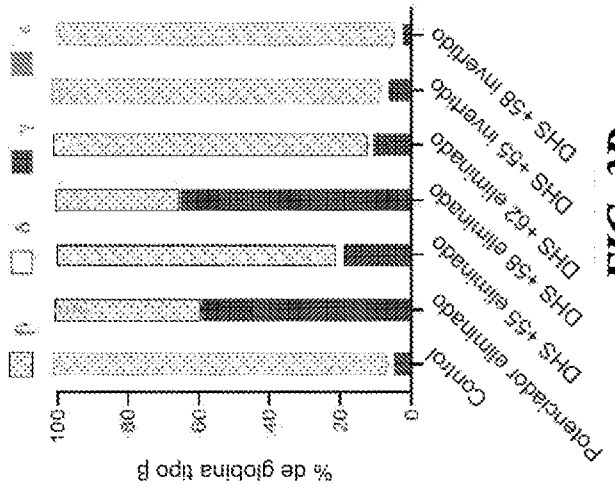

FIG. 3D

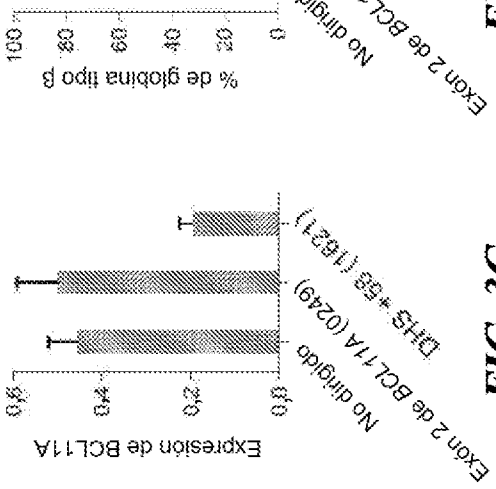

FIG. 3H

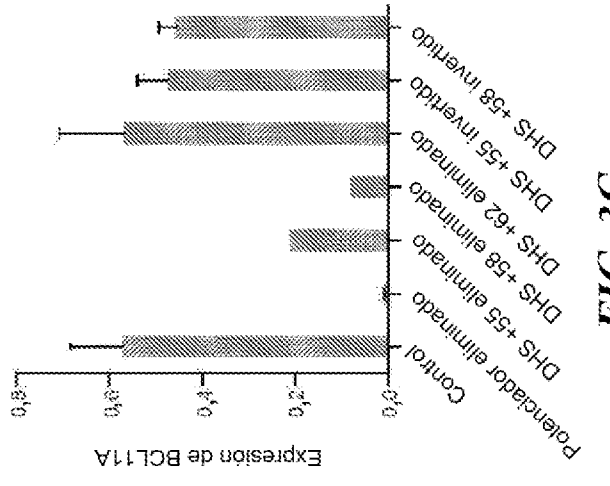

FIG. 3C

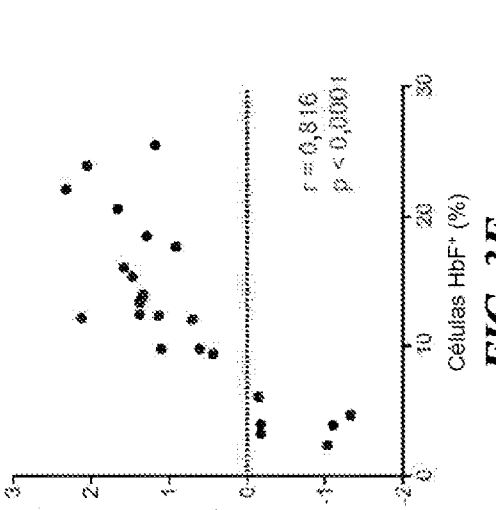

FIG. 3G

FIG. 3F

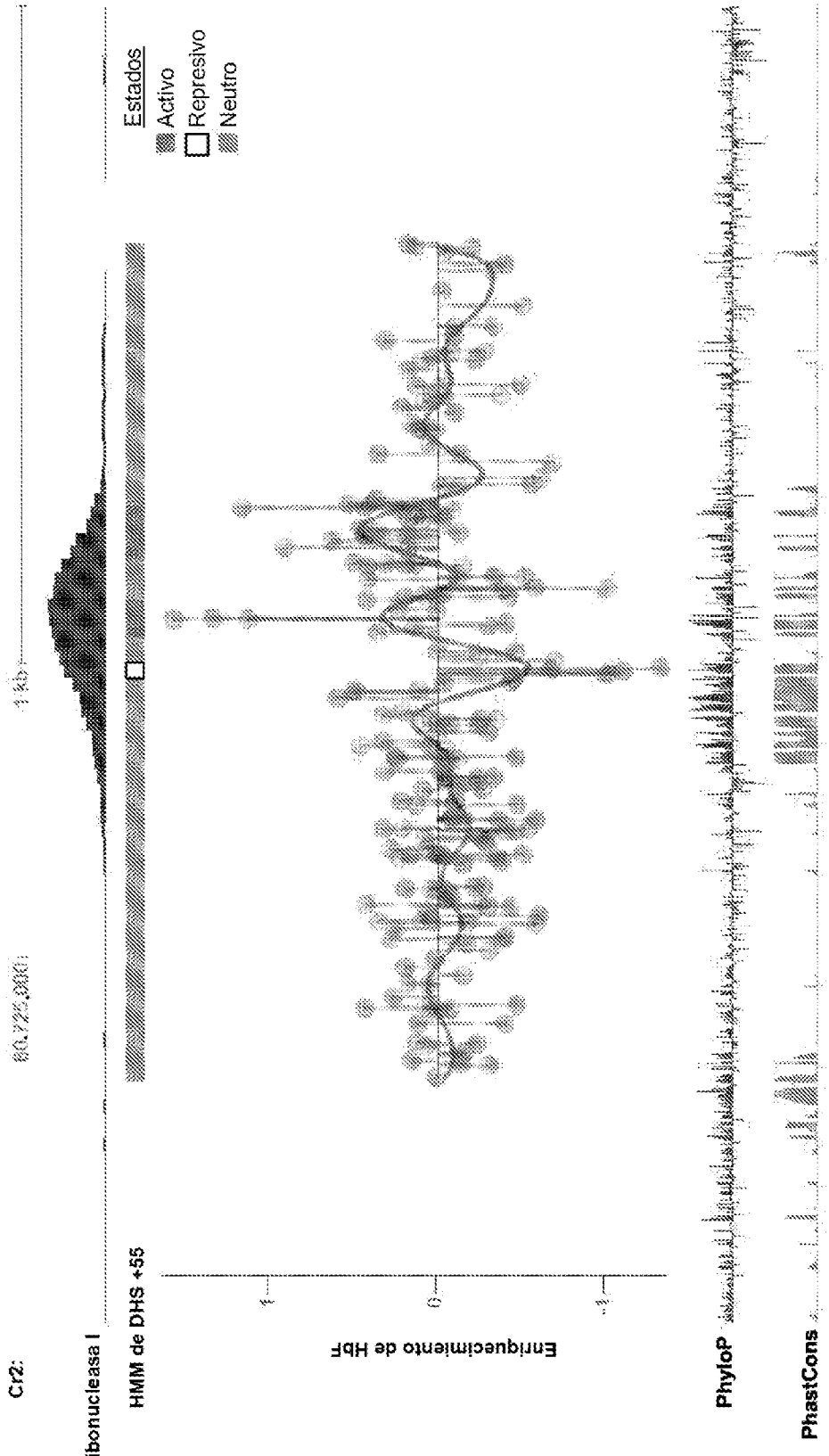
Chr2:
1 kb
Desoxirribonucleasa I
HMM de DHS +55
Estados
Activo
Represivo
Neutro
Enriquecimiento de HbF
PhyloP
PhastCons

FIG. 4A

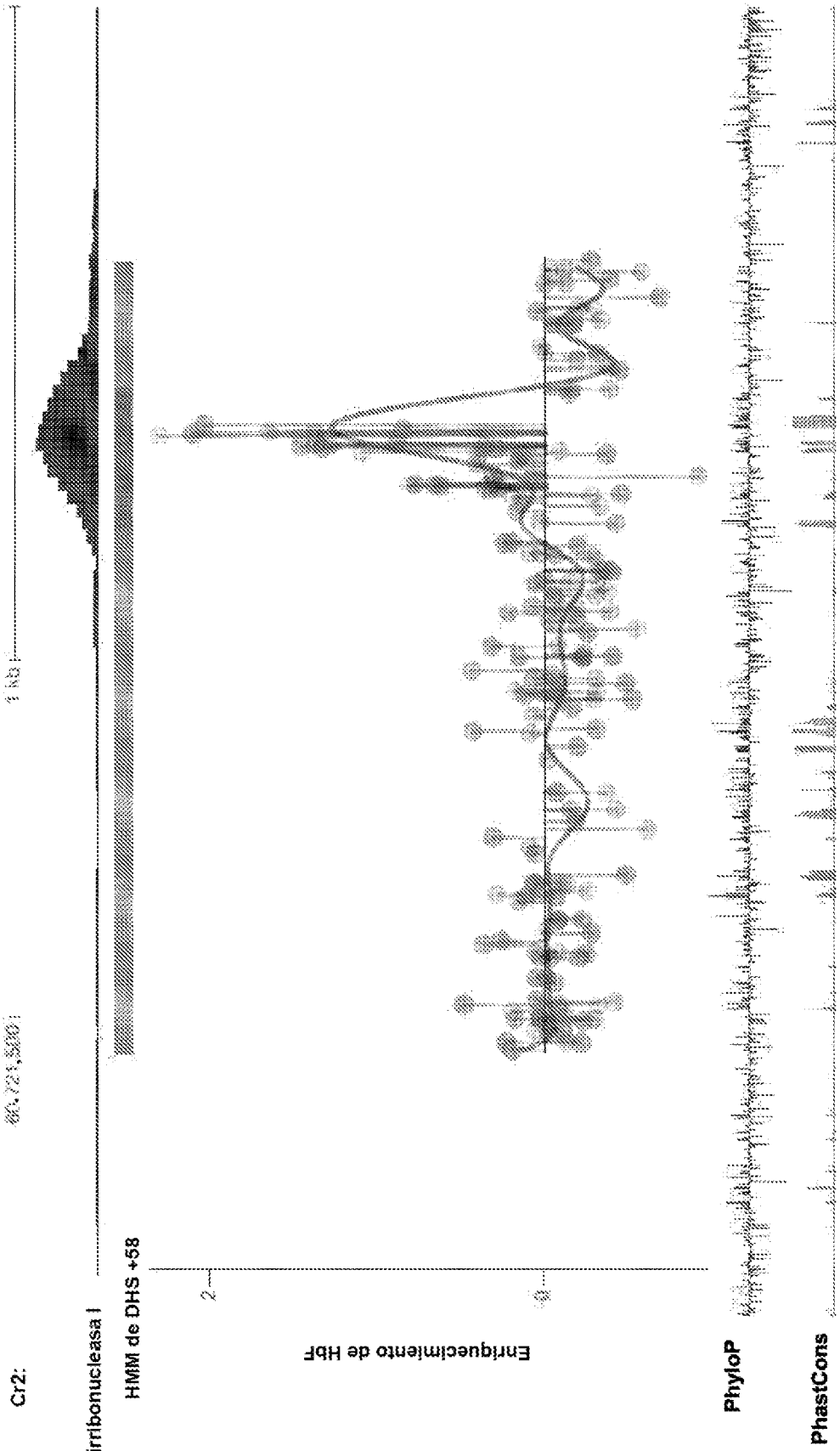
Cr2:
1 kb
Desoxirribonucleasa I
HMM de DHS +58
2
0
Enriquecimiento de HbF
PhyloP
PhastCons

FIG. 4B

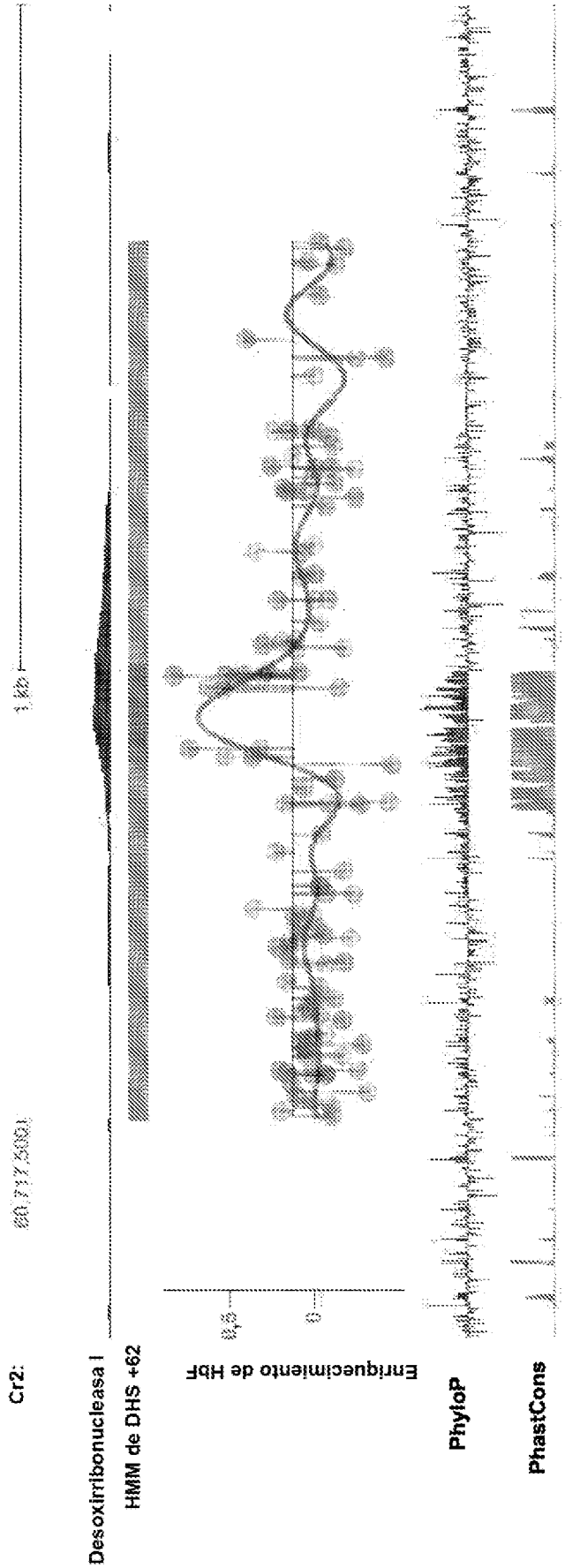
Cr2:
1 kb
Desoxirribonucleasa I
HMM de DHS +62
Enriquecimiento de HbF
8,5
0
PhyloP
PhastCons

FIG. 4C

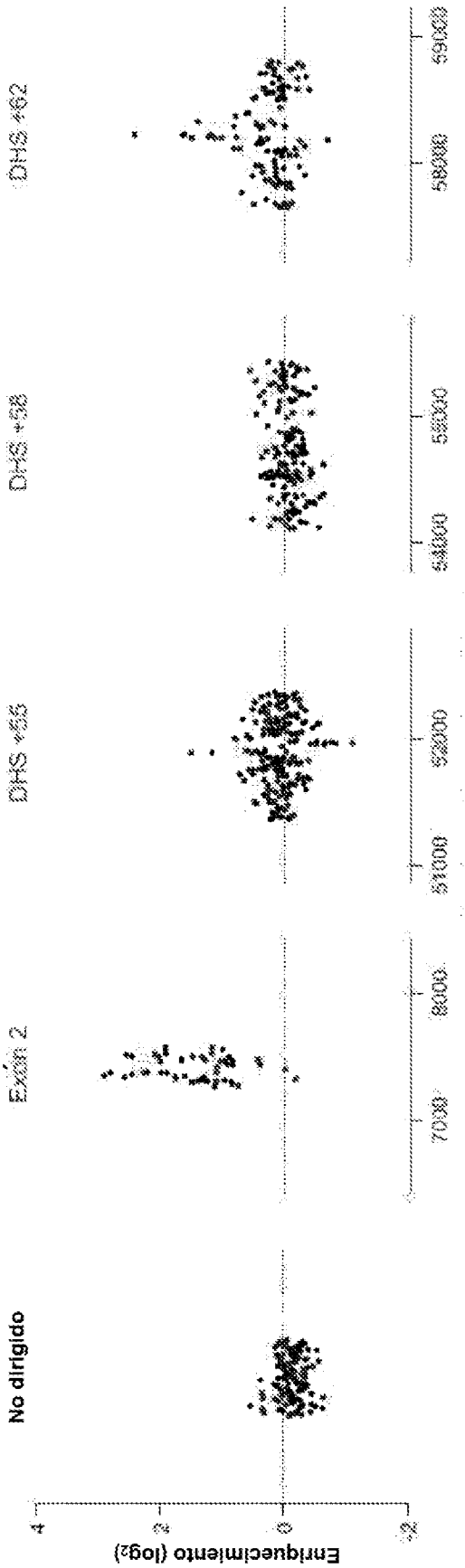
No dirigido
Exón 2
DHS +55
DHS +28
DHS +62
Enriquecimiento (log2)
4
2
0
-2
70000
80000
81000
82000
54000
56000
58000
59000
Distancia relativa a TSS (pb)

FIG. 5A

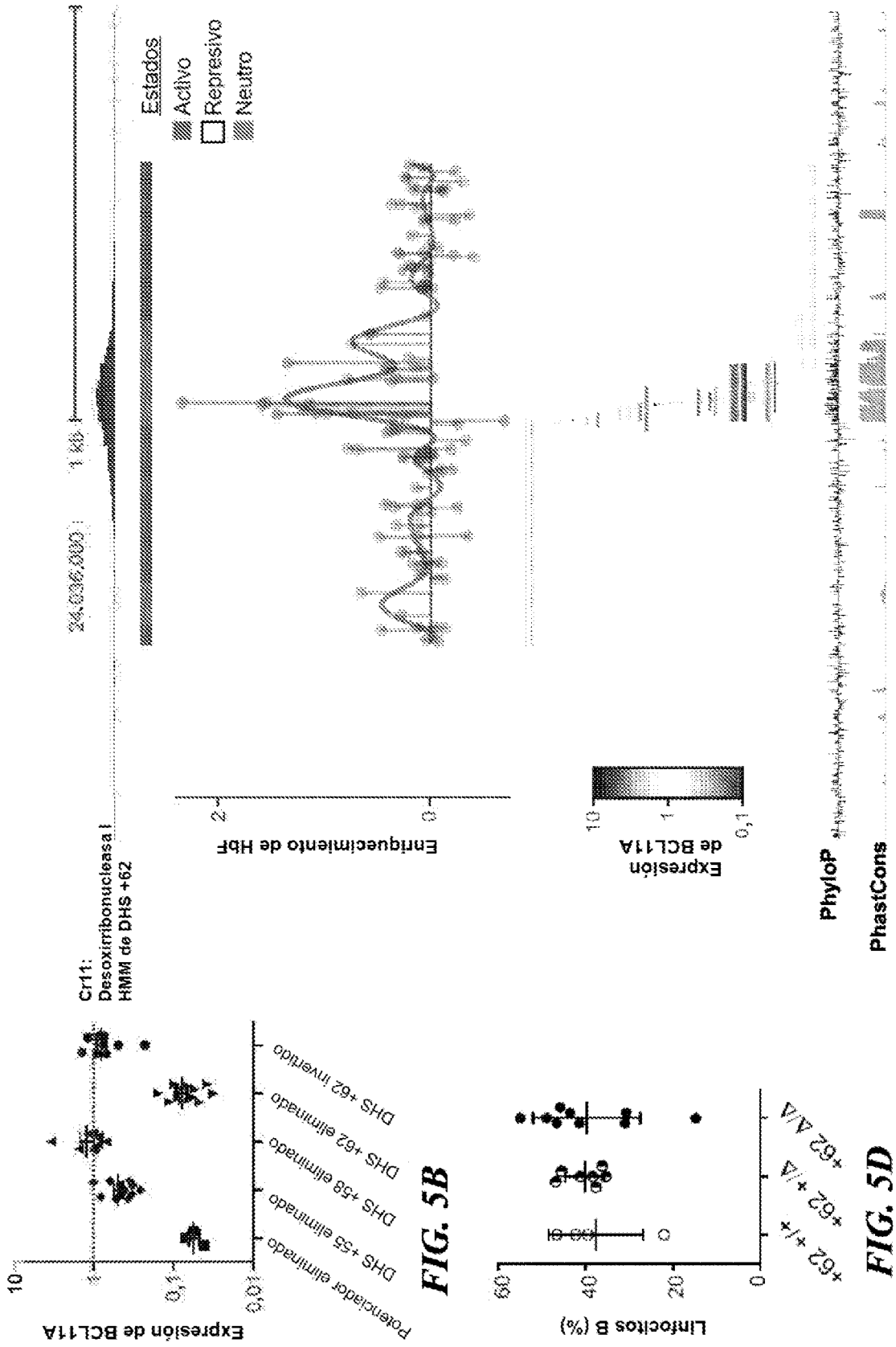

FIG. 5C

FIG. 5B

FIG. 5D

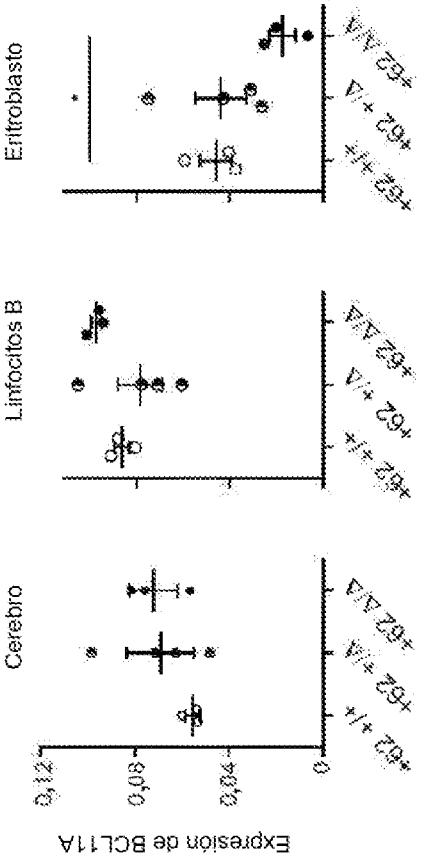

FIG. 5E

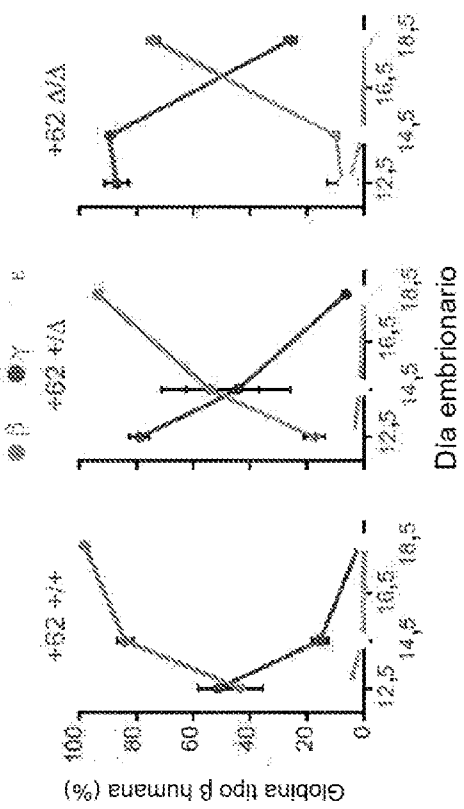

FIG. 5F

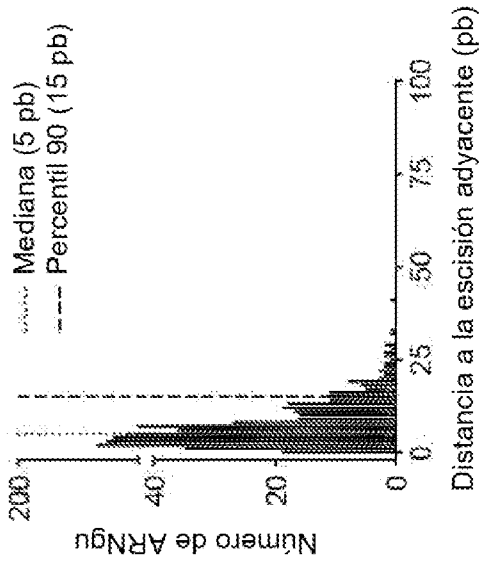

FIG. 6B

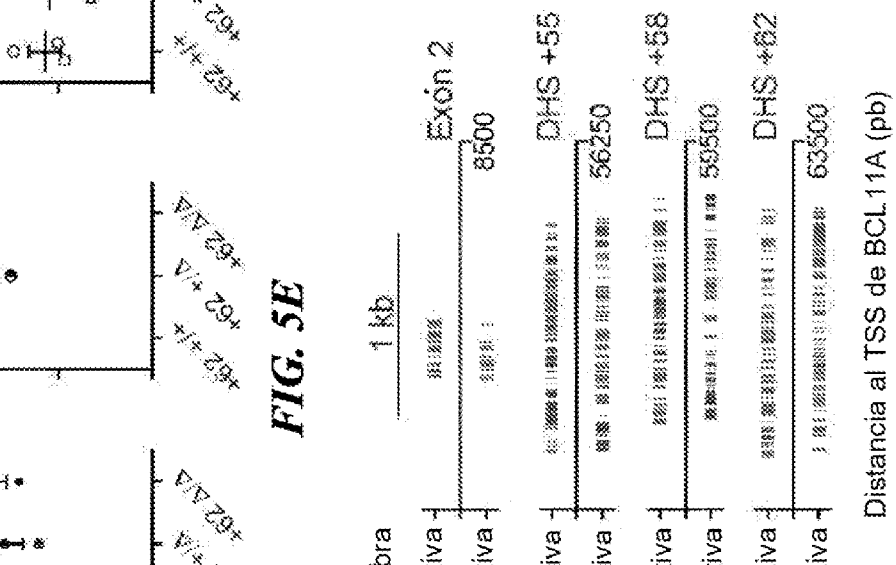

FIG. 6A

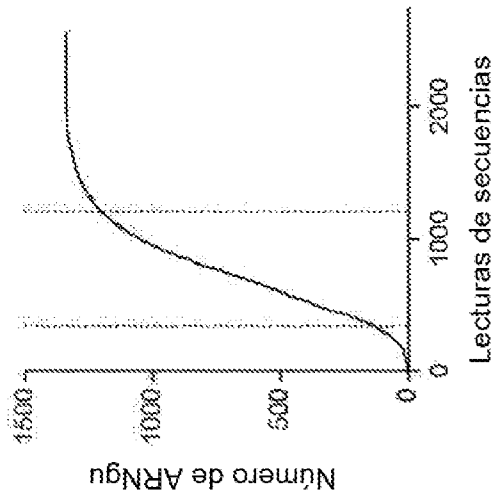

FIG. 6C

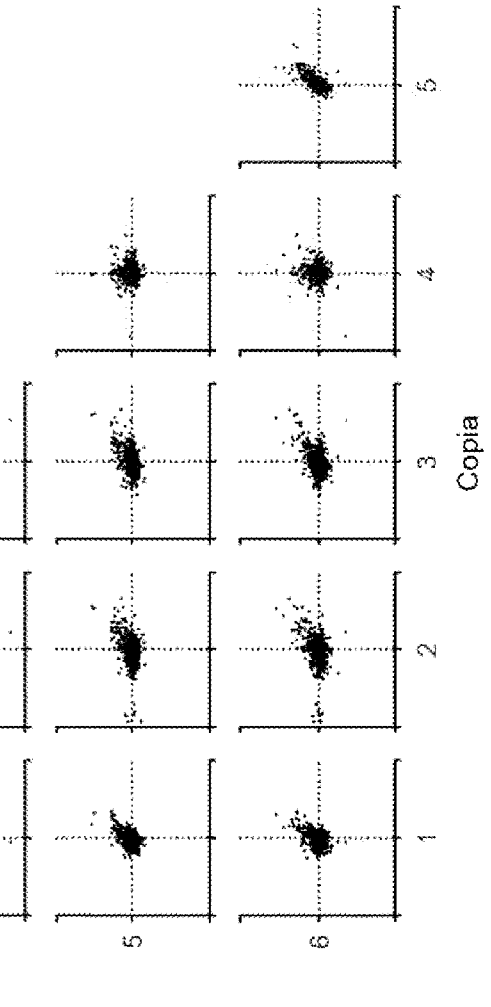

FIG. 6E

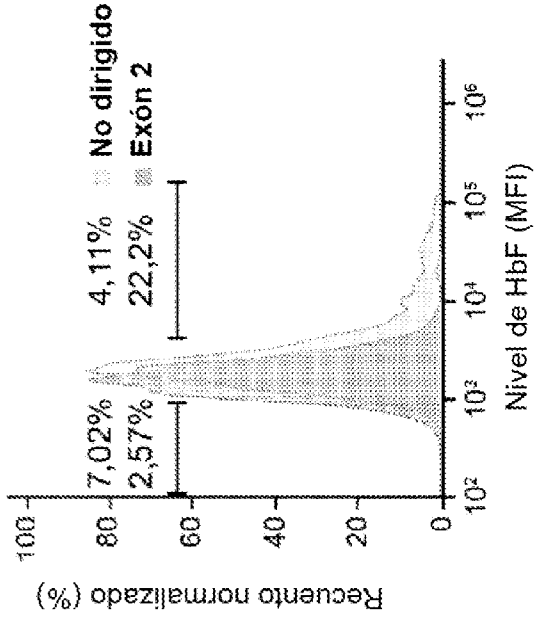

FIG. 6D

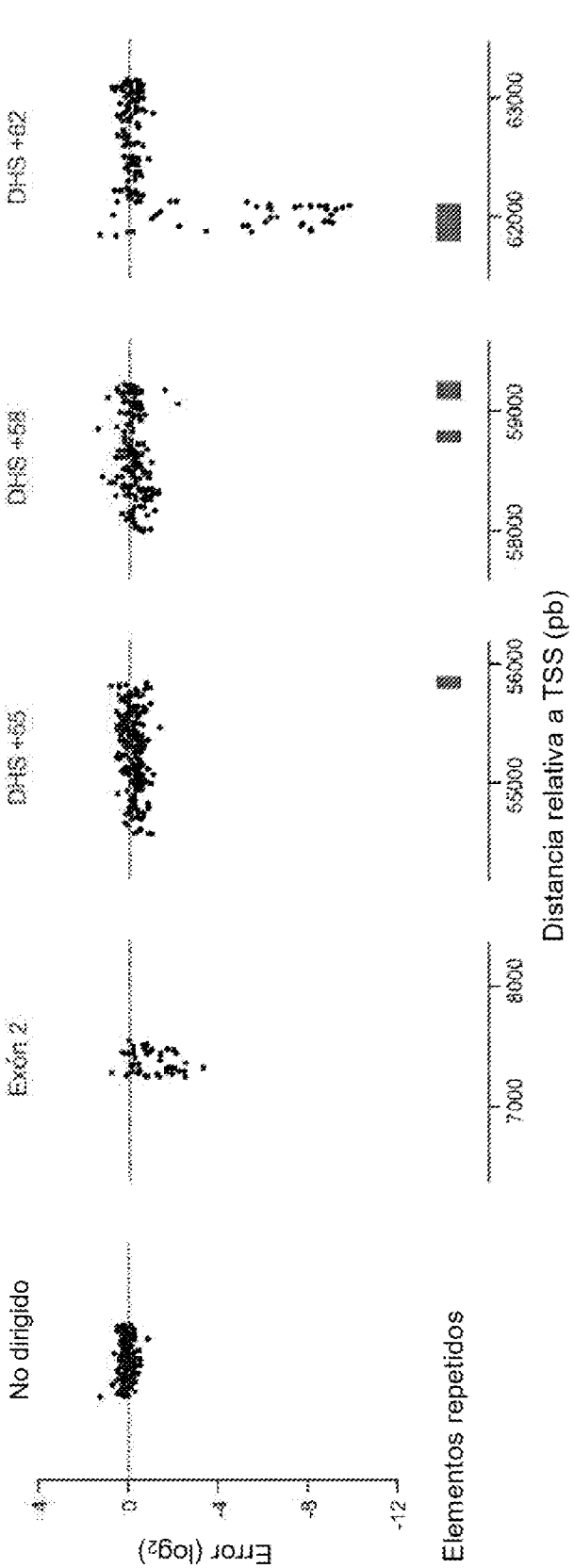
No dirigido
Exón 2
DHS +55
DHS +58
DHS +62
Error (log2)
-4
0
-4
-8
-12
Elementos repetidos
7000
8000
55000
56000
58000
59000
62000
63000
Distancia relativa a TSS (pb)

FIG. 6F

Células HbF+ (%)
30
20
10
0
1
2
No dirigido
0249
0088
1438
1448
1449
1450
0068
0070
1458
0187
0188
1617
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1626
1628
0210
1833
Exón 2
DHS +55
DHS +58
DHS +62

FIG. 7A

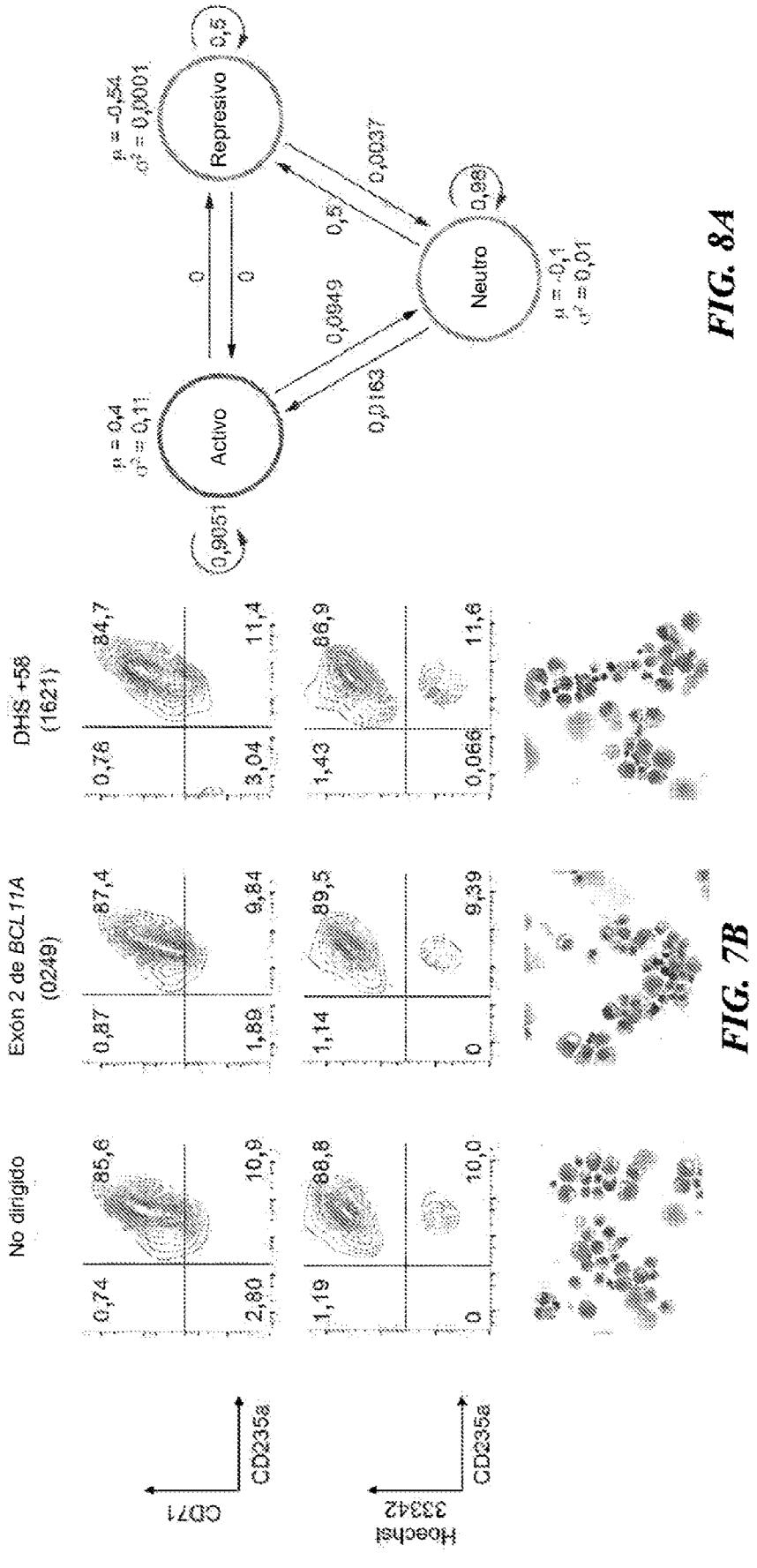
No dirigido
Exón 2 de BCL11A
(0249)
DHS +58
(1621)
CD71
CD235a
Hoechst
33342
CD235a
0,74
85,6
2,80
10,9
1,19
88,8
0
10,0
0,87
87,4
1,89
9,84
1,14
89,5
0
9,39
0,78
84,7
3,04
11,4
1,43
86,9
0,066
11,6

FIG. 7B

Activo
Represivo
Neutro
μ = 0,4
σ² = 0,11
μ = -0,54
σ² = 0,0001
μ = -0,1
σ² = 0,01
0,9051
0,5
0,98
0
0
0,0049
0,0163
0,5
0,0037

FIG. 8A

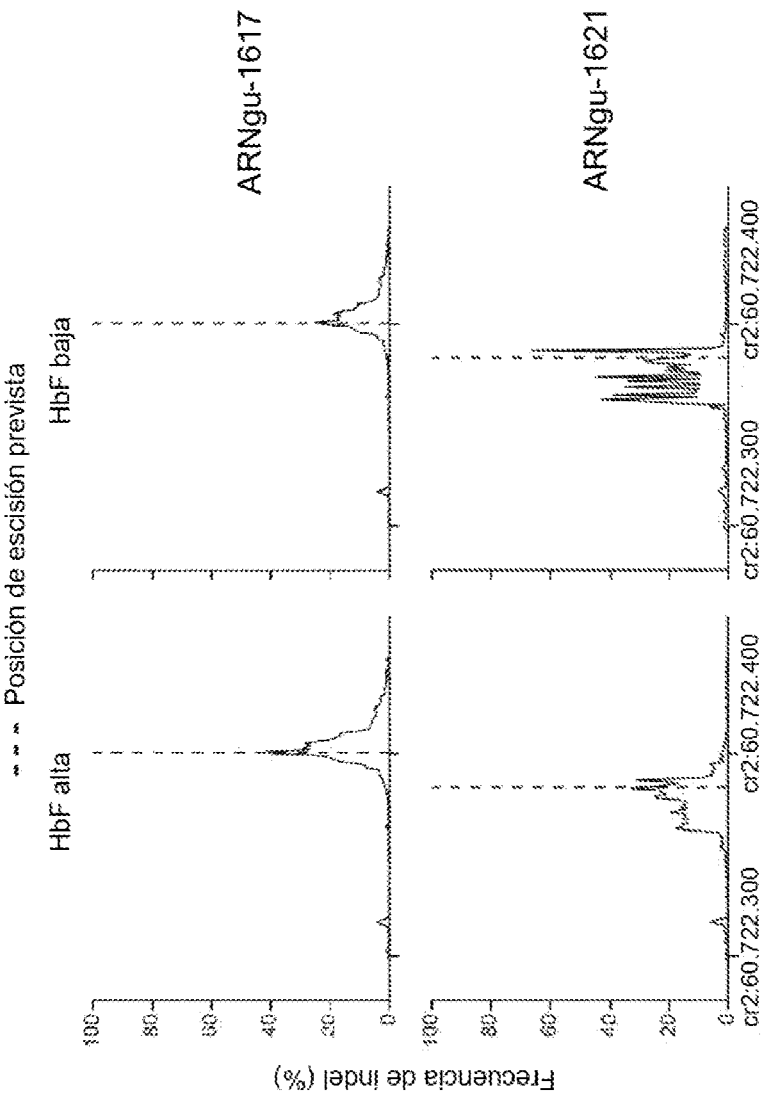
ARNgu-1617
ARNgu-1621
HbF baja
HbF alta
Posición de escisión prevista
Frecuencia de indel (%)
Posición genómica
cr2:60.722.300
cr2:60.722.400

FIG. 8B

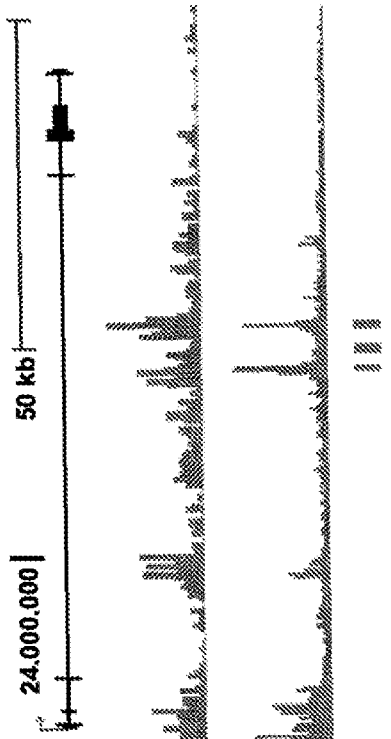

FIG. 9A

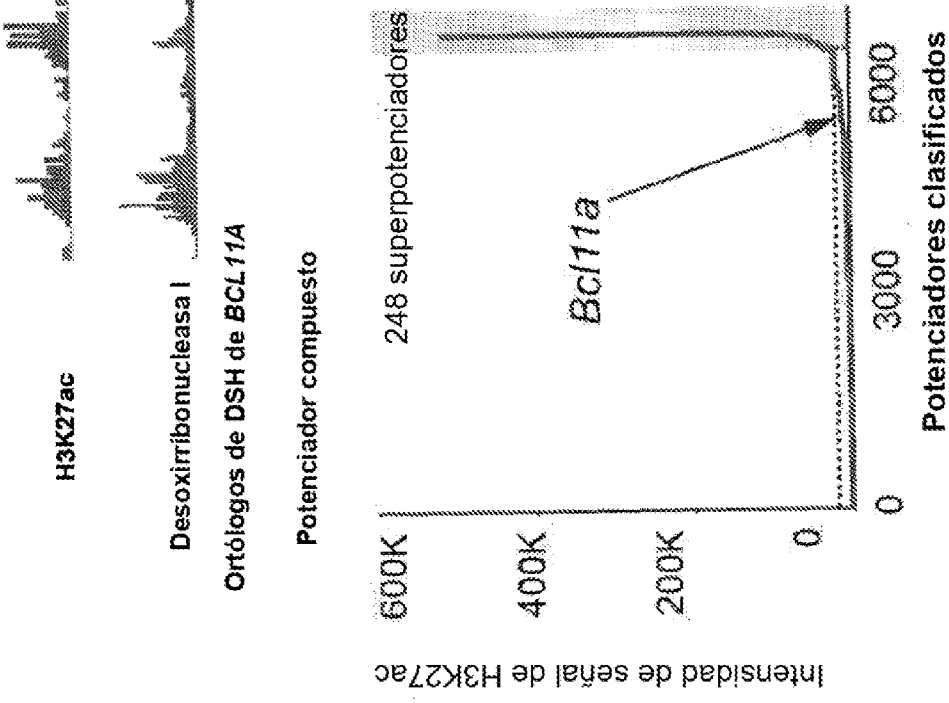

FIG. 9B

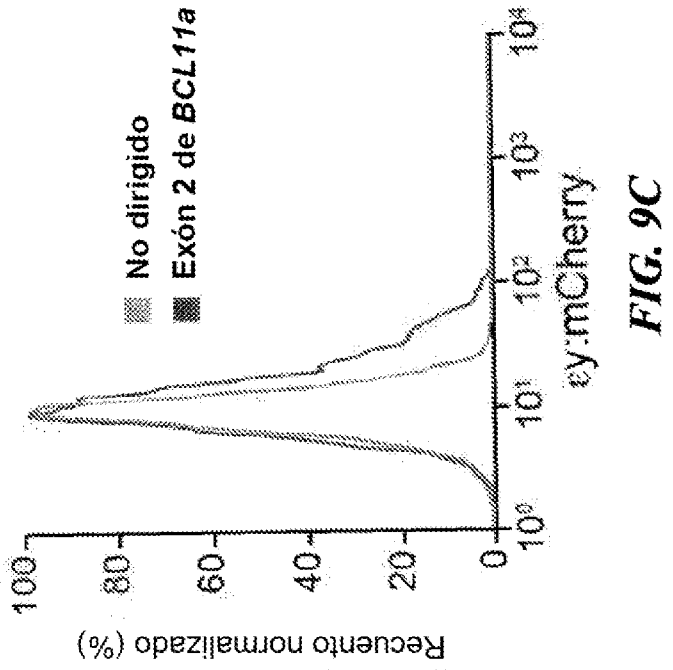

FIG. 9C

DSB dirigida
Locus endógeno
Hbb-y
Construcción de direccionamiento
Neo
mCherry
Producto de reparación dirigido por homología
Neo
mCherry
Producto de recombinación Cre
mCherry
Hbb-y

FIG. 9D

No dirigido n = 120, 9,4%
Exón-2 (330 nt) n = 91, 7,2%
Homólogo de DHS +55 (1046 nt) n = 368, 29,0%
Homólogo de DHS +58 (1341 nt) n = 385, 30,3%
Homólogo de DHS +62 (1216 nt) n = 307, 24,2%
Total n = 1271
No dirigido n = 120, 9,4%
PAM NGG n = 512, 40,3%
PAM NAG n = 639, 50,3%
Total n = 1271

FIG. 9E

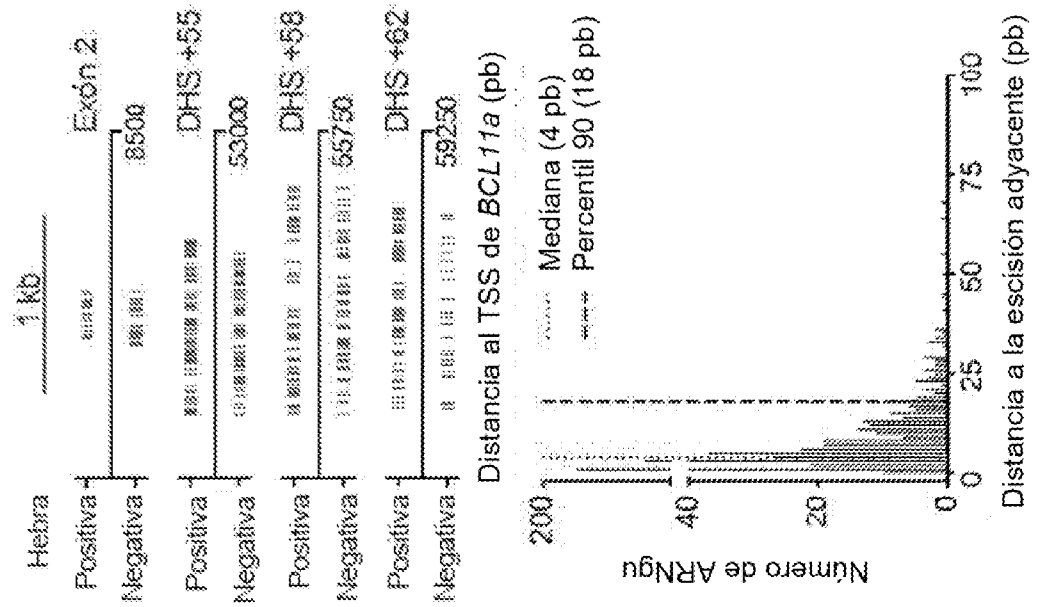
NGS
1 kb
Hebra
Positiva
Negativa
Exón 2
8500
DHS +55
53000
DHS +58
55750
DHS +62
59250
Distancia al TSS de BCL11a (pb)
Mediana (4 pb)
Percentil 90 (18 pb)
Número de ARNgu
Distancia a la escisión adyacente (pb)

FIG. 9F

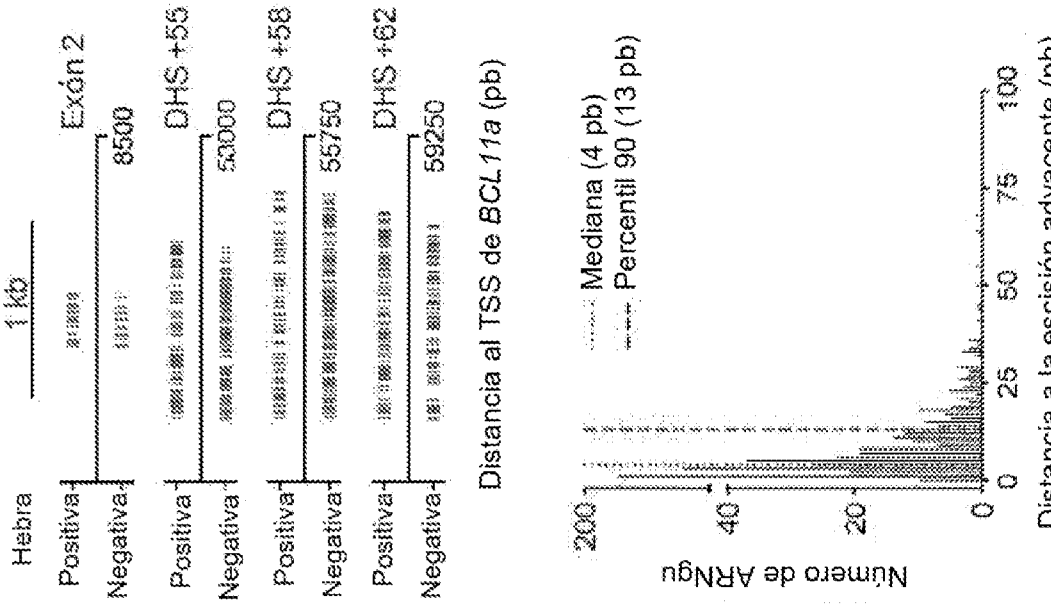
NAG
1 kb
Hebra
Positiva
Negativa
Exón 2
8500
DHS +55
53000
DHS +58
55750
DHS +62
59250
Distancia al TSS de BCL11a (pb)
Mediana (4 pb)
Percentil 90 (13 pb)
Número de ARNgu
Distancia a la escisión adyacente (pb)

FIG. 9G

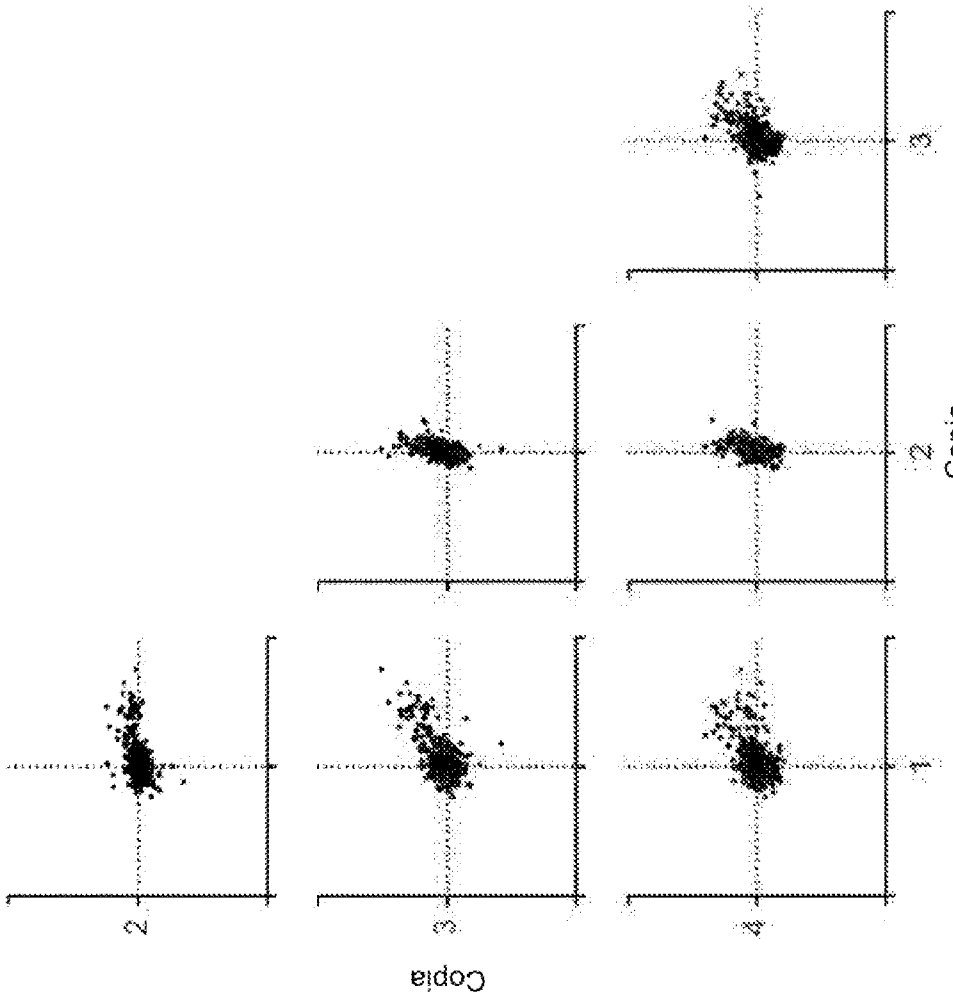

FIG. 9H

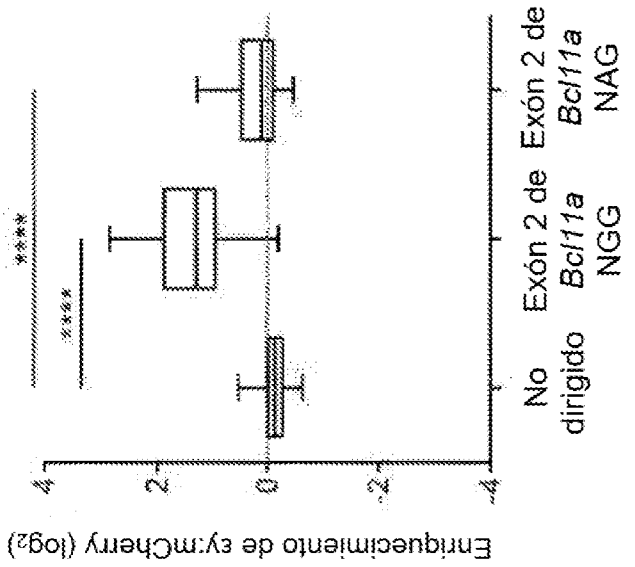

FIG. 9K

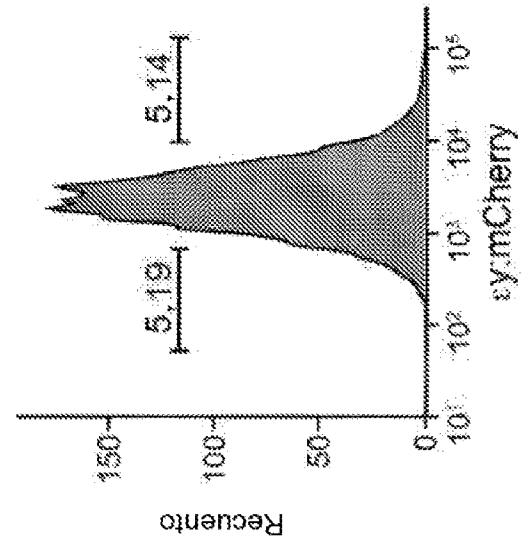

FIG. 9J

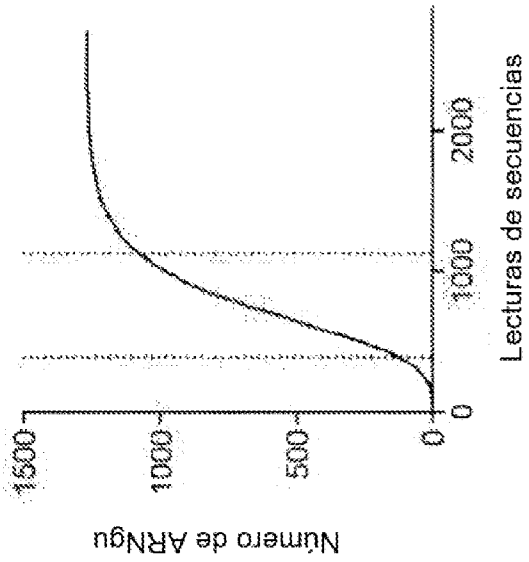

FIG. 9I

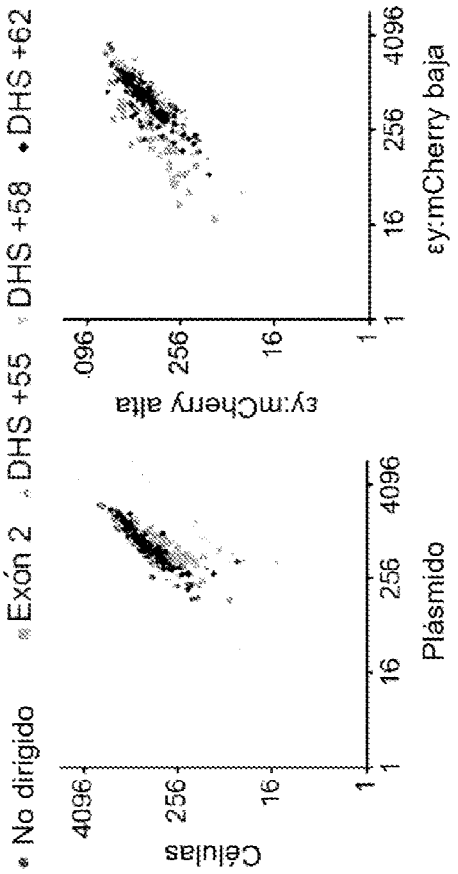

FIG. 10A

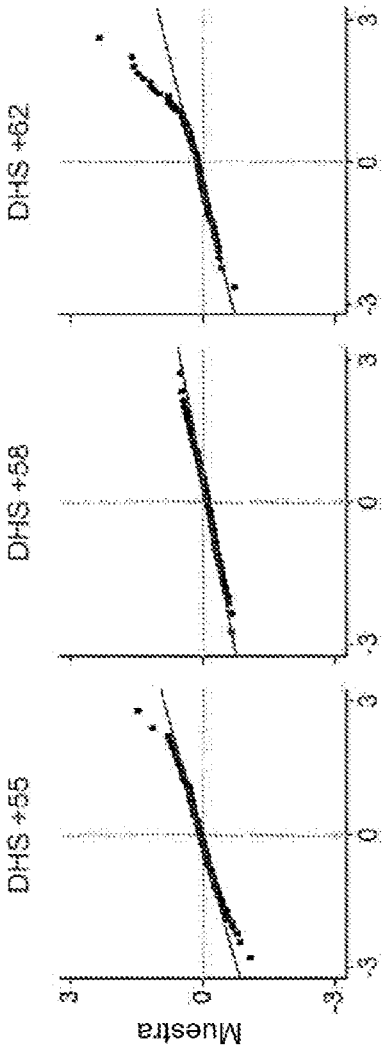

FIG. 10B

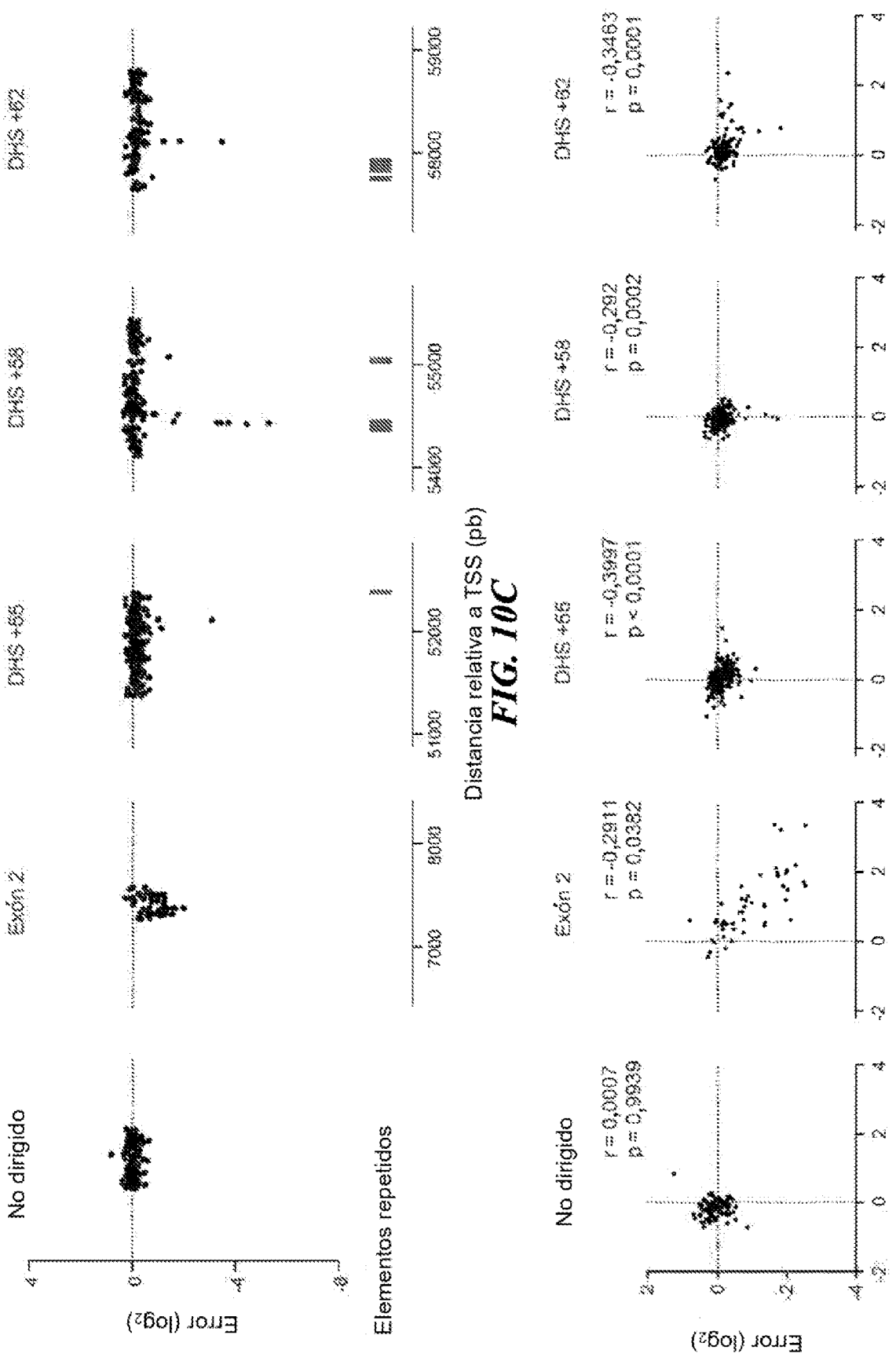

FIG. 10C

FIG. 10D

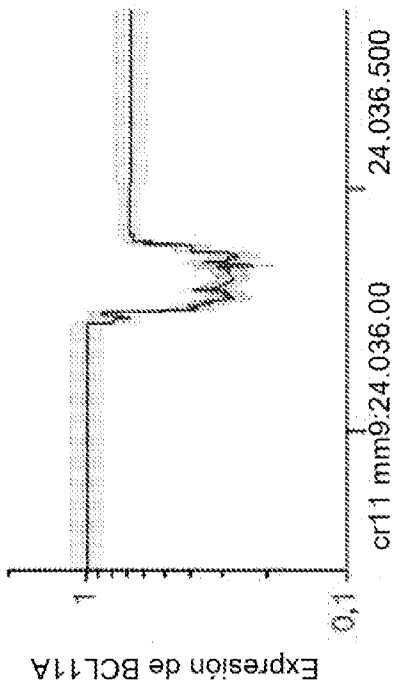

FIG. 11A

Genotipo	Progenie (n.º)	Porcentaje (esperado)
+62 +/+	7	15,6 (25)
+62 +/Δ	25	55,6 (50)
+62 Δ/Δ	13	28,9 (25)
Total	45	100 (100)

FIG. 11B

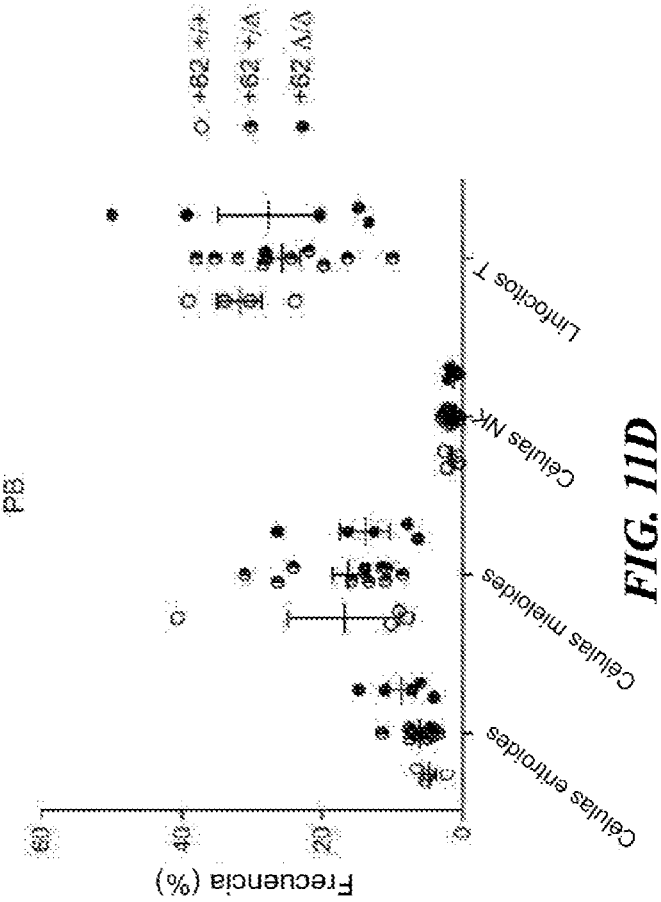

FIG. 11D

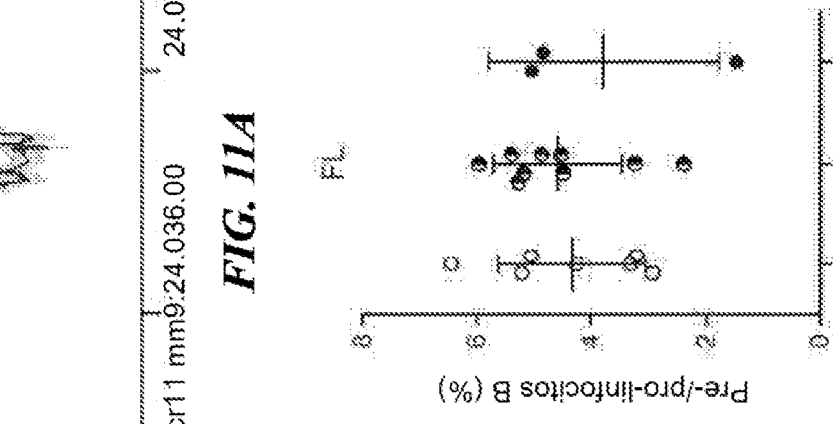

FIG. 11C

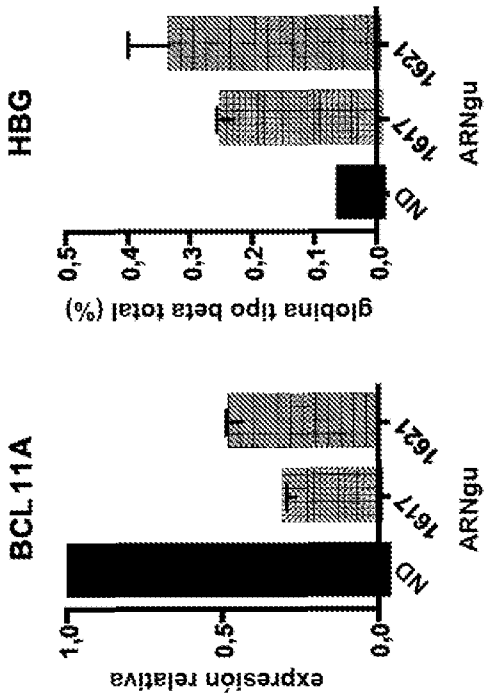
HBG
globina tipo beta total (%)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
ND
1617
1621
ARNgu
BCL11A
expresión relativa
1,0
0,5
0,0
ND
1617
1621
ARNgu

FIG. 12