

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 998 057**

⑮ Int. Cl.:

**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**C12N 9/22** (2006.01)  
**C12N 5/078** (2010.01)  
**A61K 35/14** (2015.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2017** PCT/KR2017/008835  
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2018** WO18030874  
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2017** E 17839891 (3)  
⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024** EP 3498846

④ Título: **Elemento inmunorregulador manipulado e inmunidad alterada por el mismo**

⑩ Prioridad:

**12.08.2016 KR 20160103308**  
**08.05.2017 US 201762502822 P**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.02.2025**

⑬ Titular/es:

**TOOLGEN INCORPORATED (100.00%)**  
8F, 172 Magokjungang-ro Gangseo-gu  
Seoul 07789, KR

⑦ Inventor/es:

**KIM, SEOK JOONG;**  
**KIM, YOON-YOUNG;**  
**YU, HO-SUNG;**  
**JUNG, IN-YOUNG y**  
**LEE, JUNG MIN**

⑭ Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones:

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

**ES 2 998 057 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Elemento inmunorregulador manipulado e inmunidad alterada por el mismo

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una composición para la producción de una célula inmune diseñada artificialmente y a un método para producir una célula inmune diseñada artificialmente. Se divulga en el presente documento, pero no está cubierto por la invención reivindicada, un sistema inmunitario diseñado artificialmente con una eficacia inmunológica mejorada. Más específicamente, se divulga un sistema inmunitario modificado artificialmente que comprende elementos manipuladores inmunológicos diseñados artificialmente y una célula inmune que los incluye.
- 10 Técnica antecedente
- Los agentes terapéuticos celulares son medicamentos farmacéuticos que inducen la regeneración utilizando células vivas para restaurar células/tejidos/entidades dañadas o enfermas y son medicamentos farmacéuticos que se producen mediante manipulación física, química o biológica. por ejemplo, cultivo *ex vivo*, proliferación, selección o similares de células autólogas, alogénicas o heterólogas.
- 15 Entre ellos, los agentes terapéuticos de células reguladoras inmunitarias son medicamentos farmacéuticos que se utilizan con el fin de tratar enfermedades regulando las respuestas inmunitarias en el cuerpo utilizando células inmunitarias (por ejemplo células dendríticas, células asesinas naturales, células T, etc.).
- 20 En la actualidad, se están desarrollando agentes terapéuticos de células inmunorreguladoras cuyo objetivo principal es el tratamiento del cáncer como indicación. A diferencia de la terapia quirúrgica, los agentes anticancerígenos y la radioterapia que se utilizan convencionalmente para el tratamiento del cáncer, los agentes terapéuticos de células reguladoras inmunes tienen mecanismos terapéuticos y eficacias que adquieren efectos terapéuticos al activar las funciones inmunes a través de la administración directa de células inmunes a los pacientes; se espera que ocupen una parte importante de los nuevos productos biológicos futuros.
- 25 Las características físicas y químicas de los antígenos introducidos en las células varían entre sí dependiendo del tipo de agente terapéutico celular inmunorregulador.
- Cuando se introduce un gen exógeno en las células inmunes en forma de vector viral, etc., Estas células podrán tener tanto las características de un agente terapéutico celular como un agente terapéutico genético.
- 30 La administración de agentes terapéuticos de células reguladoras inmunes se puede realizar activando varias células inmunes (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células T, células NK, etc. aisladas de pacientes mediante aféresis) con varios anticuerpos y citocinas, luego proliferando *ex vivo* e inyectándolas nuevamente en un paciente; o inyectando nuevamente en el paciente células inmunes, en las que se introduce un gen (por ejemplo, receptores de células T (TCR) o receptores de antígenos químéricos (CAR)).
- 35 La inmunoterapia adoptiva, que implica la administración de células inmunes autólogas específicas de antígeno (por ejemplo, células T) producidas *ex vivo*, puede convertirse en una estrategia prometedora para tratar diversas enfermedades inmunes, así como el cáncer.
- 40 El documento WO 2015090230 A1 divulga una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno químérico (CAR) , en donde el CAR comprende: i) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de unión antimesotelina humana, ii) un dominio transmembrana, y iii) un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulador, y en donde dicho dominio de unión antimesotelina comprende uno o más de la región determinante complementaria 1 de la cadena ligera (LC CDR1), la región determinante complementaria 2 de la cadena ligera (LC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de la cadena ligera (LC CDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 5 y uno o más de la región determinante complementaria 1 de la cadena pesada (HC CDR1), la región determinante complementaria 2 de la cadena pesada (HC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de la cadena pesada (HC CDR3).
- 45 El documento WO 2014039513 A2 divulga una composición para mejorar la actividad citolítica de una célula, comprendiendo dicha composición un inhibidor de la diacilglicerol quinasa (DGK) o una proteína efectora corriente abajo de la misma.
- 50 PETRA U. PRINZ ET AL: "High DGK-[alpha] and Disabled MAPK Pathways Cause Dysfunction of Human Tumor-Infiltrating CD8 + T Cells That Is Reversible by Pharmacologic Intervention", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 188, no. 12, 9 May 2012 (2012-05-09), páginas 5990-6000 divultan células T CD8<sup>+</sup> que se infiltran en tumores (CD8-TIL) que se encuentran en muchos tipos de tumores, incluido el carcinoma de

células renales humano. Sin embargo, el rechazo del tumor rara vez ocurre, lo que sugiere una actividad funcional limitada en el microambiente del tumor.

M. J. RIESE ET AL: "Enhanced Effector Responses in Activated CD8+ T Cells Deficient in Diacylglycerol Kinases", CANCER RESEARCH, vol. 73, no. 12, 10 April 2013 (2013-04-10), páginas 3566-3577 informan sobre ensayos clínicos recientes que han demostrado ser prometedores en el uso de células T transducidas con receptores de antígenos quiméricos (CAR); sin embargo, el aumento de su actividad puede ampliar su uso clínico y mejorar su eficacia. Recientemente, se informó que los agentes terapéuticos de células inmunes se pueden utilizar de diversas formas, por ejemplo, como inhibidor autoinmune, etc., además de exhibir una función anticancerígena. Por lo tanto, los agentes terapéuticos de células inmunes pueden utilizarse en diversas indicaciones modulando las respuestas inmunes. En consecuencia, existe una gran demanda de mejora y desarrollo de la eficacia terapéutica de las células inmunes manipuladas utilizadas para la inmunoterapia adoptiva.

Divulgación

Problema técnico

15 Se divulga un sistema inmunitario diseñado artificialmente con un efecto inmunológico mejorado.

Se divulga un factor inmunorregulador manipulado artificialmente y una célula que lo comprende.

Se divulga un método para modificar (por ejemplo mejorar o inhibir) la función de una célula inmune.

20 Se divulga un uso terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad acompañada de una anomalía inmunológica, que comprende un factor inmunorregulador y/o una función inmunológica modificada por células inmunitarias como componentes eficaces.

Se divulga en el presente documento, pero no está cubierto por la invención reivindicada, una función anticancerígena al mejorar la proliferación, la supervivencia, la citotoxicidad, la infiltración y la liberación de citoquinas de las células inmunes.

25 Se divulga un gen inmunorregulador tal como PD -1, CTLA-4, A20, DGKa, DGK $\zeta$ , FAS, EGR2, PPP2R2D, PSGL-1, KDM6A, TET2, etc., y/o productos expresados a partir de ellos.

Se divulga una composición para editar el genoma de una célula inmune que comprende un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía aplicable a la regulación de la actividad de un gen inmunorregulador, y un método para su uso.

30 Se divulga un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía que se puede utilizar para manipular un gen inmunorregulador como PD-1, CTLA-4, A20, DGKa, DGK $\zeta$ , FAS, EGR2, PPP2R2D, PSGL-1, KDM6A, TET2, etc.

Solución técnica

35 La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto. Los aspectos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones se divultan sólo a título informativo. Para resolver estos problemas, la presente invención proporciona una composición para la producción de una célula inmune diseñada artificialmente que tiene al menos un gen inmunorregulador diseñado artificialmente seleccionado entre el gen Dgka y el gen Dgk $\zeta$ , que comprende:

uno o más ácidos nucleicos guía o ácidos nucleicos que codifican los mismos; y

40 una proteína editora o un ácido nucleico que la codifica, en donde la proteína editora es una proteína Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes*, en donde el ácido nucleico guía y la proteína editora son capaces de formar un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, y el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía es capaz de inducir uno o más indoles en una secuencia de ácido nucleico de uno o más del gen Dgka y el gen Dgk $\zeta$  de una célula inmune, y

45 en donde el ácido nucleico guía tiene una secuencia capaz de dirigirse a una secuencia diana seleccionada entre las SEQ ID NO: 19, 20, 21 y 23 en una región de exón del gen Dgka, o la secuencia diana seleccionada entre las SEQ ID NO: 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123 en una región de exón del gen Dgk $\zeta$ .

Las realizaciones preferidas se reflejan en las reivindicaciones dependientes.

50 Además, se divulga un sistema inmunitario diseñado artificialmente con un efecto inmunológico mejorado. Más específicamente, se divulga un sistema inmunitario diseñado artificialmente que comprende un factor inmunorregulador diseñado artificialmente y una célula inmune que lo incluye.

Además, se divulga un factor de regulación inmunitaria modificado o manipulado genéticamente para un propósito particular.

El término "factor inmunorregulador" se refiere a sustancias que funcionan en relación con la formación y el desempeño de una respuesta inmunológica, incluidas todas las diversas sustancias que pueden ser no naturales, es decir, diseñadas artificialmente, y que tienen una función reguladora de la respuesta inmunológica. Por ejemplo, puede ser un gen o una proteína modificados o genéticamente y expresados en una célula inmune.

El factor inmunorregulador puede funcionar en la activación o inactivación de las células inmunes. El factor inmunorregulador puede funcionar para promover una respuesta inmune (por ejemplo, un factor regulador del crecimiento de células inmunes, un factor regulador de la muerte de células inmunes, un factor de pérdida de función de células inmunes o un elemento de secreción de citoquinas, etc.).

El factor inmunorregulador puede ser, por ejemplo, un gen DGKA modificado o diseñado genéticamente, o un gen DGKZ.

El factor inmunorregulador puede incluir dos genes modificados o manipulados genéticamente. Por ejemplo, los dos genes seleccionados del grupo que consiste en un gen DGKA y un gen DGKZ pueden ser manipulados o modificados artificialmente.

Se divultan en el presente documento uno o más factores inmunorreguladores manipulados artificialmente seleccionados del grupo que consiste en un gen DGKA y un gen DGKZ, que han sufrido una modificación en una secuencia de ácido nucleico.

La modificación de una secuencia de ácido nucleico puede ser manipulada artificialmente, de forma ilimitada, mediante un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

El término "complejo de proteína editora-ácido nucleico guía" se refiere a un complejo formado a través de la interacción entre un ácido nucleico guía y una proteína editora, y el complejo de ácido nucleico-proteína incluye el ácido nucleico guía y la proteína editora.

El complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede servir para modificar un sujeto. El sujeto puede ser un ácido nucleico diana, un gen, un cromosoma o una proteína.

Por ejemplo, el gen puede ser un gen inmunorregulador, manipulado artificialmente por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía,

En donde el gen inmunorregulador manipulado artificialmente incluye una o más modificaciones de ácidos nucleicos que son

al menos una de una delección o inserción de uno o más nucleótidos, una sustitución con uno o más nucleótidos diferentes de un gen de tipo salvaje, y una inserción de uno o más nucleótidos extraños, en una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM) en una secuencia de ácido nucleico que constituye el gen inmunorregulador o en una región de secuencia de bases continua de 1pb a 50pb adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' del mismo,

o

una modificación química de uno o más nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico que constituye el gen inmunorregulador.

La modificación de los ácidos nucleicos puede ocurrir en una región promotora del gen.

La modificación de los ácidos nucleicos puede ocurrir en una región exón del gen. En una realización de ejemplo, el 50% de las modificaciones pueden ocurrir en la sección corriente arriba de las regiones codificantes del gen.

La modificación de los ácidos nucleicos puede ocurrir en una región intrón del gen.

La modificación de los ácidos nucleicos puede ocurrir en una región potenciadora del gen.

La secuencia PAM puede ser, por ejemplo, una o más de las siguientes secuencias (descritas en la dirección 5' a 3'):

NGG (N es A, T, C o G);

NNNNRYAC (cada uno de N es independientemente A, T, C o G, R es A o G, e Y es C o T);

NNAGAAW (cada uno de N es independientemente A, T, C o G, y W es A o T);

NNNNGATT (cada uno de N es independientemente A, T, C o G);

NNGRR(T) (cada uno de N es independientemente A, T, C o G, R es A o G e Y es C o T); y

TTN (N es A, T, C o G).

La presente invención proporciona uno o más ácidos nucleicos guía seleccionados del grupo descrito a continuación:

5 un ácido nucleico guía capaz de formar un enlace complementario con cada una de las secuencias diana de SEQ ID NO: 19, 20, 21 y 23, en la secuencia de ácido nucleico del gen Dgk $\alpha$ ;

un ácido nucleico guía capaz de formar un enlace complementario con cada una de las secuencias diana de SEQ ID NO: 109, 110, 111, 112 y 113, en la secuencia de ácido nucleico del gen Dgk $\zeta$ .

10 El ácido nucleico guía puede tener, sin limitación, de 18 a 25 pb, de 18 a 24 pb, de 18 a 23 pb, de 19 a 23 pb, o de 20 a 23 pb nucleótidos.

Además, se divulga una célula inmune manipulada artificialmente que comprende uno o más genes inmunorreguladores diseñados artificialmente y productos expresados a partir de ellos.

15 La célula es, sin limitación, una célula inmune y una célula madre. Las células inmunes son células involucradas en una respuesta inmune, incluyendo todas las células que participan directa o indirectamente en la respuesta inmune y sus células diferenciadoras.

20 Las células madre pueden ser células madre embrionarias, células madre adultas, células madre pluripotentes inducidas (células iPS) o células derivadas de células madre pluripotentes inducidas (por ejemplo, una célula iPS generada a partir de un sujeto, manipulada para alterar (por ejemplo, inducir una mutación en), que tiene capacidad de autorreplicación y diferenciación.

La célula inmune puede ser una célula CD3 positiva. Por ejemplo, puede ser una célula T o una célula T CAR.

La célula inmune puede ser una célula CD56 positiva. Por ejemplo, puede ser una célula NK, como una célula NK primaria NK92.

25 La célula inmune puede ser una célula doble positiva CD3 y CD56 (célula doble positiva CD3/CD56). Por ejemplo, puede ser una célula asesina natural T (NKT) o una célula asesina inducida por citoquinas (CIK).

30 Específicamente, por ejemplo, la célula es al menos una especie seleccionada del grupo que consiste en células T tales como células T CD8+ (por ejemplo, una célula T CD8+ ingenua, una célula T efectora CD8+, una célula T de memoria central o una célula T de memoria efectora), una célula T CD4+, una célula T asesina natural (célula NKT), una célula T reguladora, una célula T de memoria de células madre, una célula progenitora linfoide, una célula madre hematopoyética, una célula asesina natural (célula NK), una célula dendrítica, una célula inducida por citoquinas (CIK), una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), un monocito, un macrófago, una célula T asesina natural (NKT) y similares. Preferiblemente, la célula inmune puede ser una célula T, una célula T CAR, una célula NK o una célula NKT.

35 La célula inmune puede ser manipulada artificialmente para suprimir o inactivar la actividad del gen inmunorregulador.

La célula inmune puede comprender además un receptor de antígeno quimérico (CAR).

A modo de ejemplo, la célula T comprende además un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un TCR (receptor de células T) diseñado.

40 La célula inmune comprende además un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía o una secuencia de ácido nucleico que lo codifica.

La proteína editora es una proteína Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes*.

45 El ácido nucleico guía puede formar un enlace complementario con una parte de las secuencias de ácido nucleico de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en DGK $\alpha$  y DGK $\zeta$ . Puede crear no coincidencias de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3 o de 0 a 2. Como ejemplo preferido, el ácido nucleico guía puede ser un nucleótido que forma un enlace complementario con una o más de las secuencias diana de las SEQ ID NO: 19, 20, 21, 23, 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123 de la Tabla 1.

A modo de ejemplo ejemplar, el ácido nucleico guía puede ser nucleótidos que forman un enlace complementario con una o más de las secuencias diana de las SEQ ID NO: 19, 20, 21 y 23 (DGK $\alpha$ ), y SEQ ID NO: 109, 110, 111, 112 y 113 (DGK $\zeta$ ) respectivamente.

En la presente invención, la célula inmune comprende al menos un gen diseñado artificialmente seleccionado entre el gen DGK $\alpha$  y el gen DGK $\zeta$  que ha sufrido una modificación en una secuencia de ácido nucleico.

En otra realización de ejemplo de la presente invención, la célula inmune comprende el gen DGK $\alpha$  y el gen DGK $\zeta$  diseñados artificialmente que han sufrido una modificación en una secuencia de ácido nucleico.

5 La presente invención proporciona una composición para provocar la respuesta inmune deseada. Puede denominarse como composición farmacéutica o composición terapéutica.

La presente invención proporciona una composición para manipulación genética que comprende un ácido nucleico guía capaz de formar un enlace complementario con cada una de las secuencias diana de las SEQ ID NO: 19, 20, 21 y 23 (DGK $\alpha$ ), y SEQ ID NO: 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123 (DGK $\zeta$ ); y una 10 proteína editora o ácido nucleico que la codifica.

La descripción de la configuración relevante es la misma que la descrita anteriormente.

La presente invención proporciona un método para manipular artificialmente una célula inmune que comprende poner en contacto una célula inmune aislada del cuerpo humano con al menos una seleccionada entre:

15 (a) un ácido nucleico guía capaz de formar un enlace complementario con cada una de las secuencias diana de SEQ ID NOS: 19, 20, 21 y 23 en una región de exón del gen Dg $\alpha$  y SEQ ID NOS: 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123 en una región de exón del gen Dg $\zeta$ ; y

(b) una proteína editora que es proteína Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes*.

20 El ácido nucleico guía y la proteína editora pueden estar presentes en uno o más vectores, cada uno en forma de una secuencia de ácido nucleico o pueden estar presentes formando un complejo mediante la unión de un ácido nucleico guía y una proteína editora.

Se realiza el paso de entrar en contacto *in vivo* o *ex vivo*.

El paso de entrar en contacto se lleva a cabo mediante uno o más métodos seleccionados entre electroporación, liposoma, plásmido, vectores virales, nanopartículas y método de proteína de fusión de dominio de translocación de proteínas.

25 El vector viral es al menos uno seleccionado del grupo de un retrovirus, un lentivirus, un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV), un virus vaccinia, un poxvirus y un virus del herpes simple.

Se divulga en el presente documento, pero no está cubierto por la invención reivindicada, un método para proporcionar información sobre una secuencia de una posición diana de una célula inmune en un sujeto, mediante la secuenciación de al menos un gen seleccionado del grupo de Dg $\alpha$  y Dg $\zeta$ .

30 Se divulga un método para construir una biblioteca utilizando la información proporcionada a través del método.

Se divulga un kit para manipulación genética, que incluye los siguientes componentes:

(a) un ácido nucleico guía capaz de formar un enlace complementario con cada una de las secuencias diana de SEQ ID NOS: 19, 20, 21 y 23 en una región de exón del gen Dg $\alpha$  y SEQ ID NOS: 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123 en una región de exón del gen Dg $\zeta$ ; y

35 (b) una proteína editora que es una proteína Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes*.

Estos kits se pueden utilizar para manipular artificialmente el gen deseado.

40 Se divultan en el presente documento, pero no están cubiertos por la invención reivindicada, todos los aspectos del uso terapéutico de una enfermedad utilizando un enfoque terapéutico inmunológico que comprende la administración de una célula inmune manipulada artificialmente, tal como una célula inmune o una célula madre modificada genéticamente, a un sujeto. Es particularmente útil para la inmunoterapia adoptiva.

Los objetivos del tratamiento pueden ser mamíferos, incluidos primates (por ejemplo humanos, monos, etc.), roedores (por ejemplo ratones, ratas, etc.).

Efectos ventajosos de la invención

45 Un producto eficaz de terapia celular inmune puede obtenerse mediante un sistema inmunitario en el que las funciones son manipuladas artificialmente por factores inmunorreguladores manipulados artificialmente y células que los contienen.

Por ejemplo, cuando los factores inmunorreguladores se controlan artificialmente mediante el método o la composición de la presente invención, se podrían mejorar las eficacias inmunes involucradas en la

supervivencia, proliferación, persistencia, citotoxicidad, liberación de citoquinas y/o infiltración, etc., de las células inmunes.

Breves descripciones de los dibujos

FIG. 1 es un gráfico que muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD25 en células donde se elimina el gen DGK-alfa, utilizando ARNsg (#11; indicado como DGK-alfa #11) para DGK-alfa.

FIG. 2 es un gráfico que muestra la MFI de CD25 en células donde se inactiva el gen A20, utilizando ARNsg (#11; indicado como A20#11) para A20.

FIG. 3 es un gráfico que muestra la MFI de CD25 en células donde se inactiva el gen EGR2, utilizando ARNsg (#1; indicado como EGR2#1) para EGR2.

FIG. 4 es un gráfico que muestra la MFI de CD25 en células donde se inactiva el gen PPP2R2D, utilizando ARNsg (#10; indicado como PPP2R2D#10) para PPP2R2D.

FIG. 5 es un gráfico que muestra el nivel de IFN-gamma en un medio de cultivo en células, donde el gen DGK-alfa está inactivado, utilizando ARNsg (#11; indicado como DGK-alfa #11) para DGK-alfa; en células, donde el gen A20 está inactivado, utilizando ARNsg (#11; indicado como A20#11) para A20; y en células, donde el gen EGR2 está inactivado, utilizando ARNsg (#1; indicado como EGR2#1) para EGR2, respectivamente (unidad de nivel de IFN-gamma: pg/mL).

FIG. 6 es un gráfico que muestra el nivel de IFN-gamma en un medio de cultivo en células, donde el gen DGK-alfa está inactivado, utilizando ARNsg (#11; indicado como DGK-alfa #11) para DGK-alfa; en células, donde el gen DGK-alfa está inactivado, utilizando ARNsg (un gen uso de #8 y #11; indicado como DGK-alfa #8+11) para DGK-alfa; en células donde se inactiva el gen DGK zeta, se utiliza ARNsg (#5; indicado como DGK-zeta #5) para DGK-zeta; y en células donde se inactiva el gen A20, se utiliza ARNsg (#11; indicado como A20#11) para A20, respectivamente (unidad del nivel de IFN-gamma: pg/mL).

FIG. 7 es un gráfico que muestra el nivel de IL-2 en un medio de cultivo en células, donde el gen DGK-alfa se inactiva usando DGK-alfa #11; en células, donde el gen DGK-alfa se inactiva usando DGK-alfa #8+11; en células, donde el gen DGK-zeta se inactiva usando DGKzeta#5; y en células, donde el gen A20 se inactiva usando A20#11, respectivamente (unidad del nivel de IL-2: pg/mL).

FIG. 8a muestra los resultados de la inactivación del gen DGK mediado por CRISPR/Cas9 en células T primarias humanas, en la que (A) confirma la cronología de la inactivación del gen en células T primarias humanas (activación celular por perlas CD3/CD28, administración lentiviral de 139 CAR e inactivación del gen DGK mediante electroporación d) y (B) confirma las eficiencias de indel para DGK $\alpha$  y DGK $\zeta$ , utilizando el sistema Mi-seq; y la FIG. 8b muestra gráficos que ilustran los resultados del análisis fuera del objetivo.

La FIG. 9a muestra gráficos que ilustran los efectos de mejorar el efecto y la proliferación de células CAR-T mediante la inactivación del gen DGK, en los que (A) se muestran los resultados de la evaluación de la actividad de inactivación de células 139 CAR-T midiendo células U87vIII positivas a 7-AAD mediante citometría de flujo, y (B) se muestran los resultados del ensayo de capacidad de secreción de citoquinas mediante ELISA (IFN- $\gamma$ , kit IL-2, Biolegend); y la FIG. 9b muestra gráficos que ilustran los resultados de la evaluación de la capacidad de proliferación de células 139 CART mediante citometría de flujo.

La FIG. 10 muestra los resultados de la mejora de la expresión de 139 CAR y la amplificación de la señalización en el terminal CD3 después de que la inactivación de DGK expone los antígenos, en la que (A) muestra los resultados de la transferencia Western en las señales ERK fosforiladas de las células 139 CAR-T estimuladas con perlas CD3/CD28, y (B) muestra los resultados de la expresión de 139 CAR utilizando citometría de flujo (izquierda: Expresión de CAR en función de la presencia de exposición a antígenos; y derecha: comparación de la expresión de CAR 3 días después de la exposición a antígenos).

La FIG. 11 muestra gráficos que ilustran los resultados donde la inactivación de DGK no induce activación tónica y agotamiento de células T, en los que (A) muestra la evaluación de la capacidad de secreción de IFN- $\gamma$  por ELISA, y (B) muestra los resultados del análisis de marcadores de agotamiento en células CAR-T positivas (es decir, PD-1 (izquierda) y TIM-3 (derecha)).

La FIG. 12 muestra gráficos que ilustran los resultados donde las células T con inactivación de DGK evitan los efectos inmunosupresores de TGF- $\beta$  y PGE2, en los que (A) muestra la evaluación de la actividad de eliminación, la capacidad de secreción de IFN- $\gamma$  y la capacidad de secreción de IL-2 de células 139 CAR-T y células 139 CAR-T DGK $\alpha\zeta$ , dependiendo de la presencia de TGF- $\beta$  (10 ng/mL), y (B) muestra la evaluación de la actividad de eliminación, la capacidad de secreción de IFN- $\gamma$  y la capacidad de secreción de IL-2 de células 139 CAR-T y células 139 CAR-T DGK $\alpha\zeta$ , dependiendo de la presencia de PGE2 (0.5  $\mu$ g/mL).

La FIG. 13 muestra gráficos que ilustran los resultados de la eficiencia de inactivación mediada por

CRISPR/Cas9 de DGK $\alpha$  y el efecto sobre las funciones efectoras en células NK humanas, en las que (A) y (B) muestran gráficos que ilustran el análisis de la eficiencia de inactivación en células NK-92 y células NK primarias humanas utilizando el sistema Mi-seq, y (C) muestra un gráfico que ilustra la actividad de eliminación de NK-92 mediante la medición de células Raji positivas para 7-AAD.

5 La FIG. 14 muestra los resultados de las eficiencias de inactivación mediadas por CRISPR/Cas9 de DGK $\alpha$  y DGK $\zeta$  en células NKT humanas, en las que (A) muestra los resultados de la evaluación de la eficiencia de indel, (B) muestra los resultados de la evaluación del crecimiento celular, (C) muestra los resultados de la evaluación de la capacidad de supervivencia celular y (D) muestra los resultados experimentales de transferencia Western para identificar la presencia de expresión a nivel de proteína.

10 La FIG. 15 muestra gráficos que ilustran los efectos de DGK $\alpha$  y DGK $\zeta$  sobre las funciones efectoras en células NKT humanas, en las que se confirmó el efecto de la inactivación respectiva y la inactivación simultánea de DGK $\alpha$  y DGK $\zeta$  sobre (A) la actividad de inactivación y (B) la capacidad de secreción de IFN- $\gamma$  mediante ELISA (IFN-kit, Biologend).

15 La FIG. 16 muestra gráficos que ilustran (A) la eficiencia de indel y (B) la mejora de la citotoxicidad (es decir, la mejora de la actividad de eliminación), después de que se inactiva PA-1 en las células NKT, para la evaluación funcional de la inactivación de DGK $\alpha$  y DGK $\zeta$  en células NKT humanas.

20 Las FIGS. 17a a 17c muestran gráficos que ilustran los resultados del análisis para la detección de ARNsg hPSGL-1 en células Jurkat, en las que la FIG. 17a muestra la eficiencia de indel y el grado de células Jurkat donde PSGL-1 no se expresa después de la inactivación, y las FIGS. 17b y 17c muestran el grado de expresión de PSGL-1 expresado en la superficie de las células Jurkat después de la inactivación.

La FIG. 18 muestra gráficos que ilustran los resultados del experimento de inactivación de hPSGL-1 (KO) en células T primarias humanas, en el que (A) muestra la eficiencia de indel, (B) muestra el grado de células T donde PSGL-1 no se expresa después de la inactivación, y (C) muestra el grado de expresión de PSGL-1 expresado en la superficie de las células T después de la inactivación.

25 [Mejor modo de llevar a cabo la invención]

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entienden aquellos con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o prueba de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o idénticos a los descritos en este documento, a continuación se describe 30 métodos y materiales adecuados.

Se divulga en el presente documento, pero no está cubierto por la invención reivindicada, un sistema inmunitario manipulado artificialmente con una eficacia inmunológica mejorada. Más específicamente, se divulga un sistema inmunitario modificado artificialmente que comprende un factor inmunorregulador manipulado artificialmente y células que lo comprenden.

35 [Factor inmunorregulador]

Factor inmunorregulador

El término "factor inmunorregulador" se refiere a un material que funciona en relación con la formación y el desempeño de una respuesta inmunológica, incluidos todos los diversos materiales que pueden no ser 40 naturales, es decir, manipulado artificialmente y capaz de regular las respuestas inmunes. Por ejemplo, el factor inmunorregulador puede ser un gen o proteína genéticamente manipulado o modificado, que se expresa en las células inmunes.

El término "manipulado artificialmente" significa un estado en el que se aplica una modificación artificial, no un estado de ser tal como es que ocurre en un estado natural.

45 El término "manipulado genéticamente" significa un caso en el que se realiza una operación de aplicación artificial de modificación genética a un material biológico o no biológico al que se refiere la presente invención, por ejemplo, puede ser un gen y/o un producto genético (por ejemplo polipéptidos, proteínas, etc.) en el que el genoma ha sido modificado artificialmente bajo una propósito particular.

Se divulga un factor inmunorregulador modificado o manipulado genéticamente para un propósito particular.

50 Los siguientes elementos enumerados son sólo ejemplos de factores de regulación inmunitaria. Los genes o proteínas enumerados a continuación pueden no tener solo un tipo de función inmunorreguladora, sino que pueden tener varios tipos de funciones. Además, se pueden proporcionar dos o más factores de regulación inmunitaria, si es necesario.

[Elementos reguladores de la actividad de las células inmunes]

El término "elemento regulador de la actividad de las células inmunes" es un elemento que funciona para regular el grado o la actividad de una respuesta inmune, por ejemplo, puede ser un gen o proteína genéticamente manipulado o modificado que funciona para regular el grado o la actividad de la respuesta inmune.

- 5 El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede realizar funciones asociadas con la activación o desactivación de las células inmunes.

El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede funcionar para estimular o mejorar la respuesta inmune.

- 10 El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede funcionar para suprimir la respuesta inmune.

El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede unirse a las proteínas del canal de la membrana celular y a los receptores y, de ese modo, realizar funciones asociadas con la transducción de señales que regulan las respuestas inmunes y funciones asociadas con la síntesis y descomposición de proteínas.

- 15 Por ejemplo, el elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede ser la proteína de muerte celular programada (PD-1).

El gen PD-1 (también denominado gen PDCD1; en adelante, el gen PD-1 y el gen PDCD1 se utilizan para significar el mismo gen) se refiere a un gen (ADN, ADNc o ARNm de longitud completa) que codifica la proteína PD-1, también denominada agrupación de diferenciación 279 (CD279). El gen PD-1 puede ser, pero no está limitado a, uno o más seleccionados del grupo que consiste en los siguientes genes: genes que codifican PD-1 humano (por ejemplo NCBI Accession No.: NP\_005009.2, etc.), Por ejemplo genes PD-1 expresados como NCBI Accession No. NM\_005018.2, NG\_012110.1, etc.

El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede ser la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4).

- 25 El gen CTLA-4 se refiere a un gen (ADN, ADNc o ARNm de longitud completa) que codifica la proteína CTLA-4, que también se conoce como agrupación de diferenciación 152 (CD152). El gen CTLA-4 puede ser, pero no está limitado a, uno o más seleccionados del grupo que consiste en los siguientes genes: genes que codifican CTLA-4 humano (por ejemplo NCBI Accession: NP\_001032720.1, NP\_005205.2, etc.), por ejemplo, los genes CTLA-4 expresados como NCBI Accession No. NM\_001037631.2, NM\_005214.4, NG\_011502.1, etc.

- 30 El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede ser CBLB.

El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede ser PSGL-1.

El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede ser ILT2.

El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede ser KIR2DL4.

El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede ser SHP-1.

- 35 Los genes anteriores pueden derivar de mamíferos, incluidos los primates (por ejemplo humanos, monos, etc.), roedores (por ejemplo ratas, ratones, etc.).

En una realización, el elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede funcionar para estimular la respuesta inmune.

- 40 El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede ser un elemento regulador del crecimiento de las células inmunes.

El término "elemento regulador del crecimiento de células inmunes" se refiere a un elemento que funciona para regular el crecimiento de las células inmunes regulando la síntesis de proteínas, etc. en las células inmunes, por ejemplo, un gen o proteína expresado en las células inmunes.

- 45 El elemento regulador del crecimiento de las células inmunes puede funcionar en la transcripción del ADN, la traducción del ARN y la diferenciación celular.

Los ejemplos del elemento regulador del crecimiento de células inmunes pueden ser genes o proteínas involucrados en las vías de expresión de NFAT, IkB/NF-κB, AP-1, 4E-BP1, eIF4E y S6.

Por ejemplo, el elemento regulador del crecimiento de las células inmunes puede ser DGK-alfa.

El gen DGKA(Dgk-alfa) se refiere a un gen (ADN, ADNc o ARNm de longitud completa) que codifica la proteína

5 diacilglicerol quinasa alfa (DGKA). En una realización, el gen DGKA puede ser, pero no se limita a, uno o más seleccionados del grupo que consiste en los siguientes genes: genes que codifican genes humanos DGKA (por ejemplo, NCBI Accession No. NP\_001336.2, NP\_958852.1, NP\_958853.1, NP\_963848.1, etc.), por ejemplo, DGKA genes expresado como NCBI Accession No. NM\_001345.4, NM\_201444.2, NM\_201445.1, NM\_201554.1, NC\_000012.12, etc.

El elemento regulador del crecimiento de las células inmunes puede ser DGK-zeta.

10 El gen DGKZ (Dgk-zeta) se refiere a un gen (ADN, ADNc o ARNm de longitud completa) que codifica la proteína diacilglicerol quinasa zeta (DGKZ). En una realización, el gen DGKZ puede ser, pero no está limitado a, uno o más seleccionados del grupo que consiste en los siguientes genes: genes que codifican DGKZ humano (por ejemplo NCBI Accession No. NP\_001099010.1, NP\_001186195.1, NP\_001186196.1, NP\_001186197.1, NP\_003637.2, NP\_963290.1, NP\_963291.2, etc.). Por ejemplo **gen DGKZ** expresado como NCBI Accession No. NM\_001105540.1, NM\_001199266.1, NM\_001199267.1, NM\_001199268.1, NM\_003646.3, NM\_201532.2, NM\_201533.3, NG\_047092.1, etc.

El elemento regulador del crecimiento de las células inmunes puede ser EGR2.

15 El gen EGR2 se refiere a un gen (ADN, ADNc o ARNm de longitud completa) que codifica la proteína de respuesta al crecimiento temprano 2 (EGR2). El gen EGR2 puede ser, pero no está limitado a, uno o más seleccionados del grupo que consiste en los siguientes.

El elemento regulador del crecimiento de las células inmunes puede ser EGR3.

El elemento regulador del crecimiento de las células inmunes puede ser PPP2R2D.

20 El elemento regulador del crecimiento de células inmunes puede ser A20 (TNFAIP3).

El elemento regulador del crecimiento de las células inmunes puede ser PSGL-1.

Los genes anteriores pueden ser definidos de mamíferos, incluidos los primates (por ejemplo humanos, monos, etc.), roedores (por ejemplo ratas, ratones, etc.).

25 El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede ser un elemento regulador de la muerte de las células inmunes.

El término "elemento regulador de la muerte de células inmunes" se refiere a un elemento que funciona en relación con la muerte de las células inmunes, y puede ser un gen o una proteína expresados en las células inmunes que realizan dicha función.

30 El elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede realizar funciones asociadas con la apoptosis o necrosis de las células inmunes.

El elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser una proteína o un gen asociado a la cascada de caspasas.

35 El elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser Fas. Al hacer referencia a la proteína o al gen en lo sucesivo, es evidente para aquellos con conocimientos ordinarios en la materia que se puede manipular un receptor o una región de unión sobre la que actúa la proteína o el gen.

El elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser una proteína o un gen asociado al dominio de muerte. En particular, el elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser Daxx.

El elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser una proteína de la familia Bcl-2.

40 El elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser una proteína de la familia BH3 únicamente.

El elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser Bim.

El elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser Bid.

El elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser BAD.

45 El elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser un ligando o un receptor ubicado en la membrana extracelular inmunitaria.

En particular, el elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser PD-1.

Además, el elemento regulador de la muerte de las células inmunes puede ser CTLA-4.

El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede ser un elemento regulador del agotamiento de las células inmunes.

El término "elemento regulador del agotamiento de las células inmunes" se refiere a un elemento que desempeña funciones asociadas con la pérdida progresiva de funciones de las células inmunes, y puede ser un gen o una proteína expresados en las células inmunes que desempeñan dicha función.

El elemento regulador del agotamiento de las células inmunes puede funcionar para ayudar a la transcripción o traducción de genes involucrados en la inactivación de las células inmunes.

En particular, la función de ayudar a la transcripción puede ser una función de desmetilación de los genes correspondientes.

10 Además, los genes implicados en la inactivación de las células inmunes incluyen el gen del elemento regulador de la actividad de las células inmunes.

En particular, el elemento regulador del agotamiento de las células inmunes puede ser TET2.

15 Genes que codifican el humano (por ejemplo NCBI Accession No. NP\_001120680.1, NP\_060098.3, etc.), por ejemplo, el gen TET2 se expresa como NCBI Accession NM\_001127208.2, No. NM\_01 7628.4, NG\_028191.1, etc.

El elemento regulador del agotamiento de las células inmunes puede funcionar para participar en el crecimiento excesivo de las células inmunes. Las células inmunes que experimentan un crecimiento excesivo y no se regeneran perderán sus funciones.

20 En particular, el elemento regulador del agotamiento de las células inmunes puede ser Wnt. De aquí en adelante, cuando se hace referencia a una proteína o un gen, es evidente para aquellos con conocimientos ordinarios en la materia que la proteína o el gen en la vía de transducción de señales en la que está incluida la proteína y el receptor sobre el que actúa el gen, y la región de unión pueden ser manipulados.

25 Además, el elemento regulador del agotamiento de las células inmunes puede ser Akt. De aquí en adelante, cuando se hace referencia a una proteína o un gen, es evidente para aquellos con conocimientos ordinarios en la materia que la proteína o el gen en la vía de transducción de señales en la que está incluida la proteína y el receptor sobre el que actúa el gen, y la región de unión pueden ser manipulados.

El elemento regulador de la actividad de las células inmunes puede ser un elemento regulador de la producción de citoquinas.

30 El término "elemento regulador de la producción de citoquinas" se refiere a un gen o proteína implicado en la secreción de citoquinas de las células inmunes y puede ser un gen o proteína expresado en las células inmunes que realiza dicha función.

Citoquina es un término colectivo que se refiere a una proteína secretada por las células inmunes y es una proteína señal que desempeña un papel importante *in vivo*. Las citoquinas están involucradas en infecciones, inmunidad, inflamación, trauma, corrupción, cáncer, etc. Las citoquinas pueden secretarse desde las células y luego afectar a otras células o a las células que las secretaron ellas mismas. Por ejemplo, pueden inducir la proliferación de macrófagos o promover la diferenciación de las propias células secretoras. Sin embargo, cuando las citoquinas se secretan en exceso cantidad, pueden causar problemas como atacar células normales, por lo que la secreción adecuada de citoquinas también es importante en las respuestas inmunes.

40 El elemento regulador de la producción de citoquinas puede ser, por ejemplo, preferiblemente un gen o proteína en las vías de TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-1, IL-6, IL-12, IL-7, IL-15, IL-17 e IFN- $\alpha$ .

Alternativamente, las citoquinas pueden funcionar para enviar una señal a otras células inmunes para inducirlas a matar las células portadoras de antígeno reconocidas o para ayudar en la diferenciación. En particular, el elemento regulador de la producción de citoquinas puede ser, preferiblemente, un gen o proteína en la vía genética relacionada con la secreción de IL-2.

45 El factor inmunorregulador puede referirse a un grupo de moléculas que se expresan en las células inmunes. Estas moléculas pueden actuar eficazmente para subregular/sobrerregular o inhibir/promover las respuestas inmunes.

Por ejemplo, como un grupo de moléculas que expresan las células T, el "punto de control inmunológico" puede ser, pero no se limita a, la Muerte Programada1 (PD-1). PDCD1 o CD279, No. de Acceso: NM\_005018) antígeno de linfocito T citotóxico 4 (CTLA-4 o CD152, GenBank No. de Acceso: AF414120.1), LAG3 (CD223, No. de Acceso: NM\_002286.5), Tim3 (HAVCR2, GenBank No. de Acceso: JX049979.1), BTLA(CD272, No. de Acceso: NM\_181780.3), BY55 (CD160, GenBank No. de Acceso: CR541888.1), TIGIT(IVSTM3, No. de Acceso: NM\_173799), LAIR1 (CD305, GenBank No. de Acceso: CR542051.1), SIGLEC10 (GeneBank No. de Acceso:

AY358337.1), 2B4 (CD244, No. de Acceso: NM\_001166664.1), PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, CD96, CRTAM, SIGLEC7, SIGLEC9, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, TGFBRII, TGFRBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 y GUCY1B3, que inhiben directamente las células inmunes.

En una realización de la presente invención, el factor inmunorregulador es un gen DGKA o un gen DGKZ modificado o manipulado genéticamente.

En una realización de la presente invención, el factor inmunorregulador incluye dos genes modificados o manipulados genéticamente. Es decir, se manipulan o modifican los genes DGKA y DGKZ.

10 La manipulación o modificación genética puede obtenerse induciendo mutaciones artificiales de inserción, eliminación, sustitución e inversión en todas o en regiones parciales de la secuencia genómica de genes de tipo salvaje. Además, la manipulación o modificación genética también puede obtenerse mediante una fusión de manipulación o modificación genética de dos o más genes.

15 Por ejemplo, estos genes pueden ser inactivados por dicha manipulación o modificación genética y, como resultado, se impide que las proteínas codificadas por estos genes se expresen en forma de proteínas que tengan sus funciones originales.

20 Por ejemplo, estos genes pueden activarse aún más mediante dicha manipulación o modificación genética de modo que las proteínas codificadas por estos genes se expresen en forma de proteínas que tengan funciones más mejoradas en comparación con sus funciones originales. En un ejemplo, cuando la función de una proteína codificada por un gen particular es A, la función de la proteína expresada por el gen manipulado puede ser completamente diferente de A, o puede tener una función adicional (A+B) que incluye A.

Por ejemplo, la manipulación o modificación genética puede ser tal que dos o más proteínas se expresen en una forma fusionada utilizando dos o más genes que tienen funciones que son diferentes entre sí o complementarias entre sí.

25 Por ejemplo, la manipulación o modificación genética puede ser tal que dos o más proteínas se expresen en una forma independiente separada en una célula mediante el uso de dos o más genes que tienen funciones que son diferentes entre sí o complementarias entre sí.

La información genética se puede obtener de bases de datos conocidas tales como GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

30 En una realización, la manipulación o modificación de un gen puede ser inducida por uno o más de los siguientes:

35 eliminación de todo o parte del gen a modificar (en adelante, "gen diana"), por ejemplo, eliminación, delección de nucleótidos de 1 pb o más de un gen diana (por ejemplo 1 a 30 nucleótidos, 1 a 27 nucleótidos, 1 a 25 nucleótidos, 1 a 23 nucleótidos, 1 a 20 nucleótidos, 1 a 15 nucleótidos, 1 a 10 nucleótidos, 1 a 5 nucleótidos, 1 a 3 nucleótidos o 1 nucleótido); y

40 sustitución de nucleótidos de 1 pb o más de un gen diana (por ejemplo 1 a 30 nucleótidos, 1 a 27 nucleótidos, 1 a 25 nucleótidos, 1 a 23 nucleótidos, 1 a 20 nucleótidos, 1 a 15 nucleótidos, 1 a 10 nucleótidos, 1 a 5 nucleótidos, 1 a 3 nucleótidos, o 1 nucleótido diferente de los del original 1(tipo salvaje)), e inserción de uno o más nucleótidos (por ejemplo 1 a 30 nucleótidos, 1 a 27 nucleótidos, 1 a 25 nucleótidos, 1 a 23 nucleótidos, 1 a 20 nucleótidos, 1 a 15 nucleótidos, 1 a 10 nucleótidos, 1 a 5 nucleótidos, 1 a 3 nucleótidos o 1 nucleótido) a cualquier ubicación de un gen diana.

45 Una parte del gen diana que se va a modificar ("región diana") puede ser una región de secuencia de nucleótidos continua en el gen de 1 pb o más, 3 pb o más, 5 pb o más, 7 pb o más, 10 pb o más, 12 pb o más, 15 pb o más, 17 pb o más, 20 pb o más (por ejemplo 1 pb a 30 pb, 3 pb a 30 pb, 5 pb a 30 pb, 7 pb a 30 pb, 10 pb a 30 pb, 12 pb a 30 pb, 15 pb a 30 pb, 17 pb a 30 pb, 20 pb a 30 pb, 1 pb a 27 pb, 3 pb a 27 pb, 5 pb a 27 pb, 7 pb a 27 pb, 10 pb a 27 pb, 12 pb a 27 pb, 15 pb a 27 pb, 17 pb a 27 pb, 20 pb a 27 pb, 1 pb a 25 pb, 3 pb a 25 pb, 5 pb a 25 pb, 7 pb a 25 pb, 10 pb a 25 pb, 12 pb a 25 pb, 15 pb a 25 pb, 17 pb a 25 pb, 20 pb a 25 pb, 1 pb a 23 pb, 3 pb a 23 pb, 5 pb a 23 pb, 7 pb a 23 pb, 10 pb a 23 pb, 12 pb a 23 pb, 15 pb a 23 pb, 17 pb a 23 pb, 20 pb a 23 pb, 1 pb a 20 pb, 3 pb a 20 pb, 5 pb a 20 pb, 7 pb a 20 pb, 10 pb a 20 pb, 12 pb a 20 pb, 15 pb a 20 pb, 17 pb a 20 pb, 21 pb a 25 pb, 18 pb a 22 pb o 21 pb a 23 pb).

50 [Células que contienen factores reguladores del sistema inmunitario]

Se divultan en el presente documento células que incluyen el factor inmunorregulador manipulado artificialmente.

Las células son, pero no se limitan a, células inmunes y células madre.

La "célula inmune" de la presente invención es una célula involucrada en respuestas inmunes, e incluye todas las células que están involucradas directa o indirectamente en la respuesta inmune y las células de prediferenciación de la misma.

5 Las células inmunes pueden tener la función de secreción de citoquinas, diferenciación en otras células inmunes y citotoxicidad. Las células inmunes también incluyen células que han sufrido mutaciones del estado natural.

10 Las células inmunes se diferencian de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea e incluyen en gran medida células progenitoras linfoides y células progenitoras mieloídes; y también incluyen todas las células T y células B en las que se diferencian las células progenitoras linfoides y son responsables de la inmunidad adquirida; y macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, megacariocitos, eritrocitos, etc. diferenciadas de las células progenitoras mieloídes.

15 Específicamente, las células pueden ser al menos una seleccionada del grupo que consiste en células T, por ejemplo, células T CD8+ (por ejemplo Células T CD8+ ingenuas, células T efectoras CD8+, células T de memoria central o células T de memoria efectoras), células T CD4+, células T asesinas naturales (células NKT), células T reguladoras (Treg), células T de memoria de células madre, células progenitoras linfoides, células madre hematopoyéticas, células asesinas naturales (células NK), células dendríticas, células asesinas inducidas por citoquinas (CIK), células mononucleares de sangre periférica (PBMC), monocitos, macrófagos, células T asesinas naturales (NKT), etc. Los macrófagos y las células dendríticas pueden denominarse células presentadoras de antígenos (APC), que son células especializadas capaces de activar las células T, cuando 20 los receptores del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en su superficie celular interactúan con el TCR en la superficie de la célula T. Alternativamente, cualquier célula madre hematopoyética o célula del sistema inmunitario se puede convertir en APC mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico que exprese antígeno, reconocida por TCR u otra proteína de unión a antígeno (por ejemplo CAR).

25 En una realización, la célula inmune puede ser una célula que se utiliza como terapia inmunitaria mediante la inactivación o el intercambio del gen que sintetiza la proteína asociada con el reconocimiento de MHC y/o las funciones inmunitarias (por ejemplo proteína de punto de control inmune).

En una realización, la célula inmune puede incluir además polinucleótidos que codifican receptores de cadena corta y de múltiples subunidades (por ejemplo CAR, TCR, etc.) para el reconocimiento de células específicas.

30 En una realización, la célula inmune de la presente invención puede ser aquella derivada de la sangre (por ejemplo sangre periférica), células madre (por ejemplo células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, etc.), sangre del cordón umbilical, médula ósea, etc. de un donante sano o de un paciente, o pueden ser aquellos manipulados *ex vivo*.

35 En una realización, la célula inmune puede ser una célula CD3 positiva, por ejemplo, una célula T o célula T CAR. CD3 es un receptor en el que el TCR y varias proteínas están presentes como un complejo en la superficie de las células T. Cinco tipos de proteínas, que se denominan cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ , y  $\eta$ , constituyen el CD3, y están presentes como un complejo TCR/CD3 en un estado de  $\alpha\beta:\gamma\delta\epsilon\zeta$  o  $\alpha\beta:\gamma\delta\epsilon\eta$  junto con TCR. Se sabe que tienen la función de transducción de señales en las células durante el reconocimiento de antígenos de las células T.

40 En una realización, la célula inmune puede ser una célula CD56 positiva, por ejemplo, una célula NK (por ejemplo Célula NK92 y célula NK primaria).

45 Las células NK tienen el tercer mayor número de células inmunes y aproximadamente el 10% de los inmunocitos de la sangre periférica son células NK. Las células NK tienen CD56 y CD16 y maduran en el hígado o la médula ósea. Las células NK atacan células infectadas por virus o células tumorales. Cuando las células NK reconocen células anormales, rocían perforina sobre la membrana celular para disolver la membrana celular que se va a perforar, rocían granzima dentro de la membrana celular para disecionar el citoplasma y provocar apoptosis e inyectan agua y solución salina en las células para provocar necrosis. Las células NK tienen la capacidad de matar varios tipos de células cancerosas. En particular, las células NK son bien conocidas como células en las que no se pueden introducir fácilmente materiales genéticos exógenos.

50 En una realización, la célula NK puede ser una célula doblemente positiva, por ejemplo, una célula T asesina natural (NKT) o una célula asesina inducida por citoquinas (CIK).

55 La célula T asesina natural (NKT) o célula asesina inducida por citoquinas (CIK) es una célula inmune que expresa simultáneamente CD3 (es decir, un marcador de células T) y y moléculas CD56 (es decir, un marcador de células asesinas naturales (células NK)). Las células NKT o células CIK matan las células tumorales independientemente del complejo de histocompatibilidad primario (MHC) porque estas células se derivan de las células T y tienen las características y funciones de las células NK. En particular, las células NKT son células que expresan receptores de células T (TCR) y el marcador de superficie específico de células NK NK1.1 o NKR-P1A (CD161).

En un ejemplo, las células NKT pueden reconocer los glicolípidos presentados por CD1d, una proteína monomórfica con una estructura similar a la MHC clase I. Las células NKT secretan una amplia variedad de citoquinas (por ejemplo IL-4, IL-13, IL-10 e IFN-γ) cuando son activadas por ligandos, como α-GalCer. Además, las células NKT tienen actividad antitumoral.

5 En otro ejemplo, las células CIK son un tipo de células inmunes que proliferan cuando la sangre extraída se trata con interleucina 2 y anticuerpo CD3 y se cultiva durante 2 o 3 semanas *ex vivo*, y son células CD3 y CD56 positivas. Las células CIK producen grandes cantidades de IFN-γ y TNF-α.

10 En una realización, la célula puede ser una célula madre embrionaria, una célula madre adulta, una célula madre pluripotente inducida (célula iPS) o una célula derivada de la célula madre pluripotente inducida (por ejemplo células derivadas de células iPS) con capacidades de autorreplicación y diferenciación.

Como realizaciones preferidas de la presente invención, la célula puede incluir genes manipulados o modificados que son factores inmunorreguladores.

La célula puede incluir todo o parte del gen manipulado o modificado; o un producto de expresión del mismo.

15 Por ejemplo, la célula puede ser una en la que la proteína codificada por el gen no se expresa en forma de una proteína que tiene la función original de la misma al inactivar el gen correspondiente mediante manipulación o modificación genética.

Por ejemplo, la célula puede ser una en la que la proteína codificada por el gen se expresa en forma de una proteína que tiene una función mejorada en comparación con su función original activando aún más el gen correspondiente a través de dicha manipulación o modificación genética.

20 Por ejemplo, la célula puede ser una en la que la proteína codificada por el gen se expresa en forma de una proteína que exhibe la función original de la misma y/o una función adicional a través de dicha manipulación o modificación genética.

Por ejemplo, la célula puede ser una en la que dos o más proteínas se expresan en una forma modificada utilizando dos o más genes que son diferentes entre sí o que son complementarios entre sí a través de dicha manipulación o modificación genética.

Por ejemplo, la célula puede ser una célula inmune con alta producción de citoquinas o capacidad de secreción de tres tipos de citoquinas (por ejemplo IL-2, TNF-α, e IFN-γ) a través de dicha manipulación o modificación genética.

En un ejemplo, la célula de la presente divulgación puede incluir además las siguientes constituciones.

### 30 Receptores

La célula de la presente divulgación puede incluir un "receptor inmune".

El término "receptor inmune", que es un receptor presente en la superficie de una célula inmune manipulada o modificada artificialmente, se refiere a un material involucrado en las respuestas inmunes, por ejemplo, una entidad funcional que reconoce antígenos y realiza una función específica.

35 El receptor puede estar en estado salvaje o manipulado artificialmente.

El receptor puede tener afinidad por los antígenos.

El receptor puede tener capacidad de reconocimiento para las estructuras formadas por las proteínas estructurales del MHC y los antígenos divulgados en las proteínas estructurales.

El receptor puede producir una señal de respuesta inmune.

40 El término "señal de respuesta inmune" se refiere a cualquier señal que ocurre en el proceso de respuesta inmune.

La señal de respuesta inmune puede ser una señal asociada con el crecimiento y la diferenciación de las células inmunes.

La señal de respuesta inmune puede ser una señal asociada con la muerte de células inmunes.

45 La señal de respuesta inmune puede ser una señal asociada con la actividad de las células inmunes.

La señal de respuesta inmune puede ser una señal asociada con la ayuda de las células inmunes.

La señal de respuesta inmune puede ser una señal que regule la expresión del gen de interés.

La señal de respuesta inmune puede ser una que promueva o inhiba la síntesis de citoquinas.

La señal de respuesta inmune puede ser una que promueva o inhiba la secreción de citoquinas.

La señal de respuesta inmune puede ser una señal que ayude al crecimiento o diferenciación de otras células inmunes.

5 La señal de respuesta inmune puede ser una señal que regula la actividad de otras células inmunes.

La señal de respuesta inmune puede ser una señal que atrae a otras células inmunes a una posición donde se produce la señal.

En una realización, el receptor puede ser un receptor de células T (TCR).

10 En una realización, la célula puede ser una que esté modificada de tal manera que pueda incluir un gen del receptor de células T (TCR) particular (por ejemplo gen TRAC o TRBC). En otra realización, el TCR puede ser uno que tenga especificidad de unión para el antígeno asociado al tumor (por ejemplo antígeno de melanoma reconocido por células T 1 (MART1), antígeno3 asociado al melanoma (MAGEA3), NY-ESO1, NYESO1, antígeno carcinoembrionario (CEA), GP100, etc.).

En una realización, el receptor puede ser un receptor tipo Toll (TLR).

15 El receptor puede ser CD4 y CD8, que son correceptores involucrados en la activación de células T restringida por MHC.

El receptor puede ser CTLA-4 (CD152).

El receptor puede ser CD28.

El receptor puede ser CD137 y 4-1BB, que son receptores que amplifican la respuesta de las células T.

20 El receptor puede ser CD3ζ, que es un elemento de transducción de señales de los receptores de antígenos de las células T.

El receptor puede ser un receptor de antígeno químérico (CAR).

En una realización de la presente invención, el receptor puede ser un receptor artificial manipulado artificialmente.

25 El término "receptor artificial" se refiere a una entidad funcional preparada artificialmente, no a un receptor de tipo salvaje, y que tiene la capacidad específica de reconocer antígenos y realiza una función específica.

Un receptor artificial de este tipo puede producir señales de respuesta inmune con un reconocimiento mejorado o potenciado de antígenos específicos y, por lo tanto, puede contribuir a la mejora de las respuestas inmunes.

El receptor artificial puede tener las siguientes constituciones, a modo de ejemplo:

30 (i) Parte de reconocimiento de antígeno

Un receptor artificial incluye una parte de reconocimiento de antígeno.

El término "parte de reconocimiento de antígeno", que es una parte del receptor artificial, se refiere a una región que reconoce un antígeno.

35 La parte de reconocimiento de antígenos puede ser una que tenga un reconocimiento mejorado de antígenos específicos en comparación con los receptores de tipo salvaje. En particular, el antígeno específico puede ser un antígeno de una célula cancerosa. Además, el antígeno específico puede ser un antígeno de células comunes del cuerpo.

La parte de reconocimiento de antígeno puede tener una afinidad de unión por los antígenos.

40 La parte de reconocimiento de antígeno puede generar una señal mientras se une al antígeno. La señal puede ser una señal eléctrica. La señal puede ser una señal química.

La parte de reconocimiento de antígeno puede incluir una secuencia señal.

La secuencia de señales se refiere a una secuencia peptídica que permite que una proteína llegue a un sitio específico durante el proceso de síntesis de proteínas.

45 La secuencia de señales puede estar ubicada cerca del terminal N de la parte de reconocimiento de antígeno. En particular, la distancia desde el terminal N puede ser de aproximadamente 100 aminoácidos. La secuencia

de señales puede estar ubicada cerca del terminal C de la parte de reconocimiento de antígeno. En particular, la distancia desde el terminal C puede ser de aproximadamente 100 aminoácidos.

La parte de reconocimiento de antígeno puede tener una relación funcional orgánica con una primera parte generadora de señales.

- 5 La parte de reconocimiento de antígeno puede ser homóloga a un dominio de unión a antígeno (Fab) de un anticuerpo.

La parte de reconocimiento de antígeno puede ser un fragmento variable de cadena sencilla (scFv).

La parte de reconocimiento de antígeno puede reconocer antígenos por sí misma o formando una estructura de reconocimiento de antígeno.

- 10 La estructura de reconocimiento de antígeno puede reconocer antígenos estableciendo una estructura específica, y las unidades monoméricas que constituyen la estructura específica y la unión de las unidades monoméricas pueden ser fácilmente entendidas por aquellos con conocimientos ordinarios en la materia. Además, la estructura de reconocimiento de antígeno puede consistir en uno o dos o más unidades monoméricas.

- 15 La estructura de reconocimiento de antígeno puede ser una estructura en la que las unidades monoméricas están conectadas en serie o puede ser una estructura en la que las unidades monoméricas están conectadas en paralelo.

- 20 La estructura conectada en serie se refiere a una estructura en la que dos o más unidades monoméricas están conectadas continuamente en una dirección, mientras que la estructura conectada en paralelo se refiere a una estructura en la que cada una de dos o más unidades monoméricas está conectada simultáneamente en el extremo distal de una unidad monomérica, por ejemplo, en diferentes direcciones.

Por ejemplo, la unidad monomérica puede ser un material inorgánico.

La unidad monomérica puede ser un ligando bioquímico.

- 25 La unidad monomérica puede ser homóloga a una parte de reconocimiento de antígeno de un receptor de tipo salvaje.

La unidad monomérica puede ser homóloga a una proteína de anticuerpo.

La unidad monomérica puede ser una cadena pesada de una inmunoglobulina o puede ser homóloga a la misma.

La unidad monomérica puede ser una cadena ligera de una inmunoglobulina o puede ser homóloga a la misma.

- 30 La unidad monomérica puede incluir una secuencia de señal.

Mientras tanto, la unidad monomérica puede estar unida mediante un enlace químico o puede estar unida a través de una parte de combinación específica.

- 35 El término "parte de combinación de la unidad de reconocimiento de antígeno" es una región en la que las unidades de reconocimiento de antígeno están conectadas entre sí, y puede ser una constitución opcional que está presente cuando está presente una estructura de reconocimiento de antígeno que consiste en dos o más unidades de reconocimiento de antígeno.

La parte de combinación de la unidad de reconocimiento de antígeno puede ser un péptido. En particular, la parte que se combina puede tener altas proporciones de serina y treonina.

La parte de combinación de la unidad de reconocimiento de antígeno puede ser un enlace químico.

- 40 La parte de combinación de la unidad de reconocimiento de antígeno puede ayudar en la expresión de la estructura tridimensional de la unidad de reconocimiento de antígeno al tener una longitud específica.

La parte de combinación de la unidad de reconocimiento de antígeno puede ayudar a la función de la estructura de reconocimiento de antígeno al tener una relación posicional específica entre las unidades de reconocimiento de antígeno.

- 45 (ii) Cuerpo receptor

El receptor artificial incluye un cuerpo receptor.

El término "cuerpo receptor" es una región donde se media la conexión entre la parte de reconocimiento de

antígeno y la parte generadora de señal, y la parte de reconocimiento de antígeno y la parte generadora de señal pueden estar conectadas físicamente.

La función del cuerpo receptor puede ser entregar la señal producida en la parte de reconocimiento de antígeno o en la parte generadora de señal.

5 La estructura del cuerpo receptor puede tener la función de parte generadora de señales al mismo tiempo dependiendo de los casos.

La función del cuerpo receptor puede ser permitir que el receptor artificial se inmovilice en las células inmunes.

El cuerpo del receptor puede incluir una estructura helicoidal de aminoácidos.

10 La estructura del cuerpo del receptor puede incluir una parte que sea homóloga a una parte de la proteína receptora común presente en el cuerpo. La homología puede estar en un rango del 50% al 100%.

La estructura del cuerpo del receptor puede incluir una parte homóloga a las proteínas de las células inmunes. La homología puede estar en un rango de 50% a 100%.

Por ejemplo, el cuerpo del receptor puede ser un dominio transmembrana CD8.

15 El cuerpo del receptor puede ser un dominio transmembrana CD28. En particular, cuando una segunda parte generadora de señal es CD28, CD28 puede realizar las funciones de la segunda parte generadora de señal y del cuerpo receptor.

(iii) Parte generadora de señales

El receptor artificial puede incluir una parte generadora de señales.

20 El término "primera parte generadora de señal", que es una parte del receptor artificial, se refiere a una parte que produce una señal de respuesta inmune.

El término "segunda parte generadora de señal", que es una parte del receptor artificial, se refiere a una parte que produce una señal de respuesta inmune al interactuar con la primera parte generadora de señal o de forma independiente.

25 El receptor artificial puede incluir la primera parte generadora de señales y/o la segunda parte generadora de señales.

El receptor artificial puede incluir dos o más de la primera y/o segunda parte generadora de señales, respectivamente.

La primera y/o segunda parte generadora de señales puede incluir un motivo de secuencia específico.

30 El motivo de secuencia puede ser homólogo a los motivos de las proteínas de la agrupación de designación (CD).

En particular, las proteínas CD pueden ser CD3, CD247 y CD79.

El motivo de secuencia puede ser una secuencia de aminoácidos de YxxL/I.

El motivo de secuencia puede ser múltiple en la primera y/o segunda parte generadora de señal.

35 En particular, un primer motivo de secuencia puede estar ubicado a una distancia de 1 a 200 aminoácidos desde la posición de inicio de la primera parte generadora de señal. Un segundo motivo de secuencia puede estar ubicado a una distancia de 1 a 200 aminoácidos desde la posición de inicio de la segunda parte generadora de señal.

Además, la distancia entre cada motivo de secuencia puede ser de 1 a 15 aminoácidos.

En particular, la distancia preferida entre cada motivo de secuencia es de 6 a 8 aminoácidos.

40 Por ejemplo, la primera y/o segunda parte generadora de señal puede ser CD3  $\zeta$ .

La primera y/o segunda parte generadora de señal puede ser Fc $\epsilon$ Rly.

La primera y/o segunda parte generadora de señales pueden ser aquellas que producen una respuesta inmune sólo cuando se cumple una condición específica.

La condición específica puede ser que la parte de reconocimiento de antígenos reconozca antígenos.

- La condición específica puede ser que la parte de reconocimiento de antígeno forme una unión con un antígeno.
- La condición específica puede ser que la señal generada se entregue cuando la parte de reconocimiento de antígeno forme una unión con el antígeno.
- 5 La condición específica puede ser que la parte de reconocimiento de antígeno reconozca un antígeno o que la parte de reconocimiento de antígeno se separe de un antígeno mientras se une con el antígeno.
- La señal de respuesta inmune puede ser una señal asociada con el crecimiento y la diferenciación de las células inmunes.
- La señal de respuesta inmune puede ser una señal asociada con la muerte de células inmunes.
- 10 La señal de respuesta inmune puede ser una señal asociada con la actividad de las células inmunes.
- La señal de respuesta inmune puede ser una señal asociada con la ayuda de las células inmunes.
- La señal de respuesta inmune puede activarse para que sea específica para la señal producida en la parte de reconocimiento de antígeno.
- La señal de respuesta inmune puede ser una señal que regula la expresión de un gen de interés.
- La señal de respuesta inmune puede ser una señal que suprime las respuestas inmunes.
- 15 20 En una realización, la parte generadora de señales puede incluir una parte generadora de señales adicional.
- El término "parte generadora de señal adicional", que es una parte de un receptor artificial, se refiere a una región que produce una señal de respuesta inmunitaria adicional con respecto a la señal de respuesta inmunitaria producida por la primera y/o segunda partes generadoras de señal.
- En adelante, la parte generadora de señal adicional se denominará  $n^{\text{ésima}}$  parte generadora de señal ( $n \neq 1$ ) según el orden.
- El receptor artificial puede incluir una parte generadora de señales adicional, además de la primera parte generadora de señales.
- 25 Se pueden incluir dos o más partes generadoras de señales adicionales en un receptor artificial.
- La parte generadora de señales adicional puede ser una estructura en la que se pueden producir señales de respuesta inmune de 4-1BB, CD27, CD28, ICOS y OX40, u otras señales de los mismos.
- Las condiciones en las que la parte generadora de señal adicional produce una señal de respuesta inmunitaria y las características de las señales de respuesta inmunitaria producidas por la misma incluyen las detalles que corresponden a las señales de respuesta inmune de la primera y/o segunda partes generadoras de señales.
- 30 La señal de respuesta inmune puede ser una que promueva la síntesis de citoquinas. La señal de respuesta inmune puede ser una que promueva o inhiba la secreción de citoquinas. En particular, la citoquina puede ser, preferiblemente, IL-2, TNF $\alpha$  o IFN- $\gamma$ .
- La señal de respuesta inmune puede ser una señal que ayude al crecimiento o diferenciación de otras células inmunes.
- La señal de respuesta inmune puede ser una señal que regula la actividad de otras células inmunes.
- 35 La señal de respuesta inmune puede ser una señal que atrae a otras células inmunes a un lugar donde se produce la señal.
- La presente divulgación incluye todas las posibles relaciones de unión de los receptores artificiales.
- En consecuencia, los aspectos de los receptores artificiales de la presente divulgación no se limitan a los descritos en este documento.
- 40 45 El receptor artificial puede consistir en una parte de reconocimiento de antígeno, un cuerpo receptor y una primera parte generadora de señales. El cuerpo receptor puede incluirse opcionalmente.
- El receptor artificial puede consistir en una parte de reconocimiento de antígeno, un cuerpo receptor, una segunda parte generadora de señales y una primera parte generadora de señales. El cuerpo receptor puede incluirse opcionalmente. En particular, se pueden cambiar las posiciones de la primera parte generadora de señal y de la segunda parte generadora de señal.

El receptor artificial puede consistir en una parte de reconocimiento de antígeno-un cuerpo receptor-una segunda parte generadora de señales-una tercera parte generadora de señales-una primera parte generadora de señales. El cuerpo receptor puede incluirse opcionalmente. En particular, se pueden cambiar las posiciones desde la primera parte generadora de señal a la tercera parte generadora de señal.

- 5 En el receptor artificial, el número de partes generadoras de señales no está limitado a 1 a 3, sino que puede incluirse más de tres.

Además de la realización anterior, el receptor artificial puede tener la estructura de una parte de reconocimiento de antígeno-parte de generación de señal-un cuerpo receptor. La estructura puede ser ventajosa en el momento en que se debe producir una señal de respuesta inmune que actúe desde una célula que tiene el receptor artificial.

El receptor artificial puede funcionar de una manera correspondiente al receptor de tipo salvaje.

El receptor artificial puede funcionar para formar una relación posicional específica formando una unión con un antígeno específico.

15 El receptor artificial puede funcionar para reconocer un antígeno y producir una señal de respuesta inmune que promueva una respuesta inmune contra el antígeno específico.

El receptor artificial puede funcionar para reconocer los antígenos de una célula general del cuerpo e inhibir una respuesta inmune contra la célula del cuerpo.

(iv) Secuencia de señales

En una realización, el receptor artificial puede incluir opcionalmente una secuencia de señales.

20 Cuando el receptor artificial incluye una secuencia de señales de una proteína específica, esto puede ayudar a que el receptor artificial se ubique fácilmente en la membrana de una célula inmune. Preferiblemente, cuando el receptor artificial incluye una secuencia de señales de una proteína transmembrana, esto puede ayudar al receptor artificial a penetrar a través de la membrana de la célula inmune para ubicarse en la membrana externa de la célula inmune.

- 25 El receptor artificial puede incluir una o más secuencia de señales.

La secuencia de señales puede incluir muchos aminoácidos con carga positiva.

La secuencia de señales puede incluir un aminoácido cargado positivamente en una ubicación cercana al terminal N o C.

La secuencia de señales puede ser una secuencia de señales de la proteína transmembrana.

30 La secuencia de señales puede ser una secuencia de señales de una proteína ubicada en la membrana externa de una célula inmune.

La secuencia de señales puede estar incluida en la estructura que posee el receptor artificial, es decir, una parte de reconocimiento de antígeno, un cuerpo receptor, una primera parte generadora de señal y una parte generadora de señal adicional.

35 En particular, la secuencia de señales puede estar ubicada en una posición cercana al terminal N o C de cada estructura.

En particular, la distancia de la secuencia de señales desde el terminal N o C puede ser de aproximadamente 100 aminoácidos.

40 En una realización, la célula puede ser una que esté modificada de modo que se incluya un gen del receptor de células T (TCR) específico.

En otra realización, el TCR puede ser uno que tenga especificidad de unión para el antígeno asociado al tumor (por ejemplo antígeno de melanoma reconocido por células T 1 (MART1), antígeno3 asociado al melanoma (MAGEA3), NY-ESO1, antígeno carcinoembrionario (CEA), NY-ES-O1 (GP100, etc.), melanoma).

45 En todavía otra realización, la célula puede ser una que esté modificada de modo que se incluya un receptor de antígeno químérico específico (CAR). En una realización, el CAR puede ser uno que tenga especificidad de unión para el antígeno asociado al tumor (por ejemplo CD19, CD20, anhidrasa carbónica IX (CAIX), CD171, CEA, ERBB2, GD2, receptor de alfa-folato, antígeno Lewis Y, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) o glicoproteína asociada a tumores 72 (TAG72)).

En todavía otra realización, la célula puede ser, por ejemplo, una que esté modificada de modo que la célula

pueda unirse a uno o más de los siguientes antígenos tumorales mediante TCR o CAR.

Los antígenos tumorales pueden incluir, pero no se limita, AD034, AKT1, BRAP, CAGE, CDX2, CLP, CT-7, CT8/HOM-TES-85, cTAGE-1, EGFR, EGFRvIII, Fibulina- 1, HAGE, HCA587/MAGE-C2, hCAP-G, HCE661, HER2/neu, HLA-Cw, HOM-HD-21/Galectina9, HOM-MEEL-40/SSX2, HOM-RCC-3.1.3/CAXII, HOXA7, HOXB6, Hu, HUB 1, KM-HN-3, KM-KN- 1, KOC1, KOC2, KOC3, KOC3, LAGE-1, MAGE-1, MAGE-4a, MPP1 1, MSLN, NNP-1, NY-BR-1, NY-BR-62 , NY-BR-85, NY-CO-37, NY-CO-38, NY-ESO-1, NY-ESO-5, NY-LU-12, NY-REN-10, NY-REN-19/LKB/STK1 1, NY-REN-21, NY-REN-26/BCR, NY-REN-3/NY-CO-38, NY-REN-33/SNC6, NY-REN-43, NY-REN-65, NY-REN-9, NY-SAR-35, OGFr, PSMA, PSCA PLU-1, Rab38, RBPJkappa, RHAMM, SCP1, SCP-1, SSX3, SSX4, SSX5, TOP2A, TOP2B y tirosinasa.

10 - Elemento regulador de la unión del antígeno

Las células de la presente invención pueden incluir además un "elemento regulador de la unión al antígeno".

El "elemento regulador de la unión al antígeno", que es un elemento que permite la unión entre un receptor y un antígeno, puede ser un gen o una proteína que realiza dicha función.

15 Una respuesta inmune puede regularse utilizando dicho elemento regulador de la unión al antígeno. Por ejemplo, cuando el tratamiento se realiza añadiendo células que han sido sometidas a manipulación externa al cuerpo vivo, y cuando HVGD (HVGD huésped (enfermedad del injerto; enfermedad de injerto contra huésped y HuéspedInjerto) en la que se activa la respuesta inmune con respecto a las células que han sufrido una manipulación externa y, por lo tanto, se elimina la eficacia del tratamiento, el problema se puede resolver suprimiendo la capacidad de unión al antígeno del receptor de la célula inmune.

20 El elemento regulador de la unión al antígeno puede ser una proteína o un gen asociado con la estructura de un receptor.

El elemento regulador de la unión al antígeno puede ser una proteína o un gen homólogo a la estructura del receptor.

Por ejemplo, el elemento regulador de la unión del antígeno puede ser dCK.

25 El elemento regulador de la unión al antígeno puede ser CD52.

El elemento regulador de la unión al antígeno puede ser B2M.

El elemento regulador de la unión del antígeno puede ser una proteína o un gen asociado con las estructuras que reconoce un receptor.

Por ejemplo, el elemento regulador de la unión del antígeno puede ser una proteína MHC.

30 En una realización, la presente divulgación se refiere a una célula inmune que incluye genes inmunorreguladores manipulados artificialmente o las proteínas expresadas por estos genes.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a una célula inmune que incluye genes inmunorreguladores manipulados artificialmente o las proteínas expresadas por estos genes; y un receptor.

35 En todavía otra realización, la presente invención se refiere a una célula inmune que incluye genes inmunorreguladores manipulados artificialmente o las proteínas expresadas por estos genes; un receptor; y un elemento regulador de unión a antígeno.

El ejemplo representativo de la célula divulgada en la presente memoria descriptiva es una célula inmune.

40 La célula inmune puede ser al menos una seleccionada del grupo que consiste en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (células NK), monocitos, células T, células CAR-T, macrófagos, células T asesinas naturales (células NKT), etc., y preferiblemente, células T, células CAR-T, células asesinas naturales (células NK) o células T asesinas naturales (células NKT).

Los factores que limitan la eficacia de las células inmunes manipuladas genéticamente (por ejemplo Las células T, células NK y células NKT) incluyen:

45 (1) proliferación de células inmunes (por ejemplo propagación limitada de células inmunes después de la transferencia adoptiva);

(2) supervivencia de las células inmunes (por ejemplo inducción de la apoptosis de las células inmunes por factores del entorno tumoral); y

(3) función de las células inmunes (por ejemplo inhibición de la función de las células inmunes citotóxicas por

factores inhibidores secretados por las células inmunes del huésped y las células cancerosas).

Para este fin, los factores limitantes anteriormente mencionados se regulan a través de las células inmunes, en las que uno o más genes expresados en las células inmunes (por ejemplo, uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en DGKA y DGKZ) se inactivan.

5 En un ejemplo, uno o más genes expresados en células inmunes (por ejemplo, uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en los genes de DGKA y DGKZ) pueden ser seleccionados y manipulados para ser inactivados, desactivados o introducidos independientemente, de modo de afectar la proliferación, supervivencia y función de una o más células inmunes.

10 En un ejemplo, en una célula inmune, se pueden seleccionar y manipular dos genes que consisten en genes DGKA y DGKZ para que se inactiven, desactiven o introduzcan simultáneamente. En una realización, se eliminaron simultáneamente DGKA y DGKZ.

15 En un ejemplo, uno o más genes que expresan células inmunes (por ejemplo, uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en genes DGKA y DGKZ) pueden ser seleccionados y manipulados para ser inactivados, desactivados o introducidos independientemente, de modo que afectan la proliferación, supervivencia y función de una o más células inmunes, al seleccionar una región no codificante o una región codificante (por ejemplo región promotora, potenciador, 3'UTR y/o secuencia de señales de poliadenilación, o secuencia de transcripción (por ejemplo intrón o secuencia de exones)).

20 En un ejemplo, uno o más genes expresados en células inmunes (por ejemplo, uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en genes DGKA y DGKZ) pueden ser direccionados y manipulados para ser cada uno independientemente inactivado, desactivado o introducido, de modo que afecte la proliferación, supervivencia y función de una o más células inmunes, mediante la inducción de alteraciones que incluyen delección, sustitución, inserción o mutación en una o más regiones de las secuencias.

[Sistema inmunitario]

25 Además, se divulga un sistema inmunitario que forma un mecanismo de respuesta inmunológica en el que están involucrados el factor inmunorregulador manipulado artificialmente y/o las células que lo incluyen.

30 El "sistema inmunitario" que se divulga en este documento es un término que incluye todos los fenómenos que afectan respuestas inmunitarias *in vivo* por los cambios en la función del factor inmunorregulador manipulado (*es decir*, estar involucrado en mecanismos que exhiben nuevas eficacias inmunológicas), e incluye todos los materiales, composiciones, métodos y usos que están involucrados directa o indirectamente en dicho sistema inmunitario. Por ejemplo, incluye todos los genes, células inmunes y órganos/tejidos inmunes involucrados en la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa, la inmunidad celular, la inmunidad humoral, la inmunidad activa y la respuesta inmune pasiva.

Los elementos que constituyen dicho sistema inmunitario suelen denominarse colectivamente "factor del sistema inmunitario".

35 El sistema inmunitario divulgado en este documento incluye células inmunes manipuladas.

40 La célula inmune manipulada significa una célula inmune que ha sido sometida a una manipulación artificial, no en un estado natural. Recientemente, se han estudiado activamente técnicas para mejorar la inmunidad mediante la extracción de células inmunes del cuerpo y la aplicación de manipulación artificial. Se ha demostrado que este tipo de células inmunes manipuladas constituyen un nuevo método terapéutico debido a su excelente eficacia inmunológica contra ciertas enfermedades. En particular, se han realizado activamente estudios sobre células inmunes manipuladas en relación con el tratamiento del cáncer.

La célula inmune manipulada puede ser una célula inmune funcionalmente manipulada o una célula inmune complementada con una estructura artificial.

Célula inmune funcionalmente manipulada

45 La "célula inmune funcionalmente manipulada" divulgada en este documento se refiere a una célula inmune, en la que el receptor de tipo salvaje o el factor inmunorregulador ha sido manipulado en la naturaleza.

50 En adelante, manipulación se refiere a todo tipo de manipulación, incluyendo la escisión, ligadura, eliminación, inserción y modificación de genes; o la eliminación, adición o modificación de proteínas, que aquellos con conocimientos normales en la técnica pueden utilizar para manipular proteínas y genes. En adelante, las células inmunes incluyen no solo las células inmunes diferenciadas sino también las células de prediferenciación (por ejemplo células madre).

Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser células inmunes en las que se manipulan receptores de tipo salvaje. En particular, el receptor de tipo salvaje puede ser TCR.

Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser aquellas en las que los receptores de tipo salvaje están ausentes o presentes en una tasa menor en la superficie.

Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser aquellas en las que los receptores de tipo salvaje están presentes en una mayor proporción en la superficie.

5 Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser aquellas en las que los receptores de tipo salvaje tienen una capacidad de reconocimiento mejorada para antígenos específicos.

Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser células inmunes en las que se manipulan factores inmunorreguladores.

10 Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser aquellas en las que se manipulan elementos reguladores de la actividad de las células inmunes.

En particular, las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser células inmunes en las que están inactivados uno o más seleccionados del grupo que consiste en SHP-1, PD-1, CTLA-4, CBLB, ILT-2, KIR2DL4 y PSGL-1.

15 Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser aquellas en las que se manipulan elementos reguladores del crecimiento de células inmunes.

En particular, las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser células inmunes en las que están inactivadas una o más seleccionados del grupo que consiste en DGK-alfa, DGK-zeta, Fas, EGR2, Egr3, PPP2R2D y A20. Preferiblemente, se inactivan una o más seleccionadas del grupo que consiste en DGK-alfa, DGK-zeta, EGR2, PPP2R2D y A20.

20 Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser aquellas en las que se manipulan elementos reguladores de la muerte de las células inmunes.

En particular, las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser células inmunes en las que están inactivadas una o más seleccionadas del grupo que consiste en Daxx, Bim, Bid, BAD, PD-1 y CTLA-4.

25 Además, las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser células inmunes en las que se insertan elementos que inducen la muerte de sí mismas.

Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser aquellas en las que se manipulan elementos reguladores del agotamiento de las células inmunes.

En particular, las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser células inmunes en las que están inactivadas una o más seleccionados del grupo que consiste en TET2, Wnt y Akt.

30 Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser aquellas en las que se manipulan elementos reguladores de la producción de citoquinas.

Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser aquellas en las que se manipulan elementos reguladores de la unión del antígeno.

35 En particular, las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser células inmunes en las que están inactivadas una o más seleccionadas del grupo que consiste en dCK, CD52, B2M y MHC.

Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser aquellas en las que se manipula un factor inmunorregulador diferente a los mencionados anteriormente.

40 Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden ser aquellas en las que se manipulan simultáneamente uno o más factores inmunorreguladores. En particular, se pueden manipular uno o más tipos de factores inmunorreguladores.

Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden tener nuevas eficacias inmunológicas al manipular receptores de tipo salvaje y factores inmunorreguladores.

45 En particular, cuando se manipula un factor inmunorregulador, esto no significa necesariamente que se deba exhibir un nuevo efecto inmunorregulador. La manipulación de un factor inmunorregulador puede provocar o inhibir una variedad de nuevas eficacias inmunológicas.

La nueva eficacia inmune puede ser aquella en la que se regule la capacidad de reconocer un antígeno específico.

La nueva eficacia inmune puede ser aquella en la que se mejore la capacidad de reconocer un antígeno específico.

En particular, el antígeno específico puede ser un antígeno de enfermedad, por ejemplo, un antígeno de células cancerosas.

La nueva eficacia inmune puede ser aquella en la que se deteriore la capacidad de reconocer un antígeno específico.

5 La nueva eficacia inmunológica puede ser aquella en la que se mejore la nueva eficacia inmunológica.

La nueva eficacia inmunológica puede ser aquella en la que se regule el crecimiento de las células inmunes. En particular, la eficacia inmune puede ser aquella en la que se promuevan o retrasan el crecimiento y la diferenciación.

10 La nueva eficacia inmunológica puede ser aquella en la que se regule la muerte de las células inmunes. En particular, la eficacia inmunológica puede ser prevenir la muerte de las células inmunes. Además, la eficacia inmunológica puede ser provocar que las células inmunes se maten a sí mismas cuando haya transcurrido el tiempo apropiado.

La nueva eficacia inmunológica puede ser aquella que alivie la pérdida de funciones de las células inmunes.

15 La nueva eficacia inmunológica puede ser aquella en la que se regule la secreción de citoquinas de las células inmunes. En particular, la eficacia inmune puede ser promover o inhibir la secreción de citoquinas.

La nueva eficacia inmunológica podría ser la de regular la capacidad de unión del antígeno de los receptores de tipo salvaje en una célula inmune. En particular, la eficacia inmunológica puede consistir en mejorar la especificidad de los receptores de tipo salvaje para antígenos específicos.

Célula inmune complementada con estructura artificial

20 El término "célula inmune complementada con estructura artificial" significa una en la que una estructura artificial se complementa en una célula inmune.

Por ejemplo, la célula inmune complementada con una estructura artificial puede ser una célula inmune en la que se complementa un receptor artificial.

25 El receptor artificial puede ser uno que tenga la capacidad de reconocer ciertos antígenos. En un ejemplo, la célula inmune complementada con estructura artificial puede ser una célula T CAR.

Además, el receptor artificial puede ser uno en el que se complementen receptores artificiales, que tienen la capacidad de reconocer cada uno de dos o más antígenos causados por una enfermedad específica. En particular, cada uno de los receptores artificiales puede ser uno que se exprese de manera dependiente del tiempo según las condiciones.

30 Por ejemplo, en el caso de una célula inmune manipulada para el tratamiento del cáncer, un primer receptor artificial puede producir una señal de respuesta inmune que inicie la expresión de un segundo gen de receptor artificial, y luego se puede expresar un segundo receptor artificial. El segundo receptor artificial puede producir una señal de respuesta inmune que induce una respuesta inmune contra las células cancerosas. En este caso, se puede mejorar la capacidad de la célula inmune manipulada para atacar las células cancerosas.

35 El receptor artificial puede ser uno que tenga la capacidad de reconocer la célula inmune manipulada.

El receptor artificial puede ser uno que tenga la capacidad de reconocer las células generales del cuerpo. En un ejemplo, la célula inmune complementada con estructura artificial puede ser una célula T iCAR.

El receptor artificial puede ser uno que tenga la capacidad de reconocer un tercer material. En particular, el tercer material puede tener capacidad de unión a antígenos de una enfermedad específica.

40 En particular, el tercer material puede ser capaz de unirse al receptor artificial y, simultáneamente, unirse a los antígenos de una enfermedad específica. Por ejemplo, el tercer material puede tener la capacidad de unirse simultáneamente al receptor artificial y al antígeno relacionado con la célula cancerosa.

En otro ejemplo, la célula inmune complementada con estructura artificial puede ser una célula inmune en la que se complementa una estructura artificial que tiene una función específica, además de los receptores artificiales.

En el caso en que se añade a una célula inmune una estructura artificial diferente de su estado nativo, la célula inmune complementada con la estructura artificial puede tener una nueva eficacia inmunitaria.

Por ejemplo, la nueva eficacia inmune puede ser aquella en la que una célula inmune se une a un antígeno específico de tal manera que la célula inmune está en una relación posicional específica con el antígeno.

La nueva eficacia inmune puede ser una función para reconocer y promover una respuesta inmune contra el antígeno específico.

La nueva eficacia inmune puede ser una función para inhibir una respuesta inmune excesiva.

5 La nueva eficacia inmune puede ser una función para regular la vía de transducción de señales de una respuesta inmune.

La nueva eficacia inmunológica puede ser una función mediante la cual una célula inmune forma una unión con un tercer material y confirma una enfermedad específica. En particular, el tercer material puede ser un biomarcador de una enfermedad específica.

10 Un ejemplo preferido del antígeno específico mencionado anteriormente puede ser un antígeno de células cancerosas.

Los antígenos de células cancerosas pueden incluir, pero no se limitan a, AD034, AKT1, BRAP, CAGE, CDX2, CLP, CT-7, CT8/HOM-TES-85, cTAGE-1, EGFR, EGFRvIII, Fibulin- 1, HAGE, HCA587/MAGE-C2, hCAP-G, HCE661, HER2/neu, HLA-Cw, HOM-HD-21/Galectina9, HOM-MEEL-40/SSX2, HOM-RCC-3.1.3/CAXII, HOXA7, HOXB6, Hu, HUB 1, KM-HN-3, KM-KN- 1, KOC1, KOC2, KOC3, KOC3, LAGE-1, MAGE-1, MAGE-4a, 15 MPP1 1, MSLN, NNP-1, NY-BR-1, NY-BR-62, NY-BR-85, NY-CO-37, NY-CO-38, NY-ESO-1, NY-ESO-5, NY-LU-12, NY-REN-10, NY-REN-19/LKB/STK1 1, NY-REN-21, NY-REN-26/BCR, NY-REN-3/ NY-CO-38, NY-REN-33/SNC6, NY-REN-43, NY-REN-65, NY -REN-9, NY-SAR-35, OGFr, PLU-1, PSMA, PSCA, Rab38, RBPJkappa, RHAMM, SCP1, SCP-1, SSX3, SSX4, SSX5, TOP2A, TOP2B, ROR-1 y tirosinasa.

#### Célula inmune híbrida manipulada

20 El término "célula inmune híbrida manipulada" se refiere a una célula inmune en la que se logran tanto la manipulación de un factor inmunorregulador como la complementación de una estructura artificial.

En una célula inmune manipulada híbrida, la manipulación de un factor inmunorregulador es la misma que la descrita anteriormente en la célula inmune funcionalmente manipulada. Además, la complementación de una estructura artificial es la misma que la descrita anteriormente en la célula inmune complementada con estructura artificial.

25 Cuando la manipulación de la función de una célula inmune es una manipulación genética, la ubicación donde se complementa la estructura artificial puede ser la misma que la posición del gen donde ocurrió la manipulación de la función.

30 La nueva eficacia inmunológica de una célula inmune manipulada híbrida puede ser una que incluya las nuevas eficacias inmunológicas de la célula inmune funcionalmente manipulada y la célula inmune complementada con estructura artificial, y exhiba una eficacia inmunológica más mejorada mediante la interacción entre estas células.

35 La eficacia inmunológica mejorada puede deberse a que se mejora la especificidad y la respuesta inmunológica para una enfermedad particular. En un ejemplo preferido, una célula inmune manipulada híbrida puede ser una que tenga una mejora tanto en la especificidad del cáncer como en la respuesta inmune.

El sistema inmunitario divulgado en este documento incluye una respuesta inmunológica deseada y un mecanismo de tratamiento de enfermedades a través de ella, que se logra mediante un factor inmunorregulador manipulado y/o una célula inmunológica manipulada.

40 En una realización, el factor inmunorregulador y/o la célula inmune manipulada, en la que el gen que inhibe la proliferación de células inmunes está inactivado, pueden usarse para afectar la proliferación de células inmunes.

En una realización, el factor inmunorregulador y/o la célula inmune manipulada, en la que el gen que media la muerte de las células inmunes está inactivado, pueden usarse para afectar la supervivencia de las células inmunes.

45 En una realización, el factor inmunorregulador y/o la célula inmune manipulada, en la que el gen que codifica un factor de transducción de señales para suprimir e inhibir la inmunidad está inactivado, pueden usarse para afectar la función de las células inmunes.

Los métodos y composiciones descritos en este documento se pueden utilizar de forma individual o en combinación para influir en uno o más de los factores que limitan la eficacia de una célula inmune manipulada genéticamente como tratamiento terapéutico para una enfermedad específica (por ejemplo proliferación de células inmunes, supervivencia de células inmunes, función de células inmunes o cualquier combinación de las mismas).

Mientras tanto, el término "terapia inmunorreguladora" se refiere al tratamiento de una enfermedad regulando la respuesta inmune en el cuerpo utilizando un factor inmunorregulador manipulado y/o una célula inmune manipulada.

Por ejemplo, las células inmunes (por ejemplo células dendríticas, células asesinas naturales, células T, etc.) 5 pueden usarse para tratar enfermedades activando o inactivando la respuesta inmune en el cuerpo.

Una terapia inmunorreguladora de este tipo se ha desarrollado principalmente como indicación para la terapia del cáncer, y la terapia inmunorreguladora es un mecanismo de tratamiento diferenciado de la terapia quirúrgica, los agentes anticancerígenos o la radioterapia utilizados para el tratamiento del cáncer existente, porque la función inmunológica se activa administrando las células inmunes directamente al paciente y 10 provocando así un efecto terapéutico.

En una realización de la terapia inmunorreguladora, de acuerdo con las características de las células inmunes utilizadas y los genes introducidos en las células en el proceso de fabricación, la terapia inmunorreguladora incluye agentes terapéuticos de células inmunorreguladoras dendríticas, células asesinas activadas por 15 linfocinas (LAK), linfocitos T infiltrantes de tumores (TIL), células T modificadas por el receptor de células T (TCR-T), células T modificadas por el receptor de antígeno químérico (CAR-T), etc.

[Manipulación o modificación genética]

La manipulación o modificación de materiales involucrados en el factor inmunorregulador, la célula inmune y el sistema inmunitario descritos en la presente divulgación puede lograrse preferiblemente mediante manipulación genética.

20 En un aspecto, la composición y el método para la manipulación genética pueden proporcionarse apuntando a la totalidad o parte de las regiones codificantes y no codificantes de los genes inmunorreguladores que afectan la proliferación, supervivencia y/o función de las células inmunes.

En una realización, la composición y el método, con el fin de formar un sistema inmunitario deseado, pueden 25 manipular o modificar uno o más genes reguladores inmunológicos que están involucrados en el sistema inmunitario. Esto se consigue mediante la modificación de un ácido nucleico que constituye el gen. Como resultado de la manipulación, se incluyen todos los elementos en forma de desactivación, inactivación e inserción.

En una realización, una región promotora o secuencia de transcripción (por ejemplo secuencia de intrones, 30 secuencia de exones) pueden ser el objetivo. La secuencia de codificación (por ejemplo una región codificante y una región codificante inicial) pueden ser objeto de alteración e inactivación de la expresión.

En una realización, la alteración de un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, sustitución, delección y/o inserción de nucleótidos en el rango de 1 pb a 30 pb, 1 pb a 27 pb, 1 pb a 25 pb, 1 pb a 23 pb, 1 pb a 20 pb, 1 pb a 15 pb, 1 pb a 10 pb, 1 pb a 5 pb, 1 pb a 3 pb o 1 pb.

35 En una realización, para la inactivación de uno o más genes, o la eliminación de una o más expresiones, o para la inactivación de uno o más de un alelo o dos alelos entre el gen inmunorregulador, los genes pueden ser seleccionados de tal manera que la delección o mutación puede incluirse en uno o más de los genes reguladores inmunológicos.

En una realización, la inactivación de genes se puede utilizar para reducir la expresión de alelos o transcripciones no deseados.

40 En una realización, el direccionamiento del promotor, potenciador, intrón, 3'UTR y/o secuencia no codificante de la señal de poliadenilación se puede utilizar para alterar el gen inmunorregulador que afecta la función de las células inmunes.

En una realización, la regulación de la actividad (por ejemplo activación, inactivación) del gen inmunorregulador 45 puede ser inducida por la alteración del ácido nucleico del gen.

En una realización, la alteración del ácido nucleico del gen puede ser para inactivar el gen direccionado mediante la escisión de las cadenas simples o dobles en la región específica del gen direccionado a través de un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, es decir, catalizando las roturas de las cadenas de ácido nucleico.

En una realización, las roturas de las cadenas de ácido nucleico pueden repararse mediante mecanismos (por 50 ejemplo recombinación homóloga, unión de extremos no homólogos (NHEJ), etc.).

En este caso, cuando ocurre el mecanismo NHEJ, se induce una alteración de una secuencia de ADN en el sitio de escisión, pudiendo inactivar el gen mediante la misma. La reparación a través de NHEJ puede causar sustituciones, inserciones o delecciones de fragmentos cortos de genes y puede utilizarse para inducir la

inactivación de genes correspondientes.

En otro aspecto, se divulga en el presente documento la posición para la manipulación genética antes mencionada.

En una realización, cuando la alteración se logra mediante la alteración mediada por NHEJ, la posición para la manipulación genética se refiere a una posición en el gen que da como resultado la reducción o eliminación de la expresión del producto del gen inmunorregulador.

Por ejemplo, la posición en el gen puede ser en la región de codificación inicial, en la región de codificación 50% corriente arriba, en la secuencia promotora, en la secuencia de intrones específica y en la secuencia de exones específica.

10 La posición puede estar en una posición específica en el gen que afecta la proliferación, supervivencia y/o función de una célula inmune.

La posición puede estar en una posición específica en el gen que afecta la función de las proteínas involucradas en la respuesta inmune.

15 La posición puede estar en una posición específica en el gen que afecta la capacidad de reconocimiento de un antígeno específico.

La posición puede estar en una posición específica en el gen que afecta la función de regular la secreción de citoquinas en una célula inmune.

La posición puede estar en una posición específica en el gen que afecta la función de regular la capacidad de unión del antígeno de los receptores en una célula inmune.

20 La manipulación genética puede realizarse considerando el proceso regulador de la expresión genética.

En una realización, la manipulación genética se puede realizar en etapas de regulación transcripcional, regulación del procesamiento de ARN, regulación del transporte de ARN, regulación de la degradación de ARN, regulación de la traducción o regulación de la modificación de proteínas, seleccionando un método de manipulación adecuado para cada paso.

25 En una realización, la expresión de información genética puede controlarse previniendo o deteriorando la estabilidad del ARNm mediante ARN pequeños (ARNs) utilizando interferencia de ARN (ARNi) o silenciamiento de ARN y, en algunos casos, destruyéndolo para prevenir el suministro de la información de la síntesis de proteínas durante el paso intermedio.

30 En una realización, se puede utilizar una enzima de tipo salvaje o variante capaz de catalizar la hidrólisis (escisión) de moléculas de ADN o ARN, preferiblemente enlaces entre ácidos nucleicos en una molécula de ADN. Se puede utilizar un complejo de proteína editora- ácido nucleico guía.

Por ejemplo, la expresión de información genética puede controlarse manipulando genes utilizando uno o más seleccionados del grupo que consiste en meganucleasa, nucleasa de dedo de zinc, CRISPR/Cas9 (proteína Cas9), CRISPR-Cpf1 (proteína Cpf1) y nucleasa TALE.

35 En un ejemplo preferido, sin limitación, la manipulación genética puede estar mediada por unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR) utilizando un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía (por ejemplo Sistema CRISPR/Cas).

En una realización, los ejemplos del gen inmunorregulador que afectan la proliferación, supervivencia y/o función de las células inmunes pueden incluir el gen DGKA o el gen DGKZ.

40 Las regiones de secuencia diana de los genes anteriores (*es decir*, los sitios en los que puede ocurrir la modificación del ácido nucleico) se resumen en la Tabla 1 a continuación (la parte de la secuencia diana que se muestra en la Tabla 1 se divulga como que contiene la secuencia PAM 5'-NGG-3' en el extremo 3').

La secuencia diana puede apuntar a dos o más tipos simultáneamente.

El gen puede afectar a dos o más tipos simultáneamente.

45 Se pueden atacar simultáneamente dos o más secuencias diana en un gen homólogo o dos o más secuencias diana en un gen heterólogo.

En una realización de ejemplo, se pueden direccionar DGKA o DGKZ, respectivamente.

En una realización de ejemplo, DGKA y DGKZ pueden ser direccionadas simultáneamente.

[Tabla 1] Secuencia diana

Gen diana	ADN Secuencia Diana	ID SEQ NO
A20	CTTGTGGCGCTGAAAACGAACGG	ID SEQ NO 1
	ATGCCACTTCTCAGTACATGTGG	ID SEQ NO 2
	GCCACTTCTCAGTACATGTGGGG	ID SEQ NO 3
	GCCCCACATGTACTGAGAAGTGG	ID SEQ NO 4
	TCAGTACATGTGGGGCGTTCAAGG	ID SEQ NO 5
	GGGCGTTCAAGGACACAGACTTGG	ID SEQ NO 6
	CACAGACTTGGTACTGAGGAAGG	ID SEQ NO 7
	GGCGCTGTTCAAGCACGCTCAAGG	ID SEQ NO 8
	CACGCAACTTAAATTCCGCTGG	ID SEQ NO 9
	CGGGGCTTGCTATGATACTCGG	ID SEQ NO 10
	GGCTTCCACAGACACACCCATGG	ID SEQ NO 11
	TGAAGTCCACTTCGGGCCATGGG	ID SEQ NO 12
Gen diana	ADN Secuencia Diana	ID SEQ NO
DGK $\alpha$	CTGTACGACACGGACAGAAATGG	ID SEQ NO 13
	TGTACGACACGGACAGAAATGGG	ID SEQ NO 14
	CACGGACAGAAATGGGATCCTGG	ID SEQ NO 15
	GATGCGAGTGGCTGAATACCTGG	ID SEQ NO 16
	GAGTGGCTGAATACCTGGATTGG	ID SEQ NO 17
	AGTGGCTGAATACCTGGATTGGG	ID SEQ NO 18
	ATTGGGATGTGTCTGAGCTGAGG	ID SEQ NO 19
	ATGAAAGAGATTGACTATGATGG	ID SEQ NO 20
	CTCTGTCTCTCAAGCTGAGTGGG	ID SEQ NO 21
	TCTCTCAAGCTGAGTGGGTCCGG	ID SEQ NO 22
	CTCTCAAGCTGAGTGGGTCCGGG	ID SEQ NO 23
	CAAGCTGAGTGGGTCCGGGCTGG	ID SEQ NO 24
Gen diana	ADN Secuencia Diana	ID SEQ NO
	TTGACATGACTGGAGAGAGAGAGG	ID SEQ NO 25
	GACTGGAGAGAGAGAGAGTCGTTGG	ID SEQ NO 26
	GAGACGGGAGCAAAGCTGCTGGG	ID SEQ NO 27

EGR2	AGAGACGGGAGCAAAGCTGCTGG	SEQ ID NO 28
	TGGTTCTAGGTGCAGAGACGGG	SEQ ID NO 29
	TAAGTGAAGGTCTGGTTCTAGG	SEQ ID NO 30
	TGCCCATGTAAGTGAAGGTCTGG	SEQ ID NO 31
	GAACTTGCCCATGTAAGTGAAGG	SEQ ID NO 32
	TCCATTGACCCCTCAGTACCCCTGG	SEQ ID NO 33
	TATGCCTCTGGGTAGCAGCTGG	SEQ ID NO 34
	TGAGTGCAGGCATCTGCAAGGG	SEQ ID NO 35
	GAGTGCAGGCATCTGCAAGGGG	SEQ ID NO 36
	GATGAGGCTGTGGTTGAAGCTGG	SEQ ID NO 37
	CCACTGGCCACAGGACCCCTGGG	SEQ ID NO 38
	GGGACATGGTGCACACACCCAGG	SEQ ID NO 39
	GAGTACAGGTGGTCCAGGTCAAGG	SEQ ID NO 40
	GCGGAGAGTACAGGTGGTCCAGG	SEQ ID NO 41
	GCGGTGGCGGAGAGTACAGGTGG	SEQ ID NO 42
	TCTCCTGCACAGCCAGAATAAGG	SEQ ID NO 43
	ACGCAGAAGGGCCTGGTAGAGGG	SEQ ID NO 44
	AGGTGGTGGGTAGGCCAGAGAGG	SEQ ID NO 45
	CCCAAGCCAGCCACGGACCCAGG	SEQ ID NO 46
	ACCTGGGTCCGTGGCTGGCTTGG	SEQ ID NO 47
	AAGAGACCTGGTCCGTGGCTGG	SEQ ID NO 48
	GGATCATTGGGAAGAGACCTGGG	SEQ ID NO 49
	GGGATCATTGGGAAGAGACCTGG	SEQ ID NO 50
	CAGGATAGTCTGGATCATTGGG	SEQ ID NO 51
	GGAAAGAATCCAGGATAGTCTGG	SEQ ID NO 52
	CAGTGCCAGAGAGACCTACATGG	SEQ ID NO 53
	CTGTACCATGTAGGTCTCTCTGG	SEQ ID NO 54
	AGAGACCTACATGGTACAGCTGG	SEQ ID NO 55
	CTGGGCCAGCTGTACCATGTAGG	SEQ ID NO 56
	AGGGAAAGGGCTTACGGTCTGGG	SEQ ID NO 57

	CAGGGAAAGGGCTTACGGTCTGG	ID SEQ NO 58
Gen diana	<b>ADN</b> Secuencia Diana	ID SEQ NO
PPP2R2D	TCTGGAGATCTTCTTGCACACAGG	ID SEQ NO 59
	CTCCGGTTCATGACTTGAAGG	ID SEQ NO 60
	GTCTTCCATCTCGTCTTCAGG	ID SEQ NO 61
	GAAGACTTCGAGACCCATTAGG	ID SEQ NO 62
	TCGAGACCCATTAGGATCACGG	ID SEQ NO 63
	GTAGCGCCGTGATCCTAAATGGG	ID SEQ NO 64
	CGTAGCGCCGTGATCCTAAATGG	ID SEQ NO 65
	CATTAGGATCACGGCGCTACGG	ID SEQ NO 66
	GGTCCAATATTGAAGCCATGG	ID SEQ NO 67
	GATCCATGGGCTTCAATATTGG	ID SEQ NO 68
	AGATCCATGGGCTTCAATATTGG	ID SEQ NO 69
	GCTTCTACCATAAGATCCATGG	ID SEQ NO 70
	CGCTTCTACCATAAGATCCATGG	ID SEQ NO 71
	GCATTGCAAAATTGCCGTGG	ID SEQ NO 72
	ATGACCTGAGAATTAAATTATGG	ID SEQ NO 73
	CCATGCACTCCCAGACATCGTGG	ID SEQ NO 74
	GCACTGGTGCAGGGTGGAACTCGG	ID SEQ NO 75
	ACACGTTGCACTGGTGCAGGGTGG	ID SEQ NO 76
	CGAACACGTTGCACTGGTGCAGGG	ID SEQ NO 77
	ACGAACACGTTGCACTGGTGCAGGG	ID SEQ NO 78
	TGTAGACGAACACGTTGCACTGG	ID SEQ NO 79
	GCGCATGTCACACAGGGCGATGG	ID SEQ NO 80
	AGGAGCGCATGTCACACAGGGCG	ID SEQ NO 81
	CCGAGGAGCGCATGTCACACAGGG	ID SEQ NO 82
	CCTGTGTGACATGCGCTCCTCGG	ID SEQ NO 83
Gen diana	<b>ADN</b> Secuencia Diana	ID SEQ NO
	CGACTGGCCAGGGCGCCTGTGGG	ID SEQ NO 84
	ACCGCCCAGACGACTGGCCAGGG	ID SEQ NO 85

PD-1	CACCGCCCAGACGACTGGCCAGG	SEQ ID NO 86
	GTCTGGCGGTGCTACAACTGGG	SEQ ID NO 87
	CTACAACTGGGCTGGCGGCCAGG	SEQ ID NO 88
	CACCTACCTAAGAACCATCCTGG	SEQ ID NO 89
	CGGTCACCACGAGCAGGGCTGGG	SEQ ID NO 90
	GCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGG	SEQ ID NO 91
	CGGAGAGCTTCGTGCTAACTGG	SEQ ID NO 92
	CAGCTTGTCCGCTGGTGCTGG	SEQ ID NO 93
	AGGCGGCCAGCTTGTCCGTCTGG	SEQ ID NO 94
	CCGGGCTGGCTGCGGTCTCGGG	SEQ ID NO 95
	CGTTGGGCAGTTGTGTGACACGG	SEQ ID NO 96
Gen diana	<b>ADN</b> Secuencia Diana	SEQ ID NO
CTLA-4	CATAAAGCCATGGCTGCCTGG	SEQ ID NO 97
	CCTTGGATTTCAGCGGCACAAGG	SEQ ID NO 98
	CCTTGTGCCGCTGAAATCCAAGG	SEQ ID NO 99
	CACTCACCTTGAGAAGACAGG	SEQ ID NO 100
	TTCCATGCTAGCAATGCACGTGG	SEQ ID NO 101
	GGCCACGTGCATTGCTAGCATGG	SEQ ID NO 102
	GGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGG	SEQ ID NO 103
	AGGTCCGGGTGACAGTGCTTCGG	SEQ ID NO 104
	CCGGGTGACAGTGCTTCGGCAGG	SEQ ID NO 105
	CTGTGCGGCAACCTACATGATGG	SEQ ID NO 106
	CAACTCATTCCCCATCATGTAGG	SEQ ID NO 107
	CTAGATGATTCCATCTGCACGGG	SEQ ID NO 108
Gen diana	<b>ADN</b> Secuencia Diana	SEQ ID NO
	GGCTAGGAGTCAGCGACATATGG	SEQ ID NO 109
	GCTAGGAGTCAGCGACATATGGG	SEQ ID NO 110
	CTAGGAGTCAGCGACATATGGGG	SEQ ID NO 111
	GTACTGTGTAGCCAGGATGCTGG	SEQ ID NO 112
	ACGAGCACTCACCAGCATCCTGG	SEQ ID NO 113

DGK $\zeta$	AGGCTCCAGGAATGTCCGCGAGG	SEQ ID NO 114
	ACTTACCTCGCGGACATTCTGG	SEQ ID NO 115
	CACCTGGGCACTTACCTCGCGG	SEQ ID NO 116
	GTGCCGTACAAAGGTTGGCTGGG	SEQ ID NO 117
	GGTGCCGTACAAAGGTTGGCTGG	SEQ ID NO 118
	CTCTCCTCAGTACCAACAGCAAGG	SEQ ID NO 119
	CCTGGGGCCTCCGGCGCGAGG	SEQ ID NO 120
	AGTACTCACCTGGGCCTCCGGG	SEQ ID NO 121
	AGGGTCTCCAGCGGCCCTCCTGG	SEQ ID NO 122
	GCAAGTACTTACGCCTCCTGGG	SEQ ID NO 123
	TTGCGGTACATCTCCAGCCTGGG	SEQ ID NO 124
	TTTGCAGGTACATCTCCAGCCTGG	SEQ ID NO 125
	Gen diana	ADN Secuencia Diana
	ADN Secuencia Diana	SEQ ID NO
	GCAAAACCTGTCCACTCTTATGG	SEQ ID NO 126
	TTGGTGCCATAAGAGTGGACAGG	SEQ ID NO 127
	GGTGCAAGTTCTTATATGTTGG	SEQ ID NO 128
	ACCTGATGCATATAATAATCAGG	SEQ ID NO 129
	ACCTGATTATTATATGCATCAGG	SEQ ID NO 130
	CAGAGCACCAGAGTGCCGTCTGG	SEQ ID NO 131
	AGAGCACCAGAGTGCCGTCTGGG	SEQ ID NO 132
	AGAGTGCCGTCTGGGTCTGAAGG	SEQ ID NO 133
	AGGAAGGCCGTCCATTCTCAGGG	SEQ ID NO 134
	GGATAGAACCAACCATGTTGAGG	SEQ ID NO 135
	TCTGTTGCCCTCAACATGGTTGG	SEQ ID NO 136
	TTAGTCTGTTGCCCTCAACATGG	SEQ ID NO 137
	GTCTGGCAAATGGGAGGTGATGG	SEQ ID NO 138
	CAGAGGTTCTGTCTGGCAAATGG	SEQ ID NO 139
	TTGTAGCCAGAGGTTCTGTCTGG	SEQ ID NO 140
	ACTTCTGGATGAGCTCTCTCAGG	SEQ ID NO 141
	AGAGCTCATCCAGAAGTAAATGG	SEQ ID NO 142

Tet2

	TTGGGTGCTCCATTACTTCTGG	SEQ ID NO 143
	TTCTGGCTTCCCTTCATACAGGG	SEQ ID NO 144
	CAGGACTCACACGACTATTCTGG	SEQ ID NO 145
	CTACTTCTTGTGTAAAGTCAGG	SEQ ID NO 146
	GACTTACACAAGAAAGTAGAGG	SEQ ID NO 147
	GTCTTCTCCATTAGCCTTTGG	SEQ ID NO 148
	AATGGAGAAAGACGTAACCTCGG	SEQ ID NO 149
	ATGGAGAAAGACGTAACCTCGGG	SEQ ID NO 150
	TGGAGAAAGACGTAACCTCGGGG	SEQ ID NO 151
	TTTGGTTGACTGCTTCACCTGG	SEQ ID NO 152
	TCACTCAAATCGGAGACATTGG	SEQ ID NO 153
	ATCTGAAGCTCTGGATTTCAGG	SEQ ID NO 154
	GCTTCAGATTCTGAATGAGCAGG	SEQ ID NO 155
	CAGATTCTGAATGAGCAGGAGGG	SEQ ID NO 156
	AAGGCAGTGCTAATGCCTAATGG	SEQ ID NO 157
	GCAGAAACTGTAGCACCATTAGG	SEQ ID NO 158
	ACCGCAATGGAAACACAATCTGG	SEQ ID NO 159
	TGTGGTTTCTGCACCGCAATGG	SEQ ID NO 160
	CATAAATGCCATTAACAGTCAGG	SEQ ID NO 161
	ATTAGTAGCCTGACTGTTAATGG	SEQ ID NO 162
	CGATGGGTGAGTGATCTCACAGG	SEQ ID NO 163
	ACTCACCCATCGCATAACCTCAGG	SEQ ID NO 164
	CTCACCCATCGCATAACCTCAGGG	SEQ ID NO 165
Gen diana	ADN Secuencia Diana	SEQ ID NO
	AGCAACAGGAGGAGTTGCAGAGG	SEQ ID NO 166
	CCAGTAGGATCAGCAACAGGAGG	SEQ ID NO 167
	CTCCTGTTGCTGATCCTACTGGG	SEQ ID NO 168
	GGCCCAGTAGGATCAGCAACAGG	SEQ ID NO 169
	TTGCTGATCCTACTGGGCCCTGG	SEQ ID NO 170
	TGGCAACAGCTTGCAGCTGTGGG	SEQ ID NO 171

CTTGGGTCCCCCTGCTTGCCCCGGG	SEQ ID NO 172
GTCCCCCTGCTTGCCCCGGGACCGG	SEQ ID NO 173
CTCCGGTCCCAGGGCAAGCAGGGG	SEQ ID NO 174
TCTCCGGTCCCAGGGCAAGCAGGG	SEQ ID NO 175
GTCTCCGGTCCCAGGGCAAGCAGG	SEQ ID NO 176
GCTTGCCCCGGGACCGGAGACAGG	SEQ ID NO 177
GGTGGCCTGTCTCCGGTCCCCGG	SEQ ID NO 178
CGGTGGCCTGTCTCCGGTCCCCGG	SEQ ID NO 179
CATATTGGTGGCCTGTCTCCGG	SEQ ID NO 180
ATCTAGGTACTCATATTGGTGG	SEQ ID NO 181
ATAATCTAGGTACTCATATTGG	SEQ ID NO 182
TTATGATTCCTGCCAGAACGG	SEQ ID NO 183
ATTCTGGAGGGCTCCGTTCTGG	SEQ ID NO 184
ACTGACACCACCTCCTGACTGG	SEQ ID NO 185
CTGACACCACCTCCTGACTGGG	SEQ ID NO 186
ACCACTCCTCTGACTGGGCTGG	SEQ ID NO 187
AACCCCTGAGTCTACCACTGTGG	SEQ ID NO 188
CTCCACAGTGGTAGACTCAGGGG	SEQ ID NO 189
GCTCCACAGTGGTAGACTCAGGG	SEQ ID NO 190
GGCTCCACAGTGGTAGACTCAGG	SEQ ID NO 191
CCTGCTGCAAGGCCTGCAGCAGG	SEQ ID NO 192
CCAGTAGAACGCCTGCAGCAGG	SEQ ID NO 193
CGTTCTACTGGCCTGGATGCAGG	SEQ ID NO 194
TCTACTGGCCTGGATGCAGGAGG	SEQ ID NO 195
CCACGGAGCTGGCCAACATGGGG	SEQ ID NO 196
CGTGGACAGGTTCCCCATGTTGG	SEQ ID NO 197
GTCCACGGATTCAAGCAGCTATGG	SEQ ID NO 198
GACCACTCAACCAGTGCCACGG	SEQ ID NO 199
GGAGTGGTCTGTGCCTCCGTGGG	SEQ ID NO 200
GGCACAGACAACTCGACTGACGG	SEQ ID NO 201

## PSGL-1

GACAACTCGACTGACGGCCACGG	SEQ ID NO 202
AACTCGACTGACGGCCACGGAGG	SEQ ID NO 203
CACAGAACCCAGTGCCACAGAGG	SEQ ID NO 204
GGTAGTAGGTTCCATGGACAGGG	SEQ ID NO 205
TGGTAGTAGGTTCCATGGACAGG	SEQ ID NO 206
TCTTTGGTAGTAGGTTCCATGG	SEQ ID NO 207
ATGGAACCTACTACCAAAAGAGG	SEQ ID NO 208
AACAGACCTCTTTGGTAGTAGG	SEQ ID NO 209
GGGTATGAACAGACCTCTTTGG	SEQ ID NO 210
TGTGCTCTGTACTCACAGG	SEQ ID NO 211
GTGTCCTCTGTACTCACAGGG	SEQ ID NO 212
GTAGTTGACGGACAAATTGCTGG	SEQ ID NO 213
TTTGTCCGTCAACTACCCAGTGG	SEQ ID NO 214
TTGTCGTCAACTACCCAGTGGG	SEQ ID NO 215
TGTCCGTCAACTACCCAGTGGGG	SEQ ID NO 216
GTCCGTCAACTACCCAGTGGGGG	SEQ ID NO 217
CTCTGTGAAGCAGTGCGCTGCTGG	SEQ ID NO 218
CCTGCTGGCCATCCTAATCTTGG	SEQ ID NO 219
CCAAGATTAGGATGGCCAGCAGG	SEQ ID NO 220
GGCCATCCTAATCTTGGCGCTGG	SEQ ID NO 221
CACCAGCGCCAAGATTAGGATGG	SEQ ID NO 222
AGTGCACACGAAGAAGATAGTGG	SEQ ID NO 223
TATCTTCTCGTGTGCACTGTGG	SEQ ID NO 224
CTTCGTGTGCACTGTGGTGCTGG	SEQ ID NO 225
GGCGGTCCGCCTCTCCCGCAAGG	SEQ ID NO 226
GCGGTCCGCCTCTCCCGCAAGGG	SEQ ID NO 227
AATTACGCACGGGGTACATGTGG	SEQ ID NO 228
TGGGGGGAGTAATTACGCACGGG	SEQ ID NO 229
GTGGGGGGAGTAATTACGCACGGG	SEQ ID NO 230
GGTGGGGGGAGTAATTACGCACGG	SEQ ID NO 231

	TAATTACTCCCCCACCGAGATGG	SEQ ID NO 232
	AGATGCAGACCATCTCGTGCGG	SEQ ID NO 233
	GAGATGCAGACCATCTCGTGCG	SEQ ID NO 234
	TGAGATGCAGACCATCTCGTGCG	SEQ ID NO 235
	GGATGAGATGCAGACCATCTCGG	SEQ ID NO 236
	ATCTCATCCCTGTTGCCTGATGG	SEQ ID NO 237
	TCATCCCTGTTGCCTGATGGGGG	SEQ ID NO 238
	CTCACCCCCATCAGGCAACAGGG	SEQ ID NO 239
	GAGGGCCCTCACCCCCATCAGG	SEQ ID NO 240
	GGGCCCTCTGCCACAGCCAATGG	SEQ ID NO 241
	CCCTCTGCCACAGCCAATGGGG	SEQ ID NO 242
	CCCCCATTGGCTGTGGCAGAGGG	SEQ ID NO 243
	GCCCCCATTGGCTGTGGCAGAGG	SEQ ID NO 244
	GGACAGGCCCCATTGGCTGTGG	SEQ ID NO 245
	CCGGGCTCTGGCCTTGGACAGG	SEQ ID NO 246
	CTGTCCAAGGCCAAGAGGCCCGG	SEQ ID NO 247
	TGGCGTCAGGCCGGCTTTGG	SEQ ID NO 248
	CGGGCCTGACGCCAGAGCCCAGG	SEQ ID NO 249
Gen diana	<b>ADN</b> Secuencia Diana	SEQ ID NO
FAS	CAACAACCATGCTGGGCATCTGG	SEQ ID NO 250
	GAGGGTCCAGATGCCAGCATGG	SEQ ID NO 251
	CATCTGGACCCTCCTACCTCTGG	SEQ ID NO 252
	AGGGCTCACCAAGGTTAGGAGGG	SEQ ID NO 253
	GGAGTTGATGTCAGTCACTTGG	SEQ ID NO 254
	TGGAGTTGATGTCAGTCACTTGG	SEQ ID NO 255
	AGTGAUTGACATCAACTCCAAGG	SEQ ID NO 256
	GTGACTGACATCAACTCCAAGGG	SEQ ID NO 257
	ACTCCAAGGGATTGGAATTGAGG	SEQ ID NO 258
	CTTCCTCAATTCCAATCCCTTGG	SEQ ID NO 259
	TACAGTTGAGACTCAGAACTTGG	SEQ ID NO 260

KDM6A	TTGGAAGGCCTGCATCATGATGG	SEQ ID NO 261
	AGAATTGCCATCATGATGCAGG	SEQ ID NO 262
	GACAGGGCTATGGCAGAATTGG	SEQ ID NO 263
	TGTAACATACCTGGAGGACAGGG	SEQ ID NO 264
	GTGTAACATACCTGGAGGACAGG	SEQ ID NO 265
	Gen diana	ADN Secuencia Diana
	CGTACCTGTGCAACTCCTGTTGG	SEQ ID NO 266
	GATCTACTGGAATTCCCTAATGGG	SEQ ID NO 267
	GAGTCAGCTGTTGGCCCATTAGG	SEQ ID NO 268
	CTGCCTACAAACTCAGTCTCTGG	SEQ ID NO 269
	GGGCAGGCAGGACGGACTCCAGG	SEQ ID NO 270
	GGAGTCCGTCCTGCCTGCCCTGG	SEQ ID NO 271
	GAGTCCGTCCTGCCTGCCCTGGG	SEQ ID NO 272
	GAAAAGGGTCCATTGGCCAAAGG	SEQ ID NO 273
	GCCTGCAGAAAAGGGTCCATTGG	SEQ ID NO 274
	TTGATGTGCTACAGGAAACATGG	SEQ ID NO 275
	AGCGTTCTTGATGTGCTACAGGG	SEQ ID NO 276
	CAGCGTTCTTGATGTGCTACAGG	SEQ ID NO 277
	CTGTAGCACATCAAGAACGCTGG	SEQ ID NO 278
	TGTAGCACATCAAGAACGCTGGG	SEQ ID NO 279
	ATAGGCAATAATCATATAACAGG	SEQ ID NO 280
	AGTGCCTTCGCTGCAGGTAAGG	SEQ ID NO 281
	GAGTGAGTGCCTTCGCTGCAGG	SEQ ID NO 282
	GTCAGGTTGTGCGGTTATGAGG	SEQ ID NO 283
	CGCTGCTGGTCAGGTTGTGCGG	SEQ ID NO 284
	AAACCTGACCAGCAGCGCAGAGG	SEQ ID NO 285
	CCAGCAGCGCAGAGGAGGCCGTGG	SEQ ID NO 286
	CCACGGCTCCTCTGCCTGCTGG	SEQ ID NO 287
	CCAACATCTAACTCCACTCAGG	SEQ ID NO 288
	CCTGAGTGGAGTTAGATAGTTGG	SEQ ID NO 289

[Sistema de tijeras genéticas (nucleasa diseñada)]

La manipulación o modificación genética de materiales involucrados en los factores inmunorreguladores, las células inmunes y el sistema inmunitario se puede lograr utilizando el "un complejo de proteína editora -ácido

nucleico guía".

**Complejo de proteína editora -ácido nucleico guía**

El término "complejo de proteína editora-ácido nucleico guía" se refiere a un complejo que se forma mediante la interacción entre un ácido nucleico guía y una proteína editora, y un complejo de ácido nucleico-proteína comprende un ácido nucleico guía y una proteína editora.

5 El término "ácido nucleico guía" está configurado para reconocer un ácido nucleico, gen, cromosoma o proteína direccional mediante el complejo proteína-ácido nucleico guía.

El ácido nucleico guía puede estar presente en forma de ADN, ARN o una mezcla de ADN/ARN y tener una secuencia de ácidos nucleicos de 5 a 150.

10 El ácido nucleico guía puede incluir uno o más dominios.

Los dominios pueden ser, pero no están limitados a, un dominio guía, un primer dominio complementario, un dominio de enlace, un segundo dominio complementario, un dominio proximal o un dominio de cola.

El ácido nucleico guía puede incluir dos o más dominios, que pueden ser las mismas repeticiones de dominio o dominios diferentes.

15 El ácido nucleico guía puede ser una secuencia de ácido nucleico continua.

Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico continua puede ser (N) $m$ , donde N es A, T, C o G, o A, U, C o G, y m es un número entero de 1 a 150.

El ácido nucleico guía puede ser dos o más secuencias de ácidos nucleicos continuas.

20 Por ejemplo, las dos o más secuencias de ácidos nucleicos continuas pueden ser (N) $m$  y (N) $o$ , donde N representa A, T, C o G, o A, U, C o G, m y o son un número entero de 1 a 150, y pueden ser iguales o diferentes entre sí.

El término "proteína editora" se refiere a un péptido, polipéptido o proteína que puede unirse directamente o interactuar con un ácido nucleico, sin unirse directamente a este. La proteína editora también puede denominarse conceptualmente "tijeras genéticas" o endonucleasa guiada por ARN (RGEN).

25 La proteína editora puede ser una enzima.

La proteína editora puede ser una proteína de fusión.

Aquí, la "proteína de fusión" se refiere a una proteína que se produce fusionando una enzima con un dominio, péptido, polipéptido o proteína adicional.

30 El término "enzima" se refiere a una proteína que contiene un dominio capaz de escindir un ácido nucleico, un gen, un cromosoma o una proteína.

El dominio, péptido, polipéptido o proteína adicional puede ser un dominio, péptido, polipéptido o proteína funcional, que tiene una función igual o diferente a la de la enzima.

35 La proteína de fusión puede incluir un dominio, péptido, polipéptido o proteína adicional en una o más regiones del terminal amino (N-terminal) de la enzima o sus proximidades; el terminal carboxilo (C-terminal) o sus proximidades; la parte media de la enzima; y una combinación de los mismos.

La proteína de fusión puede incluir un dominio funcional, péptido, polipéptido o proteína en una o más regiones del terminal N de la enzima o sus proximidades; el terminal C o sus proximidades; la parte media de la enzima; y una combinación de los mismos.

El complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede servir para modificar un sujeto.

40 El sujeto puede ser un ácido nucleico, un gen, un cromosoma o una proteína diana.

Por ejemplo, el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede dar como resultado la regulación final (por ejemplo, inhibición, supresión, reducción, aumento o promoción) de la expresión de una proteína de interés, la eliminación de la proteína o la expresión de una nueva proteína.

Aquí, el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede actuar a nivel de ADN, ARN, gen o cromosoma.

45 El complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede actuar en las etapas de transcripción y traducción de genes.

El complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede actuar a nivel proteico.

1. Ácidos nucleicos guía

El ácido nucleico guía es un ácido nucleico que es capaz de reconocer un ácido nucleico, gen, cromosoma o proteína diana y forma un complejo ácido nucleico guía-proteína.

- 5 Aquí, el ácido nucleico guía está configurado para reconocer o apuntar a un ácido nucleico, gen, cromosoma o proteína al que se dirige el complejo ácido nucleico-proteína guía.

El ácido nucleico guía puede estar presente en forma de ADN, ARN o una mezcla de ADN/ARN y tener una secuencia de ácidos nucleicos de 5 a 150.

El ácido nucleico guía puede estar presente en forma lineal o circular.

- 10 El ácido nucleico guía puede ser una secuencia de ácido nucleico continua.

Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico continua puede ser  $(N)_m$ , donde N es A, T, C o G, o A, U, C o G, y m es un número entero de 1 a 150.

El ácido nucleico guía puede ser dos o más secuencias de ácidos nucleicos continuas.

- 15 Por ejemplo, las dos o más secuencias de ácidos nucleicos continuas pueden ser  $(N)_m$  y  $(N)_o$ , donde N representa A, T, C o G, o A, U, C o G, m y o son un número entero de 1 a 150, y pueden ser iguales o diferentes entre sí.

El ácido nucleico guía puede incluir uno o más dominios.

Aquí, los dominios pueden ser, pero no están limitados a, un dominio guía, un primer dominio complementario, un dominio de enlace, un segundo dominio complementario, un dominio proximal o un dominio de cola.

- 20 El ácido nucleico guía puede incluir dos o más dominios, que pueden ser las mismas repeticiones de dominio o dominios diferentes.

Los dominios se describirán a continuación.

i) Dominio guía

- 25 El término "dominio guía" es un dominio que tiene una secuencia guía complementaria que es capaz de formar un enlace complementario con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana, y sirve para interactuar específicamente con el gen o ácido nucleico diana.

La secuencia guía es una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana, que tiene, por ejemplo, al menos 50% o más, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de complementariedad o complementariedad completa.

- 30 El dominio guía puede ser una secuencia de 5 a 50 bases.

En un ejemplo, el dominio guía puede ser una secuencia de 5 a 50, de 10 a 50, de 15 a 50, de 20 a 50, de 25 a 50, de 30 a 50, de 35 a 50, de 40 a 50 o de 45 a 50 bases.

En otro ejemplo, el dominio guía puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25, de 25 a 30, de 30 a 35, de 35 a 40, de 40 a 45 o de 45 a 50 bases.

- 35 El dominio guía puede tener una secuencia guía.

La secuencia guía puede ser una secuencia de bases complementaria capaz de formar un enlace complementario con la secuencia diana en el gen o ácido nucleico diana.

- 40 La secuencia guía puede ser una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana en el gen o ácido nucleico diana, que tiene, por ejemplo, al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% o más de complementariedad o complementariedad completa.

La secuencia guía puede ser una secuencia de 5 a 50 bases.

En un ejemplo, el dominio guía puede ser una secuencia de 5 a 50, de 10 a 50, de 15 a 50, de 20 a 50, de 25 a 50, de 30 a 50, de 35 a 50, de 40 a 50 o de 45 a 50 bases.

- 45 En otro ejemplo, la secuencia guía puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25, de 25 a 30, de 30 a 35, de 35 a 40, de 40 a 45 o de 45 a 50 bases.

Además, el dominio guía puede incluir una secuencia guía y una secuencia de bases adicional.

La secuencia de bases adicional se puede utilizar para mejorar o degradar la función del dominio guía.

La secuencia de bases adicional se puede utilizar para mejorar o degradar la función de la secuencia guía.

La secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 35 bases.

5 En un ejemplo, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 5 a 35, de 10 a 35, de 15 a 35, de 20 a 35, de 25 a 35 o de 30 a 35 bases.

En otro ejemplo, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25, de 25 a 30 o de 30 a 35 bases.

La secuencia de bases adicional puede estar ubicada en el extremo 5' de la secuencia guía.

10 La secuencia de bases adicional puede estar ubicada en el extremo 3' de la secuencia guía.

ii) Primer dominio complementario

El término "primer dominio complementario" es una secuencia de ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico complementaria a un segundo dominio complementario, y tiene suficiente complementariedad para formar una doble cadena con el segundo dominio complementario.

15 El primer dominio complementario puede ser una secuencia de 5 a 35 bases.

En un ejemplo, el primer dominio complementario puede ser una secuencia de 5 a 35, de 10 a 35, de 15 a 35, de 20 a 35, de 25 a 35 o de 30 a 35 bases.

En otro ejemplo, el primer dominio complementario puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25, de 25 a 30 o de 30 a 35 bases.

20 iii) Dominio de enlace

El término "dominio de enlace" es una secuencia de ácido nucleico que conecta dos o más dominios, que son dos o más dominios idénticos o diferentes. El dominio de enlace puede estar conectado con dos o más dominios mediante enlace covalente o enlace no covalente, o puede conectar dos o más dominios mediante enlace covalente o enlace no covalente.

25 El dominio de enlace puede ser una secuencia de 1 a 30 bases.

En un ejemplo, el dominio de enlace puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25 o de 25 a 30 bases.

En otro ejemplo, el dominio de enlace puede ser una secuencia de 1 a 30, de 5 a 30, de 10 a 30, de 15 a 30, de 20 a 30 o de 25 a 30 bases.

30 iv) Segundo dominio complementario

El término "segundo dominio complementario" es una secuencia de ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico complementaria al primer dominio complementario, y tiene suficiente complementariedad para formar una doble cadena con el primer dominio complementario.

35 El segundo dominio complementario puede tener una secuencia de bases complementaria al primer dominio complementario, y una secuencia de bases que no tiene complementariedad con el primer dominio complementario, por ejemplo, una secuencia de bases que no forma una doble cadena con el primer dominio complementario, y puede tener una secuencia de bases más larga que el primer dominio complementario.

El segundo dominio complementario puede tener una secuencia de 5 a 35 bases.

40 En un ejemplo, el segundo dominio complementario puede ser una secuencia de 1 a 35, de 5 a 35, de 10 a 35, de 15 a 35, de 20 a 35, de 25 a 35 o de 30 a 35 bases.

En otro ejemplo, el segundo dominio complementario puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25, de 25 a 30 o de 30 a 35 bases.

v) Dominio proximal

45 El término "dominio proximal" es una secuencia de ácido nucleico ubicada adyacente al segundo dominio complementario.

El dominio proximal puede tener una secuencia de bases complementaria y puede formarse en una doble cadena debido a una secuencia de bases complementaria.

El dominio proximal puede ser una secuencia de 1 a 20 bases.

En un ejemplo, el dominio proximal puede ser una secuencia de 1 a 20, de 5 a 20, de 10 a 20 o de 15 a 20 bases.

En otro ejemplo, el dominio proximal puede ser una secuencia de 1 a 20, de 5 a 20, de 10 a 20 o de 15 a 20 bases. El dominio proximal puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15 o de 15 a 20 bases.

vi) Dominio de cola

El término "dominio de cola" es una secuencia de ácido nucleico ubicada en uno o más extremos de ambos extremos del ácido nucleico guía.

El dominio de cola puede tener una secuencia de bases complementaria y puede formarse en una doble cadena debido a una secuencia de bases complementaria.

El dominio de cola puede ser una secuencia de 1 a 50 bases.

En un ejemplo, el dominio de cola puede ser una secuencia de 5 a 50, de 10 a 50, de 15 a 50, de 20 a 50, de 25 a 50, de 30 a 50, de 35 a 50, de 40 a 50 o de 45 a 50 bases.

En otro ejemplo, el dominio de cola puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25, de 25 a 30, de 30 a 35, de 35 a 40, de 40 a 45 o de 45 a 50 bases.

Mientras tanto, una parte o la totalidad de las secuencias de ácidos nucleicos incluidas en los dominios, es decir, el dominio guía, el primer dominio complementario, el dominio de enlace, el segundo dominio complementario, el dominio proximal y el dominio de cola pueden incluir de manera selectiva o adicional una modificación química.

La modificación química puede ser, pero no se limita a, metilación, acetilación, fosforilación, enlace fosforotioato, un ácido nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil 3'fosforotioato (MS) o 2'-O-metil 3'tioPACE (MSP).

El ácido nucleico guía incluye uno o más dominios.

El ácido nucleico guía puede incluir un dominio guía.

El ácido nucleico guía puede incluir un primer dominio complementario.

El ácido nucleico guía puede incluir un dominio de enlace.

El ácido nucleico guía puede incluir un segundo dominio complementario.

El ácido nucleico guía puede incluir un dominio proximal.

El ácido nucleico guía puede incluir un dominio de cola.

Aquí puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dominios.

El ácido nucleico guía puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dominios guía.

El ácido nucleico guía puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más primeros dominios complementarios.

El ácido nucleico guía puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dominios de enlace.

El ácido nucleico guía puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más segundos dominios complementarios.

El ácido nucleico guía puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dominios proximales.

El ácido nucleico guía puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dominios de cola.

Aquí, en el ácido nucleico guía, se puede duplicar un tipo de dominio.

El ácido nucleico guía puede incluir varios dominios con o sin duplicación.

El ácido nucleico guía puede incluir el mismo tipo de dominio. Aquí, el mismo tipo de dominio puede tener la misma secuencia de ácidos nucleicos o diferentes secuencias de ácidos nucleicos.

El ácido nucleico guía puede incluir dos tipos de dominios. Aquí, los dos tipos diferentes de dominios pueden

tener diferentes secuencias de ácidos nucleicos o la misma secuencia de ácidos nucleicos.

El ácido nucleico guía puede incluir tres tipos de dominios. Aquí, los tres tipos diferentes de dominios pueden tener diferentes secuencias de ácidos nucleicos o la misma secuencia de ácido nucleico.

5 El ácido nucleico guía puede incluir cuatro tipos de dominios. Aquí, los cuatro tipos diferentes de dominios pueden tener diferentes secuencias de ácidos nucleicos o la misma secuencia de ácidos nucleicos.

El ácido nucleico guía puede incluir cinco tipos de dominios. Aquí, los cinco tipos diferentes de dominios pueden tener diferentes secuencias de ácidos nucleicos o la misma secuencia de ácidos nucleicos.

El ácido nucleico guía puede incluir seis tipos de dominios. Aquí, los seis tipos diferentes de dominios pueden tener diferentes secuencias de ácidos nucleicos o la misma secuencia de ácidos nucleicos.

10 Por ejemplo, el ácido nucleico guía puede consistir en [dominio guía]-[primer dominio complementario]-[dominio de enlace]-[segundo dominio complementario]-[dominio de enlace]-[dominio guía]-[primer dominio complementario]-[dominio de enlace]-[segundo dominio complementario]. Aquí, los dos dominios guía pueden incluir secuencias guía para objetivos diferentes o iguales, los dos primeros dominios complementarios y los dos segundos dominios complementarios pueden tener secuencias de ácidos nucleicos iguales o diferentes.

15 Cuando los dominios guía incluyen secuencias guía para diferentes objetivos, los ácidos nucleicos guía pueden unirse específicamente a dos objetivos diferentes y, en este caso, las uniones específicas pueden realizarse de forma simultánea o secuencial. Además, los dominios de enlace pueden escindirse mediante enzimas específicas y los ácidos nucleicos guía pueden dividirse en dos o tres partes en presencia de enzimas específicas.

20 Como ejemplo específico del ácido nucleico guía en la presente memoria descriptiva, el ácido nucleico guía se divulga a continuación.

#### ARNg

El término "ARNg" se refiere a un ácido nucleico capaz de dirigirse específicamente a un complejo enzimático ARNg-CRISPR, es decir, un complejo CRISPR, con respecto a un gen o ácido nucleico diana. Además, el ARNg es un ARN específico de ácido nucleico que puede unirse a una enzima CRISPR y guiar la enzima CRISPR hacia el gen o ácido nucleico diana.

El ARNg puede incluir múltiples dominios. Debido a cada dominio, pueden ocurrir interacciones en una estructura tridimensional o forma activa de una cadena de ARNg, o entre estas cadenas.

30 El ARNg puede denominarse ARNg monocatenario (molécula de ARN única); o ARNg bicatenario (que incluye más de una, generalmente, dos moléculas de ARN discretas).

35 En una realización de ejemplo, el ARNg monocatenario puede incluir un dominio guía, es decir, un dominio que incluye una secuencia guía capaz de formar un enlace complementario con un gen o ácido nucleico diana; un primer dominio complementario; un dominio de enlace; un segundo dominio complementario, un dominio que tiene una secuencia complementaria a la secuencia del primer dominio complementario, formando así un ácido nucleico bicatenario con el primer dominio complementario; un dominio proximal; y opcionalmente un dominio de cola en la dirección 5' a 3'.

40 En otra realización, el ARNg bicatenario puede incluir una primera cadena que incluye un dominio guía, es decir, un dominio que incluye una secuencia guía capaz de formar un enlace complementario con un gen o ácido nucleico diana y un primer dominio complementario; y una segunda cadena que incluye un segundo dominio complementario, un dominio que tiene una secuencia complementaria a la secuencia del primer dominio complementario, formando así un ácido nucleico bicatenario con el primer dominio complementario, un dominio proximal; y opcionalmente un dominio de cola en la dirección 5' a 3'.

45 Aquí, la primera cadena puede denominarse ARNcr y la segunda cadena puede denominarse ARNtracr. El ARNcr puede incluir un dominio guía y un primer dominio complementario, y el ARNtracr puede incluir un segundo dominio complementario, un dominio proximal y, opcionalmente, un dominio de cola.

50 En todavía otra realización, el ARNg monocatenario puede incluir un dominio guía, es decir, un dominio que incluye una secuencia guía capaz de formar un enlace complementario con un gen o ácido nucleico diana; un primer dominio complementario; un segundo dominio complementario y un dominio que tiene una secuencia complementaria a la secuencia del primer dominio complementario, formando así un ácido nucleico bicatenario con el primer dominio complementario en la dirección 3' a 5'.

#### Dominio guía

El dominio guía incluye una secuencia guía complementaria capaz de formar un enlace complementario con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana. La secuencia guía puede ser una secuencia de ácido

nucleico que tenga complementariedad con la secuencia diana en el gen o ácido nucleico diana, por ejemplo, al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% o más de complementariedad o complementariedad completa. Se considera que el dominio guía permite un complejo ARNg-Cas, es decir, un complejo CRISPR para interactuar específicamente con el gen o ácido nucleico diana.

5 El dominio guía puede ser una secuencia de 5 a 50 bases.

Como realización de ejemplo, el dominio guía puede ser una secuencia de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

Como realización de ejemplo, el dominio guía puede incluir una secuencia de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

10 Aquí, el dominio guía puede incluir una secuencia guía.

La secuencia guía puede ser una secuencia de bases complementaria capaz de formar un enlace complementario con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana.

15 La secuencia guía puede ser una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana en el gen o ácido nucleico diana, que tiene, por ejemplo, al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% o más de complementariedad o complementariedad completa.

La secuencia guía puede ser una secuencia de 5 a 50 bases.

En una realización de ejemplo, la secuencia guía puede ser una secuencia de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

20 En una realización de ejemplo, la secuencia guía puede incluir una secuencia de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

Aquí, el dominio guía puede incluir una secuencia guía y una secuencia de bases adicional.

La secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 35 bases.

En una realización de ejemplo, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 bases.

25 Por ejemplo, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de bases única, guanina (G), o una secuencia de dos bases, GG.

La secuencia de bases adicional puede estar ubicada en el extremo 5' de la secuencia guía.

La secuencia de bases adicional puede estar ubicada en el extremo 3' de la secuencia guía.

30 Selectivamente, una parte o la totalidad de la secuencia de bases del dominio guía puede incluir una modificación química. La modificación química puede ser metilación, acetilación, fosforilación, enlace fosforotioato, un ácido nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil 3' fosforotioato (MS) o 2'-O-metil 3' tioPACE (MSP), pero la presente invención no se limita a esto.

Primer dominio complementario

35 El primer dominio complementario incluye una secuencia de ácido nucleico complementaria a un segundo dominio complementario, y tiene suficiente complementariedad como para poder formar una doble cadena con el segundo dominio complementario.

Aquí, el primer dominio complementario puede ser una secuencia de 5 a 35 bases. El primer dominio complementario puede incluir una secuencia de 5 a 35 bases.

40 En una realización de ejemplo, el primer dominio complementario puede ser una secuencia de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

En otra realización, el primer dominio complementario puede incluir una secuencia de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

45 El primer dominio complementario puede tener homología con un primer dominio complementario natural o puede derivar de un primer dominio complementario natural. Además, el primer dominio complementario puede tener una diferencia en la secuencia de bases de un primer dominio complementario dependiendo de la especie existente en la naturaleza, puede derivarse de un primer dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza, o puede tener homología parcial o completa con el primer dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza.

En una realización de ejemplo, el primer dominio complementario puede tener homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o completa con un primer dominio complementario de *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* o *Neisseria meningitidis*, o un primer dominio complementario derivado del mismo.

- 5 Por ejemplo, cuando el primer dominio complementario es el primer dominio complementario de *Streptococcus pyogenes* o un primer dominio complementario derivado del mismo, el primer dominio complementario puede ser 5'-GUUUUAGAGCUA-3' o una secuencia de bases que tenga homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o completa con 5'-GUUUUAGAGCUA-3'. Aquí, el primer dominio complementario puede incluir además (X)<sub>n</sub>, lo que da como resultado 5'-GUUUUAGAGCUA(X)<sub>n</sub>-3'. La X puede seleccionarse del grupo que consiste 10 en las bases A, T, U y G, y la n puede representar el número de bases, que es un entero de 5 a 15. Aquí, (X)<sub>n</sub> pueden ser n repeticiones de la misma base, o una mezcla de n bases de A, T, U y G.

En otra realización, cuando el primer dominio complementario es el primer dominio complementario de *Campylobacter jejuni* o un primer dominio complementario derivado del mismo, el primer dominio complementario puede ser 5'-GUUUUAGUCCCCUUUUUAAAUUUCUU-3', o una secuencia de bases que tiene 15 homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o completa con 5'-GUUUUAGUCCCCUUUUUAAAUUUCUU-3'. Aquí, el primer dominio complementario puede incluir además (X)<sub>n</sub>, resultando m 5'-GUUUUAGUCCCCUUUUUAAAUUUCUU(X)<sub>n</sub>-3'. La X puede seleccionarse del grupo que consiste en las bases A, T, U y G, y luego puede representar el número de bases, que es un número entero de 5 a 15. Aquí, (X)<sub>n</sub> puede representar n repeticiones de la misma base, o una mezcla de n bases de A, T, U y G.

- 20 En otra realización, el primer dominio complementario puede tener homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o completa con un primer dominio complementario de *Parcubacteria bacterium* (GWC2011\_GWC2\_44\_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyribacter proteoclaicic*, *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011\_GWA\_33\_10), *Acidaminococcus* sp. (BV3L6), *Porphyromonas macacae*, *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006), *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Smilihella* sp. (SC\_KO8D17), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* (MA2020), *Francisella novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma termitum* o *Eubacterium eligens*, o un primer dominio complementario derivado del mismo.

Por ejemplo, cuando el primer dominio complementario es el primer dominio complementario de *Parcubacteria bacterium* o un primer dominio complementario derivado del mismo, el primer dominio complementario puede 30 ser 5'-UUUGUAGAU-3', o una secuencia de bases que tenga una homología parcial, es decir, al menos 50% o más con 5'-UUUGUAGAU-3'. Aquí, el primer dominio complementario puede incluir además (X)<sub>n</sub>, lo que da como resultado 5'-(X)<sub>n</sub>UUUGUAGAU-3'. La X puede seleccionarse del grupo que consiste en las bases A, T, U y G, y luego puede representar el número de bases, que es un número entero de 1 a 5. Aquí, (X)<sub>n</sub> puede representar n repeticiones de la misma base, o una mezcla de n bases de A, T, U y G.

- 35 Selectivamente, una parte o la totalidad de la secuencia de bases del primer dominio complementario puede tener una modificación química. La modificación química puede ser metilación, acetilación, fosforilación, enlace fosforotioato, un ácido nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil 3' fosforotioato (MS) o 2'-O-metil 3' tioPACE (MSP), pero la presente invención no se limita a esto.

#### Dominio de enlazador

- 40 El dominio de enlazador es una secuencia de ácido nucleico que conecta dos o más dominios y conecta dos o más dominios idénticos o diferentes. El dominio de enlazador puede estar conectado con dos o más dominios, o puede conectar dos o más dominios mediante enlace covalente o no covalente.

El dominio de enlazador puede ser una secuencia de ácido nucleico que conecta un primer dominio complementario con un segundo dominio complementario para producir ARNg monocatenario.

- 45 El dominio de enlazador puede estar conectado con el primer dominio complementario y el segundo dominio complementario mediante enlace covalente o no covalente.

El dominio de enlazador puede conectar el primer dominio complementario con el segundo dominio complementario mediante enlace covalente o no covalente.

- 50 El dominio de enlazador puede ser una secuencia de 1 a 30 bases. El dominio de enlazador puede incluir una secuencia de 1 a 30 bases.

En una realización de ejemplo, el dominio de enlazador puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25 o de 25 a 30 bases.

En una realización de ejemplo, el dominio de enlazador puede incluir una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25 o de 25 a 30 bases.

El dominio de enlazador es adecuado para ser utilizado en una molécula de ARNg monocatenario y puede utilizarse para producir ARNg monocatenario conectándolo con una primera cadena y una segunda cadena de ARNg bicatenario o conectando la primera cadena con la segunda cadena mediante enlace covalente o no covalente. El dominio de enlazador se puede utilizar para producir ARNg monocatenario conectándolo con ARNcr y ARNtracr de ARNg bicatenario o conectando el ARNcr con el ARNtracr mediante enlace covalente o no covalente.

5 El dominio de enlazador puede tener homología con una secuencia natural, por ejemplo, una secuencia parcial de ARNtracr, o puede derivarse de ella.

10 Selectivamente, una parte o la totalidad de la secuencia de bases del dominio enlazador puede tener una modificación química. La modificación química puede ser metilación, acetilación, fosforilación, enlace fosforotioato, un ácido nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil 3' fosforotioato (MS) o 2'-O-metil 3' tioPACE (MSP), pero la presente invención no se limita a esto.

#### Segundo dominio complementario

15 El segundo dominio complementario incluye una secuencia de ácido nucleico complementaria al primer dominio complementario, y tiene suficiente complementariedad como para formar una doble cadena con el primer dominio complementario. El segundo dominio complementario puede incluir una secuencia de bases complementaria al primer dominio complementario, y una secuencia de bases que no tiene complementariedad con el primer dominio complementario, por ejemplo, una secuencia de bases que no forma una doble cadena con el primer dominio complementario, y puede tener una secuencia de bases más larga que el primer dominio complementario.

20 Aquí, el segundo dominio complementario puede ser una secuencia de 5 a 35 bases. El primer dominio complementario puede incluir una secuencia de 5 a 35 bases.

25 En una realización de ejemplo, el segundo dominio complementario puede ser una secuencia de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

30 Además, el segundo dominio complementario puede tener homología con un segundo dominio complementario natural, o puede derivarse del segundo dominio complementario natural. Además, el segundo dominio complementario puede tener una diferencia en la secuencia de bases de un segundo dominio complementario según una especie existente en la naturaleza, y puede derivarse de un segundo dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza, o puede tener homología parcial o completa con el segundo dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza.

35 En una realización de ejemplo, el segundo dominio complementario puede tener homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o completa con un segundo dominio complementario de *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* o *Neisseria meningitidis*, o un segundo dominio complementario derivado del mismo.

40 Por ejemplo, cuando el segundo dominio complementario es un segundo dominio complementario de *Streptococcus pyogenes* o un segundo dominio complementario derivado del mismo, el segundo dominio complementario puede ser 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3', o una secuencia de bases que tenga una homología parcial, es decir, al menos 50% o más con 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3' (una secuencia de bases que forma una doble cadena con el primer dominio complementario está subrayada). Aquí, el segundo dominio complementario puede incluir además  $(X)_n$  y/o  $(X)_m$ , lo que da como resultado 5'- $(X)_n$

45 UAGCAAGUUAAAAU(X) $_m$ -3'. La X puede seleccionarse del grupo que consiste en las bases A, T, U y G, y cada uno de los n y m puede representar el número de bases, en el que entonces puede ser un entero de 1 a 15, y luego puede ser un entero de 1 a 6. Aquí,  $(X)_n$  puede representar n repeticiones de la misma base, o una mezcla de n bases de A, T, U y G. Además,  $(X)_m$  puede representar m repeticiones de la misma base, o una mezcla de m bases de A, T, U y G.

50 En otro ejemplo, cuando el segundo dominio complementario es el segundo dominio complementario de *Campylobacter jejuni* o un segundo dominio complementario derivado del mismo, el segundo dominio complementario puede ser 5'-AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAA-3', o una secuencia de bases que tenga una homología parcial, es decir, al menos 50% o más con 5'-AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAA-3' (una secuencia de bases que forma una doble cadena con el primer dominio complementario está subrayada). Aquí, el segundo dominio complementario puede incluir además  $(X)_n$  y/o  $(X)_m$ , lo que da como resultado 5'- $(X)_n$ AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAA(X) $_m$ -3'. La X puede seleccionarse del grupo que consiste en las bases A, T, U y G, y cada uno de ellos y m puede representar el número de bases, en el que la n puede ser un número entero de 1 a 15, y la m puede ser un número entero de 1 a 6. Aquí,  $(X)_n$  puede representar n repeticiones de la misma base, o una mezcla de n bases de A, T, U y G. Además,  $(X)_m$  puede representar m

repeticiones de la misma base, o una mezcla de m bases de A, T, U y G.

En otra realización, el segundo dominio complementario puede tener parcialidad, es decir, al menos 50% o más, u homología completa con un primer dominio complementario de *Parcubacteria bacterium* (GWC2011\_GWC2\_44\_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyribibrio proteoclaesiicu*s, 5 *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011\_GWA\_33\_10), *Acidaminococcus* sp. (BV3L6), *Porphyromonas macacae*, *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006), *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Smilihella* sp. (SC\_KO8D17), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* (MA2020), *Francisella novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma termitum* o *Eubacterium eligens*, o un segundo dominio complementario derivado del mismo.

- 10 Por ejemplo, cuando el segundo dominio complementario es un segundo dominio complementario de *Parcubacteria bacterium* o un segundo dominio complementario derivado del mismo, el segundo dominio complementario puede ser 5'-AAAUUUCUACU-3', o una secuencia de bases que tenga una homología parcial, es decir, al menos 50% o más con 5'-AAAUUUCUACU-3' (una secuencia de bases que forma una doble cadena con el primer dominio complementario está subrayada). Aquí, el segundo dominio complementario puede incluir además (X)<sub>n</sub> y/o (X)<sub>m</sub>, lo que da como resultado 5'-(X)<sub>n</sub>AAAUUUCUACU(X)<sub>m</sub>-3'. La X puede seleccionarse del grupo que consiste en las bases A, T, U y G, y cada uno de ellos y m puede representar el número de bases, en el que entonces puede ser un número entero de 1 a 10, y m puede ser un número entero de 1 a 6. Aquí, (X)<sub>n</sub> puede representar n repeticiones de la misma base, o una mezcla de n bases de A, T, U y G. Además, (X)<sub>m</sub> puede representar m repeticiones de la misma base, o una mezcla de m bases de A, T, U y G.
- 15 20 Selectivamente, una parte o la totalidad de la secuencia de bases del segundo dominio complementario puede tener una modificación química. La modificación química puede ser metilación, acetilación, fosforilación, enlace fosforotioato, un ácido nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil 3' fosforotioato (MS) o 2'-O-metil 3'tioPACE (MSP), pero la presente invención no se limita a esto.

#### Dominio proximal

- 25 El dominio proximal es una secuencia de 1 a 20 bases ubicada adyacente al segundo dominio complementario y un dominio ubicado en la dirección del extremo 3' del segundo dominio complementario. Aquí, el dominio proximal se puede utilizar para formar una doble cadena entre secuencias de bases complementarias en el mismo.

- 30 En una realización de ejemplo, el dominio proximal puede ser una secuencia de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 bases.

En otra realización, el dominio proximal puede incluir una secuencia de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 bases.

- 35 Además, el dominio proximal puede tener homología con un dominio proximal natural, o puede derivarse del dominio proximal natural. Además, el dominio proximal puede tener una diferencia en la secuencia de bases según una especie existente en la naturaleza, puede derivarse de un dominio proximal contenido en la especie existente en la naturaleza o puede tener homología parcial o completa con el dominio proximal contenido en la especie existente en la naturaleza.

- 40 En una realización de ejemplo, el dominio proximal puede tener homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o completa con un dominio proximal de *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* o *Neisseria meningitidis*, o un dominio proximal derivado del mismo.

- 45 Por ejemplo, cuando el dominio proximal es un dominio proximal de *Streptococcus pyogenes* o un dominio proximal derivado del mismo, el dominio proximal puede ser 5'-AAGGCUAGUCCG-3', o una secuencia de bases que tenga una homología parcial, es decir, al menos 50% o más con 5'-AAGGCUAGUCCG-3'. Aquí, el dominio proximal puede incluir además (X)<sub>n</sub>, lo que da como resultado 5'-AAGGCUAGUCCG(X)<sub>n</sub>-3'. La X puede seleccionarse del grupo que consiste en las bases A, T, U y G, y luego puede representar el número de bases, que es un número entero de 1 a 15. Aquí, (X)<sub>n</sub> puede representar n repeticiones de la misma base, o una mezcla de n bases de A, T, U y G.

- 50 En aún otro ejemplo, cuando el dominio proximal es un dominio proximal de *Campylobacter jejuni* o un dominio proximal derivado del mismo, el dominio proximal puede ser 5'-AAAGAGUUUGC-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-AAAGAGUUUGC-3'. Aquí, el dominio proximal puede incluir además (X)<sub>n</sub>, lo que da como resultado 5'-AAAGAGUUUGC(X)<sub>n</sub>-3'. La X puede seleccionarse del grupo que consiste en las bases A, T, U y G, y luego puede representar el número de bases, que es un número entero de 1 a 40. Aquí, (X)<sub>n</sub> puede representar n repeticiones de la misma base, o una mezcla de n bases de A, T, U y G.

- 55 55 Selectivamente, una parte o la totalidad de la secuencia de bases del dominio proximal puede tener una modificación química. La modificación química puede ser metilación, acetilación, fosforilación, enlace

fosforotioato, un ácido nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil 3' fosforotioato (MS) o 2'-O-metil 3'tioPACE (MSP), pero la presente invención no se limita a esto.

#### Dominio de cola

El dominio de cola es un dominio que se puede agregar selectivamente al extremo 3' del ARNg monocatenario o del ARNg bicatenario. El dominio de cola puede ser una secuencia de 1 a 50 bases o incluir una secuencia de 1 a 50 bases. Aquí, el dominio de cola se puede utilizar para formar una doble cadena entre secuencias de bases complementarias en el mismo.

En una realización de ejemplo, el dominio de cola puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25, de 25 a 30, de 30 a 35, de 35 a 40, de 40 a 45 o de 45 a 50 bases.

10 En una realización de ejemplo, el dominio de cola puede incluir una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25, de 25 a 30, de 30 a 35, de 35 a 40, de 40 a 45 o de 45 a 50 bases.

Además, el dominio de cola puede tener homología con un dominio de cola natural o puede derivarse del dominio de cola natural. Además, el dominio de cola puede tener una diferencia en la secuencia de bases según una especie existente en la naturaleza, puede derivarse de un dominio de cola contenido en una especie existente en la naturaleza o puede tener homología parcial o completa con un dominio de cola contenido en una especie existente en la naturaleza.

15 En una realización de ejemplo, el dominio de cola puede tener homología parcial, es decir, al menos 50% o más, u homología completa con un dominio de cola de *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* o *Neisseria meningitidis* o un dominio de cola derivado del mismo.

20 Por ejemplo, cuando el dominio de cola es un dominio de cola de *Streptococcus pyogenes* o un dominio de cola derivado del mismo, el dominio de cola puede ser 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3', o una secuencia de bases que tiene homología parcial, es decir, al menos 50% o más con 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'. Aquí, el dominio de cola puede incluir además (X)<sub>n</sub>, lo que resulta en 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(X)<sub>n</sub>-3'. La X puede ser seleccionada del grupo que consiste en las bases A, T, U y G, y n puede representar el número de bases, que es un entero de 1 a 15. Aquí, (X)<sub>n</sub> puede representar n repeticiones de la misma base, o una mezcla de n bases como A, T, U y G.

25 En otro ejemplo, cuando el dominio de cola es un dominio de cola de *Campylobacter jejuni* o un dominio de cola derivado del mismo, el dominio de cola puede ser 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCGUUUUU-3', o una secuencia de bases que tiene una homología parcial, es decir, al menos del 50 % o más con 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCGUUUUU-3'. Aquí, el dominio de cola puede incluir además (X)<sub>n</sub>, lo que da como resultado 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCGUUUUU(X)<sub>n</sub>-3'. La X puede seleccionarse del grupo que consiste en las bases A, T, U y G, y la n puede representar el número de bases, que es un entero de 1 a 15. Aquí, (X)<sub>n</sub> puede representar n repeticiones de la misma base, o una mezcla de n bases de A, T, U y G.

30 En otra realización, el dominio de cola puede incluir una secuencia de bases 1 a 10 en el extremo 3' involucrada en un método de transcripción *in vitro* o *in vivo*.

35 40 Por ejemplo, cuando se utiliza un promotor T7 en la transcripción *in vitro* de ARNg, el dominio de cola puede ser una secuencia de bases arbitraria presente en el extremo 3' de una plantilla de ADN. Además, cuando se utiliza un promotor U6 en la transcripción *in vivo*, el dominio de cola puede ser UUUUUU, cuando se utiliza un promotor H1 en la transcripción, el dominio de cola puede ser UUUU, y cuando se utiliza un promotor pol-III, el dominio de cola puede incluir varias bases de uracilo o bases alternativas.

45 50 Selectivamente, una parte o la totalidad de la secuencia de bases del dominio de cola puede tener una modificación química. La modificación química puede ser metilación, acetilación, fosforilación, enlace fosforotioato, un ácido nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil 3' fosforotioato (MS) o 2'-O-metil 3'tioPACE (MSP), pero la presente invención no se limita a esto.

El ARNg puede incluir una pluralidad de dominios como se describió anteriormente y, por lo tanto, la longitud de la secuencia de ácido nucleico puede regularse de acuerdo con un dominio contenido en el ARNg, y pueden ocurrir interacciones en cadenas en una estructura tridimensional o forma activa del ARNg o entre estas cadenas debido a cada dominio.

El ARNg puede denominarse ARNg monocatenario (molécula de ARN única); o ARNg bicatenario (que incluye más de una, generalmente dos moléculas de ARN discretas).

ARNg bicatenario

El ARNg bicatenario consiste en una primera cadena y una segunda cadena.

Aquí, la primera cadena puede consistir en

5'-[dominio guía]-[primer dominio complementario]-3', y

5 La segunda cadena puede consistir en

5'-[segundo dominio complementario]-[dominio proximal]-3' o

5'-[segundo dominio complementario]-[dominio proximal]-[dominio de cola]-3'.

Aquí, la primera cadena puede denominarse ARNcr y la segunda cadena puede denominarse ARNtracr.

Primera cadena

10 [Dominio guía]

En la primera cadena, el dominio guía incluye una secuencia guía complementaria que puede formar un enlace complementario con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana. La secuencia guía es una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana en el gen o ácido nucleico diana, que tiene, por ejemplo, al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% o más de complementariedad o complementariedad completa. Se considera que el dominio guía permite un complejo ARNg-Cas, es decir, un complejo CRISPR para interactuar específicamente con el gen o ácido nucleico diana.

Aquí, el dominio guía puede ser una secuencia de 5 a 50 bases, o incluye una secuencia de 5 a 50 bases. Por ejemplo, el dominio guía puede ser o incluir una secuencia de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

Además, el dominio guía puede incluir una secuencia guía.

20 Aquí, la secuencia guía puede ser una secuencia de bases complementaria que es capaz de formar un enlace complementario con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana, que tiene, por ejemplo, al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% o más de complementariedad o complementariedad completa.

Aquí, la secuencia guía puede ser una secuencia de 5 a 50 bases o incluir una secuencia de 5 a 50 bases. Por ejemplo, la secuencia guía puede ser o incluir una secuencia de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

25 Selectivamente, el dominio guía puede incluir una secuencia guía y una secuencia de bases adicional.

Aquí, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 35 bases. Por ejemplo, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 bases.

En una realización de ejemplo, la secuencia de bases adicional puede incluir una base, guanina (G), o dos bases, GG.

30 Aquí, la secuencia de bases adicional puede estar ubicada en el extremo 5' del dominio guía, o en el extremo 5' de la secuencia guía.

La secuencia de bases adicional puede estar ubicada en el extremo 3' del dominio guía, o en el extremo 3' de la secuencia guía.

[Primer dominio complementario]

35 El primer dominio complementario incluye una secuencia de ácido nucleico complementaria a un segundo dominio complementario de la segunda cadena, y es un dominio que tiene suficiente complementariedad como para formar una doble cadena con el segundo dominio complementario.

Aquí, el primer dominio complementario puede ser o incluir una secuencia de 5 a 35 bases. Por ejemplo, el primer dominio complementario puede ser o incluir una secuencia de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

40 El primer dominio complementario puede tener homología con un primer dominio complementario natural, o puede ser derivado de un primer dominio complementario natural. Además, el primer dominio complementario puede tener una diferencia en la secuencia de bases según una especie existente en la naturaleza, puede derivarse del primer dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza o puede tener homología parcial o completa con el primer dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza.

En una realización de ejemplo, el primer dominio complementario puede tener homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o completa con un primer dominio complementario de *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* o *Neisseria meningitidis*, o un primer dominio complementario derivado del mismo.

- 5 Selectivamente, el primer dominio complementario puede incluir una secuencia de bases adicional que no experimenta enlace complementario con el segundo dominio complementario de la segunda cadena.

Aquí, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 15 bases. Por ejemplo, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10 o de 10 a 15 bases.

- 10 Selectivamente, una parte o la totalidad de la secuencia de bases del dominio guía y/o del primer dominio complementario puede tener una modificación química. La modificación química puede ser metilación, acetilación, fosforilación, enlace fosforotioato, un ácido nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil 3' fosforotioato (MS) o 2'-O-metil 3' tioPACE (MSP), pero la presente invención no se limita a esto.

Por lo tanto, la primera cadena puede consistir en 5'-[dominio guía]-[primer dominio complementario]-3' como se describió anteriormente.

- 15 Además, la primera cadena puede incluir opcionalmente una secuencia de bases adicional.

En un ejemplo, la primera cadena puede ser

5'-(N<sub>diana</sub>)-(Q)<sub>m</sub>-3'; o

5'-(X)<sub>a</sub>-(N<sub>diana</sub>)-(X)<sub>b</sub>-(Q)<sub>m</sub>-(X)<sub>c</sub>-3'.

- 20 Aquí, el N<sub>diana</sub> es una secuencia de bases capaz de formar un enlace complementario con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana, y una región de secuencia de bases que puede cambiarse de acuerdo con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana.

- 25 Aquí, la (Q)<sub>m</sub> es una secuencia de bases que incluye el primer dominio complementario, que puede formar un enlace complementario con el segundo dominio complementario de la segunda cadena. La (Q)<sub>m</sub> puede ser una secuencia que tenga homología parcial o completa con la primera dominio complementario de una especie existente en la naturaleza, y la secuencia de bases del primer dominio complementario puede cambiarse según la especie de origen. Las Q pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y pueden ser el número de bases, que es un entero de 5 a 35.

- 30 Por ejemplo, cuando el primer dominio complementario tiene homología parcial o completa con un primer dominio complementario de *Streptococcus pyogenes* o un primer dominio complementario derivado de *Streptococcus pyogenes*, la (Q)<sub>m</sub> puede ser 5'-GUUUUAGAGCUA-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-GUUUUAGAGCUA-3'.

- 35 En otro ejemplo, cuando el primer dominio complementario tiene homología parcial o completa con un primer dominio complementario de *Campylobacter jejuni* o un primer dominio complementario derivado de *Campylobacter jejuni*, la (Q)<sub>m</sub> puede ser 5'-GUUUUAGUCCUUUUAAUUUCUU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-GUUUUAGUCCUUUUAAUUUCUU -3'.

En todavía otro ejemplo, cuando el primer dominio complementario tiene homología parcial o completa con un primer dominio complementario de *Streptococcus thermophilus* o un primer dominio complementario derivado de *Streptococcus thermophilus*, la (Q)<sub>m</sub> puede ser 5'-GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3'.

- 40 Además, cada uno de los (X)<sub>a</sub>, (X)<sub>b</sub> y (X)<sub>c</sub> es selectivamente una secuencia de bases adicional, donde X puede seleccionarse cada uno independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y cada uno de los a, b y c puede ser el número de bases, que es 0 o un entero de 1 a 20.

Segunda cadena

- 45 La segunda cadena puede consistir en un segundo dominio complementario y un dominio proximal, e incluir selectivamente un dominio de cola.

[Segundo dominio complementario]

- 50 En la segunda cadena, el segundo dominio complementario incluye una secuencia de ácido nucleico complementaria al primer dominio complementario de la primera cadena, y tiene suficiente complementariedad para formar una doble cadena con el primer dominio complementario. El segundo dominio complementario puede incluir una secuencia de bases complementaria al primer dominio complementario y una secuencia de bases no complementaria al primer dominio complementario, por ejemplo, una secuencia de bases que no

forma una doble cadena con el primer dominio complementario, y puede tener una secuencia de bases más larga que el primer dominio complementario.

Aquí, el segundo dominio complementario puede ser una secuencia de 5 a 35 bases, o incluir una secuencia de 5 a 35 bases. Por ejemplo, el segundo dominio complementario puede ser o incluir una secuencia de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases, pero la presente invención no se limita a ello.

El segundo dominio complementario puede tener homología con un segundo dominio complementario natural o puede derivar de un segundo dominio complementario natural. Además, el segundo dominio complementario puede tener una diferencia en su secuencia de bases según una especie existente en la naturaleza, puede derivarse de un segundo dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza, o puede tener homología parcial o completa con el segundo dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza.

En una realización de ejemplo, el segundo dominio complementario puede tener homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o completa con un segundo dominio complementario de *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* o *Neisseria meningitidis*, o un segundo dominio complementario derivado del mismo.

Selectivamente, el segundo dominio complementario puede incluir además una secuencia de bases adicional que no experimenta enlace complementario con el primer dominio complementario de la primera cadena.

Aquí, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 25 bases. Por ejemplo, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20 o de 20 a 25 bases.

[Dominio proximal]

En la segunda cadena, el dominio proximal es una secuencia de 1 a 20 bases y un dominio ubicado en la dirección del extremo 3' del segundo dominio complementario. Por ejemplo, el dominio proximal puede ser o incluir una secuencia de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 bases.

Aquí, el dominio proximal puede tener un enlace de doble cadena entre secuencias de bases complementarias en el mismo.

Además, el dominio proximal puede tener homología con un dominio proximal natural o puede derivar de un dominio proximal natural. Además, el dominio proximal puede tener una diferencia en la secuencia de bases según una especie existente en la naturaleza, puede derivarse de un dominio proximal de una especie existente en la naturaleza o puede tener homología parcial o completa con el dominio proximal de una especie existente en la naturaleza.

En una realización de ejemplo, el dominio proximal puede tener homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o completa con un dominio proximal de *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* o *Neisseria meningitidis*, o un dominio proximal derivado del mismo.

[Dominio de cola]

Selectivamente, en la segunda cadena, el dominio de cola puede ser un dominio añadido selectivamente al extremo 3' de la segunda cadena, y el dominio de cola puede ser o incluir una secuencia de 1 a 50 bases. Por ejemplo, el dominio de cola puede ser o incluir una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25, de 25 a 30, de 30 a 35, de 35 a 40, de 40 a 45 o de 45 a 50 bases.

Aquí, el dominio de cola puede tener un enlace de doble cadena entre secuencias de bases complementarias en el mismo.

Además, el dominio de cola puede tener homología con un dominio de cola natural o puede derivarse de un dominio de cola natural. Además, el dominio de cola puede tener una diferencia en la secuencia de bases según una especie existente en la naturaleza, puede derivarse de un dominio de cola contenido en la especie existente en la naturaleza o puede tener homología parcial o completa con el dominio de cola contenido en la especie existente en la naturaleza.

En una realización de ejemplo, el dominio de cola puede tener homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o homología completa con un dominio de cola de *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* o *Neisseria meningitidis*, o un dominio de cola derivado del mismo.

En otra realización, el dominio de cola puede incluir una secuencia de 1 a 10 bases en el extremo 3' involucrada en un método de transcripción *in vitro* o *in vivo*.

Por ejemplo, cuando se utiliza un promotor T7 en la transcripción *in vitro* de ARNg, el dominio de cola puede ser una secuencia de bases arbitraria presente en el extremo 3' de una plantilla de ADN. Además, cuando se utiliza un promotor U6 en la transcripción *in vivo*, el dominio de cola puede ser UUUUUU, cuando se utiliza un promotor H1 en la transcripción, el dominio de cola puede ser UUUU, y cuando se utiliza un promotor pol-III, el dominio de cola puede incluir varias bases de uracilo o bases alternativas.

5 Selectivamente, una parte o la totalidad de cada una de las secuencias de bases del segundo dominio complementario, del dominio proximal y/o del dominio de cola puede tener una modificación química. La modificación química puede ser metilación, acetilación, fosforilación, enlace fosforotioato, un ácido nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil 3' fosforotioato (MS) o 2'-O-metil 3'tioPACE (MSP), pero la presente invención no se limita a ello.

10 Por lo tanto, la segunda cadena puede consistir en 5'-[segundo dominio complementario]-[dominio proximal]-3' o 5'-[segundo dominio complementario]-[dominio proximal]-[dominio de cola]-3' como se describió anteriormente.

Además, la segunda cadena puede incluir selectivamente una secuencia de bases adicional.

15 En una realización de ejemplo, la segunda cadena puede ser 5'-(Z)<sub>h</sub>-(P)<sub>k</sub>-3'; o 5'-(X)<sub>d</sub>(Z)<sub>h</sub>-(X)<sub>e</sub>-(P)<sub>k</sub>-(X)<sub>f</sub>-3'.

En otra realización, la segunda cadena puede ser 5'-(Z)<sub>h</sub>-(P)<sub>k</sub>-(F)-3'; o 5'-(X)<sub>d</sub>-(Z)<sub>h</sub>(X)<sub>e</sub>-(P)<sub>k</sub>-(X)<sub>f</sub>-(F)-3'.

20 Aquí, la (Z)<sub>h</sub> es una secuencia de bases que incluye un segundo dominio complementario, que puede formar un enlace complementario con el primer dominio complementario de la primera cadena. La (Z)<sub>h</sub> puede ser una secuencia que tenga homología parcial o completa con el segundo dominio complementario de una especie existente en la naturaleza, y la secuencia de bases del segundo dominio complementario puede modificarse según la especie de origen. La Z puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y la h puede ser el número de bases, que es un entero de 5 a 50.

25 Por ejemplo, cuando el segundo dominio complementario tiene homología parcial o completa con un segundo dominio complementario de *Streptococcus pyogenes* o un segundo dominio complementario derivado del mismo, la (Z)<sub>h</sub> puede ser 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3'.

30 En otro ejemplo, cuando el segundo dominio complementario tiene homología parcial o completa con un segundo dominio complementario de *Campylobacter jejuni* o un segundo dominio complementario derivado del mismo, la (Z)<sub>h</sub> puede ser 5'-AAGAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos un 50% o más de homología con 5'-AAGAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU-3'.

35 En todvía otro ejemplo, cuando el segundo dominio complementario tiene homología parcial o completa con un segundo dominio complementario de *Streptococcus thermophilus* o un segundo dominio complementario derivado del mismo, la (Z)<sub>h</sub> puede ser 5'-CGAAACAAACACAGCGAGUUAAAAU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-CGAAACAAACACAGCGAGUUAAAAU-3'.

40 La (P)<sub>k</sub> es una secuencia de bases que incluye un dominio proximal, que puede tener homología parcial o completa con un dominio proximal de una especie existente en la naturaleza, y la secuencia de bases del dominio proximal puede modificarse según la especie de origen. La P puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y la k puede ser el número de bases, que es un entero de 1 a 20.

45 Por ejemplo, cuando el dominio proximal tiene homología parcial o completa con un dominio proximal de *Streptococcus pyogenes* o un dominio proximal derivado del mismo, la (P)<sub>k</sub> puede ser 5'-AAGGUAGUCCG-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-AAGGUAGUCCG-3'.

50 En otro ejemplo, cuando el dominio proximal tiene homología parcial o completa con un dominio proximal de *Campylobacter jejuni* o un dominio proximal derivado del mismo, la (P)<sub>k</sub> puede ser 5'-AAAGAGUUUGC-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-AAAGAGUUUGC-3'.

45 En todvía otro ejemplo, cuando el dominio proximal tiene homología parcial o completa con un dominio proximal de *Streptococcus thermophilus* o un dominio proximal derivado de allí, la (P)<sub>k</sub> puede ser 5'-AAGGUAGUCCG-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-AAGGUAGUCCG-3'.

50 La (F)<sub>i</sub> puede ser una secuencia de bases que incluye un dominio de cola y que tiene homología parcial o completa con un dominio de cola de una especie existente en la naturaleza, y la secuencia de bases del dominio de cola puede modificarse de acuerdo con la especie de origen. La F puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y la i puede ser el número de bases, que es un entero de 1 a 50.

Por ejemplo, cuando el dominio de cola tiene homología parcial o completa con un dominio de cola de *Streptococcus pyogenes* o un dominio de cola derivado del mismo, la (F)<sub>i</sub> puede ser 5'

UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3', o una secuencia de bases que tenga al menos un 50% o más de homología con 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'.

En otro ejemplo, cuando el dominio de cola tiene homología parcial o completa con un dominio de cola de *Campylobacter jejuni* o un dominio de cola derivado del mismo, la (F)<sub>i</sub> puede ser 5'-GGGACUCUGCGGGGUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos un 50% o más de homología con 5'-GGGACUCUGCGGGGUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3'.

En todavía otro ejemplo, cuando el dominio de cola tiene homología parcial o completa con un dominio de cola de *Streptococcus thermophilus* o un dominio de cola derivado del mismo, la (F)<sub>i</sub> puede ser 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos un 50% o más de homología con 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3'.

Además, la (F)<sub>i</sub> puede incluir una secuencia de 1 a 10 bases en el extremo 3' involucrada en un método de transcripción *in vitro* o *in vivo*.

Por ejemplo, cuando se utiliza un promotor T7 en la transcripción *in vitro* de ARNg, el dominio de cola puede ser una secuencia de bases arbitraria presente en el extremo 3' de una plantilla de ADN. Además, cuando se utiliza un promotor U6 en la transcripción *in vivo*, el dominio de cola puede ser UUUUUU, cuando se utiliza un promotor H1 en la transcripción, el dominio de cola puede ser UUUU, y cuando se utiliza un promotor pol-III, el dominio de cola puede incluir varias bases de uracilo o bases alternativas.

Además, la (X)<sub>d</sub>, (X)<sub>e</sub> y (X)<sub>f</sub> pueden ser secuencias de bases agregadas selectivamente, donde X puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y cada uno de d, e y f puede ser el número de bases, que es 0 o un entero de 1 a 20.

ARNg monocatenario

El ARNg monocatenario se puede clasificar en dos tipos.

i) ARNg monocatenario

En primer lugar, existe el ARNg monocatenario en el que una primera o una segunda cadena del ARNg bicatenario está unida por un dominio de enlazador, y aquí, el ARNg monocatenario consiste en 5'-[primera cadena]-[dominio de enlazador]-[segunda cadena]-3'.

En concreto, el ARNg monocatenario puede consistir en

5'-[dominio guía]-[primer dominio complementario]-[dominio de enlazador]-[segundo dominio complementario]-[dominio proximal]-3' o

5'-[dominio guía]-[primer dominio complementario]-[dominio de enlazador]-[segundo dominio complementario]-[dominio proximal]-[dominio de cola]-3'.

Cada dominio, excepto el dominio de enlazador, es el mismo que la descripción de cada dominio de la primera y segunda cadena del ARNg bicatenario.

- Dominio de enlazador

En el ARNg monocatenario, el dominio de enlazador es un dominio que conecta una primera cadena y una segunda cadena y, específicamente, es una secuencia de ácido nucleico que conecta un primer dominio complementario con un segundo dominio complementario para producir ARNg monocatenario. Aquí, el dominio de enlazador puede estar conectado con el primer dominio complementario y el segundo dominio complementario o conectar el primer dominio complementario con el segundo dominio complementario mediante enlace covalente o no covalente.

El dominio de enlazador puede ser o incluir una secuencia de 1 a 30 bases. Por ejemplo, el dominio de enlazador puede ser o incluir una secuencia de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25 o de 25 a 30 bases.

El dominio de enlazador es adecuado para ser utilizado en una molécula de ARNg monocatenario y puede estar conectado con la primera cadena y la segunda cadena del ARNg bicatenario, o conectar la primera cadena con la segunda cadena mediante enlace covalente o no covalente para ser utilizada en la producción del ARNg monocatenario. El dominio de enlazador puede estar conectado con ARNcr y ARNtracr del ARNg bicatenario, o conectar ARNcr con ARNtracr mediante enlace covalente o no covalente para ser utilizado en la producción del ARNg monocatenario.

El dominio de enlazador puede tener homología con una secuencia natural, por ejemplo, una secuencia parcial de ARNtracr, o puede derivarse de ella.

Selectivamente, una parte o la totalidad de la secuencia de bases del dominio enlazador puede tener una modificación química. La modificación química puede ser metilación, acetilación, fosforilación, enlace fosforotioato, un ácido nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil 3' fosforotioato (MS) o 2'-O-metil 3'tioPACE (MSP), pero la presente invención no se limita a esto.

- 5 Por lo tanto, el ARNg monocatenario puede consistir en 5'-[dominio guía]-[primer dominio complementario]-[dominio de enlazador]-[segundo dominio complementario]-[dominio proximal]-3' o 5'-[dominio guía]-[primer dominio complementario]-[dominio de enlazador]-[segundo dominio complementario]-[dominio proximal]-[dominio de cola]-3' como se describió anteriormente.

Además, el ARNg monocatenario puede incluir selectivamente una secuencia de bases adicional.

- 10 En una realización de ejemplo, el ARNg monocatenario puede ser

5'-(N<sub>diana</sub>)-(Q)<sub>m</sub>-(L)<sub>j</sub>-(Z)<sub>h</sub>-(P)<sub>k</sub>-3'; o

5'-(N<sub>diana</sub>)-(Q)<sub>m</sub>-(L)<sub>j</sub>-(Z)<sub>h</sub>-(P)<sub>k</sub>-(F)<sub>l</sub>-3'.

En otra realización, el ARNg monocatenario puede ser

5'-(X)<sub>a</sub>-(N<sub>diana</sub>)-(X)<sub>b</sub>-(Q)<sub>m</sub>-(X)<sub>c</sub>-(L)<sub>j</sub>-(X)<sub>d</sub>-(Z)<sub>h</sub>-(X)<sub>e</sub>-(P)<sub>k</sub>-(X)<sub>f</sub>-3'; o

- 15 5'-(X)<sub>a</sub>-(N<sub>diana</sub>)-(X)<sub>b</sub>-(Q)<sub>m</sub>-(X)<sub>c</sub>-(L)<sub>j</sub>-(X)<sub>d</sub>-(Z)<sub>h</sub>-(X)<sub>e</sub>-(P)<sub>k</sub>-(X)<sub>f</sub>-(F)<sub>l</sub>-3'.

Aquí, N<sub>diana</sub> es una secuencia de bases capaz de formar un enlace complementario con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana, y una región de secuencia de bases capaz de cambiarse de acuerdo con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana.

- 20 La (Q)<sub>m</sub> incluye una secuencia de bases que incluye el primer dominio complementario, que es capaz de formar un enlace complementario con un segundo dominio complementario. La (Q)<sub>m</sub> puede ser una secuencia que tenga homología parcial o completa con un primer complemento dominio de una especie existente en la naturaleza, y la secuencia de bases del primer dominio complementario puede cambiarse según la especie de origen. La Q puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y m puede ser el número de bases, que es un entero de 5 a 35.

- 25 Por ejemplo, cuando el primer dominio complementario tiene homología parcial o completa con un primer dominio complementario de *Streptococcus pyogenes* o un primer dominio complementario derivado del mismo, la (Q)<sub>m</sub> puede ser 5'-GUUUUAGAGCUA-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-GUUUUAGAGCUA-3'.

- 30 En otro ejemplo, cuando el primer dominio complementario tiene homología parcial o completa con un primer dominio complementario de *Campylobacter jejuni* o un primer dominio complementario derivado del mismo, la (Q)<sub>m</sub> puede ser 5'-GUUUUAGUCCUUUUUAAAUCUU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos un 50% o más de homología con 5'-GUUUUAGUCCUUUUUAAAUCUU-3'.

- 35 En todavía otro ejemplo, cuando el primer dominio complementario tiene homología parcial o completa con un primer dominio complementario de *Streptococcus thermophilus* o un primer dominio complementario derivado del mismo, la (Q)<sub>m</sub> puede ser 5'-GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3'.

- 40 Además, la (L)<sub>j</sub> es una secuencia de bases que incluye el dominio de enlazador y que conecta el primer dominio complementario con el segundo dominio complementario, produciendo así un ARNg monocatenario. Aquí, la L puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y la j puede ser el número de bases, que es un entero de 1 a 30.

- 45 La (Z)<sub>h</sub> es una secuencia de bases que incluye el segundo dominio complementario, que puede tener un enlace complementario con el primer dominio complementario. La (Z)<sub>h</sub> puede ser una secuencia que tenga homología parcial o completa con el segundo dominio complementario de una especie existente en la naturaleza, y la secuencia de bases del segundo dominio complementario puede cambiarse según la especie de origen. La Z puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y su número de bases, que puede ser un entero de 5 a 50.

- 50 Por ejemplo, cuando el segundo dominio complementario tiene homología parcial o completa con un segundo dominio complementario de *Streptococcus pyogenes* o un segundo dominio complementario derivado del mismo, la (Z)<sub>h</sub> puede ser 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5' UAGCAAGUUAAAAU-3'.

En otro ejemplo, cuando el segundo dominio complementario tiene homología parcial o completa con un segundo dominio complementario de *Campylobacter jejuni* o un segundo dominio complementario derivado del

5 mismo, la (Z)<sub>h</sub> puede ser 5' AAGAAAUUAAAAAGGGACUAAAUAU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos un 50% o más de homología con 5'-AAGAAAUUAAAAAGGGACUAAAUAU-3'.

10 En todavía otro ejemplo, cuando el segundo dominio complementario tiene homología parcial o completa con un segundo dominio complementario de *Streptococcus thermophilus* o un segundo dominio complementario derivado del mismo, la (Z)<sub>h</sub> puede ser 5'-CGAAACAAACACAGCGAGUUAAAUAU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-CGAAACAAACACAGCGAGUUAAAUAU-3'.

15 La (P)<sub>k</sub> es una secuencia de bases que incluye un dominio proximal, que puede tener homología parcial o completa con un dominio proximal de una especie existente en la naturaleza, y la secuencia de bases del dominio proximal puede modificarse según la especie de origen. La P puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y la k puede ser el número de bases, que es un entero de 1 a 20.

20 Por ejemplo, cuando el dominio proximal tiene homología parcial o completa con un dominio proximal de *Streptococcus pyogenes* o un dominio proximal derivado del mismo, la (P)<sub>k</sub> puede ser 5'-AAGGCUAGUCCG-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-AAGGCUAGUCCG-3'.

25 En otro ejemplo, cuando el dominio proximal tiene homología parcial o completa con un dominio proximal de *Campylobacter jejuni* o un dominio proximal derivado del mismo, la (P)<sub>k</sub> puede ser 5'-AAAGAGUUUGC-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-AAAGAGUUUGC-3'.

30 En todavía otro ejemplo, cuando el dominio proximal tiene homología parcial o completa con un dominio proximal de *Streptococcus thermophilus* o un dominio proximal derivado de allí, la (P)<sub>k</sub> puede ser 5'-AAGGCUUAGUCCG-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-AAGGCUUAGUCCG-3'.

35 La (F)<sub>i</sub> puede ser una secuencia de bases que incluye un dominio de cola y que tiene homología parcial o completa con un dominio de cola de una especie existente en la naturaleza, y la secuencia de bases del dominio de cola puede modificarse de acuerdo con la especie de origen. La F puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y la i puede ser el número de bases, que es un entero de 1 a 50.

40 Por ejemplo, cuando el dominio de cola tiene homología parcial o completa con un dominio de cola de *Streptococcus pyogenes* o un dominio de cola derivado del mismo, la (F)<sub>i</sub> puede ser 5'-UUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3', o una secuencia de bases que tenga al menos un 50% o más de homología con 5'-UUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'.

45 En otro ejemplo, cuando el dominio de cola tiene homología parcial o completa con un dominio de cola de *Campylobacter jejuni* o un dominio de cola derivado del mismo, la (F)<sub>i</sub> puede ser 5'-GGGACUCUGCGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos un 50% o más de homología con 5'-GGGACUCUGCGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3'.

50 En todavía otro ejemplo, cuando el dominio de cola tiene homología parcial o completa con un dominio de cola de *Streptococcus thermophilus* o un dominio de cola derivado del mismo, la (F)<sub>i</sub> puede ser 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos un 50% o más de homología con 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3'.

Además, la (F)<sub>i</sub> puede incluir una secuencia de 1 a 10 bases en el extremo 3' involucrada en un método de transcripción *in vitro* o *in vivo*.

55 Por ejemplo, cuando se utiliza un promotor T7 en la transcripción *in vitro* de ARNg, el dominio de cola puede ser una secuencia de bases arbitraria presente en el extremo 3' de una plantilla de ADN. Además, cuando se utiliza un promotor U6 en la transcripción *in vivo*, el dominio de cola puede ser UUUUUU, cuando se utiliza un promotor H1 en la transcripción, el dominio de cola puede ser UUUU, y cuando se utiliza un promotor pol-III, el dominio de cola puede incluir varias bases de uracilo o bases alternativas.

60 Además, las (X)<sub>a</sub>, (X)<sub>b</sub>, (X)<sub>c</sub>, (X)<sub>d</sub>, (X)<sub>e</sub> y (X)<sub>f</sub> pueden ser secuencias de bases añadidas selectivamente, donde X puede seleccionarse cada una independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y cada uno de a, b, c, d, e y f puede ser el número de bases, que es 0 o un entero de 1 a 20.

## ii) ARNg monocatenario

65 En segundo lugar, el ARNg monocatenario puede ser un ARNg monocatenario que consiste en un dominio guía, un primer dominio complementario y un segundo dominio complementario, y aquí, el ARNg monocatenario puede consistir en:

70 5'-[segundo dominio complementario]-[primer dominio complementario]-[dominio guía]-3'; o

75 5'-[segundo dominio complementario]-[dominio de enlazador]-[primer dominio complementario]-[dominio guía]-3'.

- Guía de dominio

En el ARNg monocatenario, el dominio guía incluye una secuencia guía complementaria capaz de formar un enlace complementario con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana. La secuencia guía puede ser una secuencia de ácido nucleico que tenga complementariedad con la secuencia diana en el gen o ácido nucleico diana, que tenga, por ejemplo, al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% o más de complementariedad o complementariedad completa. Se considera que el dominio guía permite un complejo ARNg-Cas, es decir, un complejo CRISPR para interactuar específicamente con el gen o ácido nucleico diana.

Aquí, el dominio guía puede ser o incluir una secuencia de 5 a 50 bases. Por ejemplo, el dominio guía puede ser o incluir una secuencia de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

10 Además, el dominio guía puede incluir una secuencia guía.

Aquí, la secuencia guía puede ser una secuencia de bases complementaria capaz de formar un enlace complementario con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana, que tiene, por ejemplo, al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% o más de complementariedad o complementariedad completa.

15 Aquí, la secuencia guía puede ser o incluir una secuencia de 5 a 50 bases. Por ejemplo, La secuencia guía puede ser o incluir una secuencia de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

Selectivamente, el dominio guía puede incluir una secuencia guía y una secuencia de bases adicional.

Aquí, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 35 bases. Por ejemplo, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 bases.

20 En una realización de ejemplo, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de bases única, guanina (G), o una secuencia de dos bases, GG.

Aquí, la secuencia de bases adicional puede estar ubicada en el extremo 5' del dominio guía, o en el extremo 5' de la secuencia guía.

La secuencia de bases adicional puede estar ubicada en el extremo 3' del dominio guía, o en el extremo 3' de la secuencia guía.

25 - Primer dominio complementario

El primer dominio complementario es un dominio que incluye una secuencia de ácido nucleico complementaria al segundo dominio complementario y que tiene suficiente complementariedad para formar una doble cadena con el segundo dominio complementario.

30 Aquí, el primer dominio complementario puede ser o incluir una secuencia de 5 a 35 bases. Por ejemplo, el primer dominio complementario puede ser o incluir una secuencia de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

35 El primer dominio complementario puede tener homología con un primer dominio complementario natural o puede derivar de un primer dominio complementario natural. Además, el primer dominio complementario puede tener una diferencia en la secuencia de bases de un primer dominio complementario dependiendo de la especie existente en la naturaleza, puede derivarse de un primer dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza, o puede tener homología parcial o completa con el primer dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza.

40 En una realización de ejemplo, el primer dominio complementario puede tener homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o completa con un primer dominio complementario de *Parcubacteria bacterium* (GWC2011\_GWC2\_44\_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyrivibrio proteoclasicus*, *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011\_GWA\_33\_10), *Acidaminococcus* sp. (BV3L6), *Porphyromonas macacae*, *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006), *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Smilihella* sp. (SC\_KO8D17), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* (MA2020), *Francisella novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma thermum* o *Eubacterium eligens*, o un primer dominio complementario derivado del mismo.

45 Selectivamente, el primer dominio complementario puede incluir una secuencia de bases adicional que no experimenta enlace complementario con el segundo dominio complementario.

Aquí, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 15 bases. Por ejemplo, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 5, 5 a 10, o 10 a 15 bases.

50 - Segundo dominio complementario

El segundo dominio complementario incluye una secuencia de ácido nucleico complementaria al primer dominio complementario, y tiene suficiente complementariedad como para formar una doble cadena con el primer dominio complementario. El segundo dominio complementario puede incluir una secuencia de bases complementaria al primer dominio complementario, y una secuencia de bases que no tiene complementariedad

5 con el primer dominio complementario, por ejemplo, una secuencia de bases que no forma una doble cadena con el primer dominio complementario, y puede tener una secuencia de bases más larga que el primer dominio complementario.

Aquí, el segundo dominio complementario puede ser o incluir una secuencia de 5 a 35 bases. Por ejemplo, el 10 segundo dominio complementario puede ser una secuencia de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

El segundo dominio complementario puede tener homología con un segundo dominio complementario natural, o puede derivarse del segundo dominio complementario natural. Además, el segundo dominio complementario puede tener una diferencia en la secuencia de bases del segundo dominio complementario según una especie existente en la naturaleza, y puede derivarse del segundo dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza, o puede tener homología parcial o completa con el segundo dominio complementario contenido en la especie existente en la naturaleza.

15 En una realización de ejemplo, el segundo dominio complementario puede tener homología parcial, es decir, al menos 50% o más, o completa con un segundo dominio complementario de *Parcubacteria bacterium* (GWC2011\_GWC2\_44\_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyrivibrio proteoclaicus*, *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011\_GWA\_33\_10), *Acidaminococcus* sp. (BV3L6), *Porphyromonas macacae*, *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006), *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Smilihella* sp. (SC\_KO8D17), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* (MA2020), *Francisella novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma thermum* o *Eubacterium eligens*, o un segundo dominio complementario derivado del mismo.

20 25 Selectivamente, el segundo dominio complementario puede incluir una secuencia de bases adicional que no experimenta enlace complementario con el primer dominio complementario.

Aquí, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 15 bases. Por ejemplo, la secuencia de bases adicional puede ser una secuencia de 1 a 5, 5 a 10, o 10 a 15 bases.

- Dominio de enlazador

30 35 Selectivamente, el dominio de enlazador es una secuencia de ácido nucleico que conecta un primer dominio complementario con un segundo dominio complementario para producir ARNg monocatenario. Aquí, el dominio de enlazador puede estar conectado con el primer dominio complementario y el segundo dominio complementario, o puede conectar el primer y el segundo dominio complementario mediante enlace covalente o no covalente.

40 45 El dominio enlazador puede ser o incluir una secuencia de 1 a 30 bases. Por ejemplo, el dominio enlazador puede ser o incluir una secuencias de 1 de 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25 o de 25 a 30 bases.

Selectivamente, una parte o la totalidad de la secuencia de bases del dominio guía, el primer dominio complementario, el segundo dominio complementario y el dominio de enlazador pueden tener una modificación química. La modificación química puede ser metilación, acetilación, fosforilación, enlace fosforotioato, un ácido

45 nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil 3' fosforotioato (MS) o 2'-O-metil 3'tioPACE (MSP), pero la presente invención es no limitado a ello.

Por lo tanto, el ARNg monocatenario puede consistir en 5'-[segundo dominio complementario]-[primer dominio complementario]-[dominio guía]-3' o 5'-[segundo dominio complementario]-[dominio de enlazador]-[primer dominio complementario]-[dominio guía]-3' como se describió anteriormente.

50 55 Además, el ARNg monocatenario puede incluir selectivamente una secuencia de bases adicional.

En una realización de ejemplo, el ARNg monocatenario puede ser

5'-(Z)<sub>h</sub>-(Q)<sub>m</sub>-(N<sub>diana</sub>)-3'; o

5'-(X)<sub>a</sub>-(Z)<sub>h</sub>-(X)<sub>b</sub>-(Q)<sub>m</sub>-(X)<sub>c</sub>-(N<sub>diana</sub>)-3'.

En otra realización, el ARNg monocatenario puede ser

50 55 5'-(Z)<sub>h</sub>-(L)<sub>j</sub>-(Q)<sub>m</sub>-(N<sub>diana</sub>)-3'; o

5'-(X)<sub>a</sub>-(Z)<sub>h</sub>-(L)<sub>j</sub>-(Q)<sub>m</sub>-(X)<sub>c</sub>-(N<sub>diana</sub>)-3'.

Aquí, el  $N_{diana}$  es una secuencia de bases capaz de formar un enlace complementario con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana, y una región de secuencia de bases que puede cambiarse de acuerdo con una secuencia diana en un gen o ácido nucleico diana.

- 5 La  $(Q)_m$  es una secuencia de bases que incluye el primer dominio complementario, que es capaz de formar un enlace complementario con el segundo dominio complementario de la segunda cadena. La  $(Q)_m$  puede ser una secuencia que tenga homología parcial o completa con el primer dominio complementario de una especie existente en la naturaleza, y la secuencia de bases del primer dominio complementario puede cambiarse según la especie de origen. La Q puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y puede ser el número de bases, que es un entero de 5 a 35.
- 10 Por ejemplo, cuando el primer dominio complementario tiene homología parcial o completa con un primer dominio complementario de *Parcubacteria bacterium* o un primer dominio complementario derivado del mismo, la  $(Q)_m$  puede ser 5'-UUUGUAGAU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-UUUGUAGAU-3'.
- 15 La  $(Z)_h$  es una secuencia de bases que incluye un segundo dominio complementario, que puede formar un enlace complementario con el primer dominio complementario de la primera cadena.
- La  $(Z)_h$  puede ser una secuencia que tenga homología parcial o completa con el segundo dominio complementario de una especie existente en la naturaleza, y la secuencia de bases del segundo dominio complementario puede modificarse según la especie de origen. La Z puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y la h puede ser el número de bases, que es un entero de 5 a 50.
- 20 Por ejemplo, cuando el segundo dominio complementario tiene homología parcial o completa con un segundo dominio complementario de *Parcubacteria bacterium* o un segundo dominio complementario derivado de *Parcubacteria bacterium*, la  $(Z)_h$  puede ser 5'-AAAUUUCUACU-3', o una secuencia de bases que tenga al menos 50% o más de homología con 5'-AAAUUUCUACU-3'.
- 25 Además, la  $(L)_j$  es una secuencia de bases que incluye el dominio de enlazador, que conecta el primer dominio complementario con el segundo dominio complementario. Aquí, la L puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y la j puede ser el número de bases, que es un entero de 1 a 30.
- Además, cada uno de  $(X)_a$ ,  $(X)_b$  y  $(X)_c$  es selectivamente una secuencia de bases adicional, donde X puede seleccionarse cada uno independientemente del grupo que consiste en A, U, C y G, y a, b y c pueden ser el número de bases, que es 0 o un entero de 1 a 20.
- 30 2. Proteína editora
- Una proteína editora se refiere a un péptido, polipéptido o proteína que puede unirse directamente o interactuar con un ácido nucleico, sin unirse directamente a él. Conceptualmente, a veces se le llama "tijeras genéticas" o RGEN (endonucleasa guiada por ARN).
- El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico contenido en un ácido nucleico, gen o cromosoma diana.
- 35 El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico guía.
- La proteína editora puede ser una enzima.
- La proteína editora puede ser una proteína de fusión.
- Aquí, la proteína de fusión se refiere a una proteína producida mediante la fusión de una enzima con un dominio, péptido, polipéptido o proteína adicional.
- 40 La enzima se refiere a una proteína que incluye un dominio que es capaz de escindir un ácido nucleico, gen, cromosoma o proteína.
- La enzima puede ser una nucleasa, una proteasa o una enzima de restricción.
- El dominio, péptido, polipéptido o proteína adicional puede ser un dominio, péptido, polipéptido o proteína funcional, que tiene una función igual o diferente a la de la enzima.
- 45 La proteína de fusión puede incluir un dominio, péptido, polipéptido o proteína adicional en uno o más de un terminal N de una enzima o la proximidad del mismo; un terminal C de la enzima o la proximidad del mismo; la región media de una enzima; y una combinación de los mismos.
- La proteína de fusión puede incluir un dominio funcional, péptido, polipéptido o proteína en uno o más de un terminal N de una enzima o la proximidad del mismo; un terminal C de la enzima o la proximidad del mismo; la región media de una enzima; y una combinación de los mismos.

Aquí, el dominio funcional, péptido, polipéptido o proteína puede ser un dominio, péptido, polipéptido o proteína que tiene actividad de metilasa, actividad de desmetilasa, actividad de activación de la transcripción, actividad de represión de la transcripción, actividad de factor de liberación de la transcripción, actividad de modificación de histonas, actividad de escisión de ARN o actividad de unión de ácidos nucleicos, o un gen marcador o 5 reportero para el aislamiento y purificación de una proteína (incluyendo un péptido), pero la presente invención no se limita a esto.

El dominio funcional, péptido, polipéptido o proteína puede ser una desaminasa.

La etiqueta incluye una etiqueta de histidina (His), una etiqueta V5, una etiqueta FLAG, una etiqueta de hemaglutinina de influenza (HA), una etiqueta Myc, una etiqueta VSV-G y una etiqueta de tiorredoxina (Trx), y 10 el gen reportero incluye glutatión-S-transferasa (GST), peroxidasa de rábano picante (HRP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β-galactosidasa, β-glucuronidasa, luciferasa, proteínas autofluorescentes que incluyen la proteína fluorescente verde (GFP), HcRed, DsRed, proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente amarilla (YFP) y proteína fluorescente azul (BFP), pero la presente invención no se limita a esto.

Además, el dominio funcional, péptido, polipéptido o proteína puede ser una secuencia o señal de localización 15 nuclear (NLS) o una secuencia o señal de exportación nuclear (NES).

La NLS puede ser la NLS del antígeno T grande del virus SV40 con una secuencia de aminoácidos PKKKRKV; NLS derivada de nucleoplasmina (por ejemplo, NLS bipartita de nucleoplasmina con una secuencia KRPAATKKAGQAKKKK); NLS c-myc con una secuencia de aminoácidos PAAKRVKLD o RQRRNELKRSP; 20 NLS hRNPA1 M9 con una secuencia NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGQYFAKPRRNQGGY; una secuencia de dominio IBB derivada de importina-α RMRIZFKKNKGKDTELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV; secuencias de proteína T de mioma VSRKRPP y PPKKARED; secuencia p53 humana POPKKKPL; una secuencia c-abl IV de ratón SALIKKKKKMAP; secuencias NS1 del virus de la influenza DRLRR y PKQKKRK; una secuencia de antígeno 25 del virus-δ de la hepatitis RKLKKKIKKL; una secuencia de proteína Mx1 de ratón REKKKFLKRR; una secuencia de polimerasa poli(ADP-ribosa) humana KRKGDEVGVDEVAKKKSKK; o una secuencia de glucocorticoide del receptor de hormona esteroide (humana) RKCLQAGMNLEARKTKK, pero la presente invención no se limita a ellas.

La proteína editora puede incluir una enzima activa completa.

Aquí, la "enzima activa completa" se refiere a una enzima que tiene la misma función que una enzima de tipo salvaje y, por ejemplo, la enzima de tipo salvaje que escinde la doble cadena de ADN tiene una actividad enzimática completa para escindir por completo la doble cadena de ADN. 30

Además, la enzima activa completa incluye una enzima que tiene una función mejorada en comparación con la función de la enzima de tipo salvaje y, por ejemplo, un tipo de modificación o manipulación específica de la enzima de tipo salvaje que escinde la doble cadena de ADN tiene una actividad enzimática completa que se mejora en comparación con la enzima de tipo salvaje, es decir, la actividad de escisión de la doble cadena de ADN. 35

La proteína editora puede incluir una enzima incompleta o parcialmente activa.

Aquí, la "enzima incompleta o parcialmente activa" se refiere a una enzima que tiene algunas de las funciones de la enzima de tipo salvaje y, por ejemplo, un tipo de modificación o manipulación específica de la enzima de tipo salvaje que escinde la doble cadena de ADN tiene una actividad enzimática incompleta o parcial de escindir una parte de la doble cadena, es decir, una sola cadena de ADN. 40

La proteína editora puede incluir una enzima inactiva.

Aquí, la "enzima inactiva" se refiere a una enzima en la que se ha eliminado la función de una enzima de tipo salvaje. La enzima está completamente inactivada. Por ejemplo, un tipo específico de modificación o manipulación de la enzima de tipo salvaje que escinde la doble cadena de ADN tiene inactividad de modo que no escinde completamente la doble cadena de ADN. 45

La proteína editora puede ser una enzima natural o una proteína de fusión.

La proteína editora puede estar presente en forma de enzima natural parcialmente modificada o proteína de fusión.

50 La proteína editora puede ser una enzima o proteína de fusión producida artificialmente, que no existe en la naturaleza.

La proteína editora puede estar presente en forma de una enzima artificial parcialmente modificada o una proteína de fusión, que no existe en la naturaleza.

Aquí, la modificación puede ser sustitución, eliminación, adición de aminoácidos contenidos en la proteína editora o una combinación de ellas.

Además, la modificación puede ser sustitución, eliminación, adición de algunas bases en la secuencia de bases que codifica la proteína editora, o una combinación de ellas.

- 5 Como una realización de ejemplo de la proteína editora de la presente invención, se describirá a continuación una enzima CRISPR.

#### Enzima CRISPR

El término "enzima CRISPR" es un componente proteico principal de un sistema CRISPR-Cas y forma un complejo con ARNg, dando como resultado el sistema CRISPR-Cas.

- 10 La enzima CRISPR es un ácido nucleico o polipéptido (o una proteína) que tiene una secuencia que codifica la enzima CRISPR y, de forma representativa, se utiliza ampliamente una enzima CRISPR tipo II o una enzima CRISPR tipo V.

15 La enzima CRISPR tipo II es Cas9, que puede derivar de diversos microorganismos tales como *Actinobacteria* (por ejemplo, *Actinomyces naeslundii*), *Aquifae* Cas9, *Bacteroidetes* Cas 9, *Chlamydiae* Cas9, *Chloroflexi* Cas9, *Cyanobacteria* Cas9, *Elusimicrobia* Cas9, *Fibrobacteres* Cas9, *Firmicutes* Cas9 (por ejemplo, *Streptococcus pyogenes* Cas9, *Streptococcus thermophilus* Cas9, *Listeria innocua* Cas9, *Streptococcus agalactiae* Cas9, *Streptococcus mutans* Cas9 and *Enterococcus faecium* Cas9), *Fusobacteria* Cas9, *Proteobacteria* (por ejemplo, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*) Cas9, y *Spirochaetes* (por ejemplo, *Treponema denticola*) Cas9.

- 20 El término "Cas9" es una enzima que se une al ARNg para escindir o modificar una secuencia o posición diana en un gen o ácido nucleico diana, y puede consistir en un dominio HNH capaz de escindir una cadena de ácido nucleico que forma un enlace complementario con el ARNg, un dominio RuvC capaz de escindir una cadena de ácido nucleico que forma un enlace complementario con el ARNg, un dominio REC que reconoce un objetivo y un dominio PI que reconoce PAM. Se puede consultar Hiroshi Nishimasu et al. *Cell* (2014) 156:935-949 para conocer las características estructurales específicas de Cas9.

25 Además, la enzima CRISPR tipo V puede ser Cpf1, que puede derivarse de *Streptococcus*, *Campylobacter*, *Nitratiractor*, *Staphylococcus*, *Parvibaculum*, *Roseburia*, *Neisseria*, *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Sphaerochaeta*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Corynebacter*, *Carnobacterium*, *Rhodobacter*, *Listeria*, *Paludibacter*, *Clostridium*, *Lachnospiraceae*, *Clostridiariidium*, *Leptotrichia*, *Francisella*, *Legionella*, *Alicyclobacillus*, *Methanomethyophilus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroidetes*, *Helcococcus*, *Letospira*, *Desulfovibrio*, *Desulfonatronum*, *Opitutaceae*, *Tuberibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Methylobacterium* o *Acidaminococcus*.

- 30 El Cpf1 puede consistir en un dominio RuvC similar y que corresponde al dominio RuvC de Cas9, un dominio Nuc sin el dominio HNH de Cas9, un dominio REC que reconoce un objetivo, un dominio WED y un dominio PI que reconoce PAM. Para conocer las características estructurales específicas de Cpf1, se puede consultar Takashi Yamano et al. (2016) *Cell* 165:949-962.

La enzima CRISPR de la proteína Cas9 o Cpf1 puede aislarse de un microorganismo existente en la naturaleza o producirse de forma no natural mediante un método recombinante o sintético.

#### Enzima CRISPR Tipo II

- 40 La estructura cristalina de la enzima CRISPR tipo II se determinó de acuerdo con estudios sobre dos o más tipos de moléculas enzimáticas CRISPR de tipo II microbianas naturales (Jinek et al., *Science*, 343(6176):1247997, 2014) y estudios sobre *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) en complejo con ARNg (Nishimasu et al., *Cell*, 156:935-949, 2014; y Anders et al., *Naturaleza*, 2014, doi: 10.1038/nature13579).

- 45 La enzima CRISPR tipo II incluye dos lóbulos, es decir, el lóbulo de reconocimiento (REC) y el lóbulo de nucleasa (NUC), y cada lóbulo incluye varios dominios.

El lóbulo REC incluye un dominio de hélice puente (BH) rico en arginina, un dominio REC1 y un dominio REC2.

Aquí, el dominio BH es una hélice  $\alpha$  larga y una región rica en arginina, y los dominios REC1 y REC2 juegan un papel importante en el reconocimiento de una doble cadena formada en ARNg, por ejemplo, ARNg monocatenario, ARNg bicatenario o ARNtracr.

- 50 El lóbulo NUC incluye un dominio RuvC, un dominio HNH y un dominio de interacción PAM (PI). Aquí, el dominio RuvC abarca dominios similares a RuvC, o el dominio HNH se utiliza para incluir dominios similares a HNH.

Aquí, el dominio RuvC comparte similitud estructural con miembros de la familia de microorganismos existentes

en la naturaleza que tienen la enzima CRISPR tipo II, y escinde una sola cadena, por ejemplo, una cadena no complementaria de un gen o ácido nucleico diana, es decir, una cadena que no forma un enlace complementario con el ARNg. En la técnica, a veces se hace referencia al dominio RuvC como dominio RuvCI, dominio RuvCII o dominio RuvCIII, y generalmente se lo denomina RuvC I, RuvCII o RuvCIII. Por ejemplo, en el caso de SpCas9, el dominio RuvC se ensambla a partir de cada uno de los tres dominios RuvC divididos (RuvC I, RuvCII y RuvCIII) ubicados en las secuencias de los aminoácidos 1 a 59, 718 a 769 y 909 a 1098 de SpCas9, respectivamente.

El dominio HNH comparte similitud estructural con la endonucleasa HNH y escinde una sola cadena, por ejemplo, una cadena complementaria de una molécula de ácido nucleico diana, es decir, una cadena que forma un enlace complementario con el ARNg. El dominio HNH está ubicado entre los motivos RuvC II y III. Por ejemplo, en el caso de SpCas9, el dominio HNH está ubicado en la secuencia de aminoácidos 775 a 908 de SpCas9.

El dominio PI reconoce una secuencia de bases específica en un gen o ácido nucleico diana, es decir, un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) o interactúa con PAM. Por ejemplo, en el caso de SpCas9, el dominio PI se encuentra en la secuencia de aminoácidos 1099 a 1368 de SpCas9.

Aquí, el PAM puede variar según el origen de la enzima CRISPR tipo II. Para Por ejemplo, cuando la enzima CRISPR es SpCas9, PAM puede ser 5'-NGG-3', cuando la enzima CRISPR es *Streptococcus thermophilus* Cas9 (StCas9), PAM puede ser 5'-NNAGAAW-3' (W = A o T), cuando la enzima CRISPR es *Neisseria meningitidis* Cas9 (NmCas9), PAM puede ser 5'-NNNNGATT-3', y cuando la enzima CRISPR es *Campylobacter jejuni* Cas9 (CjCas9), PAM puede ser 5'-NNNVRYAC-3' (V = G o C o A, R = A o G, Y = C o T), donde N puede ser A, T, G o C; o A, U, G o C.

#### Enzima CRISPR tipo V

La enzima CRISPR tipo V incluye dominios RuvC similares correspondientes a los dominios RuvC de la enzima CRISPR tipo II, y puede consistir en un dominio Nuc, en lugar del dominio HNH de la enzima CRISPR tipo II, dominios REC y WED, que reconocen un objetivo, y un dominio PI que reconoce PAM. Para conocer las características estructurales específicas de la enzima CRISPR tipo V, se puede consultar Takashi Yamano et al. (2016) Cell 165:949-962.

La enzima CRISPR tipo V puede interactuar con el ARNg, formando así un complejo enzimático ARNg-CRISPR, es decir, un complejo CRISPR, y puede permitir que una secuencia guía se acerque a una secuencia diana que incluye una secuencia PAM en cooperación con el ARNg. Aquí, la capacidad de la enzima CRISPR tipo V para interactuar con un gen o ácido nucleico diana depende de la secuencia PAM.

La secuencia PAM es una secuencia presente en un gen o ácido nucleico diana, y puede ser reconocida por el dominio PI de la enzima CRISPR tipo V. La secuencia PAM puede variar según el origen de la enzima CRISPR tipo V. Es decir, existen diferentes secuencias PAM que pueden reconocerse específicamente dependiendo de una especie.

En un ejemplo, la secuencia PAM reconocida por Cpf1 puede ser 5'-TTN-3' (N es A, T, C o G).

#### Actividad enzimática CRISPR

Una enzima CRISPR escinde una cadena doble o simple de un gen o ácido nucleico diana y tiene actividad nucleasa que provoca la rotura o deleción de la cadena doble o simple. Generalmente, la enzima CRISPR tipo II de tipo salvaje o la enzima CRISPR tipo V escinde la doble cadena del gen o ácido nucleico diana.

Para manipular o modificar la actividad nucleasa descrita anteriormente de la enzima CRISPR, la enzima CRISPR puede ser manipulada o modificada, y dicha enzima CRISPR manipulada o modificada puede ser modificada para convertirla en una enzima parcialmente o incompletamente activa o inactiva.

#### Enzima parcialmente o incompletamente activa

Una enzima CRISPR modificada para cambiar la actividad enzimática, exhibiendo así una actividad incompleta o parcial, se llama nickasa.

El término "nickasa" se refiere a una enzima CRISPR manipulada o modificada para escindir solo una cadena de la doble cadena del gen o ácido nucleico diana, y la nickasa tiene actividad nucleasa para escindir una sola cadena, por ejemplo, una cadena que no es complementaria o complementaria al ARNg del gen o ácido nucleico diana. Por lo tanto, para escindir la doble cadena, se necesita la actividad nucleasa de las dos nickasas.

Por ejemplo, la nickasa puede tener actividad nucleasa por el dominio RuvC. Es decir, la nickasa puede incluir actividad nucleasa del dominio HNH y, para ello, el dominio HNH puede ser manipulado o modificado.

En un ejemplo, siempre que la enzima CRISPR sea la enzima CRISPR tipo II, cuando el residuo 840 en la secuencia de aminoácidos de SpCas9 se muta de histidina a alanina, la actividad nucleasa del dominio HNH se inactiva para usarse como una nickasa. Dado que la nickasa producida de este modo tiene actividad nucleasa del dominio RuvC, es capaz de escindir una cadena que no forma un enlace complementario con una cadena no complementaria del gen o ácido nucleico diana, es decir, ARNg.

5 En otra realización de ejemplo, cuando el residuo 559 en la secuencia de aminoácidos de CjCas9 se muta de histidina a alanina, la actividad nucleasa del dominio HNH se inactiva para usarse como una nickasa. La nickasa producida de este modo tiene actividad nucleasa mediante el dominio RuvC y, por lo tanto, es capaz de escindir una cadena no complementaria del gen o ácido nucleico diana, es decir, una cadena que no forma un enlace complementario con el ARNg.

10 Por ejemplo, la nickasa puede tener actividad nucleasa por el dominio HNH. Es decir, la nickasa puede incluir la actividad nucleasa del dominio RuvC, y para ello, el dominio RuvC puede ser manipulado o modificado.

15 En un ejemplo, siempre que la enzima CRISPR sea la enzima CRISPR tipo II, en una realización de ejemplo, cuando el residuo 10 en la secuencia de aminoácidos de SpCas9 se muta de ácido aspártico a alanina, la actividad nucleasa del dominio RuvC se inactiva para usarse como una nickasa. La nickasa producida de este modo tiene la actividad nucleasa del dominio HNH y, por lo tanto, es capaz de escindir una cadena complementaria del gen o ácido nucleico diana, es decir, una cadena que forma un enlace complementario con el ARNg.

20 En otra realización de ejemplo, cuando el residuo 8 en la secuencia de aminoácidos de CjCas9 se muta de ácido aspártico a alanina, la actividad nucleasa del dominio RuvC se inactiva para usarse como una nickasa. La nickasa producida de este modo tiene la actividad nucleasa del dominio HNH y, por lo tanto, es capaz de escindir una cadena complementaria del gen o ácido nucleico diana, es decir, una cadena que forma un enlace complementario con el ARNg.

#### Enzima inactiva

25 Una enzima CRISPR que se modifica para hacer que la actividad enzimática sea completamente inactiva se denomina una enzima CRISPR inactiva.

El término "enzima CRISPR inactiva" se refiere a una enzima CRISPR que está modificada para no escindir completamente la doble cadena del gen o ácido nucleico diana, y la enzima CRISPR inactiva tiene inactividad de nucleasa debido a la mutación en el dominio con actividad de nucleasa de la enzima CRISPR de tipo salvaje. 30 La enzima CRISPR inactiva puede ser una en la que las actividades de nucleasa del dominio RuvC y del dominio HNH estén inactivadas.

Por ejemplo, la enzima CRISPR inactiva puede manipularse o modificarse en el dominio RuvC y en el dominio HNH para inactivar la actividad de la nucleasa.

35 En un ejemplo, siempre que la enzima CRISPR sea la enzima CRISPR tipo II, en una realización de ejemplo, cuando los residuos 10 y 840 en la secuencia de aminoácidos de SpCas9 se mutan de ácido aspártico e histidina a alanina, respectivamente, las actividades de nucleasa del dominio RuvC y del dominio HNH se inactivan, de modo que la doble cadena puede no escindir completamente la doble cadena del gen o ácido nucleico diana.

40 En otra realización de ejemplo, cuando los residuos 8 y 559 en la secuencia de aminoácidos de CjCas9 se mutan de ácido aspártico e histidina a alanina, la nucleasa Las actividades del dominio RuvC y del dominio HNH se inactivan, de modo que la doble cadena puede no escindir completamente la doble cadena del gen o ácido nucleico diana.

#### Otras actividades

45 La enzima CRISPR puede tener actividad endonucleasa, actividad exonucleasa o actividad helicasa, es decir, una capacidad para recoger la estructura de hélice del ácido nucleico bicatenario, además de la actividad nucleasa descrita anteriormente.

Además, la enzima CRISPR puede modificarse para activar total, incompleta o parcialmente la actividad endonucleasa, la actividad exonucleasa o la actividad helicasa.

#### Direccionamiento de la enzima CRISPR

50 La enzima CRISPR puede interactuar con el ARNg, formando así un complejo enzimático CRISPR-ARNg, es decir, un complejo CRISPR, y conducir a una secuencia guía para acercarse a una secuencia diana que incluye una secuencia PAM en cooperación con el ARNg. Aquí, la capacidad de la enzima CRISPR para interactuar con el gen o ácido nucleico diana depende de la secuencia PAM.

La secuencia PAM es una secuencia presente en el gen o ácido nucleico diana, que puede ser reconocida por el dominio PI de la enzima CRISPR. La secuencia PAM puede variar dependiendo del origen de la enzima CRISPR. Es decir, existen diversas secuencias PAM que pueden reconocerse específicamente según la especie.

- 5 En un ejemplo, siempre que la enzima CRISPR sea la enzima CRISPR tipo II,  
 en el caso de SpCas9, la secuencia PAM puede ser 5'-NGG-3', 5'-NAG-3' y/o 5' NGA-3',  
 en el caso de StCas9, la secuencia PAM puede ser 5'-NGGNG-3' y/o 5' NNAGAAW-3' (W = A o T),  
 en el caso de NmCas9, la secuencia PAM puede ser 5'-NNNNGATT-3' y/o 5' NNNGCTT-3',  
 en el caso de CjCas9, la secuencia PAM puede ser 5'-NNNVRYYAC-3' (V = G, C o A;  
 10 R = A o G. Y = C o T)  
 en el caso de *Streptococcus mutans* Cas9 (SmCas9), la secuencia PAM puede ser 5'-NGG-3' y/o 5'-NAAR-3' (R = A o G), y  
 en el caso de *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9), la secuencia PAM puede ser 5'-NNGRR-3', 5'-NNGRRT-3' y/o 5'-NNGRRV-3' (R = A o G; V = G, C o A).

- 15 En otro ejemplo, siempre que la enzima CRISPR sea la enzima CRISPR tipo V,  
 en el caso de Cpf1, la secuencia PAM puede ser 5'-TTN-3'.  
 Aquí, la N puede ser A, T, G o C; o A, U, G o C.

20 La enzima CRISPR capaz de reconocer una secuencia PAM específica puede ser manipulada o modificada utilizando la secuencia PAM capaz de ser reconocida específicamente según la especie. Por ejemplo, el dominio PI de SpCas9 puede reemplazarse con el dominio PI de CjCas9 para tener la actividad de nucleasa de SpCas9 y reconocer una secuencia PAM específica de CjCas9, produciendo así que SpCas9 reconozca la secuencia PAM específica de CjCas9. Una secuencia PAM específicamente reconocida puede modificarse mediante sustitución o reemplazo del dominio PI.

#### Mutante de enzima CRISPR

- 25 La enzima CRISPR se puede modificar para mejorar o inhibir varias características como la actividad de nucleasa, la actividad de helicasa, la capacidad de interactuar con ARNg y la capacidad de acercarse al gen o ácido nucleico diana, por ejemplo, la capacidad de reconocimiento de PAM de la enzima CRISPR.  
 Además, el mutante de enzima CRISPR puede ser una enzima CRISPR que interactúa con ARNg para formar un complejo de enzima ARNg-CRISPR, es decir, un complejo CRISPR, y se modifica o manipula para mejorar la especificidad del objetivo, cuando se aproxima o se localiza en el gen o ácido nucleico diana, de modo que solo se escinde una cadena doble o simple del gen o ácido nucleico diana sin escisión de una cadena doble o simple de un gen o ácido nucleico no objetivo que forma parcialmente un enlace complementario con ARNg y un gen o ácido nucleico no objetivo que no forma un enlace complementario con este.

30 35 Aquí, un efecto de escisión de la cadena doble o simple del gen o ácido nucleico no objetivo que forma parcialmente un enlace complementario con el ARNg y el gen o ácido nucleico no objetivo que no forma un enlace complementario con el mismo se denomina un efecto fuera del objetivo, una posición o secuencia de bases del gen o ácido nucleico no objetivo que forma parcialmente un enlace complementario con ARNg y el gen o ácido nucleico no objetivo que no forma un enlace complementario con él se denomina fuera del objetivo. Aquí puede haber uno o más objetivos fuera de lugar. Por otra parte, el efecto de escisión de la cadena doble o simple del gen o ácido nucleico diana se denomina efecto en el objetivo, y una ubicación o secuencia diana del gen o ácido nucleico diana se denomina efecto en el objetivo.

40 45 El mutante de la enzima CRISPR está modificado en al menos uno de los aminoácidos de una enzima CRISPR ed origen natural, y puede modificarse, por ejemplo, mejorarse o inhibirse en una o más de las diversas características tales como actividad de nucleasa, actividad de helicasa, una capacidad para interactuar con ARNg, una capacidad para acercarse al gen o ácido nucleico diana y especificidad de la diana, en comparación con la enzima CRIPSR no modificada **Crispr** enzima. Aquí, la modificación puede ser sustitución, eliminación, adición de un aminoácido o una mezcla de ellas.

En el mutante de la enzima CRISPR,

50 La modificación puede ser una modificación de uno o dos o más aminoácidos ubicados en una región que consiste en aminoácidos que tienen cargas positivas, presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

Por ejemplo, la modificación puede ser una modificación de uno o dos o más aminoácidos de los aminoácidos con carga positiva, como lisina (K), arginina (R) e histidina (H), presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

5 La modificación puede ser una modificación de uno o dos o más aminoácidos ubicados en una región compuesta de aminoácidos no cargados positivamente presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

10 Por ejemplo, la modificación puede ser una modificación de uno o dos o más aminoácidos de los aminoácidos no cargados positivamente, es decir, ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), serina (S), treonina (T), asparagina (N), glutamina (Q), cisteína (C), pralina (P), glicina (G), alanina (A), valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

En otro ejemplo, la modificación puede ser una modificación de uno o dos o más aminoácidos de aminoácidos no cargados, es decir, serina (S), treonina (T), asparagina (N), glutamina (Q), cisteína (C), pralina (P), glicina (G), alanina (A), valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

15 Además, la modificación puede ser una modificación de uno o dos o más de los aminoácidos que tienen residuos hidrófobos presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

Por ejemplo, la modificación puede ser una modificación de uno o dos o más aminoácidos de glicina (G), alanina (A), valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

20 La modificación puede ser una modificación de uno o dos o más de los aminoácidos que tienen residuos polares, presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

Por ejemplo, la modificación puede ser una modificación de uno o dos o más aminoácidos de serina (S), treonina (T), asparagina (N), glutamina (Q), cisteína (C), pralina (P), lisina (K), arginina (R), histidina (H), ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E), presentes en la enzima CRISPR.

25 Además, la modificación puede ser una modificación de uno o dos o más de los aminoácidos, incluida la lisina (K), arginina (R) y la histidina (H), presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

Por ejemplo, la modificación puede ser una sustitución de uno o dos o más de los aminoácidos, incluida la lisina (K), arginina (R) y la histidina (H), presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

30 La modificación puede ser una modificación de uno o dos o más de los aminoácidos, incluido el ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E), presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

Por ejemplo, la modificación puede ser una sustitución de uno o dos o más de los aminoácidos, incluido el ácido aspártico (D) y el ácido glutámico (E), presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

35 La modificación puede ser una modificación de uno o dos o más de los aminoácidos, incluyendo serina (S), treonina (T), asparagina (N), glutamina (Q), cisteína (C), pralina (P), glicina (G), alanina (A), valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

40 Por ejemplo, la modificación puede ser una sustitución de uno o dos o más de los aminoácidos, incluyendo serina (S), treonina (T), asparagina (N), glutamina (Q), cisteína (C), pralina (P), glicina (G), alanina (A), valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

Además, la modificación puede ser una modificación de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más de los aminoácidos presentes en la enzima CRISPR de origen natural.

Además, en la enzima CRISPR mutante,

45 La modificación puede ser una modificación de uno o dos o más de los aminoácidos presentes en el dominio RuvC de la enzima CRISPR. Aquí, el dominio RuvC puede ser un dominio RuvCI, RuvCII o RuvCIII.

La modificación puede ser una modificación de uno o dos o más de los aminoácidos presentes en el dominio HNH de la enzima CRISPR.

La modificación puede ser una modificación de uno o dos o más de los aminoácidos presentes en el dominio REC de la enzima CRISPR.

50 La modificación puede ser uno o dos o más de los aminoácidos presentes en el dominio PI de la enzima

CRISPR.

La modificación puede ser una modificación de dos o más de los aminoácidos contenidos en al menos dos o más dominios de los dominios REC, RuvC, HNH y PI de la enzima CRISPR.

En un ejemplo, la modificación puede ser una modificación de dos o más de los aminoácidos contenidos en los dominios REC y RuvC de la enzima CRISPR.

En una realización de ejemplo, en el mutante SpCas9, la modificación puede ser una modificación de al menos dos o más de los aminoácidos A203, H277, G366, F539, I601, M763, D965 y F1038 contenidos en los dominios REC y RuvC de SpCas9.

En otro ejemplo, la modificación puede ser una modificación de dos o más de los aminoácidos contenidos en los dominios REC y HNH de la enzima CRISPR.

En una realización de ejemplo, en el mutante SpCas9, la modificación puede ser una modificación de al menos dos o más de los aminoácidos A203, H277, G366, F539, I601 y K890 contenidos en los dominios REC y HNH de SpCas9.

En un ejemplo, la modificación puede ser una modificación de dos o más de los aminoácidos contenidos en los dominios REC y PI de la enzima CRISPR.

En una realización de ejemplo, en el mutante SpCas9, la modificación puede ser una modificación de al menos dos o más de los aminoácidos A203, H277, G366, F539, I601, T1102 y D1127 contenidos en los dominios REC y PI de SpCas9.

En otro ejemplo, la modificación puede ser una modificación de tres o más de los aminoácidos contenidos en los dominios REC, RuvC y HNH de la enzima CRISPR.

En una realización de ejemplo, en el mutante SpCas9, la modificación puede ser una modificación de al menos tres o más de los aminoácidos A203, H277, G366, F539, I601, M763, K890, D965 y F1038 contenidos en los dominios REC, RuvC y HNH de SpCas9.

En un ejemplo, la modificación puede ser una modificación de tres o más de los aminoácidos contenidos en los dominios REC, RuvC y PI contenidos en la enzima CRISPR.

En una realización de ejemplo, en el mutante SpCas9, la modificación puede ser una modificación de al menos tres o más de los aminoácidos A203, H277, G366, F539, I601, M763, D965, F1038, T1102 y D1127 contenidos en los dominios REC, RuvC y PI de SpCas9.

En otro ejemplo, la modificación puede ser una modificación de tres o más de los aminoácidos contenidos en los dominios REC, HNH y PI de la enzima CRISPR.

En una realización de ejemplo, en el mutante SpCas9, la modificación puede ser una modificación de al menos tres o más de los aminoácidos A203, H277, G366, F539, I601, K890, T1102 y D1127 contenidos en los dominios REC, HNH y PI de SpCas9.

En un ejemplo, la modificación puede ser una modificación de tres o más de los aminoácidos contenidos en los dominios RuvC, HNH y PI de la enzima CRISPR.

En una realización de ejemplo, en el mutante SpCas9, la modificación puede ser una modificación de al menos tres o más de los aminoácidos M763, K890, D965, F1038, T1102 y D1127 contenidos en los dominios RuvC, HNH y PI de SpCas9.

En otro ejemplo, la modificación puede ser una modificación de cuatro o más de los aminoácidos contenidos en los dominios REC, RuvC, HNH y PI de la enzima CRISPR.

En una realización de ejemplo, en el mutante SpCas9, la modificación puede ser una modificación de al menos cuatro o más de los aminoácidos A203, H277, G366, F539, I601, M763, K890, D965, F1038, T1102 y D1127 contenidos en los dominios REC, RuvC, HNH y PI de SpCas9.

Además, en el mutante enzimático CRISPR,

La modificación puede ser una modificación de uno o dos o más de los aminoácidos que participan en la actividad nucleasa de la enzima CRISPR.

Por ejemplo, en el mutante SpCas9, la modificación puede ser una modificación de uno o dos o más del grupo que consiste en los aminoácidos D10, E762, H840, N854, N863 y D986, o uno o dos o más del grupo que consiste en los aminoácidos correspondientes a otros ortólogos de Cas9.

La modificación puede ser una modificación para inactivar parcialmente la actividad nucleasa de la enzima CRISPR, y dicho mutante de la enzima CRISPR puede ser una nickasa.

Aquí, la modificación puede ser una modificación para inactivar la actividad nucleasa del dominio RuvC de la enzima CRISPR, y dicho mutante de la enzima CRISPR puede no escindir una cadena no complementaria de un gen o ácido nucleico diana, es decir, una cadena que no forma un enlace complementario con el ARNg.

En una realización de ejemplo, en el caso de SpCas9, cuando el residuo 10 de la secuencia de aminoácidos de SpCas9 se muta de ácido aspártico a alanina, es decir, cuando se muta a D10A, la actividad nucleasa del dominio RuvC se inactiva y, por lo tanto, el SpCas9 puede usarse como una nickasa. La nickasa producida de este modo puede no escindir una cadena no complementaria del gen o ácido nucleico diana, es decir, una cadena que no forma un enlace complementario con el ARNg.

En otra realización de ejemplo, en el caso de CjCas9, cuando el residuo 8 de la secuencia de aminoácidos de CjCas9 se muta de ácido aspártico a alanina, es decir, cuando se muta a D8A, la actividad nucleasa del dominio RuvC se inactiva y, por lo tanto, CjCas9 puede usarse como una nickasa. La nickasa producida de este modo puede no escindir una cadena no complementaria del gen o ácido nucleico diana, es decir, una cadena que no forma un enlace complementario con el ARNg.

Además, aquí, la modificación puede ser una modificación para inactivar la actividad nucleasa del dominio HNH de la enzima CRISPR, y tal mutante de enzima CRISPR puede no escindir una cadena complementaria del gen o ácido nucleico diana, es decir, una cadena que forma un enlace complementario con el ARNg.

En una realización de ejemplo, en el caso de SpCas9, cuando el residuo 840 de la secuencia de aminoácidos de SpCas9 se muta de histidina a alanina, es decir, cuando se muta a H840A, la actividad nucleasa del dominio HNH se inactiva y, por lo tanto, el SpCas9 puede usarse como una nickasa. La nickasa producida de este modo puede no escindir una cadena complementaria del gen o ácido nucleico diana, es decir, una cadena que forma un enlace complementario con el ARNg.

En otra realización de ejemplo, en el caso de CjCas9, cuando el residuo 559 de la secuencia de aminoácidos de CjCas9 se muta de histidina a alanina, es decir, cuando se muta a H559A, la actividad nucleasa del dominio HNH se inactiva y, por lo tanto, CjCas9 puede usarse como una nickasa. La nickasa producida de este modo puede no escindir una cadena complementaria del gen o ácido nucleico diana, es decir, una cadena que forma un enlace complementario con el ARNg.

Además, la modificación puede ser una modificación para inactivar completamente la actividad nucleasa de la enzima CRISPR, y dicho mutante de enzima CRISPR puede ser una enzima CRISPR inactiva.

Aquí, la modificación puede ser una modificación para inactivar las actividades de nucleasa de los dominios RuvC y HNH de la enzima CRISPR, y dicho mutante de enzima CRISPR puede no escindir una doble cadena del gen o ácido nucleico diana.

En una realización de ejemplo, en el caso de SpCas9, cuando los residuos 10 y 840 en la secuencia de aminoácidos de SpCas9 se mutan de ácido aspártico e histidina a alanina, es decir, se mutan a D10A y H840A, respectivamente, las actividades de nucleasa del dominio RuvC y del dominio HNH se inactivan, y la doble cadena del gen o ácido nucleico diana puede no escindirse completamente.

En otra realización de ejemplo, en el caso de CjCas9, cuando los residuos 8 y 559 de la secuencia de aminoácidos de CjCas9 se mutan de ácido aspártico e histidina a alanina, es decir, se mutan a D8A y H559A, respectivamente, las actividades de nucleasa por los dominios RuvC y HNH se inactivan y, por lo tanto, es posible que la doble cadena del gen o ácido nucleico diana no se escinda por completo.

Además, el mutante de la enzima CRISPR puede incluir además un dominio funcional opcional, además de las características innatas de la enzima CRISPR, y dicho mutante de la enzima CRISPR puede tener una característica adicional además de las características innatas.

Aquí, el dominio funcional puede ser un dominio que tiene actividad de metilasa, actividad de desmetilasa, actividad de activación de la transcripción, actividad de represión de la transcripción, actividad de factor de liberación de la transcripción, actividad de modificación de histonas, actividad de escisión de ARN o actividad de unión de ácidos nucleicos, o un gen etiqueta o reportero para aislar y purificar una proteína (incluyendo un péptido), pero la presente invención no se limita a esto.

El dominio funcional, péptido, polipéptido o proteína puede ser una desaminasa.

Por ejemplo, una enzima CRISPR incompleta o parcial puede incluir además una citidina desaminasa como dominio funcional. En una realización de ejemplo, se puede agregar una citidina desaminasa, por ejemplo, el complejo de edición de apolipoproteína B 1 (APOBEC1), a la nickasa SpCas9, produciendo así una proteína de fusión. La [nickasa SpCas9] [APOBEC 1] formada de esta manera se puede utilizar en la reparación de

bases o la edición de C en T o U, o de G en A.

La etiqueta incluye una etiqueta de histidina (His), una etiqueta V5, una etiqueta FLAG, una etiqueta de hemaglutinina de influenza (HA), una etiqueta Myc, una etiqueta VSV-G y una etiqueta de tiorredoxina (Trx), y el gen reportero incluye glutatión-S-transferasa (GST), peroxidasa de rábano picante (HRP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β-galactosidasa, β-glucuronidasa, luciferasa, proteínas autofluorescentes que incluyen la proteína fluorescente verde (GFP), HcRed, DsRed, proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente amarilla (YFP) y proteína fluorescente azul (BFP), pero la presente invención no se limita a esto.

Además, el dominio funcional puede ser una secuencia o señal de localización nuclear (NLS) o una secuencia o señal de exportación nuclear (NES).

En un ejemplo, la enzima CRISPR puede incluir uno o más NLS. Aquí, uno o más NLS pueden incluirse en un terminal N de una enzima CRISPR o en su proximidad; en un terminal C de la enzima o en su proximidad; o en una combinación de ellos. La NLS puede ser una secuencia NLS derivada de las siguientes NLS, pero la presente invención no se limita a ellas: NLS de un antígeno T grande del virus SV40 que tiene la secuencia de aminoácidos PKKKRKV; NLS de nucleoplasmina (por ejemplo, NLS bipartita de nucleoplasmina que tiene la secuencia KRPAATKKAGQAKKKK); NLS c-myc que tiene la secuencia de aminoácidos PAAKRVKLD o RQRRNELKRSP; NLS hRNPA1 M9 que tiene la secuencia NQSSNFGPMKGGNFGRSSGPYGGGQYFAKPRRNQGGY; la secuencia RMRIZFKNKGKDTELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV del dominio IBB de importina-α; las secuencias VSRKRPRP y PPKKARED de una proteína T de mioma; la secuencia POPKKKPL del p53 humano; la secuencia SALIKKKKKMAP de ratón c-ab1 IV; las secuencias DRLRR y PKQKKRK del virus de la influenza NS1; la secuencia RKLKKKKKKL de un antígeno del virus de la hepatitis delta; la secuencia REKKKFLKRR de una proteína Mx1 de ratón; la secuencia KRKGDEVGVDEVAKKKSKK de una poli (ADP-ribosa) polimerasa humana; o la secuencia NLS RKCLQAGMNLEARTKK, derivada de una secuencia de un glucocorticoide del receptor de hormona esteroide (humano).

Además, el mutante de la enzima CRISPR puede incluir una enzima CRISPR de tipo dividido preparada dividiendo la enzima CRISPR en dos o más partes. El término "división" se refiere a la división funcional o estructural de una proteína o a la división aleatoria de una proteína en dos o más partes.

Aquí, la enzima CRISPR de tipo dividido puede ser una enzima completamente, incompleta o parcialmente activa, o una enzima inactiva.

Por ejemplo, la SpCas9 puede dividirse en dos partes entre el residuo 656, tirosina, y el residuo 657, treonina, generando así una SpCas9 dividida.

Además, la enzima CRISPR de tipo dividido puede incluir selectivamente un dominio, péptido, polipéptido o proteína adicional para su reconstitución.

Aquí, la "reconstitución" se refiere a la formación de la enzima CRISPR de tipo dividido para que sea estructuralmente igual o similar a la enzima CRISPR de tipo salvaje.

El dominio, péptido, polipéptido o proteína adicional para la reconstitución pueden ser dominios de dimerización FRB y FKBP; dominios inteína; ERT y VPR; o dominios que forman un heterodímero en condiciones específicas.

Por ejemplo, el SpCas9 puede dividirse en dos partes entre el residuo 713, serina, y el residuo 714, glicina, generando así un SpCas9 dividido. El dominio FRB puede estar conectado a una de las dos partes y el dominio FKBP puede estar conectado a la otra. En la división SpCas9 producida de esta manera, el dominio FRB y el dominio FKBP pueden formarse en un dímero en un entorno en el que está presente la rapamicina, produciendo así una enzima CRISPR reconstituida.

La enzima CRISPR o el mutante de la enzima CRISPR descrito en la presente invención puede ser un polipéptido, una proteína o un ácido nucleico que tiene una secuencia que lo codifica, y puede estar optimizado en codones para que un sujeto introduzca la enzima CRISPR o el mutante de la enzima CRISPR.

El término "optimización de codones" se refiere a un proceso de modificación de una secuencia de ácido nucleico manteniendo una secuencia de aminoácidos nativa mientras se reemplaza al menos un codón de la secuencia nativa con un codón más frecuente o el más frecuentemente utilizado en las células huésped para mejorar la expresión en las células huésped. Una variedad de especies tienen un sesgo específico hacia un codón específico de un aminoácido específico, y el sesgo de codón (la diferencia en el uso de codones entre organismos) se correlaciona frecuentemente con la eficiencia de la traducción del ARNm, que se considera que depende de la característica de un codón traducido y la disponibilidad de una molécula de ARNt específica. El dominio del ARNt seleccionado en las células generalmente refleja los codones utilizados con mayor frecuencia en la síntesis de péptidos. Por lo tanto, un gen puede personalizarse mediante la expresión genética óptima en un organismo determinado basándose en la optimización de codones.

## 3. Secuencia diana

El término "secuencia diana" es una secuencia de bases presente en un gen o ácido nucleico diana, y tiene complementariedad con una secuencia guía contenida en un dominio guía de un ácido nucleico guía. La secuencia diana es una secuencia de bases que puede variar de acuerdo con un gen o ácido nucleico diana, es decir, un sujeto para la manipulación o corrección genética, que puede diseñarse en diversas formas de acuerdo con el gen o ácido nucleico diana.

La secuencia diana puede formar un enlace complementario con la secuencia guía contenida en el dominio guía del ácido nucleico guía, y una longitud de la secuencia diana puede ser la misma que la de la secuencia guía.

10 La secuencia diana puede ser una secuencia de 5 a 50 bases.

En una realización, la secuencia diana puede ser una secuencia de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 bases.

La secuencia diana puede ser una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia guía contenida en el dominio guía del ácido nucleico guía, que tiene, por ejemplo, al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% o más de complementariedad o complementariedad completa.

En un ejemplo, la secuencia diana puede ser o incluir una secuencia de 1 a 8 bases, que no es complementaria a la secuencia guía contenida en el dominio guía del ácido nucleico guía.

Además, la secuencia diana puede ser una secuencia de bases adyacente a una secuencia de ácido nucleico que puede ser reconocida por una proteína editora.

20 En un ejemplo, la secuencia diana puede ser una secuencia continua de 5 a 50 bases adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico que puede ser reconocida por la proteína editora.

En una realización de ejemplo, se describirán a continuación las secuencias diana para un complejo enzimático ARNg-CRISPR.

Cuando el complejo enzimático ARNg-CRISPR se dirige al gen o ácido nucleico diana,

25 La secuencia diana tiene complementariedad con la secuencia guía contenida en el dominio guía del ARNg. La secuencia diana es una secuencia de bases que varía según el gen o ácido nucleico diana, es decir, un objeto de manipulación o corrección genética, que puede diseñarse de diversas formas según el gen o ácido nucleico diana.

Además, la secuencia diana puede ser una secuencia de bases adyacente a una secuencia PAM que puede ser reconocida por la enzima CRISPR, es decir, Cas9 o Cpf1.

En un ejemplo, la secuencia diana puede ser una secuencia continua de 5 a 50 bases adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia PAM que es reconocida por la enzima CRISPR.

En una realización de ejemplo, cuando la enzima CRISPR es SpCas9, la secuencia diana puede ser una secuencia continua de 16 a 25 bases adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de una secuencia 5'-NGG-3', 5'-NAG-3' y/o 5'-NGA-3' (N = A, T, G o C; o A, U, G o C).

En otra realización de ejemplo, cuando la enzima CRISPR es StCas9, la secuencia diana puede ser una secuencia continua de 16 a 25 bases adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de una secuencia 5'-NGNG-3' y/o 5'-NNAGAAW-3' (W = A o T, y N = A, T, G o C; o A, U, G o C).

40 En todavía otra realización de ejemplo, cuando la enzima CRISPR es NmCas9, la secuencia diana puede ser una secuencia continua de 16 a 25 bases adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de una secuencia 5'-NNNNGATT-3' y/o 5'-NNNGCTT-3' (N= A, T, G o C; o A, U, G o C).

En una realización de ejemplo, cuando la enzima CRISPR es CjCas9, la secuencia diana puede ser una secuencia continua de 16 a 25 bases adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de un 5'-NNNVRVAC-3' (V = G, C o A; R = A o G, Y = C o T, N = A, T, G o C; o A, U, G o C).

45 En otra realización de ejemplo, cuando la enzima CRISPR es SmCas9, la secuencia diana puede ser una secuencia continua de 16 a 25 bases adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de una secuencia 5'-NGG-3' y/o 5'-NAAR-3'(R = A o G, N = A, T, G o C; o A, U, G o C).

En otra realización de ejemplo, cuando la enzima CRISPR es SaCas9, la secuencia diana puede ser una secuencia continua de 16 a 25 bases adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de una secuencia 5'-NNGRR-3', 5'-NNGRRT-3' y/o 5'-NNGRRV-3' (R = A o G, V = G, C o A, N= A, T, G o C; o A, U, G o C).

En una realización de ejemplo, cuando la enzima CRISPR es Cpf1, la secuencia diana puede ser una secuencia continua de 16 a 25 bases adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de una secuencia 5'-TTN-3' (N = A, T, G o C; o A, U, G o C).

**4. Complejo de proteína editora-ácido nucleico guía y su uso**

5 Un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede modificar un objetivo.

El objetivo puede ser un ácido nucleico, un gen, un cromosoma o una proteína diana.

Por ejemplo, el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía se puede utilizar para regular en última instancia (por ejemplo, inhibir, suprimir, reducir, aumentar o promover) la expresión de una proteína de interés, eliminar una proteína, regular (por ejemplo, inhibir, suprimir, reducir, aumentar o promover) la actividad de una proteína o expresar una nueva proteína.

10 Aquí, el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede actuar a nivel de ADN, ARN, genes o cromosomas.

Por ejemplo, el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede regular (por ejemplo, inhibir, suprimir, reducir, aumentar o promover) la expresión de una proteína codificada por el ADN diana, eliminar una proteína, regular (por ejemplo, inhibir, suprimir, reducir, aumentar o promover) la actividad de la proteína o expresar una proteína modificada a través de la manipulación o modificación del ADN diana.

15 En otro ejemplo, el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede regular (por ejemplo, inhibir, suprimir, reducir, aumentar o promover) la expresión de una proteína codificada por el ADN diana, eliminar una proteína, regular (por ejemplo, inhibir, suprimir, reducir, aumentar o promover) la actividad de la proteína o expresar una proteína modificada a través de la manipulación o modificación del ARN objetivo.

20 En otro ejemplo, el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede regular (por ejemplo, inhibir, suprimir, reducir, aumentar o promover) la expresión de una proteína codificada por el ADN diana, eliminar una proteína, regular (por ejemplo, inhibir, suprimir, reducir, aumentar o promover) la actividad de la proteína o expresar una proteína modificada a través de la manipulación o modificación de un gen diana.

25 En otro ejemplo, el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede regular (por ejemplo, inhibir, suprimir, reducir, aumentar o promover) la expresión de una proteína codificada por el ADN diana, eliminar una proteína, regular (por ejemplo, inhibir, suprimir, reducir, aumentar o promover) la actividad de una proteína o expresar una proteína modificada a través de la manipulación o modificación de un cromosoma diana.

30 El complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede actuar en las etapas de transcripción y traducción de genes.

35 En un ejemplo, el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede promover o suprimir la transcripción de un gen diana, regulando así (por ejemplo, inhibiendo, suprimiendo, reduciendo, aumentando o promoviendo) la expresión de una proteína codificada por el gen diana.

40 En otro ejemplo, el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede promover o suprimir la traducción de un gen diana, regulando así (por ejemplo, inhibiendo, suprimiendo, reduciendo, aumentando o promoviendo) la expresión de una proteína codificada por el gen diana.

El complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede actuar a nivel proteico.

45 En un ejemplo, el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede manipular o modificar una proteína diana, eliminando así la proteína diana o regulando (por ejemplo, inhibiendo, suprimiendo, reduciendo, aumentando o promoviendo) la actividad de la proteína.

Como ejemplo específico del uso del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía de la presente invención, se divulga a continuación la manipulación o modificación del ADN, ARN, gen o cromosoma diana utilizando el complejo enzimático ARNg-CRISPR.

**Manipulación genética**

45 Un gen o ácido nucleico diana puede manipularse o corregirse utilizando el complejo enzimático ARNg-CRISPR descrito anteriormente, es decir, el complejo CRISPR. Aquí, la manipulación o corrección del gen o ácido nucleico diana incluye todas las etapas de i) escisión o daño del gen o ácido nucleico diana y ii) reparación del gen o ácido nucleico diana dañado.

i) Escisión o daño del gen o ácido nucleico diana

50 i) La escisión o daño del gen o ácido nucleico diana puede ser la escisión o daño del gen o ácido nucleico diana

utilizando el complejo CRISPR y, en particular, la escisión o daño de una secuencia diana en el gen o ácido nucleico diana.

En un ejemplo, la escisión o daño del gen o ácido nucleico diana utilizando el complejo CRISPR puede ser una escisión completa o un daño a la doble cadena de una secuencia diana.

5 En una realización de ejemplo, cuando se utiliza SpCas9 de tipo salvaje, la doble cadena de una secuencia diana que forma un enlace complementario con ARNg puede escindirse completamente.

En otra realización de ejemplo, cuando se utilizan la nickasa SpCas9 (D10A) y la nickasa SpCas9 (H840A), una cadena sencilla complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (D10A), y una cadena sencilla no complementaria de la secuencia diana que forma un enlace complementario con el ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (H840A), y las escisiones pueden tener lugar de forma secuencial o simultánea.

10 En otra realización de ejemplo, cuando se utilizan la nickasa SpCas9 (D10A) y la nickasa SpCas9 (H840A), y dos ARNg que tienen diferentes secuencias diana, una cadena sencilla complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el primer ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (D10A), una cadena sencilla no complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el segundo ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (H840A), y las escisiones pueden tener lugar de forma secuencial o simultánea.

15 En otro ejemplo, la escisión o daño de un gen o ácido nucleico diana utilizando el complejo CRISPR puede ser una escisión o daño a solo la cadena única de una secuencia diana. Aquí, la cadena única puede ser una cadena única complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el ARNg, o una cadena única no complementaria de la secuencia diana que forma un enlace complementario con el ARNg.

20 En una realización de ejemplo, cuando se utiliza la nickasa SpCas9 (D10A), una cadena sencilla complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (D10A), pero una cadena sencilla no complementaria de la secuencia diana que forma un enlace complementario con el ARNg puede no ser escindida.

25 En otra realización de ejemplo, cuando se utiliza la nickasa SpCas9 (H840A), una cadena sencilla no complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el ARNm puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (H840A), pero una cadena sencilla complementaria de la secuencia diana que forma un enlace complementario con el ARNg no puede ser escindida.

30 En todavía otro ejemplo, la escisión o daño de un gen o ácido nucleico diana utilizando el complejo CRISPR puede ser la eliminación parcial de un fragmento de ácido nucleico.

35 En una realización de ejemplo, cuando se utilizan dos ARNg que tienen diferentes secuencias diana y SpCas9 de tipo salvaje, se puede escindir una doble cadena de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el primer ARNg, y se puede escindir una doble cadena de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el segundo ARNg, lo que da como resultado la eliminación de fragmentos de ácido nucleico por el primer y segundo ARNg y SpCas9.

40 En otra realización de ejemplo, cuando se utilizan dos ARNg que tienen diferentes secuencias diana, SpCas9 de tipo salvaje, nickasa SpCas9 (D10A) y nickasa SpCas9 (H840A), una doble cadena de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el primer ARNg puede ser escindida por el SpCas9 de tipo salvaje, una cadena sencilla complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el segundo ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (D10A), y una cadena sencilla no complementaria puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (H840A), lo que da como resultado la eliminación de fragmentos de ácido nucleico por el primer y segundo ARNg, el SpCas9 de tipo salvaje, la nickasa SpCas9 (D10A) y la nickasa SpCas9 (H840A).

45 En todavía otra realización de ejemplo, cuando se utilizan dos ARNg que tienen diferentes secuencias diana, la nickasa SpCas9 (D10A) y la nickasa SpCas9 (H840A), una cadena sencilla complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el primer ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (D10A), una cadena sencilla no complementaria puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (H840A), una doble cadena complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el segundo ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (D10A), y una cadena sencilla no complementaria puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (H840A), lo que da como resultado la eliminación de fragmentos de ácido nucleico por el primer y el segundo ARNg, la nickasa SpCas9 (D10A) y la nickasa SpCas9 (H840A).

55 En aún otra realización de ejemplo, cuando se utilizan tres ARNg que tienen diferentes secuencias diana, SpCas9 de tipo salvaje, SpCas9 nickasa (D10A) y SpCas9 nickasa (H840A), una doble cadena de una secuencia diana forma un enlace complementario. con el primer ARNg puede ser escindido por el SpCas9 de tipo salvaje, una cadena sencilla complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario

con el segundo ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (D10A), y una cadena sencilla no complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el tercer ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (H840A), lo que da como resultado la eliminación de fragmentos de ácido nucleico por el primer ARNg, el segundo ARNg, el tercer ARNg, el SpCas9 de tipo salvaje, la nickasa SpCas9 (D10A) y la nickasa SpCas9 (H840A).

En aún otra realización de ejemplo, cuando se utilizan cuatro ARNg que tienen diferentes secuencias diana, la nickasa SpCas9 (D10A) y la nickasa SpCas9 (H840A), una cadena sencilla complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el primer ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (D10A), una cadena sencilla no complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el segundo ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (H840A), una cadena sencilla complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el tercer ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (D10A), y una cadena sencilla no complementaria de una secuencia diana que forma un enlace complementario con el cuarto ARNg puede ser escindida por la nickasa SpCas9 (H840A), lo que da como resultado la eliminación de fragmentos de ácido nucleico por el primer ARNg, el segundo ARNg, el tercer ARNg, el cuarto ARNg, la nickasa SpCas9 (D10A) y la nickasa SpCas9 (H840A).

ii) Reparación o restauración de un gen o ácido nucleico diana dañado

El gen o ácido nucleico diana escindido o dañado por el complejo CRISPR puede repararse o restaurarse mediante NHEJ y reparación dirigida por homología (HDR).

Unión de extremos no homólogos (NHEJ)

NHEJ es un método de restauración o reparación de roturas de doble cadena en el ADN mediante la unión de ambos extremos de una cadena doble o simple escindida y, generalmente, cuando dos extremos compatibles formados por la rotura de la doble cadena (por ejemplo, escisión) están frecuentemente en contacto entre sí para unir completamente los dos extremos, se recupera la doble cadena rota. El NHEJ es un método de restauración que se puede utilizar en todo el ciclo celular, y generalmente ocurre cuando no hay un genoma homólogo que pueda usarse como plantilla en las células, como la fase G1.

En el proceso de reparación del gen o ácido nucleico dañado mediante NHEJ, se producen algunas inserciones y/o delecciones (indels) en la secuencia de ácido nucleico en la región reparada por NHEJ; dichas inserciones y/o delecciones provocan que el marco principal se desplace, lo que da como resultado un ARNm del transcriptoma con marco desplazado. Como resultado, las funciones innatas se pierden debido a una descomposición mediada por sinsentidos o al fracaso en la síntesis de proteínas normales. Además, aunque se mantiene el marco principal, pueden producirse mutaciones en las que se pueda provocar la inserción o delección de una cantidad considerable de secuencia que destruyen la funcionalidad. La mutación depende del locus porque la mutación en un dominio funcional significativo es probablemente menos tolerada que las mutaciones en una región no significativa de una proteína.

Si bien es imposible esperar mutaciones indel producidas por NHEJ en un estado natural, se prefiere una secuencia indel específica en una región rota determinada y puede provenir de una pequeña región de microhomología. Convencionalmente, la longitud de delección varía de 1 pb a 50 pb, las inserciones tienden a ser más cortas y con frecuencia incluyen una secuencia de repetición corta que rodea directamente una región rota.

Además, el NHEJ es un proceso que provoca una mutación y, cuando no es necesario para producir una secuencia final específica, puede utilizarse para eliminar un motivo de la secuencia pequeña.

Una inactivación específica de un gen al que se direcciona el complejo CRISPR puede realizarse utilizando dicho NHEJ. Una doble cadena o dos cadenas simples de un gen o ácido nucleico diana se pueden escindir utilizando la enzima CRISPR como Cas9 o Cpf1, y la doble cadena rota o las dos cadenas simples del gen o ácido nucleico diana pueden tener indeles a través del NHEJ, induciendo así la eliminación específica del gen o ácido nucleico diana. Aquí, el sitio de un gen o ácido nucleico diana escindido por la enzima CRISPR puede ser una región codificante o no codificante y, además, el sitio del gen o ácido nucleico diana restaurado por NHEJ puede ser una región codificante o no codificante.

Reparación dirigida por homología (HDR)

HDR es un método de corrección sin error, que utiliza una secuencia homóloga como plantilla para reparar o restaurar un gen o ácido nucleico dañado, y en general, para reparar o restaurar ADN roto, es decir, para restaurar la información innata de las células, el ADN roto se repara utilizando información de una secuencia de bases complementaria que no está modificada o información de una cromátida hermana. El tipo más común de la HDR es la recombinación homóloga (HR). La HDR es un método de reparación o restauración que generalmente ocurre en la fase S o G2/M de células en división activa.

Para reparar o restaurar el ADN dañado utilizando HDR, en lugar de utilizar una secuencia de bases

complementaria o cromatina hermana de las células, se puede proporcionar a las células una plantilla de ADN sintetizada artificialmente utilizando información de una secuencia de bases complementaria o una secuencia de bases homóloga, es decir, una plantilla de ácido nucleico que incluye una secuencia de bases complementaria o una secuencia de bases homóloga, reparando así el ADN roto. Aquí, cuando una secuencia de ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico se añade además a la plantilla de ácido nucleico para reparar el ADN roto, la secuencia de ácido nucleico o el fragmento de ácido nucleico añadido además al ADN roto se puede someter a reemplazo. La secuencia de ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico adicional puede ser una secuencia de ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico para corregir el gen o ácido nucleico diana modificado por una mutación a un gen o ácido nucleico normal, o un gen o ácido nucleico que se expresará en células, pero la presente invención no se limita a esto.

En un ejemplo, una cadena doble o simple de un gen o ácido nucleico diana puede escindirse utilizando el complejo CRISPR, se puede proporcionar a las células una plantilla de ácido nucleico que incluye una secuencia de bases complementaria a una secuencia de bases adyacente al sitio de escisión, y la secuencia de bases escindida del gen o ácido nucleico diana puede repararse o restaurarse mediante HDR.

Aquí, la plantilla de ácido nucleico que incluye la secuencia de bases complementaria puede tener ADN roto, es decir, una cadena doble o simple escindida de una secuencia de bases complementaria, e incluir además una secuencia de ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico que se insertará en el ADN roto. Una secuencia de ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico adicional se puede insertar en un sitio escindido del ADN roto, es decir, el gen o ácido nucleico diana utilizando la plantilla de ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico que se insertará en la secuencia de bases complementaria. Aquí, la secuencia de ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico que se va a insertar y la secuencia de ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico adicional puede ser una secuencia de ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico para corregir un gen o ácido nucleico diana modificado por una mutación a un gen o ácido nucleico normal o un gen o ácido nucleico que se va a expresar en células. La secuencia de bases complementaria puede ser una secuencia de bases que tenga enlaces complementarios con el ADN roto, es decir, secuencias de bases derecha e izquierda de la cadena doble o simple escindida del gen o ácido nucleico diana. Alternativamente, la secuencia de bases complementaria puede ser una secuencia de bases que tenga enlaces complementarios con el ADN roto, es decir, los extremos 3' y 5' de la cadena doble o simple escindida del gen o ácido nucleico diana. La secuencia de bases complementaria puede ser una secuencia de 15 a 3000 bases, y la longitud o el tamaño de la secuencia de bases complementaria puede diseñarse adecuadamente de acuerdo con el tamaño de la plantilla de ácido nucleico o del gen diana. Aquí, como plantilla de ácido nucleico, se puede utilizar un ácido nucleico de cadena doble o simple, o puede ser lineal o circular, pero la presente invención no se limita a ello.

En otro ejemplo, un gen o ácido nucleico diana de cadena simple o doble se escinde utilizando el complejo CRISPR, se proporciona a las células una plantilla de ácido nucleico que incluye una secuencia de bases homóloga con una secuencia de bases adyacente a un sitio de escisión, y la secuencia de bases escindida del gen o ácido nucleico diana puede repararse o restaurarse mediante (HDR).

Aquí, la plantilla de ácido nucleico que incluye la secuencia de bases homóloga puede ser ADN roto, es decir, una secuencia de bases homóloga monocatenaria o bicatenaria escindida, e incluir además una secuencia de ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico que se insertará en el ADN roto. Una secuencia de ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico adicional se puede insertar en el ADN roto, es decir, un sitio escindido de un gen o ácido nucleico diana utilizando la plantilla de ácido nucleico que incluye una secuencia de bases homóloga y una secuencia de ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico que se insertará. Aquí, la secuencia de ácido nucleico o el fragmento de ácido nucleico que se va a insertar y la secuencia de ácido nucleico o el fragmento de ácido nucleico adicional pueden ser una secuencia de ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico para corregir un gen o ácido nucleico diana modificado por una mutación a un gen o ácido nucleico normal o un gen o ácido nucleico que se va a expresar en células. La secuencia de bases homóloga puede ser ADN roto, es decir, una secuencia de bases que tiene homología con una secuencia de bases bicatenaria escindida o secuencias de bases monocatenarias derechas e izquierdas de un gen o ácido nucleico diana. Alternativamente, la secuencia de bases complementaria puede ser una secuencia de bases que tenga homología con el ADN roto, es decir, los extremos 3' y 5' de una cadena doble o simple escindida de un gen o ácido nucleico diana. La secuencia de bases homóloga puede ser una secuencia de 15 a 3000 bases, y una longitud o tamaño de la secuencia de bases homóloga puede diseñarse adecuadamente de acuerdo con un tamaño de la plantilla de ácido nucleico o un gen o ácido nucleico diana. Aquí, como plantilla de ácido nucleico, se puede utilizar un ácido nucleico de cadena doble o simple y puede ser lineal o circular, pero la presente invención no se limita a esto.

Aparte del NHEJ y HDR, existen métodos para reparar o restaurar el ADN dañado.

Recocido monocatenario (SSA)

SSA es un método de reparación de roturas de doble cadena entre dos secuencias repetidas presentes en un ácido nucleico diana y generalmente utiliza una secuencia repetida de más de 30 bases. La secuencia repetida

se escinde (para tener extremos pegajosos) para tener una sola cadena con respecto a una doble cadena del ácido nucleico diana en cada uno de los extremos rotos, y después de la escisión, un saliente de una sola cadena que contiene la secuencia repetida se recubre con una proteína RPA de tal manera que se impide que las secuencias repetidas sean recocidas de manera inapropiada entre sí. RAD52 se une a cada secuencia repetida en el saliente y se organiza una secuencia capaz de recocerse a una secuencia repetida complementaria. Después del recocido, se escinde un saliente monocatenario del saliente y la síntesis de ADN nuevo llena una cierta brecha para restaurar una doble cadena de ADN. Como resultado de esta reparación, se deleciona una secuencia de ADN entre dos repeticiones, y la longitud de la deleción puede depender de varios factores, incluidas las ubicaciones de las dos repeticiones utilizadas en este documento y una ruta o grado del progreso de la escisión.

5 SSA, similar a HDR, utiliza una secuencia complementaria, es decir, una secuencia de repetición complementaria, y, por el contrario, no requiere una plantilla de ácido nucleico para modificar o corregir una secuencia de ácido nucleico diana.

#### Reparación de rotura de cadena sencilla (SSBA)

10 Las roturas de una sola cadena en un genoma se reparan a través de un mecanismo separado, SSBR, de los mecanismos de reparación descritos anteriormente. En el caso de roturas de ADN de una sola cadena, PARP1 y/o PARP2 reconocen las roturas y reclutan un mecanismo de reparación. La unión de PARP1 y la actividad con respecto a las roturas de ADN son temporales y la SSBR se promueve promoviendo la estabilidad de un complejo de proteína SSBR en las regiones dañadas. La proteína más importante del complejo SSBR es XRCC1, que interactúa con una proteína que promueve el procesamiento de los extremos 3' y 5' del ADN para estabilizar el ADN. El procesamiento de los extremos generalmente está involucrado en la reparación del extremo 3' dañado a un estado hidroxilado, y/o el extremo 5' dañado a una fracción fosfática, y después de que se procesan los extremos, se produce el llenado de las brechas en el ADN. Hay dos métodos para llenar las brechas del ADN, es decir, la reparación de parche corto y la reparación de parche largo, y la reparación de parche corto implica la inserción de una sola base. Después de llenar las brechas en el ADN, una ligasa de ADN promueve la unión de los extremos.

#### Reparación de no coincidencias (MMR)

15 La MMR trabaja sobre bases de ADN no coincidentes. Cada uno de un complejo MSH2/6 o MSH2/ tiene actividad ATPasa y, por lo tanto, juega un papel importante en el reconocimiento de una no coincidencia e inicio de una reparación, y el MSH2/6 reconoce principalmente no coincidencias base-base e identifica una o dos no coincidencias de bases, pero el MSH2/3 reconoce principalmente una no coincidencia más grande.

#### Reparación por escisión de base (BER)

20 BER es un método de reparación que está activo durante todo el ciclo celular y se utiliza para eliminar una pequeña región dañada de la base que no distorsiona la hélice del genoma. En el ADN dañado, las bases dañadas se eliminan escindiendo un enlace N-glucósido que une una base a la cadena principal de fosfato-desoxirribosa, y luego se escinde la cadena principal de fosfodiéster, lo que genera roturas en el ADN monocatenario. Los extremos rotos de la cadena simple formados de este modo se eliminan, una brecha generada debido a la cadena simple eliminada se llena con una nueva base complementaria, y luego un extremo de la base complementaria recién llena se liga con la cadena principal mediante una ADN ligasa, lo que da como resultado la reparación del ADN dañado.

#### Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

25 La NER es un mecanismo de escisión importante para eliminar grandes daños que distorsionan la hélice del ADN y, cuando se reconoce el daño, se elimina un segmento corto de ADN de una sola cadena que contiene la región dañada, lo que da como resultado un espacio de una sola cadena de 22 a 30 bases. El espacio generado se rellena con una nueva base complementaria, y un extremo de la base complementaria recién rellenada se liga con la cadena principal mediante una ligasa de ADN, lo que da como resultado la reparación del ADN dañado.

#### Efectos de la manipulación genética

30 La manipulación o corrección de un gen o ácido nucleico diana puede conducir en gran medida a efectos de inactivación, *knockdown* y *knockin*.

#### *Knockout*

35 El término "*knockout*" se refiere a la inactivación de un gen o ácido nucleico diana, y la "inactivación de un gen o ácido nucleico diana" se refiere a un estado en el que no se produce la transcripción y/o traducción de un gen o ácido nucleico diana. La transcripción y traducción de un gen que causa una enfermedad o un gen que tiene una función anormal se puede inhibir mediante la inactivación, lo que da como resultado la prevención de la

expresión de la proteína.

Por ejemplo, cuando se edita o corrige un gen o ácido nucleico diana utilizando un complejo enzimático ARNg-CRISPR, es decir, un complejo CRISPR, el gen o ácido nucleico diana se puede escindir utilizando el complejo CRISPR. El gen o ácido nucleico dañado se puede reparar a través de NHEJ utilizando el complejo CRISPR.

- 5 El gen o ácido nucleico diana dañado puede tener indeles debido a NHEJ y, por lo tanto, se puede inducir una eliminación específica del gen o ácido nucleico diana.

#### ***Knockdown***

El término "*knockdown*" se refiere a una disminución en la transcripción y/o traducción de un gen o ácido nucleico diana o en la expresión de una proteína diana. Se puede prevenir la aparición de una enfermedad o 10 tratarla regulando la sobreexpresión de un gen o proteína a través del *knockdown*.

Por ejemplo, cuando se edita o corrige un gen o ácido nucleico diana utilizando un complejo de dominio de actividad inhibidora de la transcripción de enzima inactiva ARNg-CRISPR, es decir, un complejo CRISPR inactivo que incluye un dominio de actividad inhibidora de la transcripción, el complejo CRISPR inactivo puede 15 unirse específicamente al gen o ácido nucleico diana, la transcripción del gen o ácido nucleico diana puede ser inhibida por el dominio de actividad inhibidora de la transcripción incluido en el complejo CRISPR inactivo, induciendo así un *knockdown* en el que se inhibe la expresión del gen o ácido nucleico correspondiente.

#### ***Knockin***

El término "*knockin*" se refiere a la inserción de un ácido nucleico o gen específico en un gen o ácido nucleico diana y, en particular, el término "ácido nucleico específico" se refiere a un gen o ácido nucleico que se va a 20 insertar o que se desea expresar. *Knockin* se puede utilizar para el tratamiento de enfermedades corrigiendo con precisión un gen mutante que causa una enfermedad o induciendo la expresión genética normal mediante la inserción de un gen normal.

Además, para *knockin* puede ser necesario un donante adicional.

Por ejemplo, cuando se edita o corrige un gen o ácido nucleico diana utilizando un complejo enzimático ARNg-CRISPR (es decir, un complejo CRISPR), el gen o ácido nucleico diana se puede escindir utilizando un complejo CRISPR. Un gen o ácido nucleico dañado se puede reparar mediante HDR utilizando el complejo CRISPR. En particular, se puede insertar un ácido nucleico específico en un gen o ácido nucleico dañado utilizando un donante.

El término "donante" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ayuda a reparar el gen o ácido nucleico dañado a través de HDR, y en particular, la plantilla puede incluir un ácido nucleico específico.

El donante puede ser un ácido nucleico bicatenario o un ácido nucleico monocatenario.

El donante puede ser lineal o circular.

El donante puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tenga homología con un gen o ácido nucleico diana.

35 Por ejemplo, el donante puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con una secuencia de nucleótidos en posiciones en las que se insertará un ácido nucleico específico (por ejemplo, corriente arriba y corriente abajo de un ácido nucleico dañado), respectivamente. En particular, el ácido nucleico específico que se va a insertar puede estar ubicado entre la secuencia de ácido nucleico que tiene homología con la secuencia de ácido nucleico corriente abajo del ácido nucleico dañado y la secuencia de ácido nucleico que 40 tiene homología con la secuencia de ácido nucleico corriente arriba del ácido nucleico dañado. En particular, la secuencia de ácido nucleico que tiene la homología anterior puede tener al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% o más de homología, u homología completa.

45 El donante puede incluir opcionalmente una secuencia de ácido nucleico adicional. En particular, la secuencia de ácido nucleico adicional puede tener funciones en la mejora de la estabilidad, la eficiencia de knockin o eficiencia HDR del donante.

Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico adicional puede ser una secuencia de ácido nucleico rica en bases A y T (es decir, un dominio rico en A-T). Alternativamente, la secuencia de ácido nucleico adicional puede ser una región de unión a la matriz/andamio (S/MAR).

#### **5. Otros componentes adicionales**

50 Se puede agregar selectivamente un componente adicional para aumentar la eficiencia de un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía o mejorar la eficiencia de reparación de un gen o ácido nucleico dañado.

El componente adicional se puede utilizar de forma selectiva para mejorar la eficiencia del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

Activador

El componente adicional se puede utilizar como activador para aumentar la eficiencia de escisión de un ácido nucleico, gen o cromosoma diana del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

El término "activador" se refiere a un ácido nucleico que sirve para estabilizar la unión entre el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía y el ácido nucleico, gen o cromosoma diana, o para permitir que el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía se acerque más fácilmente al ácido nucleico, gen o cromosoma diana.

El activador puede ser un ácido nucleico bicatenario o un ácido nucleico monocatenario.

10 El activador puede ser lineal o circular.

El activador puede dividirse en un "auxiliar" que estabiliza la unión entre el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía y el ácido nucleico, gen o cromosoma diana, y un "escoltador" que sirve para permitir que el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía se acerque más fácilmente al ácido nucleico, gen o cromosoma diana.

15 El ayudante puede aumentar la eficiencia de escisión del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía con respecto al ácido nucleico, gen o cromosoma diana.

Por ejemplo, el ayudante incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con el ácido nucleico, gen o cromosoma diana. Por lo tanto, cuando el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía está unido al ácido nucleico, gen o cromosoma diana, la secuencia de ácido nucleico homóloga incluida en el auxiliar puede formar un enlace complementario adicional con el ácido nucleico, gen o cromosoma diana para estabilizar la unión entre el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía y el ácido nucleico, gen o cromosoma diana.

El escoltador puede aumentar la eficiencia de escisión del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía con respecto al ácido nucleico, gen o cromosoma diana.

25 Por ejemplo, el escoltador incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con el ácido nucleico, gen o cromosoma diana. Aquí, la secuencia de ácido nucleico homóloga incluida en el escoltador puede formar parcialmente un enlace complementario con un ácido nucleico guía del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía. Por lo tanto, el escoltador que forma parcialmente un enlace complementario con el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede formar parcialmente un enlace complementario con el ácido nucleico, gen o cromosoma diana y, como resultado, puede permitir que el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía se acerque con precisión a la posición del ácido nucleico, gen o cromosoma diana.

30 La secuencia de ácido nucleico homóloga puede tener al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% o más de homología, u homología completa.

Además, el componente adicional puede usarse selectivamente para mejorar la eficiencia de reparación del gen o ácido nucleico dañado.

35 Asistente

El componente adicional se puede utilizar como asistente para mejorar la eficiencia de reparación del gen o ácido nucleico dañado.

40 El término "asistente" se refiere a un ácido nucleico que sirve para participar en un proceso de reparación o aumentar la eficiencia de reparación del gen o ácido nucleico dañado, por ejemplo, el gen o ácido nucleico escindido por el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

El asistente puede ser un ácido nucleico bicatenario o un ácido nucleico monocatenario.

El asistente puede estar presente en forma lineal o circular.

45 El asistente puede dividirse en un "asistente NHEJ" que participa en un proceso de reparación utilizando NHEJ o mejora la eficiencia de la reparación y un "asistente HDR" que participa en un proceso de reparación utilizando HDR o mejora la eficiencia de la reparación de acuerdo con un método de reparación.

El asistente NHEJ puede participar en un proceso de reparación o mejorar la eficiencia de reparación del gen o ácido nucleico dañado utilizando NHEJ.

50 Por ejemplo, el asistente NHEJ puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tenga homología con una parte de la secuencia de ácido nucleico dañada. Aquí, la secuencia de ácido nucleico homóloga puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con la secuencia de ácido nucleico en un extremo (por

ejemplo, el extremo 3') de la secuencia de ácido nucleico dañada, e incluir una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con la secuencia de ácido nucleico en el otro extremo (por ejemplo, el extremo 5') de la secuencia de ácido nucleico dañada. Además, se puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tenga homología con cada una de las secuencias de bases corriente arriba y corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico dañada. La secuencia de ácido nucleico que tiene dicha homología puede ayudar a que dos partes de la secuencia de ácido nucleico dañada se coloquen en estrecha proximidad, aumentando así la eficiencia de reparación del ácido nucleico dañado por NHEJ.

El asistente HDR puede participar en el proceso de reparación o mejorar la eficiencia de reparación del gen o ácido nucleico dañado mediante HDR.

- 10 Por ejemplo, el asistente HDR puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tenga homología con una parte de la secuencia de ácido nucleico dañada. Aquí, la secuencia de ácido nucleico homóloga puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con la secuencia de ácido nucleico en un extremo (por ejemplo, el extremo 3') de la secuencia de ácido nucleico dañada, y una secuencia de ácido nucleico secuencia de ácido que tiene homología con la secuencia de ácido nucleico en el otro extremo (por ejemplo, el extremo 5') de la secuencia de ácido nucleico dañada. Alternativamente, se puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tenga homología con cada una de las secuencias de bases corriente arriba y corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico dañada. La secuencia de ácido nucleico que tiene dicha homología puede servir como plantilla de la secuencia de ácido nucleico dañada para aumentar la eficiencia de reparación del ácido nucleico dañado mediante HDR.
- 15 20 En otro ejemplo, el asistente HDR puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tenga homología con una parte de la secuencia de ácido nucleico dañada y un ácido nucleico específico, por ejemplo, un ácido nucleico o un gen que se va a insertar. Aquí, la secuencia de ácido nucleico homóloga puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con cada una de las secuencias de bases corriente arriba y corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico dañada. El ácido nucleico específico puede estar ubicado entre una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con una secuencia de bases corriente abajo del ácido nucleico dañado y una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con una secuencia de bases corriente arriba del ácido nucleico dañado. La secuencia de ácido nucleico que tiene dicha homología y ácido nucleico específico puede servir como donante para insertar un ácido nucleico específico en el ácido nucleico dañado, aumentando así la eficiencia de HDR para *knockin*.
- 25 30 La secuencia de ácido nucleico homóloga puede tener al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o más de homología u homología completa.

#### 6. Sujeto

El término "sujeto" se refiere a un organismo en el que se introduce un ácido nucleico guía, una proteína editora o un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, un organismo en el que actúa un ácido nucleico guía, una proteína editora o un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, o un espécimen o muestra obtenida del organismo.

El sujeto puede ser un organismo que incluye un ácido nucleico, gen, cromosoma o proteína diana del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

El organismo puede ser una célula, un tejido, una planta, un animal o un ser humano.

40 45 Las células pueden ser células procariotas o células eucariotas.

Las células eucariotas pueden ser células vegetales, células animales o células humanas, pero la presente invención no se limita a ello.

El tejido puede ser tejido corporal animal o humano, como piel, hígado, riñón, corazón, pulmón, cerebro o tejido muscular.

El sujeto puede ser un espécimen o muestra que incluye un ácido nucleico, gen, cromosoma o proteína diana del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

La muestra o espécimen puede obtenerse de un organismo que incluye un ácido nucleico, gen, cromosoma o proteína diana y puede ser saliva, sangre, tejido cutáneo, células cancerosas o células madre.

Como una realización de los sujetos de la presente invención, a continuación se divultan los sujetos que contienen un gen o ácido nucleico diana de un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

50 Por ejemplo, el gen DGKA, y/o el gen DGKZ pueden ser los genes diana.

En una realización, la secuencia diana de cada uno de los genes anteriores puede ser una o más seleccionadas de las secuencias descritas en la Tabla 1, excluyendo la secuencia PAM (donde T se cambia a U). Esta

secuencia diana puede servir como base para diseñar un ácido nucleico guía.

Es decir, la secuencia de nucleótidos de la región de secuencia diana para cada gen y la región de secuencia diana correspondiente de un ARN guía (una región de secuencia diana de un ARN guía y una región de secuencia diana de un ARN guía que tiene una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con la región de secuencia diana) se resumen en la Tabla 1 anterior (las regiones de secuencia diana que se muestran en la Tabla 1 se describen en un estado donde la secuencia PAM (5'-NGG-3') está incluida en el extremo 3').

5 Estas regiones de secuencia diana se caracterizan porque son secuencias sin ninguna región de no coincidencia de 0 pb a 2 pb en el genoma de un gen excepto la secuencia diana, y tienen un bajo efecto fuera del objetivo y una alta eficiencia de corrección genética.

10 La secuencia diana puede apuntar a dos o más tipos simultáneamente.

El gen puede afectar a dos o más tipos simultáneamente.

Se pueden atacar simultáneamente dos o más secuencias diana en un gen homólogo o dos o más secuencias diana en un gen heterólogo.

15 Se puede direccionar a una región no codificante o una región codificante dentro del gen (por ejemplo, región promotora, potenciadora, 3'UTR y/o secuencia de señal de poliadenilación, o secuencia de transcripción (por ejemplo, secuencia de intrones o exones)).

Se puede direccionar el 50% superior de las regiones codificantes de los genes.

En una realización de ejemplo, DGKa o DGKz pueden ser direccionados, respectivamente.

En una realización de ejemplo, DGKa y DGKz pueden ser objetivos simultáneamente.

20 En la presente invención, para la manipulación artificial de cada gen, se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos guía correspondientes a las secuencias diana de SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 23, 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123.

25 En la presente invención, para la manipulación artificial de cada gen, se proporcionan proteínas editoras (por ejemplo, proteínas que forman un complejo) que interactúan con secuencias de ácidos nucleicos guía correspondientes a las secuencias diana de SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 23, 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123.

En la presente invención, se proporciona un producto de modificación de ácido nucleico de cada gen, en el que se ha producido una manipulación artificial en las regiones de secuencia diana de SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 23, 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123, y un producto de expresión de los mismos.

30 En la presente invención, para la manipulación artificial de cada gen, se forman complejos entre secuencias de ácidos nucleicos guía correspondientes a una o más secuencias diana entre

SEQ ID NOS: 19, 20, 21 y 23 (DGKa)

SEQ ID NOS: 109, 110, 111, 112 y 113 (Dgkζ)

y se proporcionan proteínas editoras que interactúan con los mismos.

35 En la presente invención, se proporciona un producto de modificación de ácido nucleico de cada gen, en el que se ha producido una manipulación artificial en las regiones de secuencia diana de SEQ ID NO: 19, 20, 21 y 23 (DGKa) y SEQ ID NO: 109, 110, 111, 112 y 113 (Dgkζ), y un producto de expresión de los mismos.

## 7. Administración

40 El ácido nucleico guía, proteína editora o complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede ser administrado o introducido en un sujeto mediante diversos métodos de administración y diversas formas.

El ácido nucleico guía puede administrarse o introducirse en un sujeto en forma de ADN, ARN o una forma mixta.

La proteína editora puede administrarse o introducirse en un sujeto en forma de ADN, ARN, una mezcla de ADN/ARN, un péptido, un polipéptido que codifica la proteína editora o una proteína.

45 El complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede administrarse o introducirse en un objetivo en forma de ADN, ARN o una mezcla de los mismos, que codifica cada componente, es decir, un ácido nucleico guía o una proteína editora.

El complejo de proteína editora-ácido nucleico guía se puede administrar o introducir en un sujeto como un complejo de un ácido nucleico guía que tiene una forma de ADN, ARN o una mezcla de los mismos y una proteína editora que tiene una forma de péptido, polipéptido o proteína.

5 Además, un componente adicional capaz de aumentar o inhibir la eficiencia del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede administrarse o introducirse en un sujeto mediante diversos métodos de administración y en diversas formas.

i) Administración en forma de ADN, ARN o mezcla de los mismos.

La forma de ADN, ARN o una mezcla de los mismos, que codifica el ácido nucleico guía y/o la proteína editora puede administrarse o introducirse en un sujeto mediante un método conocido en la técnica.

10 O, la forma de ADN, ARN o una mezcla de los mismos, que codifica el ácido nucleico guía y/o la proteína editora, puede administrarse o introducirse en un sujeto mediante un vector, un no vector o una combinación de los mismos.

El vector puede ser un vector viral o no viral (por ejemplo, un plásmido).

El no vector puede ser ADN desnudo, un complejo de ADN o ARNm.

15 Introducción basada en vectores

La secuencia de ácido nucleico que codifica el ácido nucleico guía y/o la proteína editora puede administrarse o introducirse en un sujeto mediante un vector.

El vector puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico guía y/o una proteína editora.

20 Por ejemplo, el vector puede incluir simultáneamente secuencias de ácidos nucleicos, que codifican el ácido nucleico guía y la proteína editora, respectivamente.

Por ejemplo, el vector puede incluir la secuencia de ácido nucleico que codifica el ácido nucleico guía.

A modo de ejemplo, los dominios incluidos en el ácido nucleico guía pueden estar contenidos todos en un vector, o pueden dividirse y luego estar contenidos en diferentes vectores.

25 Por ejemplo, el vector puede incluir la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína editora.

En un ejemplo, en el caso de la proteína editora, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína editora puede estar contenida en un vector, o puede dividirse y luego estar contenida en varios vectores.

El vector puede incluir uno o más componentes reguladores/de control.

30 Aquí, los componentes reguladores/de control pueden incluir un promotor, un potenciador, un intrón, una señal de poliadenilación, una secuencia de consenso de Kozak, un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), un acceptor de empalme y/o una secuencia 2A.

El promotor puede ser un promotor reconocido por la ARN polimerasa II.

El promotor puede ser un promotor reconocido por la ARN polimerasa III.

El promotor puede ser un promotor inducible.

35 El promotor puede ser un promotor específico del sujeto.

El promotor puede ser un promotor viral o no viral.

El promotor puede utilizar un promotor adecuado según una región de control (que es una secuencia de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico guía o una proteína editora).

40 Por ejemplo, un promotor útil para el ácido nucleico guía puede ser un promotor H1, EF-1a, ARNt o U6. Por ejemplo, un promotor útil para la proteína editora puede ser un promotor CMV, EF-1a, EFS, MSCV, PGK o CAG.

El vector puede ser un vector viral o un vector viral recombinante.

El virus puede ser un virus de ADN o un virus de ARN.

45 Aquí, el virus de ADN puede ser un virus de ADN bicatenario (ADNbc) o un virus de ADN monocatenario (ADNmc).

Aquí, el virus ARN puede ser un virus ARN monocatenario (ARNbc).

El virus puede ser un retrovirus, un lentivirus, un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV), un virus vaccinia, un poxvirus o un virus del herpes simple, pero la presente invención no se limita a ellos.

Generalmente, el virus puede infectar a un huésped (por ejemplo, células), introduciendo así un ácido nucleico que codifica la información genética del virus en el huésped o insertando un ácido nucleico que codifica la información genética en el genoma del huésped. El ácido nucleico guía y/o la proteína editora pueden introducirse en un sujeto utilizando un virus que tenga dicha característica. El ácido nucleico guía y/o la proteína editora introducidos mediante el virus pueden expresarse temporalmente en el sujeto (por ejemplo, células). Alternativamente, el ácido nucleico guía y/o la proteína editora introducida utilizando el virus pueden expresarse continuamente en un sujeto (por ejemplo, células) durante un largo tiempo (por ejemplo, 1, 2 o 3 semanas, 1, 2, 3, 6 o 9 meses, 1 o 2 años, o de forma permanente).

La capacidad de empaquetamiento del virus puede variar desde al menos 2 kb hasta 50 kb según el tipo de virus. Dependiendo de dicha capacidad de empaquetamiento, se puede diseñar un vector viral que incluya un ácido nucleico guía o una proteína editora o un vector viral que incluya tanto un ácido nucleico guía como una proteína editora. Alternativamente, se puede diseñar un vector viral que incluya un ácido nucleico guía, una proteína editora y componentes adicionales.

En un ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico guía y/o una proteína editora puede ser suministrada o introducida por un lentivirus recombinante.

En otro ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico guía y/o una proteína editora puede ser suministrada o introducida por un adenovirus recombinante.

En todavía otro ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico guía y/o una proteína editora puede ser suministrada o introducida por AAV recombinante.

En todavía otro ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico guía y/o una proteína editora puede ser suministrada o introducida por un virus híbrido, por ejemplo, uno o más híbridos de los virus aquí enumerados.

#### Introducción basada en no vectores

Una secuencia de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico guía y/o una proteína editora puede administrarse o introducirse en un sujeto utilizando un no vector.

El no vector puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico guía y/o una proteína editora.

El no vector puede ser ADN desnudo, un complejo de ADN, ARNm o una mezcla de ellos.

El no vector puede administrarse o introducirse en un sujeto mediante electroporación, bombardeo de partículas, sonoporación, magnetofección, compresión o exprimido transitorio de células (por ejemplo, descrito en la literatura [Lee, et al, (2012) Nano Lett., 12, 6322-6327]), transfección mediada por lípidos, un dendrímero, nanopartículas, fosfato de calcio, sílice, un silicato (Ormosil) o una combinación de los mismos.

A modo de ejemplo, la administración mediante electroporación se puede realizar mezclando células y una secuencia de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico guía y/o una proteína editora en un cartucho, cámara o cubeta, y aplicando estímulos eléctricos con una duración y amplitud predeterminadas a las células.

En otro ejemplo, el no vector puede administrarse mediante nanopartículas. Las nanopartículas pueden ser nanopartículas inorgánicas (por ejemplo, nanopartículas magnéticas, sílice, etc.) o nanopartículas orgánicas (por ejemplo, un lípido recubierto de polietilenglicol (PEG), etc.). La superficie exterior de las nanopartículas puede conjugarse con un polímero cargado positivamente que se puede adherir (por ejemplo, polietilenimina, polilisina, poliserina, etc.).

#### ii) Administración en forma de péptido, polipéptido o proteína.

Una proteína editora en forma de péptido, polipéptido o proteína puede administrarse o introducirse en un sujeto mediante un método conocido en la técnica.

La forma de péptido, polipéptido o proteína se puede administrar o introducir en un sujeto mediante electroporación, microinyección, compresión o exprimido transitorio de células (por ejemplo, descrito en la literatura [Lee, et al, (2012) Nano Lett., 12, 6322-6327]), mediada por transfección de lípidos, nanopartículas, un liposoma, administración mediada por péptidos o una combinación de los mismos.

El péptido, polipéptido o proteína puede administrarse con una secuencia de ácido nucleico que codifica un

ácido nucleico guía.

En un ejemplo, la transferencia a través de electroporación se puede realizar mezclando células en las que se introducirá la proteína editora con o sin un ácido nucleico guía en un cartucho, cámara o cubeta, y aplicando estímulos eléctricos con una duración y amplitud predeterminadas a las células.

5 i) Administración en forma de mezcla de ácido nucleico-proteína.

El ácido nucleico guía y la proteína editora pueden administrarse o introducirse en un sujeto en forma de un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

Por ejemplo, el ácido nucleico guía puede ser ADN, ARN o una mezcla de ellos. La proteína editora puede ser un péptido, un polipéptido o una proteína.

10 En un ejemplo, el ácido nucleico guía y la proteína editora pueden administrarse o introducirse en un sujeto en forma de un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía que contiene un ácido nucleico guía de tipo ARN y una proteína editora de tipo proteína, es decir, una ribonucleoproteína (RNP).

15 En la presente invención, como una realización de un método para administrar el ácido nucleico guía y/o la proteína editora a un sujeto, se describirá a continuación la administración de ARNg, una enzima CRISPR o un complejo de enzima ARNg-CRISPR.

#### 8. Transformante

20 El término "transformante" se refiere a un organismo en el que se introduce un ácido nucleico guía, una proteína editora o un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, un organismo en el que se expresa un ácido nucleico guía, una proteína editora o un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, o un espécimen o muestra obtenida del organismo.

El transformante puede ser un organismo en el que se introduce un ácido nucleico guía, una proteína editora o un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía en forma de ADN, ARN o una mezcla de ellos.

25 Por ejemplo, el transformante puede ser un organismo en el que se introduce un vector que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico guía y/o una proteína editora. Aquí, el vector puede ser un vector no viral, un vector viral o un vector viral recombinante.

En otro ejemplo, el transformante puede ser un organismo en el que se introduce una secuencia de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico guía y/o una proteína editora en una forma no vectorial. Aquí, el vector puede ser ADN desnudo, un complejo de ADN, ARNm o una mezcla de ellos.

30 El transformante puede ser un organismo en el que se introduce un ácido nucleico guía, una proteína editora o un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía en forma de péptido, polipéptido o proteína.

El transformante puede ser un organismo en el que se introduce un ácido nucleico guía, una proteína editora o un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía en forma de ADN, ARN, un péptido, un polipéptido, una proteína o una mezcla de ellos.

35 Por ejemplo, el transformante puede ser un organismo en el que se introduce un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía que incluye un ácido nucleico guía de tipo ARN y una proteína editora de tipo proteína.

El transformante puede ser un organismo que incluye un ácido nucleico, gen, cromosoma o proteína diana del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

El organismo puede ser una célula, un tejido, una planta, un animal o un humano.

Las células pueden ser células procariotas o células eucariotas.

40 Las células eucariotas pueden ser células vegetales, células animales o células humanas, pero la presente invención no se limita a ellas.

El tejido puede ser tejido corporal animal o humano, como piel, hígado, riñón, corazón, pulmón, cerebro o tejido muscular.

45 El transformante puede ser un organismo en el que se introduce o expresa un ácido nucleico guía, una proteína editora o un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, o un espécimen o muestra obtenida del organismo.

La muestra puede ser saliva, sangre, tejido cutáneo, células cancerosas o células madre.

Además, en una realización, la presente invención proporciona un complejo de proteína editora-ácido nucleico

guía, que se utiliza para la modificación de ácidos nucleicos en los sitios objetivo del gen DGKA y/o DGKZ.

En particular, se pueden proporcionar moléculas de ARNg que contienen un dominio capaz de formar un enlace complementario con un sitio objetivo de un gen (por ejemplo moléculas de ARNg aisladas o de origen no natural y los ADN que las codifican. Las secuencias de las moléculas de ARNg y los ADN que las codifican pueden 5 diseñarse de modo que estas secuencias puedan tener una unión complementaria con las secuencias del sitio objetivo de la Tabla 1.

Además, los sitios diana de las moléculas de ARNg están constituidos de tal manera que se proporciona un 10 tercer factor inmunorregulador, en el que el tercer factor inmunorregulador está asociado con el cambio en la posición diana de una célula inmune (por ejemplo roturas de doble cadena o roturas de cadena simple); o tiene una función específica en la posición diana, en el gen DGKA y/o DGKZ.

Además, cuando se utilizan dos o más ARNg para localizar dos o más eventos de escisión (por ejemplo roturas de cadenas dobles o de cadenas simples) en un ácido nucleico diana, dos o más eventos de escisión pueden ser generados por las mismas o diferentes proteínas Cas9.

Los ARNg pueden ser, por ejemplo,

15 pueden ser capaces de dirigir dos genes de los genes DGKA y DGKZ;

pueden ser capaces de dirigir dos o más sitios dentro de cada uno de los genes DGKA y/o DGKZ;

pueden ser capaces de inducir de forma independiente la escisión de una cadena doble y/o cadena sencilla del gen DGKA y/o DGKZ; o

20 pueden ser capaces de inducir la inserción de uno o más nucleótidos exógenos en el sitio de escisión del gen DGKA y/o DGKZ.

Además, en otra realización de la presente invención, el ácido nucleico que constituye un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede incluir:

(a) una secuencia que codifica una molécula de ARNg que incluye un dominio guía complementario a una secuencia del sitio objetivo en el gen DGKA y/o DGKZ como se divulga en este documento; y

25 (b) una secuencia que codifica una proteína editora.

En particular, pueden estar presentes dos o más en (a) según el sitio objetivo, y pueden usarse proteínas editoras homólogas o dos o más en (b).

En una realización, el ácido nucleico está constituido de modo que se dirija a una proteína editora enzimáticamente inactiva, que está lo suficientemente cerca de la posición objetivo de eliminación de una célula inmune, o una proteína de fusión de la misma (por ejemplo una fusión de dominios represores de la transcripción), para reducir, disminuir o inhibir la expresión del gen DGKA y/o DGKZ.

Además, en una realización de la presente invención, la manipulación de los genes expresados por las células inmunes (por ejemplo, gen DGKA y/o DGKZ) por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede estar mediada por cualquier mecanismo.

35 Ejemplos del mecanismo incluyen, pero no se imitan a, unión de extremos no homólogos (NHEJ), unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ) y reparación dirigida por homología (HDR), recocido de cadena dependiente de síntesis (SDSA), o penetración de cadena única.

Además, será evidente que todas las características de la estructura, función y utilización del complejo de 40 proteína editora-ácido nucleico guía descrito anteriormente pueden usarse para la manipulación del gen DGKA y/o DGKZ.

El factor del sistema inmunitario, que es el producto resultante obtenido utilizando el "complejo de proteína editora-ácido nucleico guía", puede ser, por ejemplo, un gen manipulado, un producto expresado por el gen manipulado, una célula, una composición, un transformante, etc. que contiene el mismo.

45 El factor del sistema inmunitario puede ser un gen inmunorregulador manipulado artificialmente por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, o una proteína expresada del mismo; y una célula que lo contenga.

El factor del sistema inmunitario puede ser un gen inmunorregulador manipulado genéticamente por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, o una proteína expresada del mismo; y una célula que lo contenga.

50 El factor del sistema inmunitario puede ser una secuencia de ácidos nucleicos o una secuencia de aminoácidos de un gen inmunorregulador manipulado genéticamente por un complejo de proteína editora-ácido nucleico

guía.

El factor del sistema inmunitario puede ser un gen inmunorregulador manipulado genéticamente por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía; una proteína expresada del mismo; una célula que contiene el factor y/o proteína inmunorregulador manipulados; o una composición que contiene el factor, proteína y/o célula inmunorregulador manipulados.

El factor del sistema inmunitario puede ser un transformante, que se forma mediante la introducción de uno o más de los siguientes: un gen inmunorregulador manipulado genéticamente por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía; una proteína expresada del mismo; una célula que contiene el factor y/o proteína inmunorregulador manipulados; o una composición que contiene el factor, proteína y/o célula inmunorregulador manipulados.

El factor inmune, que es un producto resultante obtenido utilizando el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, puede incluir independientemente dos o más de cada uno de los factores, y puede incluir además dos o más por factor.

Por ejemplo,

el factor inmune puede proporcionarse en una forma que incluya simultáneamente dos o más entre el gen inmunorregulador manipulado artificialmente, una proteína expresada del mismo y una célula que lo contenga;

manipulados artificialmente, se pueden proporcionar simultáneamente uno o dos o más tipos de genes reguladores inmunológicos;

manipuladas artificialmente, se pueden proporcionar simultáneamente uno o dos o más tipos de proteínas reguladoras inmunitarias;

manipuladas artificialmente, se pueden proporcionar simultáneamente uno o dos o más tipos de células inmunes; y

se puede proporcionar simultáneamente una combinación de dos o más de los factores inmunes manipulados artificialmente.

Los ejemplos preferidos del factor del sistema inmunitario, que es el producto obtenido utilizando un "complejo de proteína editora-ácido nucleico guía", pueden tener las siguientes constituciones.

En una realización, cuando el factor inmunorregulador es un gen, la constitución del gen inmunorregulador manipulado artificialmente por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede incluir:

en una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM) en una secuencia de ácido nucleico que constituye el gen inmunorregulador o en una región de secuencia de nucleótidos continua de 1 pb a 50 pb, de 1 pb a 40 pb, de 1 pb a 30 pb y preferiblemente de 3 pb a 25 pb adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la misma, una o más modificaciones de ácido nucleico entre:

deleción o inserción de uno o más nucleótidos;

sustitución con uno o más nucleótidos diferentes de un gen de tipo salvaje; y

inserción de uno o más nucleótidos extraños.

Además, la constitución del gen inmunorregulador manipulado artificialmente por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía puede incluir una modificación química de uno o más nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico que constituye el gen inmunorregulador.

En particular, el término "nucleótido extraño" es un concepto que incluye todos aquellos producidos desde el exterior (por ejemplo nucleótidos derivados de un bioorganismo heterólogo o nucleótidos sintetizados artificialmente), no aquellos nucleótidos que posee un gen inmunorregulador. El nucleótido extraño incluye no sólo un oligonucleótido de tamaño pequeño de 50 pb o menos, sino también un nucleótido de gran tamaño (por ejemplo unos pocos cientos, unos pocos miles o unas pocas decenas de miles de pb) para la expresión de una proteína con una función específica. A ese "nucleótido extraño" se le puede llamar donante.

La modificación química incluye metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, miristilación y glicosilación, por ejemplo parte del grupo funcional del nucleótido está sustituido con, pero no se limita a, uno cualquiera de un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo -O-alquilo, un grupo -O-acilo y un grupo amino. Además, para aumentar la capacidad de transferencia de una molécula de ácido nucleico, parte del grupo funcional del nucleótido puede sustituirse por cualquiera de los siguientes: -Br, -C1, -R, -R'OR, -SH, -SR, -N3 y -CN (R= alquilo, arilo, alquileno). Además, una cadena principal de fosfato de al menos un nucleótido se sustituye con cualquiera de la forma alquilfosfonato, forma fosforoamidato y forma boranofosfato.

Además, la modificación química puede caracterizarse porque al menos un nucleótido incluido en la molécula de ácido nucleico se sustituye con cualquiera entre ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico desbloqueado (UNA), morfolino y ácido nucleico peptídico (PNA), y la modificación química puede caracterizarse porque la molécula de ácido nucleico está unida a uno o más seleccionados del grupo que consiste en lípidos, péptidos que penetran en las células y ligandos de direccionamiento celular.

5

Para formar un sistema inmunitario deseado, un ácido nucleico que constituye artificialmente un gen inmunorregulador puede ser modificado por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

El sitio, que es capaz de formar un sistema inmunitario deseado, que contiene la modificación del ácido nucleico de un gen inmunorregulador, se denomina secuencia diana o sitio objetivo.

10

La "secuencia diana" puede ser un objetivo de un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, y la secuencia diana puede incluir, pero no se limita a, una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM) reconocida por la proteína editora. La secuencia diana puede proporcionar al médico criterios importantes para el diseño de un ácido nucleico guía.

Tal modificación del ácido nucleico incluye la "escisión" de un ácido nucleico.

15

La "escisión" en un sitio objetivo se refiere a una rotura de la cadena principal covalente de un polinucleótido. La escisión puede incluir, pero no se limita a, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster, y puede realizarse mediante varios otros métodos. Puede ser posible tanto la escisión de una cadena simple como la escisión de una cadena doble, y la escisión de una cadena doble puede ocurrir como resultado de la escisión de dos cadenas simples distintas. La escisión de hebras dobles puede producir extremos romos o escalonados.

20

Cuando se utiliza una proteína editora inactivada, se pueden inducir factores que poseen una función específica para que se ubiquen cerca de cualquier parte del sitio objetivo o del gen inmunorregulador, sin el proceso de escisión. Dependiendo de esta función particular, la modificación química de uno o más nucleótidos puede incluirse en la secuencia de ácido nucleico de un gen inmunorregulador.

25

Pueden ocurrir diversas delecciones y eliminaciones (indel) debido a la actividad objetivo y no objetivo a través de la escisión de un ácido nucleico formado por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

El término "indel" se refiere colectivamente a una mutación en la que se insertan o delecionan algunos nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del ADN.

30

Como se describió anteriormente, cuando un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía escinde el ácido nucleico (ADN, ARN) de un gen inmunorregulador, un indel puede ser uno que se introduce en una secuencia diana en el proceso de reparación por recombinación homóloga o mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ).

35

El gen inmunorregulador manipulado artificialmente de la presente invención significa uno en el que la secuencia de ácido nucleico del gen original fue modificada por escisión e indel del ácido nucleico, inserción de un donante, etc., y el gen inmunorregulador manipulado artificialmente contribuye al establecimiento de un sistema inmunitario deseado (por ejemplo exhibición del efecto de promover o suprimir o complementar funciones inmunes específicas).

Por ejemplo, la expresión y actividad de una proteína específica puede ser promovida por el gen inmunorregulador manipulado artificialmente.

Una proteína específica puede ser inactivada por el gen inmunorregulador manipulado artificialmente.

40

En un ejemplo, los sitios objetivo específicos de los genes inmunorreguladores que regulan negativamente la respuesta inmune en el genoma (por ejemplo, gen DGKA (Dgk $\alpha$ ) y/o DGKAZ (Dgk $\zeta$ ) se pueden escindir para inactivar estos genes.

45

En otro ejemplo, para la alteración de la transcripción, por ejemplo, para bloquear, disminuir o reducir la transcripción del gen DGKA (Dgk $\alpha$ ) y/o DGKAZ (Dgk $\zeta$ ), la inactivación dirigida puede mediarse dirigiendo una proteína editora, que está fusionada a un dominio represor de la transcripción o una proteína de modificación de la cromatina y es enzimáticamente inactiva.

La actividad de las células inmunes puede ser regulada por el gen inmunorregulador manipulado artificialmente. Se pueden regular la proliferación, supervivencia, citotoxicidad, infiltración, liberación de citoquinas de las células inmunes, etc.

50

Pueden obtenerse efectos terapéuticos (por ejemplo función inmune, función antitumoral, función antiinflamatoria, etc.) mediante el gen inmunorregulador manipulado artificialmente.

Dependiendo de las características constitucionales de un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía,

las principales secuencias PAM que posee el sitio objetivo del gen inmunorregulador pueden variar.

A continuación, se describirá la presente invención con respecto a ejemplos representativos de proteínas editoras y genes inmunorreguladores, pero estas realizaciones son solo para fines de ilustración específicos y la presente invención no se limita a estas realizaciones.

5 Por ejemplo, cuando la proteína editora es una *proteína Cas9 derivada de Streptococcus pyogenes*, la secuencia PAM puede ser 5'-NGG-3' (N es A, T, G o C); y la región de secuencia de nucleótidos que se va a escindir (sitio objetivo) puede ser una región de secuencia de nucleótidos con una longitud continua de 1 pb a 25 pb (por ejemplo 17 pb a 23 pb o 21 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 5'-NGG-3' dentro de un gen diana.

10 Se pueden proporcionar genes reguladores inmunológicos manipulados artificialmente (por ejemplo genes DGKA y genes DGKZ manipulados artificialmente) debido a las siguientes modificaciones en los genes reguladores inmunológicos:

15 a) deleción de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NGG' (N es A, T, C o G);

b) sustitución de uno o más nucleótidos con uno o más nucleótidos, que son diferentes de un gen de tipo salvaje, en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NGG';

20 c) inserción de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NGG'; o

d) una combinación de dos o más seleccionados entre a) a c).

25 Se divulga aquí, por ejemplo, cuando la proteína editora es una *proteína Cas9 derivada de Campylobacter jejuni*, la secuencia PAM puede ser 5'-NNNNRYAC-3' (N es cada uno independientemente A, T, C o G, R es A o G, e Y es C o T); y la región de secuencia de nucleótidos que se va a escindir (sitio objetivo) puede ser una región de secuencia de nucleótidos con un 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb o 21 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 5'-NNNNRYAC-3' dentro de un gen diana.

30 Se pueden proporcionar genes reguladores inmunológicos manipulados artificialmente (por ejemplo genes PD-1 manipulados artificialmente, gen CTLA-4, gen TNFAIP3, gen DGKA, gen DGKZ, gen Fas, gen EGR2, gen PPP2R2D, gen PSGL-1, gen KDM6A y gen TET2) debido a las siguientes modificaciones en los genes reguladores inmunológicos:

a') deleción de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NNNNRYAC' (N es independientemente A, T, C o G, R es A o G, e Y es C o T);

35 b') sustitución de uno o más nucleótidos con uno o más nucleótidos, que son diferentes de un gen de tipo salvaje, en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NNNNRYAC';

(c') inserción de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NNNNRYAC'; o

d') una combinación de dos o más seleccionados de a') a c').

40 Se divulga aquí, por ejemplo, cuando la proteína editora es una *proteína Cas9 derivada de Streptococcus thermophilus*, la secuencia PAM puede ser 5'-NNAGAAW-3' (N es cada uno independientemente A, T, C o G, y W es A o T); y la región de secuencia de nucleótidos que se va a escindir (sitio objetivo) puede ser una región de secuencia de nucleótidos con un 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb o 21 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 5'-NNAGAAW-3' dentro de un gen diana.

45 Se pueden proporcionar genes reguladores inmunológicos manipulados artificialmente (por ejemplo genes PD-1 manipulados artificialmente, gen CTLA-4, gen TNFAIP3, gen DGKA, gen DGKZ, gen Fas, gen EGR2, gen PPP2R2D, gen PSGL-1, gen KDM6A y gen TET2) debido a las siguientes modificaciones en los genes reguladores inmunológicos:

50 a'') deleción de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NNAGAAW' (N es cada uno independientemente A, T, C o G, y W es A o T);

b'') sustitución de uno o más nucleótidos con uno o más nucleótidos, que son diferentes de un gen de tipo

salvaje, en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NNAGAAW';

c") inserción de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NNAGAAW'; o

- 5 d") una combinación de dos o más seleccionados de a") a c").

Se divulga aquí, por ejemplo, cuando la proteína editora es una proteína Cas9 derivada de *Neisseria meningitidis*, la secuencia PAM puede ser 5'-NNNNGATT-3' (N es cada uno independientemente A, T, C o G); y la región de secuencia de nucleótidos que se va a escindir (sitio objetivo) puede ser una región de secuencia de nucleótidos con un 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb o 21 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 5'-NNNNGATT-3' dentro de un gen diana.

10 Se pueden proporcionar genes reguladores inmunológicos manipulados artificialmente (por ejemplo genes PD-1 manipulados artificialmente, gen CTLA-4, gen TNFAIP3, gen DGKA, gen DGKZ, gen Fas, gen EGR2, gen PPP2R2D, gen PSGL-1, gen KDM6A y gen TET2) debido a las siguientes modificaciones en los genes reguladores inmunológicos:

15 a"") delección de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NNNNGATT' (N es cada uno independientemente A, T, C o G);

20 b"") sustitución de uno o más nucleótidos con uno o más nucleótidos, que son diferentes de un gen de tipo salvaje, en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NNNNGATT';

c"") inserción de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) ubicado adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 'NNNNGATT'; o

d"") una combinación de dos o más seleccionados de a"") a c"").

25 Se divulga aquí, por ejemplo, cuando la proteína editora es una proteína Cas9 derivada de *Staphylococcus aureus*, la secuencia PAM puede ser 5'-NNGRR(T)-3' (N es cada uno independientemente A, T, C o G, R es A o G, y (T) es cualquier secuencia que se pueda incluir opcionalmente); y la región de secuencia de nucleótidos que se va a escindir (sitio objetivo) puede ser una región de secuencia de nucleótidos con un 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb o 21 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' o al extremo 3' de la secuencia 5'-NNGRR(T)-3' dentro de un gen diana.

30 Se pueden proporcionar genes reguladores inmunológicos manipulados artificialmente (por ejemplo genes PD-1 manipulados artificialmente, gen CTLA-4, gen TNFAIP3, gen DGKA, gen DGKZ, gen Fas, gen EGR2, gen PPP2R2D, gen PSGL-1, gen KDM6A y gen TET2) debido a las siguientes modificaciones en los genes reguladores inmunológicos:

35 a"") delección de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 5'-NNGRR(T)-3' (N es cada uno independientemente A, T, C o G; R es A o G, y; Y es C o T);

40 b"") sustitución de uno o más nucleótidos con uno o más nucleótidos, que son diferentes de un gen de tipo salvaje, en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 5'-NNGRR(T)-3';

c"") inserción de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 25 pb continuos (por ejemplo 17 pb a 23 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 5'-NNGRR(T)-3'; o

d"") una combinación de dos o más seleccionados de a"") a c"").

45 En este documento se divulga, por ejemplo, cuando se utiliza una proteína Cpf1 como proteína editora, la secuencia PAM puede ser 5'-TTN-3' (N es A, T, C o G); y la región de secuencia de nucleótidos que se va a escindir (sitio objetivo) puede ser una región de secuencia de nucleótidos con un 10 pb a 30 pb continuos (por ejemplo 15 pb a 26 pb, 17 pb a 30 pb o 17 pb a 26 pb) adyacentes al extremo 5' o al extremo 3' de la secuencia 5'-TTN-3' dentro de un gen diana.

50 La proteína Cpf1 puede ser una derivada de un microorganismo tales como *Parcubacteria bacterium* (GWC201\_1\_GWC2\_44\_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyribacterium proteoclaasicus*, *Peregrinibacterium bacterium* (GW2011\_GWA\_33\_10), *Acidaminococcus* sp. (BV3L6), *Porphyromonas macacae*, *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006), *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Smilihella* sp. (SC\_KO8D17), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* (MA2020), *Francisella*

5 *novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, etc.), y por ejemplo, aquellas derivadas de *Parcubacteria bacterium* (GWC2011\_GWC2\_44\_17), *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011\_GWA\_33\_10), *Acidaminococcus* sp. (BV3L6), *Porphyromonas macacae*, *Lachnospiraceae* bacterium (ND2006), *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae* bacterium (MA2020), *Francisella novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma termitum*, or *Eubacterium eligens*, pero el microorganismo no se limita a ello.

10 Se pueden proporcionar genes reguladores inmunológicos manipulados artificialmente (por ejemplo genes PD-1 manipulados artificialmente, gen CTLA-4, gen TNFAIP3, gen DGKA, gen DGKZ, gen Fas, gen EGR2, gen PPP2R2D, gen PSGL-1, gen KDM6A y gen TET2) debido a las siguientes modificaciones en los genes reguladores inmunológicos:

a"") delección de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 10 pb a 30 pb continuos (por ejemplo 15 pb a 26 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 5'-TTN-3' (N es A, T, C o G);

15 b"") sustitución de uno o más nucleótidos con uno o más nucleótidos, que son diferentes de un gen de tipo salvaje, en una región de secuencia de nucleótidos de 10 pb a 30 pb continuos (por ejemplo 15 pb a 26 pb) adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 5'-TTN-3';

c"") inserción de uno o más nucleótidos en una región de secuencia de nucleótidos de 10 pb a 30 pb continuos (por ejemplo 15 pb a 26 pb) ubicado adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia 5'-TTN-3'; o

d"") una combinación de dos o más seleccionados de a"") a c"").

20 En otra realización, cuando el factor inmunorregulador es una proteína, la proteína manipulada artificialmente puede incluir todas las proteínas involucradas en una respuesta inmune nueva o alterada formada por la acción directa/indirecta de un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

25 Por ejemplo, el factor inmunorregulador puede ser, pero no está limitado a, una proteína expresada por un gen inmunorregulador manipulado artificialmente por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, u otras proteínas en las que la expresión aumenta o disminuye por la influencia de la actividad de la proteína.

La proteína inmunorreguladora manipulada artificialmente puede tener una constitución y una actividad de aminoácidos correspondientes a las de los genes inmunorreguladores manipulados artificialmente.

En una realización, (i) Se puede proporcionar una proteína manipulada artificialmente cuyas características de expresión están alteradas.

30 Por ejemplo, las modificaciones de proteínas que tienen una de las siguientes características pueden incluirse en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 50 pb, de 1 pb a 40 pb, de 1 pb a 30 pb y, preferiblemente, de 3 pb a 25 pb continuos, ubicada en la secuencia del motivo adyacente al protoespaciador (PAM) o adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia PAM dentro de la secuencia de ácido nucleico de un gen inmunorregulador;

35 una disminución o aumento en la cantidad de expresión debido a la delección o inserción de uno o más nucleótidos;

una disminución o aumento en la cantidad de expresión debido a la sustitución con una o más nucleótidos diferentes del gen de tipo salvaje;

40 una disminución o aumento en el nivel de expresión debido a la inserción de uno o más nucleótidos extraños, o una expresión de una proteína de fusión o expresión independiente de una proteína específica; y

una disminución o aumento en el nivel de expresión de una tercera proteína que se ve afectada por las características de expresión de las proteínas descritas anteriormente.

(ii) Se puede proporcionar una proteína manipulada artificialmente en la que se hayan modificado las características estructurales.

45 Por ejemplo, las modificaciones de proteínas que tienen una de las siguientes características pueden incluirse en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 50 pb, de 1 pb a 40 pb, de 1 pb a 30 pb y, preferiblemente, de 3 pb a 25 pb continuos, ubicada en la secuencia del motivo adyacente al protoespaciador (PAM) o adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia PAM dentro de la secuencia de ácido nucleico de un gen inmunorregulador;

50 cambios en los codones, cambios en los aminoácidos y cambios en las estructuras tridimensionales debido a la delección o inserción de uno o más nucleótidos;

cambios en los codones, cambios en los aminoácidos y cambios subsiguientes en las estructuras tridimensionales debido a la sustitución con uno o más nucleótidos diferentes del gen de tipo salvaje;

5 cambios en los codones, cambios en los aminoácidos y cambios en las estructuras tridimensionales debido a la inserción de uno o más nucleótidos extraños, o una estructura de fusión con una proteína específica o una estructura independiente en la que se separa una proteína específica; y

cambios en los codones, cambios en los aminoácidos y cambios en las estructuras tridimensionales de una 10 tercera proteína afectada por una proteína en la que se modifican las características estructurales descritas anteriormente.

(iii) Se puede proporcionar una proteína manipulada artificialmente en la que se modifiquen las características 15 de las funciones inmunes.

Por ejemplo, las modificaciones de proteínas que tienen una de las siguientes características se pueden incluir 20 en una región de secuencia de nucleótidos de 1 pb a 50 pb, 1 pb a 40 pb, 1 pb a 30 pb y, preferiblemente, 3 pb a 25 pb continuos, ubicada en la secuencia del motivo adyacente al protoespaciador (PAM) o adyacente al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia PAM dentro de la secuencia de ácido nucleico de un gen inmunorregulador;

activación o inactivación de funciones inmunes específicas o introducción de nuevas funciones inmunes mediante modificación de proteínas debido a la delección o inserción de uno o más nucleótidos;

activación o inactivación de funciones inmunes específicas o introducción de nuevas funciones inmunes mediante modificación de proteínas debido a la sustitución con uno o más nucleótidos diferentes del gen de tipo salvaje;

activación o inactivación de funciones inmunes específicas o introducción de una nueva función inmune mediante modificación de proteínas debido a la inserción de uno o más nucleótidos extraños (en particular, una tercera función puede introducirse en una función inmune existente mediante una expresión de fusión o expresión independiente de una proteína específica); y

25 un cambio en la función de una tercera proteína afectada por una proteína en la que se cambian las características de la función inmune descritas anteriormente.

Además, se puede incluir una proteína manipulada artificialmente mediante modificación química de uno o más nucleótidos dentro de una secuencia de ácido nucleico que constituye un gen inmunorregulador.

30 Por ejemplo, se pueden cambiar una o más características entre las características de expresión, características estructurales y características de función inmune de las proteínas por metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, miristilación y glicosilación.

Por ejemplo, una tercera estructura y función puede obtenerse mediante la unión de una tercera proteína a la secuencia de ácido nucleico de un gen mediante modificación química de nucleótidos.

35 En otra realización, se proporciona una célula manipulada artificialmente, que es un factor del sistema inmunitario como producto obtenido utilizando "un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía".

La célula manipulada artificialmente puede ser una célula que incluya uno o más de los siguientes:

un gen inmunorregulador manipulado artificialmente por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía; y

40 una proteína que participa en una respuesta inmune nueva o alterada que se forma por la acción directa/indirecta de un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía. La célula es una célula inmune.

Estas células poseen funciones inmunes exhibidas por genes y/o proteínas reguladoras inmunes manipulados artificialmente descritos anteriormente y las funciones subsiguientes involucradas en los mecanismos intracelulares de los mismos.

45 En todavía otra realización, se proporciona una composición que induce una respuesta inmune deseada, que es un factor del sistema inmunitario como un producto obtenido utilizando "un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía". Esta composición puede denominarse composición farmacéutica o composición terapéutica.

La composición que induce una respuesta inmune deseada puede contener uno o más de los siguientes como ingrediente activo:

50 un gen inmunorregulador manipulado artificialmente por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía;

una proteína que participa en una respuesta inmune nueva o alterada que se forma por la acción directa/indirecta de un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía; y

una célula que incluye el gen y/o proteína inmunorregulador.

5 Estas composiciones poseen funciones inmunes exhibidas por genes, proteínas y/o células reguladoras inmunes manipulados artificialmente descritos anteriormente y las funciones subsiguientes involucradas en los diversos mecanismos de los mismos en el cuerpo.

Las composiciones (por ejemplo un agente terapéutico celular) puede usarse para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario (por ejemplo cáncer).

[Método de preparación]

10 Como una realización de la presente invención, se proporciona un factor regulador inmunológico manipulado artificialmente y un método para preparar células inmunes que lo incluyen.

La descripción del factor inmunorregulador manipulado artificialmente puede consultarse en la descripción anterior. A continuación, se describirá el método anterior centrándose en realizaciones representativas de células inmunes manipuladas.

15 - Cultivo celular

Para producir células inmunes manipuladas, primero se recolectan células de donantes sanos y se cultivan. Por ejemplo, las células inmunes (por ejemplo Células T, células NK, células NKT, etc.) Se recogen de un donante mediante un método conocido y se cultivan en un medio de cultivo celular apropiado.

20 Como se describe más adelante, algunos de los factores inmunorreguladores expresados por células inmunes cultivadas se seleccionan y manipulan artificialmente. Por ejemplo, DGKA (Dgka) y/o DGKAZ (Dgkζ) están manipulados genéticamente. La descripción detallada de la manipulación genética puede consultarse más arriba.

Alternativamente, las células inmunes se transfecan y luego se cultivan para producir células inmunes manipuladas.

25 - Método de producción de células inmunes funcionalmente manipuladas

Se pueden producir células inmunes funcionalmente manipuladas insertando o eliminando una proteína como factor inmunorregulador.

Se pueden producir células inmunes funcionalmente manipuladas modificando un gen como factor inmunorregulador.

30 Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden producirse mediante *knock-down* (KD) o *knockout* (KO) de un receptor de tipo salvaje o de un gen inmunorregulador. El término *knock-down* o *knockout* se refiere a la supresión de la expresión genética a través de la escisión de un gen diana, un inhibidor transcripcional del ADN y un inhibidor de la traducción del ARN (por ejemplo microARN complementario, etc.), etc.

El *knock-down* o *knock-out* se puede lograr a través de microARN.

35 El *knock-down* o *knock-out* se puede lograr preferiblemente mediante un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía de la presente invención.

El *knock-down* o *knockout* se puede lograr a través de NHEJ utilizando una tijera genética.

El *knock-down* o *knockout* se puede lograr a través de HR utilizando una tijera genética y una plantilla de nucleótidos.

40 En un ejemplo, el *knockdown* o *knockout* se puede lograr escindiendo sitios objetivo específicos del gen DGKA (Dgka) y/o DGKAZ (Dgkζ).

Las células inmunes funcionalmente manipuladas pueden incluir la modificación de una región diana, por ejemplo,

45 inserción o delección de uno o más nucleótidos en la región codificante que están muy cerca o dentro de la región codificante de un gen (por ejemplo, inserción o delección mediada por NHEJ);

delección de una secuencia genómica que contiene al menos parte del gen (por ejemplo delección mediada por NHEJ); y

modificación del *knockdown* o *knockout* de un gen mediada por una proteína editora enzimáticamente inactiva al dirigir a una región no codificante de un gen (por ejemplo una región promotora).

Además, se pueden producir células inmunes funcionalmente manipuladas mediante la transfección de un receptor de tipo salvaje o de un gen inmunorregulador.

- 5 El método de transfección incluye la inserción de episomas que contienen un gen diana o una fusión en el genoma.

La transfección puede lograrse insertando un episoma. Un vector episomal se refiere a un vector que actúa como un gen exógeno en el núcleo de un organismo eucariota y no está fusionado al genoma. En particular, el episoma puede ser un plásmido.

- 10 La transfección se puede lograr a través de HR utilizando un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía y una plantilla de nucleótidos.

Además, se pueden producir células inmunes funcionalmente manipuladas mediante la transfección de un receptor de tipo salvaje o un gen inmunorregulador diferente, mientras que simultáneamente se elimina un receptor de tipo salvaje o un gen inmunorregulador. Los métodos de transfección incluyen la inserción de episomas que contienen un gen diana o la fusión al genoma.

En particular, el gen que se va a transfectar puede fusionarse a la posición del gen que debe ser disminuido.

La transfección puede lograrse insertando un episoma.

La transfección se puede lograr a través de HR utilizando un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía y una plantilla de nucleótidos.

- 20 - Método de producción de células inmunes complementadas con estructura artificial

Las células inmunes complementadas con estructuras artificiales pueden producirse directamente complementando una estructura artificial a las células inmunes en forma de proteína.

Se pueden producir células inmunes complementadas con estructura artificial mediante la transfección de un gen que codifica una estructura artificial.

- 25 El método de transfección incluye la inserción de episomas que contienen un gen diana o una fusión en el genoma.

La transfección puede lograrse insertando un episoma.

La transfección se puede lograr a través de HR utilizando un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía y una plantilla de nucleótidos.

- 30 En una realización, se proporciona un método para inactivar uno o más genes inmunorreguladores en una célula inmune, que incluye la introducción de un ácido nucleico guía y una proteína editora en la célula inmune (transfección).

En una realización, se proporciona un método para preparar una célula inmune transfectada, que incluye la introducción de un ácido nucleico guía y una proteína editora en la célula inmune (transfección).

- 35 - Método de producción de células inmunes manipuladas híbridas

Se puede preparar una célula inmune manipulada híbrida mediante un método de producción de células inmunes funcionalmente manipuladas y un método de manipulación de una proteína o gen descrito en el método de producción de células inmunes complementadas con estructura artificial.

- 40 El método para producir una célula inmune manipulada híbrida incluye la inactivación de un receptor de tipo salvaje o un factor inmunorregulador, o la realización de una transfección. Este paso puede lograrse de acuerdo con el método descrito en el método de producción de células inmunes funcionalmente manipuladas.

El método para producir una célula inmune híbrida manipulada incluye la transfección de una estructura artificial. Este paso puede lograrse de acuerdo con el método descrito en el método de producción de células inmunes complementadas con estructura artificial.

- 45 Un aspecto preferido del método de producción de células inmunes manipuladas híbridas es realizar la transfección de una estructura artificial mientras se inactivan simultáneamente los receptores de tipo salvaje de una célula inmune.

En un ejemplo, el método consiste en realizar la transfección de una estructura artificial mientras se inactivan simultáneamente PD-1 y CTLA-4 de una célula inmune.

En otro ejemplo, el método para producir células inmunes manipuladas híbridas es realizar la transfección de una estructura artificial mientras se inactivan TNFAIP3(A20), DGK-alfa, DGK-zeta, Fas, EGR2, PPP2R2D, 5 PSGL-1, KDM6A y/o TET2.

En particular, el gen que se va a transfectar puede fusionarse en la misma posición que el gen que se va a inactivar.

El sistema inmunitario manipulado descrito anteriormente se puede producir utilizando un método conocido, por ejemplo, que emplea comúnmente un vector recombinante.

10 - Vector de expresión recombinante para células inmunes

El término "secuencia diana de expresión" se refiere a un medio para modificar una proteína o un gen de una célula diana, o una secuencia de nucleótidos que codifica un gen que se va a expresar recientemente. En una realización de la presente invención, la secuencia diana de expresión puede incluir secuencias que codifican un ácido nucleico guía y una proteína editora, y secuencias adicionales para la expresión del ácido nucleico guía y la proteína editora.

15 El término "vector recombinante" se refiere a un transportador que funciona para transportar una secuencia diana de expresión a una célula diana, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, vectores episómicos, vectores virales, etc.

20 El término "vector de expresión recombinante", que es una realización de un vector recombinante, se refiere a un vector construido artificialmente que exhibe incluso la función de la secuencia diana de expresión enlazada al vector recombinante que se va a expresar en una célula diana.

El vector de expresión recombinante para células inmunes, que es un vector de expresión recombinante, es un medio para modificar una proteína o un gen de una célula inmune de tal manera que expresa la célula inmune como una célula inmune manipulada; o un vector de expresión recombinante para codificar un gen que se va a expresar recientemente.

25 El vector de expresión recombinante para células inmunes incluye el vector de expresión recombinante para la expresión de un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía descrito anteriormente.

En una realización, las células inmunes manipuladas pueden obtenerse únicamente transfectando un tipo de vector de expresión recombinante para células inmunes.

30 Las células inmunes manipuladas pueden obtenerse transfectando dos o más tipos de un vector de expresión recombinante para células inmunes.

El vector de expresión recombinante para células inmunes puede diseñarse dividiendo el vector de expresión recombinante en un número apropiado de vectores de expresión recombinante según el tamaño de la secuencia de nucleótidos que se expresará finalmente.

35 (Vector de expresión recombinante funcionalmente manipulado)

En una realización, se proporciona un vector de expresión recombinante para preparar células inmunes funcionalmente manipuladas.

En una realización, el vector de expresión recombinante funcionalmente manipulado incluye una secuencia de nucleótidos recombinante para eliminar un receptor de tipo salvaje o un gen de factor inmunorregulador.

40 El vector de expresión recombinante para inactivar un gen incluye un vector de expresión recombinante para expresar un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía descrito anteriormente. En particular, la secuencia diana del ARNg puede tener complementariedad con la secuencia de nucleótidos de un receptor de tipo salvaje o una secuencia de nucleótidos del factor inmunorregulador. Además, el vector de expresión recombinante puede incluir una plantilla de nucleótidos que se insertará en una posición escindida por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, según sea necesario.

45 En una realización, el vector de expresión recombinante funcionalmente manipulado incluye una secuencia de nucleótidos recombinante para la transfección de un receptor tipo salvaje o un gen de factor inmunorregulador.

En particular, el vector de expresión recombinante funcionalmente manipulado puede ser un vector episoma. El vector episomal puede incluir un promotor para la expresión genética.

50 En una realización, el vector de expresión recombinante funcionalmente manipulado puede ser uno que tenga

la función de fusionarse con el genoma de un cuerpo vivo. En particular, el vector de expresión recombinante funcionalmente manipulado puede ser un vector viral. En particular, un vector viral preferido puede ser un vector viral adenoasociado.

5 En una realización, el vector de expresión recombinante funcionalmente manipulado puede incluir una secuencia de nucleótidos que es homóloga al sitio objetivo de inserción. La secuencia de nucleótidos puede ser una plantilla de nucleótidos que se insertarán durante el proceso de HR. La plantilla de nucleótidos puede ser homóloga a la secuencia de la región que será escindida por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

10 En una realización, el vector de expresión recombinante funcionalmente manipulado puede incluir independientemente una secuencia para la expresión del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía como se describió anteriormente, ya sea en el mismo vector o en un vector diferente.

En otro aspecto, el vector de expresión recombinante funcionalmente manipulado incluye una secuencia de nucleótidos recombinante para inactivar un receptor de tipo salvaje o un gen de factor inmunorregulador, o para la transfección de un receptor de tipo salvaje o gen de factor inmunorregulador diferente.

15 La secuencia de nucleótidos recombinante para inactivar un gen incluye una secuencia de nucleótidos del vector de expresión recombinante para expresar un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía descrito anteriormente. En particular, la secuencia diana del ARNg puede tener complementariedad con la secuencia de nucleótidos del factor inmunorregulador.

20 El vector de expresión recombinante para la transfección puede ser un vector episomal. En particular, el vector episomal puede incluir un promotor para la expresión genética.

El vector de expresión recombinante para la transfección puede tener la función de fusionarse con el genoma de un cuerpo vivo.

El vector de expresión recombinante para la transfección puede ser un vector viral. En particular, un vector viral preferido puede ser un vector viral adenoasociado.

25 El vector de expresión recombinante para la transfección puede incluir una secuencia de nucleótidos que sea homóloga al sitio objetivo de inserción. La secuencia de nucleótidos puede ser una plantilla de nucleótidos que se insertarán durante el proceso de HR. La plantilla de nucleótidos puede ser homóloga a la secuencia de la región que será escindida por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

30 Además, el vector de expresión recombinante funcionalmente manipulado puede incluir un vector de expresión recombinante para la expresión del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía descrito anteriormente.

(Vector de expresión recombinante complementado con estructura artificial)

En una realización, se proporciona un vector de expresión recombinante para preparar células inmunes complementadas con estructura artificial.

35 El vector de expresión recombinante complementado con estructura artificial incluye una secuencia de nucleótidos recombinante para transfectar un gen de factor inmunorregulador.

En un ejemplo, el vector de expresión recombinante complementado con estructura artificial puede ser un vector episomal. Un vector episomal se refiere a un vector que actúa como un gen exógeno en el núcleo de un organismo eucariota y no está fusionado al genoma. En particular, el vector episomal puede incluir un promotor para la expresión genética.

40 En otro ejemplo, el vector de expresión recombinante complementado con estructura artificial puede tener la función de fusionarse con el genoma de un cuerpo vivo.

En particular, el vector de expresión recombinante complementado con estructura artificial puede ser un vector viral. En particular, un vector viral preferido puede ser un vector viral adenoasociado.

45 Además, el vector de expresión recombinante complementado con estructura artificial puede incluir una secuencia de nucleótidos que sea homóloga al sitio de inserción. La secuencia de nucleótidos puede ser una plantilla de nucleótidos que se insertarán durante el proceso de HR. La plantilla de nucleótidos puede ser homóloga a la secuencia que será escindida por un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

50 Además, el vector de expresión recombinante complementado con estructura artificial puede incluir un vector de expresión recombinante para la expresión del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía descrito anteriormente.

(Vector de expresión recombinante manipulado híbrido)

El vector de expresión recombinante manipulado híbrido puede incluir una secuencia de nucleótidos recombinante para inactivar un gen de receptor tipo salvaje o factor inmunorregulador y transfectar un gen diferente con una estructura artificial.

5 La secuencia de nucleótidos recombinante para inactivar un gen puede incluir una secuencia de nucleótidos del vector de expresión recombinante para expresar un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía descrito anteriormente. En particular, la secuencia diana del ARNg puede tener complementariedad con la secuencia de nucleótidos del factor inmunorregulador.

En un ejemplo, el vector de expresión recombinante para la transfección puede ser un vector episomal. En particular, el vector episomal puede incluir un promotor para la expresión genética.

10 En otro ejemplo, el vector de expresión recombinante para la transfección puede tener la función de fusionarse con el genoma de un cuerpo vivo.

En particular, el vector de expresión recombinante para la transfección puede ser un vector viral. En particular, un vector viral preferido puede ser un vector viral adenoasociado.

15 Además, el vector de expresión recombinante para la transfección puede incluir una secuencia de nucleótidos que sea homóloga al sitio objetivo de inserción. La secuencia de nucleótidos puede ser una plantilla de nucleótidos que se insertarán durante el proceso de HR. La plantilla de nucleótidos puede ser homóloga a la secuencia que se va a escindir mediante un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

Además, el vector de expresión recombinante funcionalmente manipulado puede incluir un vector de expresión recombinante para la expresión del complejo de proteína editora-ácido nucleico guía descrito anteriormente.

20 Mientras tanto, en una realización de ejemplo específica de la presente invención, se proporciona un método para preparar células inmunes que incluye un factor inmunorregulador manipulado artificialmente mediante un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.

En una realización, el método puede ser uno para preparar células inmunes manipuladas, en las que se altera la secuencia de un ácido nucleico diana en la célula, que incluye poner las células en contacto con (a) uno o más ácidos nucleicos guía (por ejemplo ARNg) que se direccional al gen DGKA (Dgka) y/o DGKAZ (Dgk $\zeta$ ); y (b) una proteína editora (por ejemplo proteína Cas9).

El método de contacto puede ser introducir el ácido nucleico guía y la proteína editora directamente en las células inmunes mediante un método convencional.

30 El método de contacto puede ser introducir cada molécula de ADN que codifica el ácido nucleico guía y la proteína editora en las células inmunes en un estado en el que estén contenidas en un vector o en un vector separado.

El método de contacto puede lograrse utilizando un vector. El vector puede ser un vector viral. El vector viral puede ser, por ejemplo, un retrovirus, un vector adenoasociado.

35 En el método, se pueden emplear una diversidad de métodos conocidos en la técnica (por ejemplo electroporación, liposomas, vectores virales, nanopartículas, así como el método de proteína de fusión del dominio de translocación de proteínas (PTD), etc.) para el transporte a las células inmunes.

El método puede incluir además la introducción de ARNg direccional a diferentes genes en una célula, o la introducción de un ácido nucleico que codifica dicho ARNg en una célula.

El método puede realizarse *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, *ex vivo*.

40 Por ejemplo, el contacto puede realizarse *in vitro* y las células contactadas pueden ser devueltas al cuerpo del sujeto después del contacto.

El método puede emplear células u organismos inmunes *in vivo*, por ejemplo, células inmunes aisladas del cuerpo humano o células inmunes producidas artificialmente. En un ejemplo, se podría incluir el contacto con células del sujeto que padece cáncer.

45 Las células inmunes utilizadas en el método anterior pueden ser células inmunes derivadas de mamíferos, incluidos primates (por ejemplo humanos, monos, etc.) y roedores (por ejemplo ratones, ratas, etc.). Por ejemplo, las células inmunes pueden ser células NKT, células NK, células T, etc. En particular, las células inmunes pueden ser células inmunes manipuladas a las que se les añaden receptores inmunes (por ejemplo receptores de antígenos químéricos (CAR) o receptores de células T manipulados (TCR) se complementan).

50 Las células inmunes pueden ser manipuladas de tal manera que los receptores inmunes (por ejemplo TCR o CAR) se expresan antes, después o simultáneamente con respecto a la introducción de una mutación en la posición objetivo de las células inmunes en uno o más genes entre Gen PD-1, CTLA-4, TNFAIP3, DGKA

(Dgka), DGKAZ (Dgk $\zeta$ ), Fas, EGR2, PPP2R2D, PSGL-1 y/o TET2.

El método puede realizarse en un medio apropiado para las células inmunes, que puede contener suero (por ejemplo suero fetal bovino o suero humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-gamma, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-15, TGF-beta y TNF-alfa; o en un medio apropiado que pueda contener factores necesarios para la 5 proliferación y viabilidad, incluidos otros aditivos para el crecimiento de células conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo medios esenciales mínimos, RPMI Media 1640, o X-vivo-10, -15, -20, (Lonza)), pero el medio no se limita a ellos.

[Uso]

Se divulga en este documento el uso para el tratamiento de enfermedades mediante un enfoque de 10 inmunoterapia, que incluye la administración de células manipuladas artificialmente (por ejemplo células inmunes o células madre genéticamente manipuladas) a un sujeto.

El sujeto a tratar puede ser un mamífero, incluidos los primates (por ejemplo humanos, monos, etc.) y roedores (por ejemplo ratones, ratas, etc.).

Composición farmacéutica

15 Se divulga aquí una composición para su uso en el tratamiento de enfermedades utilizando una respuesta inmune, por ejemplo, una composición que contiene un gen inmunorregulador manipulado artificialmente o una célula inmune que lo incluye. La composición puede denominarse composición terapéutica, composición farmacéutica o agente terapéutico celular.

En una realización, la composición puede contener células inmunes.

20 En una realización, la composición puede contener un gen manipulado artificialmente para la regulación inmunológica y/o una proteína expresada por el mismo.

Las células inmunes pueden ser células inmunes que ya han experimentado una diferenciación.

Las células inmunes pueden extraerse de la médula ósea o de la sangre del cordón umbilical.

25 Las células inmunes pueden ser células madre. En particular, las células madre pueden ser células madre hematopoyéticas.

La composición puede contener células inmunes manipuladas.

La composición puede contener células inmunes funcionalmente manipuladas.

La composición puede contener células inmunes complementadas con estructura artificial.

En otra realización, la composición puede contener además factores adicionales.

30 La composición puede contener un agente de unión a antígeno.

La composición puede contener citoquinas.

La composición puede contener un secretagogo o inhibidor de citoquinas.

La composición puede contener un portador adecuado para la administración de la célula inmune manipulada al cuerpo.

35 Las células inmunes contenidas en la composición pueden ser alogénicas para el paciente.

Método de tratamiento

Se divulga en este documento un método para tratar una enfermedad en un paciente, que incluye administrar la composición, en la que la producción de la composición y una cantidad efectiva de la composición se describen anteriormente, a un paciente que la necesita.

40 El método puede ser uno que utilice inmunoterapia adoptiva.

- Enfermedad a tratar

La inmunoterapia adoptiva puede utilizarse para tratar cualquier enfermedad específica.

Cualquier enfermedad específica puede ser una enfermedad inmune. En particular, la enfermedad inmune puede ser una enfermedad en la que la competencia inmunológica está deteriorada.

La enfermedad inmune puede ser una enfermedad autoinmune.

Por ejemplo, la enfermedad autoinmune puede incluir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, diabetes mellitus tipo I, enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, etc.

5 La enfermedad inmune puede ser una enfermedad hiperplásica.

Por ejemplo, la enfermedad inmune puede ser una malignidad hematológica o un cáncer sólido. Las malignidades hematológicas representativas incluyen leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia eosinofílica crónica (CEL), síndrome mielodisplásico (MDS), linfoma no Hodgkin (NHL) y mieloma múltiple (MM). Ejemplos de tumores sólidos incluyen cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, carcinoma de huesos y tejidos blandos, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer cervical uterino, cáncer de colon, adenocarcinoma de colon, cáncer colorrectal, tumor desmoide, cáncer embrionario, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, adenocarcinoma gástrico, glioblastoma multiforme, tumores ginecológicos, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer hepático, cáncer de pulmón, melanoma maligno, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, adenocarcinoma del conducto pancreático, tumor astrocítico primario, cáncer de tiroides primario, cáncer de próstata, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, rhabdomiosarcoma, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, tumor de células germinales testiculares, cáncer de células epiteliales urinarias, sarcoma uterino, cáncer uterino, etc.

Un amplio rango de cánceres, incluidos los tumores malignos sólidos y las malignidades hematológicas, pueden ser enfermedades sujetas a tratamiento.

20 Por ejemplo, los tipos de cáncer que se pueden tratar incluyen adenocarcinoma de mama, próstata, páncreas, colon y recto; carcinoma broncogénico de pulmón en todas sus formas (incluido carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas); mieloma; melanoma; hepatoma; neuroblastoma; papiloma; apudoma; coristoma; quiste de la hendidura branquial; síndrome carcinoide maligno; enfermedad cardíaca carcinoide; y carcinoma (por ejemplo Walker, célula basal, basoescamoso, Brown-Pierce, conducto, tumor de Ehrlich, Krebs-2, células de Merkel, mucinoso, pulmón de células no pequeñas, célula de avena, papilar, escirroso, bronquiolar, broncogénico, célula escamosa y célula transicional).

25 Por ejemplo, otros tipos de cáncer que pueden tratarse incluyen: trastorno histiocitocítico; leucemia; histiocitosis maligna; enfermedad de Hodgkin; linfoma no Hodgkin; plasmocitoma; reticulonodetoma; melanoma; carcinoma de células renales; condroblastoma; condroma; condrosarcoma; fibroma; fibrosarcoma; tumores de células gigantes; histiocitoma; lipoma; liposarcoma; mesotelioma; mixoma; mixosarcoma; osteoma; osteosarcoma; cordoma; craneofaringioma; disgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; mesonefroma; miosarcoma; adamantio; cementoma; odontoma; teratoma; timoma; y tumor trofoblástico.

30 Además, los siguientes tipos de cáncer también pueden considerarse susceptibles de tratamiento: adenoma, colangioma, colesteatoma, cilindroma, cistadenocarcinoma, cistadenoma, tumor de células de la granulosa, ginandroblastoma, hepatoma, hidadenoma, tumor de células de los islotes, tumor de células de Leydig, papiloma, tumor de células de Sertoli, tumor de células de la teca, leiomioma uterino, sarcoma uterino, mioblastoma, mioma, miosarcoma, rhabdomioma, rhabdomiosarcoma, ependimoma, ganglioneuroma, glioma, meduloblastoma, meningioma, neurilemoma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibroma, neuroma, 40 paraganglioma, paraganglioma no cromafín y glioblastoma multiforme.

35 Los tipos de cáncer que se pueden tratar también incluyen angioqueratoma; hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia; esclerosis vascular; angiomas; glomangioma; hemangiopericitoma; hemangioma; hemangiopericitoma; hemangiosarcoma; linfangioma; linfangiomioma; linfangiosarcoma; pinealoma; carcinomasarcoma; condrosarcoma; cistosarcoma filodes; fibrosarcoma; hemangiosarcoma; leiomiosarcoma; leucosarcoma; liposarcoma; linfangiosarcoma; miosarcoma; mixosarcoma; carcinoma ovárico; r45 rhabdomiosarcoma; sarcoma; neoplasia; neurofibromatosis y displasia cervical.

45 Además, cualquier enfermedad específica puede ser una enfermedad refractaria para la cual se conocen patógenos pero se desconoce el tratamiento.

La enfermedad refractaria puede ser una enfermedad infecciosa viral.

50 La enfermedad refractaria puede ser una enfermedad causada por un patógeno priónico.

Cualquier enfermedad específica puede ser una enfermedad bacteriana.

Cualquier enfermedad específica puede ser una enfermedad inflamatoria.

Cualquier enfermedad específica puede ser una enfermedad relacionada con el envejecimiento.

- Tratamiento que mejora la inmunidad

- En pacientes con inmunidad significativamente reducida, incluso infecciones leves pueden tener consecuencias fatales. La disminución de la inmunidad es causada por el deterioro funcional de las células inmunes, una cantidad disminuida de producción de células inmunes, etc. Como métodos para mejorar la inmunidad para tratar el deterioro de la función inmunológica, uno puede ser un método de tratamiento permanente que activa la producción de células inmunes normales, y el otro puede ser un método de tratamiento temporal en el que se inyectan temporalmente células inmunes.
- 5 El tratamiento para mejorar la inmunidad puede tener como objetivo inyectar la composición terapéutica en el cuerpo de un paciente para mejorar permanentemente la inmunidad.
- El tratamiento para mejorar la inmunidad puede ser un método de inyectar la composición terapéutica en una parte específica del cuerpo del paciente. En particular, la parte específica del cuerpo puede ser una parte cuyos tejidos suministran fuentes de células inmunes.
- 10 El tratamiento para mejorar la inmunidad puede consistir en crear una nueva fuente de células inmunes en el cuerpo del paciente. En particular, en un ejemplo, la composición terapéutica puede incluir células madre. En particular, las células madre pueden ser células madre hematopoyéticas.
- El tratamiento para mejorar la inmunidad puede tener como objetivo inyectar la composición terapéutica en el cuerpo de un paciente para mejorar temporalmente la inmunidad.
- 15 El tratamiento para mejorar la inmunidad puede consistir en inyectar una composición terapéutica en el cuerpo de un paciente.
- En particular, una composición terapéutica preferida puede contener células inmunes diferenciadas.
- 20 La composición terapéutica utilizada en el tratamiento para mejorar la inmunidad puede contener un número específico de células inmunes.
- El número específico puede variar dependiendo del grado de deterioro de la inmunidad.
- El número específico puede variar dependiendo del volumen del cuerpo.
- El número específico se puede ajustar según la cantidad de citoquinas liberadas por el paciente.
- 25 - Tratamiento de la enfermedad refractaria
- Las técnicas de manipulación de células inmunes pueden proporcionar un método para tratar enfermedades en las que no se conoce el tratamiento completo para patógenos como el VIH, los priones y el cáncer. Aunque se conocen los patógenos de estas enfermedades, en muchos casos estas enfermedades son difíciles de tratar porque existen problemas debido a que los anticuerpos apenas se forman, las enfermedades progresan rápidamente e inactivan el sistema inmunitario del paciente y los patógenos tienen un período de latencia en el cuerpo. Las células inmunes manipuladas pueden ser un medio poderoso para resolver estos problemas.
- 30 El tratamiento de la enfermedad refractaria puede realizarse inyectando la composición terapéutica en el cuerpo. En particular, una composición terapéutica preferida puede contener células inmunes manipuladas. Además, la composición terapéutica puede inyectarse en una parte específica del cuerpo.
- 35 Las células inmunes manipuladas pueden ser aquellas en las que las células inmunes tienen una capacidad mejorada para reconocer el patógeno de la enfermedad objetivo.
- Las células inmunes manipuladas pueden ser aquellas en las que se mejora la intensidad o actividad de la respuesta inmune.
- Tratamiento de corrección genética
- 40 Además del método de tratamiento que utiliza células inmunes extraídas exógenamente, puede haber un método de tratamiento que afecte directamente la expresión de las células inmunes mediante la manipulación del gen de un cuerpo vivo. Este método de tratamiento puede lograrse inyectando directamente una composición de corrección genética para manipular un gen en el cuerpo.
- La composición de corrección genética puede contener un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía.
- 45 La composición de corrección genética puede inyectarse en una parte específica del cuerpo.
- La parte específica del cuerpo puede ser una fuente de células inmunes, por ejemplo, la médula ósea.
- Se divulga un método para tratar una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una composición que contiene los componentes de un sistema inmunitario manipulado artificialmente descrito anteriormente.

En cualquier realización, los métodos de tratamiento proporcionan un uso de poblaciones de células manipuladas o modificadas de manera recombinante *ex vivo*, *por ejemplo*, a través de vectores virales. En una realización adicional, la población de células modificadas es una célula homóloga, alogénica o autóloga. En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, la población de células manipuladas o modificadas 5 puede formularse además con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable como se describe en este documento.

El sujeto a administrar puede ser un mamífero, incluidos primates, por ejemplo humanos, monos, etc.; y roedores, por ejemplo ratones, ratas, etc.

La administración se refiere a la administración de objetos a un sujeto, independientemente de la ruta o modo 10 de administración. La administración puede realizarse de forma continua o intermitente y por vía parenteral.

En ciertas realizaciones, la coadministración con un agente terapéutico adyuvante puede implicar la administración simultánea y/o secuencial de múltiples agentes en cualquier orden y cualquier régimen de dosificación (por ejemplo, administración de una o más citoquinas junto con células T huésped recombinantes 15 específicas de antígeno y células que expresan antígeno; terapia inmunosupresora, por ejemplo, inhibidores de calcineurina, corticosteroides, inhibidores de microtúbulos, profármacos de ácido micofenólico en dosis bajas o cualquier combinación de los mismos).

En ciertas realizaciones, la administración puede repetirse varias veces y durante un período de unas pocas semanas, unos pocos meses o hasta dos años.

La composición puede administrarse de una manera adecuada para la enfermedad o las condiciones que se 20 están tratando o previniendo, según lo determinen los expertos en las técnicas médicas. Una dosis apropiada, una duración adecuada y una frecuencia de administración de la composición estarán determinadas por factores como el estado de salud del paciente, el tamaño del paciente (es decir, peso, masa, área corporal), el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, la forma particular del ingrediente activo y el método de administración.

25 Por ejemplo, la administración de la composición puede realizarse de cualquier manera conveniente, por ejemplo inyección, transfusión, implantación, trasplante, etc.). La vía de administración puede seleccionarse entre subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, intravenosa, intralinfática, intraperitoneal, intraperitoneal, administraciones intraperitoneales, etc.

30 Se puede seleccionar una dosis única de la composición (una cantidad farmacéuticamente eficaz para lograr el efecto deseado) de entre todos los valores enteros en el rango de aproximadamente  $10^4$  hasta  $10^9$  células/kg de peso corporal del sujeto (por ejemplo aproximadamente  $10^5$  hasta  $10^6$  células/kg (peso corporal)) a administrar, pero la dosis no está limitada a la misma, y la dosis única de la composición puede prescribirse apropiadamente considerando la edad, las condiciones de salud y el peso del sujeto a administrar, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hubiera, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

35 Cuando un factor inmunorregulador manipulado artificialmente se regula mediante los métodos y composiciones de la presente especificación, se puede mejorar la eficacia inmunológica implicada en la supervivencia, proliferación, persistencia, citotoxicidad, liberación y/o infiltración de citoquinas, etc. de las células inmunes.

### Ejemplos experimentales

#### 40 Ejemplo 1: Preparación de células (activación y cultivo) y transfección

Las células Jurkat (ATCC TIB-152; línea celular inmortalizada de células T humanas) fueron cultivados en medio RPMI 1640 complementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (GeneA11). Las células se incubaron en una incubadora bajo condiciones de 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

45 Las células T humanas ingenuas (tecnología STEMCELL) se cultivaron en medio X-VIVO 15 (Lonza) complementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal (GeneA11) y/o IL-2 (50 U/mL), IL-7 (5 ng/mL) e IL-15 (5 ng/mL) (PEPROTECH). Para la activación celular, la concentración de células en el medio se mantuvo en 1x10<sup>6</sup> células/mL, respectivamente.

50 Se añadieron perlas CD2/CD3/CD28 (Dynabeads anti-CD2/3/CD28; Miltenyi Biotec) en una relación de 3: 1 (perlas: células; número de perlas y células), y las células se incubaron en una incubadora bajo condiciones de 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de realizar la activación celular durante 72 horas, las perlas CD2/CD3/CD28 se retiraron utilizando un imán y las células se cultivaron adicionalmente durante 12-24 horas en ausencia de perlas.

Para encontrar un ARNg capaz de inactivar un gen específico con alta eficiencia, se introdujeron 1 ug de ARNsg transcrita *in vitro* y 4 ug de proteína Cas9 (Toolgen, Corea) en 1 x 10<sup>6</sup> células Jurkat mediante electroporación

(*in vitro*) como se describe en los Ejemplos 2 y 3 a continuación. Utilizando la punta de 10uL del sistema de transfección Neon (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY), se introdujo el gen en las siguientes condiciones:

Jurkats (Tampón R): 1,400 V, 20 ms, 2 pulsos.

- 5 De manera similar, se introdujeron 1 ug de ARNg y 4 ug de proteína Cas9 (Toolgen, Corea) en 1x10 ^ 6 células T primarias humanas mediante electroporación para inactivar genes específicos en las células T. El ARNg utilizado en este estudio es ARNsg transcrita *in vitro* y tratado con AP (fosfatasa alcalina); o complejo ARNcr y ARNtracr sintetizado químicamente (Integrated DNA Technologies). Para la electroporación, se utilizó una punta de 10 uL del sistema de transfección Neon (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) para introducir el gen en las siguientes condiciones:

10 Células T primarias humanas (Tampón T): 1,550 V, 10 ms, 3 pulsos;

Las células se sembraron en 500 ul de medio sin antibiótico y se cultivaron en una incubadora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### Ejemplo 2: Diseño y síntesis de ARNsg

15 2.1. Diseño de ARNsg

Las regiones diana de CRISPR/Cas9 del gen PD-1 humano (PDCD1; No. de acceso NCBI NM\_005018.2), gen CTLA-4 (No. de acceso NCBI NM\_001037631.2), gen A20 (TNFAIP3; No. de acceso NCBI NM\_001270507.1), gen Dgk-alfa (No. de acceso NCBI NM\_001345.4), gen Dgk-zeta (No. de acceso NCBI NM\_001105540.1), gen Egr2 (No. de acceso NCBI NM\_000399.4), gen PPP2r2d (No. de acceso NCBI NM\_001291310.1), gen PSGL-1 (No. de acceso NCBI NP\_001193538.1) y gen Tet2 (No. de acceso NCBI NM\_017628.4) utilizando las herramientas CRISPR RGEN (Institute for Basic Science, Corea) y estimado mediante prueba fuera del objetivo. Para las regiones objetivo de CRISPR/Cas9, se seleccionaron secuencias de ADN sin sitios de no coincidencia de 0-, 1- o 2 pb como regiones objetivo del ARNsg, excepto para las regiones de secuencia en objetivo en el genoma humano (GRCh38 / hg38).

25 2.2 Síntesis de ARNsg

Las plantillas para la síntesis de ARNsg se amplificaron mediante PCR mediante recocido y la extensión de dos oligonucleótidos complementarios.

30 La secuencia de regiones objetivo utilizadas en este momento, la secuencia del cebador para amplificarlas y la secuencia diana de ADN a la que se dirige el ARNsg obtenido a partir de ellas se describen en la Tabla 2 a continuación.

La transcripción *in vitro* se realizó utilizando la ARN polimerasa T7 (New England Biolabs) para el ADN de plantilla (excepto para 'NGG' en el extremo 3' de la secuencia diana), el ARN se sintetizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y luego se utilizó la ADNasa (Ambion) para eliminar el ADN de plantilla. El ARN transcrita se purificó mediante el kit Expiin Combo (GeneA11) y precipitación con isopropanol

35 En experimentos con células T, con el fin de minimizar la inmunogenicidad y degradación del ARNsg, los residuos de fosfato del terminal 5' se eliminaron del ARNsg sintetizado mediante el método anterior utilizando fosfatasa alcalina (New England Biolabs) y luego el ARN se purificó nuevamente mediante el kit Expiin Combo (GeneA11) y precipitación con isopropanol. Además, se utilizó ARNsg sintetizado químicamente (Trilink) en algunos experimentos con células T.

40 El ARNsg sintetizado químicamente utilizado en un determinado ejemplo fue ARNsg modificado con 2'OMe y fosforotioato.

Por ejemplo, el ARNsg #11 de DGKα usado en este ejemplo tiene una estructura de 5'-2'OMe(C(ps)U(ps)C(ps)) UCA AGC UGA GUG GGU CCG UUU UAG AGC UAG AAA UAG CAA GUU AAA AUA AGG CUA GUC CGU UAU CAA CUU GAA AAA GUG GCA CCG AGU CGG UGC 2'OMe(U(ps)U(ps)U(ps)U -3' (2'OMe = 2'-metil ARN y ps=fosforotioato).

45 En otro ejemplo, el A20 ARNsg # 1 utilizado en esta realización es GCUUGUGGCUGAAAACGAAGCUUGUGGCUGAAAACGAAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (la parte en negrita es la secuencia que se hibrida con la región de la secuencia diana; sgRNA para otro gen diana u otra secuencia diana es que la secuencia en negrita tiene una secuencia diana (solo, T se cambia a U)), modificada de la misma en la que los tres nucleótidos en el extremo 3' de la secuencia y los tres nucleótidos en el extremo 5' están modificados con 2'-OMe y una introducción de cadena principal de fosforotioato)

[Tabla 2]

Gen	#	ADN secuencia diana	Secuencia de cebador directo	Cebador inverso	SEQ ID NO
A20	1	CTTGTGGCGCTGA AAACGAACGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTTGT GGCGCTGAAAACG AAGTTTAGAGCTA AAATAGC	AAAAAAAGC ACCGACTCG GTGCCACTTT TTCAAGTTGA TAACGGACT AGCCTTATT TAACTTGCTA TTCTAGCTC TAAAAC	SEQ ID NO 1
	2	ATGCCACTTCTCA GTACATGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGATGCC ACTTCTAGTACAT GGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 2
	3	GCCACTTCTCAGT ACATGTGGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCCAC TTCTCAGTACATGT GGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 3
	4	GCCCCACATGTAC TGAGAAGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCCCC ACATGTACTGAGAA GGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 4
	5	TCAGTACATGTGG GGCGTTCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTCAGT ACATGTGGGGCGTT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 5
	6	GGGCGTTCAAGGA CACAGACTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGCG TTCAAGTACACAGAC TGTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 6
	7	CACAGACTTGGTA CTGAGGAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCACAG ACTGGTACTGAGG AGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 7
	8	GGCGCTGTTCAAGC ACGCTCAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGCGC TGTTCAGCACGCTC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 8

9	CACGCAACTTAA ATTCCGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCACGC AACTTTAAATTCCG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 9	
10	CGGGGCTTGTCA TGATACTCGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCGGGG CTTTGCTATGATACT GTTTTAGAGCTAGA AAATAGC		SEQ ID NO 10	
11	GGCTTCCACAGA CACACCCATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGCTT CCACAGACACACCC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 11	
12	TGAAGTCCACTTC GGGCCATGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGAAG TCCACTTCGGGCCA TGTGTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 12	
Gen	#	ADN secuencia diana	Secuencia de cebador directo	Cebador inverso	SEQ ID NO
	1	CTGTACGACACG GACAGAAATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTGTA CGACACGGACAGA AAGTTTTAGAGCTA GAAATAGC		SEQ ID NO 13
	2	TGTACGACACGG ACAGAAATGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGTAC GACACGGACAGAA ATGTTTTAGAGCTA GAAATAGC		SEQ ID NO 14
	3	CACGGACAGAAA TGGGATCCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCACGG ACAGAAATGGGATC CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 15
	4	GATGCGAGTGGC TGAATACCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGATGC GAGTGGCTGAATAC CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 16

Gen	#	ADN secuencia diana	Secuencia de cebador directo	Cebador inverso	SEQ ID NO
DGK $\alpha$	5	GAGTGGCTGAAT ACCTGGATTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGAGTG GCTGAATACCTGGA TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 17
	6	AGTGGCTGAATAC CTGGATTGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGAGTG CTGAATACCTGGAT TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	AAAAAAAGC ACCGACTCG GTGCCACTTT TTCAAGTTGA	SEQ ID NO 18
	7	ATTGGGATGTGT CTGAGCTGAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGATTGG GATGTGCTGAGCT GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	TAACGGACT AGCCTTATT TAACTTGCTA TTCTAGCTC TAAAAC	SEQ ID NO 19
	8	ATGAAAGAGATT GACTATGATGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGATGAA AGAGATTGACTATG AGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 20
	9	CTCTGTCTCTCAA GCTGAGTGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCTCTG TCTCTCAAGCTGAG TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 21
	10	TCTCTCAAGCTGA GTGGGTCCGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGTCTCTC AAGCTGAGTGGGTC GTTTTAGAGCTAGA AAATAGC		SEQ ID NO 22
	11	CTCTCAAGCTGA GTGGGTCCGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCTCTC AAGCTGAGTGGGTC CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 23
	12	CAAGCTGAGTGG GTCCGGGCTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCAAGC TGAGTGGGTCCGG GCGTTTAGAGCTA GAAATAGC		SEQ ID NO 24

1	TTGACATGACTG GAGAGAAAGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTGAC ATGACTGGAGAGA AGGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO 25
2	GACTGGAGAGAA GAGGTCTGTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGACTG GAGAGAAGAGGTC GTGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO 26
3	GAGACGGGAGCA AAGCTGCTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGAGAC GGGAGCAAAGCTG CTGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO 27
4	AGAGACGGGAGC AAAGCTGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGAGA CGGGAGCAAAGCT GCGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO 28
5	TGGTTCTAGGTG CAGAGACGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGGTT CTAGGTGCAGAGAC GTTTTAGAGCTAGA AATAGC	SEQ ID NO 29
6	TAAGTGAAGGTCT GGTTTCTAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTAAGT GAAGGTCTGGTTTC TGTGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 30
7	TGCCCATGTAAGT GAAGGTCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTCCCC ATGTAAGTGAAGGT CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 31
8	GAACTTGCCCATG TAAGTGAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGAACT TGCCCATGTAAGTG AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 32

9	TCCATTGACCCTC AGTACCCCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTCATT GACCCCTCAGTACCC GTTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO 33
10	TATGCCTCTGGG TAGCAGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTATGC CTTCTGGGTAGCAG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 34
11	TGAGTGCAGGCAT CTTGCAAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGA GCAGGCATCTTGCA AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 35
12	GAGTGCAGGCAT CTTGCAAGGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGAGTG CAGGCATCTTGCAA GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 36
13	GATGAGGCTGTG GTTGAAGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGATGA GGCTGTGGTTGAAG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 37
14	CCACTGGCCACA GGACCCCTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCACT GGCCACAGGACCC CTGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO 38
15	GGGACATGGTGC ACACACCCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGGAC ATGGTGCACACACC CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 39
16	GAGTACAGGTGG TCCAGGTCAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGAGTA CAGGTGGTCCAGGT CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 40

EGR2	17	GCGGAGAGTACA GGTGGTCCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCGGA GAGTACAGGTGGTC CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	AAAAAAAGC ACCGACTCG GTGCCACTTT TTCAAGTTGA TAACGGACT	SEQ ID NO 41
	18	GCGGTGGCGGAG AGTACAGGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCGGT GGCGGAGAGTACA GGGTTTAGAGCTA AAATAGC	AGCCTTATT TAACTGCTA TTTCTAGCTC TAAAAC	SEQ ID NO 42
	19	TCTCCTGCACAGC CAGAATAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTCTCCT GCACAGCCAGAAT AGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 43
	20	ACGCAGAAGGGT CCTGGTAGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGACGCA GAAGGGTCTGGTA GGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 44
	21	AGGTGGTGGTA GGCCAGAGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGGTG GTGGTAGGCCAG AGGTTTAGAGCTA AAATAGC		SEQ ID NO 45
	22	CCCAAGCCAGCC ACGGACCCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCAA GCCAGCCACGGAC CCGTTTAGAGCTA AAATAGC		SEQ ID NO 46
	23	ACCTGGGTCCGTG GCTGGCTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGACCTG GGTCCGTGGCTGGC TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 47
	24	AAGAGACCTGGG TCCGTGGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAAGAG ACCTGGGTCCGTGG CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 48

25	GGATCATTGGGA AGAGACCTGGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGGGATC ATTGGGAAGAGAC CTGTTTAGAGCTA AAATAGC	SEQ ID NO 49
26	GGGATCATTGGG AAGAGACCTGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGGGAT CATTGGGAAGAGA CCGTTTAGAGCTA AAATAGC	SEQ ID NO 50
27	CAGGATAGTCTGG GATCATTGGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGCAGGA TAGTCTGGGATCAT TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 51
28	GGAAAGAACCCA GGATAGTCTGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGGGAAA GAATCCAGGATAGT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 52
29	CAGTGCCAGAGA GACCTACATGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGCAGTG CCAGAGAGACCTAC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 53
30	CTGTACCATGTAG GTCTCTCTGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGCTGTA CCATGTAGGTCTCT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 54
31	AGAGACCTACAT GGTACAGCTGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGAGAGA CCTACATGGTACAG CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 55
32	CTGGGCCAGCTGT ACCATGTAGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGCTGGG CCAGCTGTACCATG TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 56

33	AGGGAAAGGGCTACGGTCTGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGAGGGAAAGGGCTTACGGTC TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 57	
34	CAGGGAAAGGGCTTACGGTCTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCAGGGAAAGGGCTTACGGT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 58	
Gen	#	ADN secuencia diana	Secuencia de cebador directo	Cebador inverso	SEQ ID NO
	5	TCTGGAGATCTCTTGCAACAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGTCTGG AGATCTCTTGCAA CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 59
	6	CTCCGGTTCATGACTTGAAAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCTCG GTTCATGACTTTGA AGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 60
	7	GTCTTCCATCTCTGCTTCAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGTCTT CCATCTCGTCTTC GTTTAGAGCTAGA AAATAGC		SEQ ID NO 61
	8	GAAGACTTCGAGACCCATTAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGAAGA CTTCGAGACCCATT TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 62
	9	TCGAGACCCATTAGGATCACGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGTCGAG ACCCATTAGGATC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 63
	10	GTAGCGCCGTGATCCTAAATGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGTAGC GCCGTGATCCTAAA TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 64

PPP2R2D	11	CGTAGGCCGTG ATCCTAAATGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCGTAG CGCCGTGATCCTAA AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 65
	12	CATTTAGGATCAC GGCGCTACGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCATTTA GGATCACGGCGCTA GTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO 66
	13	GGTCCCATAATTG AAGCCCATGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGGTCC CAATATTGAAGCCC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 67
	14	GATCCATGGGCTT CAATATTGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGATCC ATGGGCTTCAATAT TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 68
	15	AGATCCATGGGCT TCAATATTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGAGATC CATGGGCTTCAATA TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 69
	16	GCTTCTACCATAA GATCCATGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGCTTC TACCATAAGATCCA TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 70
	17	CGCTTCTACCATA AGATCCATGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCGCTT CTACCATAAGATCC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 71
	18	GCATTTGCAAAAA TTCGCCGTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGCATT TGCAAAAATTGCC GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 72

19	ATGACCTGAGAAT TAATTTATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGATGAC CTGAGAATTAATT AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 73
20	CCATGCACTCCCA GACATCGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCATG CACTCCCAGACATC GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 74
21	GCACTGGTGC GG GTGGAAC TCGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGC ACT GGTGGGGTGGAA CTGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO 75
22	ACACGTTGCACTG GTGCGGGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGACACG TTGCACTGGTGC GG GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 76
23	CGAACACGTTGCA CTGGTGC GGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCGAAC ACGTTGCACTGGT G CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 77
24	ACGAACACGTTGC ACTGGTGC GGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGACGAA CACGTTGCACTGGT GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 78
25	TGTAGACGAACA CGTTGCACTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGTAG ACGAACACGTTGCA CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 79
26	GCGCATGTCACAC AGGCGGATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGC GCA TGTACACAGGC GG AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 80

27	AGGAGCGCATGT CACACAGGCGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGAGGAG CGCATGTCACACAG GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 81
28	CCGAGGAGCGCA TGTACACAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCCGAG GAGCGCATGTCACA CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 82
29	CCTGTGTGACATG CGCTCCTCGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCCTGT GTGACATGCGCTCC TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO 83
Gen	#	ADN secuencia diana	Secuencia de cebador inverso
	1	CGACTGGCCAGG GCGCCTGTGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCGACT GGCCAGGGCGCCT GTGTTTTAGAGCTA AAATAGC
	2	ACCGCCCAGACG ACTGGCCAGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGACCGC CCAGACGACTGGCC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC
	3	CACCGCCCAGAC GACTGGCCAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCACCG CCCAGACGACTGGC CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC
	4	GTCTGGGCCGTG CTACAACCTGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGTCTG GGCGGTGCTACAAC TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC
	5	CTACAACCTGGGCT GGCGGCCAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCTACA ACTGGGCTGGCGG CCGTTTTAGAGCTA AAATAGC

Gen	#	ADN secuencia diana	Secuencia de cebador directo	Cebador inverso	SEQ ID NO
					SEQ ID NO
PD-1	6	CACCTACCTAAG AACCATCCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCACCT ACCTAAGAACCATC CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	AAAAAAAGC ACCGACTCG GTGCCACTTT TTCAAGTTGA TAACGGACT AGCCTTATT TAACTTGCTA	SEQ ID NO 89
	7	CGGTCAACCACGA GCAGGGCTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCGGTC ACCACGAGCAGGG CTGTTTAGAGCTA AAATAGC	TTTCTAGCTC TAAAAC	SEQ ID NO 90
	8	GCCCTGCTCGTGG TGACCGAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCCCT GCTCGGGTGACCG AGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 91
	9	CGGAGAGCTTCGT GCTAAACTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCGGAG AGCTTCGTGCTAAA CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 92
	10	CAGCTTGTCCGTC TGGTTGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCAGCT TGTCCGTCTGGTTG CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 93
	11	AGGCGGCCAGCT TGTCCGTCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGGCG GCCAGCTTGTCCGT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 94
	12	CCGGGCTGGCTG CGGTCTCGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCGGG CTGGCTCGGTCT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 95
	13	CGTTGGGCAGTTG TGTGACACGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCGTTG GGCAGTTGTGTGAC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 96

CTLA-4	1	CATAAAGCCATG GCTTGCCCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCATAA AGCCATGGCTTGCC TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 97
	2	CCTTGGATTTCAG CGGCACAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCTTG GATTCAAGCGGCAC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 98
	3	CCTTGTGCCGCTG AAATCCAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCTTG TGCCGCTGAAATCC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 99
	4	CACTCACCTTTC AGAAGACAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCACTC ACCTTGCAGAAGA CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 100
	5	TTCCATGCTAGCA ATGCACGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTCCAT GCTAGCAATGCACG GTTTAGAGCTAGA AAATAGC		SEQ ID NO 101
	6	GGCCACGTGCATT GCTAGCATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGCCA CGTGCATTGCTAGC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	AAAAAAAGC ACCGACTCG GTGCCACTTT TTCAAGTTGA TAACGGACT	SEQ ID NO 102
	7	GGCCCAGCCTGCT GTGGTACTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGCCC AGCCTGCTGTGGTA CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	AGCCTTATTT TAACTTGCTA TTTCTAGCTC TAAAAC	SEQ ID NO 103
	8	AGGTCCGGGTGA CAGTGCTTCGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGGTC CGGGTGACAGTGCT TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO 104

9	CCGGGTGACAGT GCTTCGGCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCGGG TGACAGTGCTTCGG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO105	
10	CTGTGCGGCAACC TACATGATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTGTG CGGCAACCTACATG AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO106	
11	CAACTCATTCCCC ATCATGTAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCAACT CATTCCCCATCATG TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO107	
12	CTAGATGATTCCA TCTGCACGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTAGA TGATTCCATCTGCA CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO108	
Gen	#	ADN secuencia diana	Secuencia de cebador directo	
			Cebador inverso	
	1	GGCTAGGAGTCA GCGACATATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGCTA GGAGTCAGCGACAT AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO109
	2	GCTAGGAGTCAG CGACATATGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCTAG GAGTCAGCGACATA TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO110
	3	CTAGGAGTCAGC GACATATGGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTAGG AGTCAGCGACATAT GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO111
	4	GTACTGTGTAGC CAGGATGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTACT GTGTAGCCAGGATG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO112

DGKZ	5	ACGAGCACTCAC CAGCATCCTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGACGAG CACTCACCAGCATC CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID No113
	6	AGGCTCCAGGAA TGTCCGCGAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGAGGCT CCAGGAATGTCCGC GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID No114
	7	ACTTACCTCGCGG ACATTCCTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGACTTA CCTCGCGGACATTG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID No115
	8	CACCCCTGGGCACT TACCTCGCGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCACCC TGGGCACCTTACCTC GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	AAAAAAAGC ACCGACTCG
	9	GTGCCGTACAAA GGTTGGCTGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGTGCC GTACAAAGGTTGGC TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	GTGCCACTTT TTCAGTTGA TAACGGACT AGCCTTATT TAACTTGCTA
	10	GGTGCCGTACAA AGGTTGGCTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGGTGC CGTACAAAGGTTGG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	TTTCTAGCTC TAAAAC
	11	CTCTCCTCAGTAC CACAGCAAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCTCTC CTCAGTACCAACAGC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID No119
	12	CCTGGGGCCTCC GGGCGCGGGAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCCTGG GGCCTCCGGGCGC GGGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID No120

13	AGTACTCACCTGG GGCCTCCGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGTAC TCACCTGGGGCCTC CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO121	
14	AGGGTCTCCAGC GGCCCTCCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGGGT CTCCAGCGGCCCTC CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO122	
15	GCAAGTACTTACG CCTCCTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCAAG TACTTACGCCCTCCT GTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO123	
16	TTGCGGTACATCT CCAGCCTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTGCG GTACATCTCCAGCC TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO124	
17	TTTGCAGGTACATC TCCAGCCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTGC GGTACATCTCCAGC CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO125	
Gen	#	ADN secuencia diana	Secuencia de cebador inverso	SEQ ID NO
1	GCAAAACCTGTC CACTCTTATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCAA ACCTGTCCACTCTT AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO126	
2	TTGGTGCCATAAG AGTGGACAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTGGT GCCATAAGAGTGG ACGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO127	
3	GGTGCAAGTTTC TTATATGTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGTGC AAGTTCTTATATGT GTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO128	

4	ACCTGATGCATA TAATAATCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGACCTG ATGCATATAATAAT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO129
5	ACCTGATTATTAT ATGCATCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGACCTG ATTATTATATGCATC GTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO130
6	CAGAGCACCAGA GTGCCGTCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCAGAG CACCAGAGTGCCGT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO131
7	AGAGCACCAGAG TGCCGTCTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGAGC ACCAGAGTGCCGT TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO132
8	AGAGTGCCGTCTG GGTCTGAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGAGT GCCGTCTGGGTCTG AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO133
9	AGGAAGGCCGTC CATTCTCAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGGAA GGCCGTCCATTCTC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO134
10	GGATAGAACCAA CCATGTTGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGATA GAACCAACCATGTT GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO135
11	TCTGTTGCCCTCA ACATGGTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTCTGTT GCCCTCAACATGGT GTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO136

12	TTAGTCTGTTGCC CTCAACATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTAGT CTGTTGCCCTCAAC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO137
13	GTCTGGCAAATGG GAGGTGATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTCTG GCAAATGGGAGGT GAGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO138
14	CAGAGGTTCTGTC TGGCAAATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCAGAG GTTCTGTCTGGCAA AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO139
15	TTGTAGCCAGAGG TTCTGTCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTGTA GCCAGAGGTTCTGT CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO140
16	ACTTCTGGATGAG CTCTCTCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGACTTCT GGATGAGCTCTCTC GTTTTAGAGCTAGA AATAGC	SEQ ID NO141
17	AGAGCTCATCCAG AAGTAAATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGAGC TCATCCAGAAGTAA AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO142
18	TTGGTGTCTCCAT TTACTTCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTGGT GTCTCCATTACTTC GTTTTAGAGCTAGA AATAGC	SEQ ID NO143
19	TTCTGGCTTCCCTT CATACAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTCTG GCTTCCCTTCATAC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO144

Tet2	20	CAGGACTCACAC GACTATTCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCAGGA CTCACACGACTATT CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	AAAAAAAAGC ACCGACTCG GTGCCACTTT TTCAGTTGA TAACGGACT AGCCTTATT TAACTTGCTA TTTCTAGCTC TAAAAC	SEQ ID NO145
	21	CTACTTTCTTGTGT AAAGTCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTACTT TCTTGTGTAAAGTC GTTTTAGAGCTAGA AAATAGC		SEQ ID NO146
	22	GACTTTACACAAG AAAGTAGAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGACTT TACACAAGAAAGTA GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO147
	23	GTCTTTCTCCATTA GCCTTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTCTTT CTCCATTAGCCTTG TTTTAGAGCTAGAA ATAGC		SEQ ID NO148
	24	AATGGAGAAAGA CGTAACCTCGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAATGG AGAAAGACGTAACT TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO149
	25	ATGGAGAAAGAC GTAACCTCGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGATGGA GAAAGACGTAACTT CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO150
	26	TGGAGAAAGACG TAACTTCGGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGAG AAAGACGTAACTTC GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO151
	27	TTTGGTTGACTGC TTTCACCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTGGT TGACTGCTTCACC GTTTTAGAGCTAGA AAATAGC		SEQ ID NO152

28	TCACTCAAATCGG AGACATTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTCACT CAAATCGGAGACAT TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO153
29	ATCTGAAGCTCTG GATTTTCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGATCTG AAGCTCTGGATTT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO154
30	GCTTCAGATTCTG AATGAGCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCTTC AGATTCTGAATGAG CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO155
31	CAGATTCTGAATG AGCAGGAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCAGAT TCTGAATGAGCAGG AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO156
32	AAGGCAGTGCTA ATGCCTAATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAAGGC AGTGCTAATGCTA AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO157
33	GCAGAAACTGTA GCACCATTAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCAGA AACTGTAGCACCAT TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO158
34	ACCGCAATGGAA ACACAATCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGACCGC AATGGAAACACAAT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO159
35	TGTGGTTTCTGC ACCGCAATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGTGG TTTCTGCACCGCA AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO160

36	CATAAATGCCATT AACAGTCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCATAA ATGCCATTAACAGT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO161
37	ATTAGTAGCCTGA CTGTTAATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGATTAG TAGCCTGACTGTTA AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO162
38	CGATGGGTGAGT GATCTCACAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCGATG GGTAGTGTACTCA CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO163
39	ACTCACCCATCGC ATACCTCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGACTCA CCCATCGCATAACCT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO164
40	CTCACCCATCGCA TACCTCAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTCAC CCATCGCATAACCTC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO165
Gen	#	ADN secuencia diana	Secuencia de cebador directo
			Cebador inverso
	1	AGCAACAGGAGG AGTTGCAGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGCAA CAGGAGGAGTTGC AGGTTTAGAGCTA GAAATAGC
	2	CCAGTAGGATCA GCAACAGGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCAGT AGGATCAGCAACA GGGTTTAGAGCTA GAAATAGC
	3	CTCCTGTTGCTGA TCCTACTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTCCT GTTGCTGATCCTAC TGTTTAGAGCTAG AAATAGC
			SEQ ID NO
			SEQ ID NO166
			SEQ ID NO167
			SEQ ID NO168

4	GGCCCAAGTAGGA TCAGCAACAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGCCC AGTAGGGATCAGCAA CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO169
5	TTGCTGATCCTAC TGGGCCCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTGCT GATCCTACTGGGCC CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO170
6	TGGCAACACAGCTTG CAGCTGTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGGCA ACAGCTTGCAGCTG TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO171
7	CTTGGGTCCCCCTG CTTGCCCCGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTTGG GTCCCCCTGCTTGCC CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO172
8	GTCCCCCTGCTTGC CCGGGACCGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTCCC CTGCTTGCCTGGGA CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO173
9	CTCCGGTCCCGG GCAAGCAGGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTCCG GTCCCCGGCAAGC AGGTTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO174
10	TCTCCGGTCCCGG GCAAGCAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTCTCC GGTCCCCGGCAAG CAGTTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO175
11	GTCTCCGGTCCCG GGCAAGCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTCTC CGGTCCCCGGCAA GCGTTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO176

12	GCTTGCCCGGGA CCGGAGACAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCTTG CCCAGGACCGGAG ACGTTTAGAGCTA AAATAGC	SEQ ID NO177
13	GGTGGCCTGTCTC CGGTCCCCGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCTTG CCTGTCTCCGGTCC CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO178
14	CGGTGGCCTGTCT CCGGTCCCCGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCGGTG GCCTGTCTCCGGTC CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO179
15	CATATTGGTGGC CTGTCTCCGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCATATT CGGTGGCCTGTCTC GTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO180
16	ATCTAGGTACTCA TATTGGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGATCTA GGTACTCATATTG GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO181
17	ATAATCTAGGTA CTCATATTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGATAAT CTAGGTACTCATAT GTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO182
18	TTATGATTCTTG CCAGAAACGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTATG ATTCTCTGCCAGAA AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO183
19	ATTTCTGGAGGCT CCGTTCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGATTCT GGAGGCTCCGTTTC GTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO184

20	ACTGACACCACTC CTCTGACTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGACTGA CACCACTCCTCTGA CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO185
21	CTGACACCACTCC TCTGACTGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCTGAC ACCACTCCTCTGAC TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO186
22	ACCACTCCTCTGA CTGGGCCTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGACCAAC TCCTCTGACTGGGC CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO187
23	AACCCCTGAGTCT ACCACTGTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGAACCC CTGAGTCTACCACT GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO188
24	CTCCACAGTGGTA GACTCAGGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCTCA CAGTGGTAGACTCA GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO189
25	GCTCCACAGTGGT AGACTCAGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGCTCC ACAGTGGTAGACTC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO190
26	GGCTCCACAGTG GTAGACTCAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGGCTC CACAGTGGTAGACT CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO191
27	CCTGCTGCAAGGC GTTCTACTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCCTGC TGCAAGGCGTTCTA CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO192

28	CCAGTAGAACGC CTTGCAGCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCAGT AGAACGCCTGCAG CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO193
29	CGTTCTACTGGCC TGGATGCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCGTTC TACTGGCCTGGATG CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO194
30	TCTACTGGCCTGG ATGCAGGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTCTACT GGCCTGGATGCAG GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO195
31	CCACGGAGCTGG CCAACATGGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCACG GAGCTGGCCAACAT GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO196
32	CGTGGACAGGTTC CCCATGTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCGTGG ACAGGTTCCCCATG TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO197
33	GTCCACGGATTCA GCAGCTATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTCCA CGGATTCAAGCAGCT AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO198
34	GACCACTCAACCA GTGCCACGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGACCA CTCAACCAGTGCC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO199
35	GGAGTGGTCTGTG CCTCCGTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGAGT GGTCTGTGCCTCCG TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO200

PSGL-1	36	GGCACAGACAAC TCGACTGACGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGCAC AGACAACTCGACTG AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO201	
	37	GACAACTCGACTG ACGGCCACGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGACAA CTCGACTGACGGCC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO202	
	38	AACTCGACTGACCG GCCACGGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAACTC GACTGACGGCCAC GGGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO203	
	39	CACAGAACCCAG TGCCACAGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCACAG AACCCAGTGCCACA GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO204	
	40	GGTAGTAGGTTCC ATGGACAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTAG TAGGTTCCATGGAC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO205	
	41	TGGTAGTAGGTTC CATGGACAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGGTA GTAGGTTCCATGGA CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO206	
	42	TCTTTGGTAGTA GGTTCCATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTCTTT GGTAGTAGGTTCCA GTTTAGAGCTAGA AAATAGC	AAAAAAAGC ACCGACTCG GTGCCACTTT TTCAAGTTGA TAACGGACT AGCCTTATTT TAACTTGCTA TTCTAGCTC TAAAAC	SEQ ID NO207
	43	ATGGAACCTACTA CCAAAAGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGATGGA ACCTACTACCAAAA GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO208	

44	AACAGACCTCTT TGGTAGTAGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGAACAG ACCTCTTTGGTAGT GTTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO209
45	GGGTATGAACAG ACCTCTTTGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGGGTA TGAACAGACCTCTT TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO210
46	TGTGTCCCTGT ACTCACAAAGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGTGTGT CCTCTGTTACTCAC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO211
47	GTGTCCCTGT CTCACAAAGGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGGTGTC CTCTGTTACTCAC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO212
48	GTAGTTGACGGAC AAATTGCTGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGGTAGT TGACGGACAAATTG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO213
49	TTTGTCCGTCAAC TACCCAGTGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGTTGTC CGTCAACTACCCAG GTTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO214
50	TTGTCCGTCAACT ACCCAGTGGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGTTGTC CGTCAACTACCCAG TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO215
51	TGTCCGTCAACTA CCCAGTGGGG	GAAATTAAACGAC TCACTATAGTGTCC GTCAACTACCCAGT GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO216

52	GTCCGTCAACTAC CCAGTGGGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTCCG TCAACTACCCAGTG GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO217
53	CTCTGTGAAGCAG TGCCCTGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTCTG TGAAGCAGTGCCTG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO218
54	CCTGCTGGCCATC CTAATCTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCTGC TGGCCATCCTAATC TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO219
55	CCAAGATTAGGAT GGCCAGCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCAAG ATTAGGATGGCCAG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO220
56	GGCCATCCTAATC TTGGCGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGCCA TCCTAATCTTGGCG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO221
57	CACCAGCGCAA GATTAGGATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCACCA GCGCCAAGATTAGG AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO222
58	AGTGCACACGAA GAAGATAGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGTGC ACACGAAGAAGAT AGGTTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO223
59	TATCTTCTTCGTGT GCACTGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTATCTT CTTCGTGTGCACTG GTTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO224

60	CTTCGTGTGCACT GTGGTGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTTCG TGTGCACTGTGGTG CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO225
61	GGCGGTCCGCCCT CTCCCGCAAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGCGG TCCGCCCTCTCCCGC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO226
62	GCGGTCCGCCCTCT CCCGCAAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGGGT CCGCCCTCTCCCGCA AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO227
63	AATTACGCACGG GGTACATGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAATT CGCACGGGGTACAT GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO228
64	TGGGGGAGTAATT ACGCACGGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGGGG GAGTAATTACGCAC GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO229
65	GTGGGGGAGTAA TTACGCACGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTGGG GGAGTAATTACGCA CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO230
66	GGTGGGGGAGTA ATTACGCACGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGTGG GGGAGTAATTACGC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO231
67	TAATTACTCCCC ACCGAGATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTAATT ACTCCCCACCGAG AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO232

68	AGATGCAGACCA TCTCGGTGGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGATG CAGACCCTCTCGGT GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO233
69	GAGATGCAGACC ATCTCGGTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGAGAT GCAGACCCTCTCGG TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO234
70	TGAGATGCAGAC CATCTCGGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGAGA TGCAGACCCTCTCG GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO235
71	GGATGAGATGCA GACCATCTCGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGATG AGATGCAGACCATC TGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO236
72	ATCTCATCCCTGT TGCCTGATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGATCTC ATCCCTGTTGCCTG AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO237
73	TCATCCCTGTTGC CTGATGGGGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTCATC CCTGTTGCCTGATG GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO238
74	CTCACCCCCATCA GGCAACAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTCAC CCCCATCAGGCAAC AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO239
75	GAGGGCCCCCTCA CCCCCATCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGAGGG CCCCCTCACCCCCAT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO240

76	GGGCCCTCTGCCA CAGCCAATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGGCC CTCTGCCACAGCCA AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO241
77	CCCTCTGCCACAG CCAATGGGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCCTC TGCCACAGCCAATG GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO242
78	CCCCCATGGCTG TGGCAGAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCCCC ATTGGCTGTGGCAG AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO243
79	GCCCCCATGGCT GTGGCAGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCCCC CATTGGCTGTGGCA GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO244
80	GGACAGGCCCCC ATTGGCTGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGACA GGCCCCCATGGCT GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO245
81	CCGGGCTCTGGC CTTGGACAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCGGG CTCTTGGCCTTGGA CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO246
82	CTGTCCAAGGCCA AGAGCCCCGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTGTC CAAGGCCAAGAGC CCGTTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO247
83	TGGCGTCAGGCC CGGGCTCTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGGCG TCAGGGCCGGGCTC TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO248

	84	CGGGCCTGACGC CAGAGCCCAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCGGGC CTGACGCCAGAGCC CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO249
Gen	#	ADN secuencia diana	Secuencia de cebador directo	Cebador inverso	SEQ ID NO
	1	CAACAACCATGCT GGGCATCTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCAACA ACCATGCTGGGCAT CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO250
	2	GAGGGTCCAGAT GCCCGAGCATGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGAGGG TCCAGATGCCAGC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO251
	3	CATCTGGACCCT CCTACCTCTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCATCT GGACCCCTCCTACCT CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO252
	4	AGGGCTCACCAAG AGGTAGGGAGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGAGGGC TCACCAGAGGTAGG AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO253
	5	GGAGTTGATGTC AGTCACTTGGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGGGAGT TGATGTCAGTCACT TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO254
	6	TGGAGTTGATGTC AGTCACTTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGTGGAG TTGATGTCAGTCAC TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO255
	7	AGTGAAGTGCACATC AACTCCAAGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGAGTGA CTGACATCAACTCC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO256

FAS	8	<b>GTGACTGACATC</b> AACTCCAAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTGAC TGACATCAACTCCA AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	AAAAAAAAGC ACCGACTCG GTGCCACTTT TTCAAGTTGA TAACGGACT	SEQ ID NO257
	9	ACTCCAAGGGATT GGAATTGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGACTCC AAGGGATTGGAATT GGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	AGCCTTATT TAACTTQCTA TTTCTAGCTC TAAAAC	SEQ ID NO258
	10	CTTCCTCAATTCC AATCCCTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTTCCT CAATTCCAATCCCT GTTTTAGAGCTAGA AAATAGC		SEQ ID NO259
	11	TACAGTTGAGACT CAGAACTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTACAG TTGAGACTCAGAAC TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO260
	12	TTGGAAGGCCTGC ATCATGATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTGGA AGGCCTGCATCATG AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO261
	13	AGAATTGGCCATC ATGATGCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGAAC TGGCCATCATGATG CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO262
	14	GACAGGGCTTATG GCAGAAATTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGACAG GGCTTATGGCAGAA TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO263
	15	<b>TGTAACATACCT</b> GGAGGGACAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGAA CATACCTGGAGGGAC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO264

16	GTGTAACATACCT GGAGGACAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTGTA ACATACCTGGAGGA CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO265	
Gen	#	ADN secuencia diana	Secuencia de cebador directo	Cebador inverso	
	1	CGTACCTGTGCAA CTCCTGTTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCGTAC CTGTGCAACTCCTG TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO266
	2	GATCTACTGGAAT TCCTAATGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGATCT ACTGGAATTCTAA TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO267
	3	GAGTCAGCTGTTG GCCCATTAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGAGTC AGCTGTTGGCCAT TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO268
	4	CTGCCTACAAACT CAGTCTCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTGCC TACAAACTCAGTCT CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO269
	5	GGGCAGGCAGGA CGGACTCCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGGCA GGCAGGACGGACT CCGTTTAGAGCTA AAATAGC		SEQ ID NO270
	6	GGAGTCCGTCTG CCTGCCCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGAGT CCGTCTGCCCTGCC CGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO271
	7	GAGTCCGTCTGC CTGCCCTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGAGTC CGTCTGCCCTGCC TGTTTAGAGCTAG AAATAGC		SEQ ID NO272

KDM6A	8	GAAAAGGGTCCA TTGGCCAAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGAAAA GGGTCCATTGCCA AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO273
	9	GCCTGCAGAAAA GGGTCCATTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGCCTG CAGAAAAGGGTCC ATGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO274
	10	TTGATGTGCTACA GGGAACATGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTTGAT GTGCTACAGGGAAC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO275
	11	AGCGTTCTTGATG TGCTACAGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGCGT TCTTGATGTGCTAC AGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO276
	12	CAGCGTTCTTGAT GTGCTACAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCAGCG TTCTTGATGTGCTAC GTTTTAGAGCTAGA AATAGC	AAAAAAAAGC ACCGACTCG GTGCCACTTT TTCAAGTTGA TAACGGACT AGCCTTATT TAACTTGCTA TTCTAGCTC TAAAAC
	13	CTGTAGCACATCA AGAACGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCTGTA GCACATCAAGAAC GCGTTTAGAGCTA GAAATAGC	SEQ ID NO278
	14	TGTAGCACATCAA GAACGCTGGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGTGTAG CACATCAAGAACGC TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO279
	15	ATAGGCAATAATE ATATAACAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGATAGG CAATAATCATATAA CGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO280

16	AGTGCCTTCGCT GCAGGTAAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAGTGC GTTTCGCTGCAGGT AGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO281
17	GAGTGAGTGCCTT TCGCTGCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGAGTG AGTGCCTTCGCTG CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO282
18	GTCAGGTTGTGC GGTTATGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGGTCA GTTTGTGCGTTAT GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO283
19	CGCTGCTGGTCAG GTTTGTGCGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCGCTG CTGGTCAGGTTGT GGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO284
20	AAACCTGACCAAG CAGCGCAGAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGAAACC TGACCAAGCAGCGC AGGTTTAGAGCTA AAATAGC	SEQ ID NO285
21	CCAGCAGCGCAG AGGAGCCGTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCACG AGCGCAGAGGGAGC CGGTTTAGAGCTA AAATAGC	SEQ ID NO286
22	CCACGGCTCCTCT GCGCTGCTGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCACG GCTCCTCTGCGCTG CGTTTAGAGCTAG AAATAGC	SEQ ID NO287
23	CCAACATCTAAC TCCACTCAGG	GAAATTAATACGAC TCACTATAGCCAAC TATCTAACTCCACTC GTTTAGAGCTAGA AAATAGC	SEQ ID NO288

	24	CCTGAGTGGAGTT AGATAGTTGG	GAAATTAAATACGAC TCACTATAGCCTGA GTGGAGTTAGATAG TGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	seq id no 289
--	----	-----------------------------	--	---------------

### 2.3 Secuenciación profunda

Los sitios dentro y fuera del objetivo se amplificaron mediante PCR a un tamaño de 200-300 pb utilizando la ADN polimerasa Hifi Plus (Elpis-bio). El producto de PCR obtenido por el método anterior fue secuenciado utilizando el equipo Mi-seq (Illumina) y analizado por el analizador Cas de la herramienta CRISPR RGEN ([www.rgenome.net](http://www.rgenome.net)). Inserciones/delecciones dentro de 5 pb desde el sitio de escisión CRISPR/Cas9 se consideró como una mutación inducida por RGEN.

Como se muestra en la Tabla 4 y la Tabla 6, como resultado de la secuenciación profunda, se confirmó que la mutación indel ocurrió con alta eficiencia en diversas células inmunes cuando se administró CRISPR-Cas9.

#### 10 Ejemplo 3: Preparación de ARNsg

##### 3.1. Detección de ARNsg en células Jurkat

Se probó la actividad de los ARNsg direccionalmente dirigidos a los exones de A20, DGKa, EGR2, PPP2R2D, EGR2, PPP2r2dPPP2R2D, PD-1, CTLA-4, DGK $\zeta$ , PSGL-1, KDM6A, FAS y TET2TET2TET2 obtenidos mediante el método descrito en el Ejemplo 2 en células Jurkat.

15 Cada uno de los ARNsg obtenidos en el Ejemplo 2 se probó comparando la relación indel entre células Jurkat transfectadas con Cas9 mediante el método del Ejemplo 1 y en células Jurkat sin transducción. La Tabla 3 muestra el número de sitios no coincidentes que tienen secuencias diana similares en la secuencia diana CRISPR/Cas9 y el genoma humano, y la Tabla 4 muestra la relación indel de cada ARNsg. Entre los ARNsg direccionalmente dirigidos a cada gen, la región diana del ADN de aquellos con buena actividad se muestra en negrita.

20 [Tabla 3]

Gen	#	ADN secuencia diana	No coincidencia			
			0 bp	1 bp	2 bp	
A20	1	CTTGTGGCGCTGAAAACGAACGG	1	0	0	
	2	ATGCCACTTCTCAGTACATGTGG	1	0	0	
	3	GCCACTTCTCAGTACATGTGGGG	1	0	0	
	4	GCCCCACATGTACTGAGAAGTGG	1	0	0	
	5	TCAGTACATGTGGGGCGTCAGG	1	0	0	
	6	<b>GGGCGTTCAGGACACAGACTTGG</b>	1	0	0	
	7	CACAGACTTGGTACTGAGGAAGG	1	0	0	
	8	GGCGCTGTTCAGCACGCTCAAGG	1	0	0	
	9	CACGCAACTTAAATTCCGCTGG	1	0	0	
	10	CGGGGCTTGTCTATGATACTCGG	1	0	0	
	11	<b>GGCTTCCACAGACACACCCATGG</b>	1	0	0	
	12	TGAAGTCCACTTCGGGCCATGGG	1	0	0	
DGK $\alpha$	Gen	#	ADN secuencia diana	No coincidencia		
				0 bp	1 bp	2 bp
	1		CTGTACGACACGGACAGAAATGG	1	0	0
	2		TGTACGACACGGACAGAAATGGG	1	0	0
	3		CACGGACAGAAATGGGATCCTGG	1	0	0
	4		GATGCGAGTGGCTGAATACCTGG	1	0	0
	5		GAGTGGCTGAATACCTGGATTGG	1	0	0
	6		AGTGGCTGAATACCTGGATTGGG	1	0	0
	7		<b>ATTGGGATGTGCTGAGCTGAGG</b>	1	0	0
	8		<b>ATGAAAGAGATTGACTATGATGG</b>	1	0	0
	9		<b>CTCTGTCTCTCAAGCTGAGTGGG</b>	1	0	0
	10		TCTCTCAAGCTGAGTGGGTCCGG	1	0	0
	11		<b>CTCTCAAGCTGAGTGGGTCCGGG</b>	1	0	0
	12		CAAGCTGAGTGGGTCCGGGCTGG	1	0	0
	Gen	#	ADN secuencia diana	No coincidencia		
				0 bp	1 bp	2 bp
	1		<b>TTGACATGACTGGAGAGAAGAGG</b>	1	0	0

EGR2

2	GACTGGAGAGAAGAGGGCTTGG	1	0	0
3	GAGACGGGAGCAAAGCTGCTGG	1	0	0
4	AGAGACGGGAGCAAAGCTGCTGG	1	0	0
5	TGGTTCTAGGTGCAGAGACGGG	1	0	0
6	TAAGTGAAGGTCTGGTTCTAGG	1	0	0
7	TGCCCATGTAAGTGAAGGTCTGG	1	0	0
8	GAACTTGCCCATGTAAGTGAAGG	1	0	0
9	TCCATTGACCCTCAGTACCCCTGG	1	0	0
10	TATGCCTCTGGGTAGCAGCTGG	1	0	0
11	TGAGTGCAGGCATCTGCAAGGG	1	0	0
12	GAGTGCAGGCATCTGCAAGGGG	1	0	0
13	GATGAGGCTGTGGTGAAGCTGG	1	0	0
14	CCACTGGCCACAGGACCCCTGGG	1	0	0
15	GGGACATGGTGCACACACCCAGG	1	0	0
16	GAGTACAGGTGGTCCAGGTCAAGG	1	0	0
17	GCGGAGAGTACAGGTGGTCCAGG	1	0	0
18	GCGGTGGCGGAGAGTACAGGTGG	1	0	0
19	TCTCCTGCACAGCCAGAATAAGG	1	0	0
20	ACGCAGAAGGGCTTGGTAGAGG	1	0	0
21	AGGTGGTGGGTAGGCCAGAGAGG	1	0	0
22	CCCAAGCCAGCCACGGACCCAGG	1	0	0
23	ACCTGGGTCCGTGGCTGGCTTGG	1	0	0
24	AAGAGACCTGGTCCGTGGCTGG	1	0	0
25	GGATCATTGGGAAGAGACCTGG	1	0	0
26	GGGATCATTGGGAAGAGACCTGG	1	0	0
27	CAGGATAGTCTGGATCATTGGG	1	0	0
28	GGAAAGAATCCAGGATAGTCTGG	1	0	0
29	CAGTGCCAGAGAGACCTACATGG	1	0	0
30	CTGTACCATGTAGGTCTCTCTGG	1	0	0
31	AGAGACCTACATGGTACAGCTGG	1	0	0
32	CTGGGCCAGCTGTACCATGTAGG	1	0	0

	33	AGGGAAAGGGCTACGGTCTGGG	1	0	0
	34	CAGGGAAAGGGCTACGGTCTGG	1	0	0
	Gen	#	<b>ADN secuencia diana</b>		
			<b>No coincidencia</b>		
			<b>0 bp</b>	<b>1 bp</b>	<b>2 bp</b>
PPP2R2D	5	TCTGGAGATCTTCTTGCAACAGG	1	0	0
	6	CTCCGGTTCATGACTTGAAAGG	1	0	0
	7	GTCTTCCATCTCGTCTTCAGG	1	0	0
	8	GAAGACTTCGAGACCCATTAGG	1	0	0
	9	TCGAGACCCATTAGGATCACGG	1	0	0
	10	<b>GTAGCGCCGTGATCCTAAATGGG</b>	1	0	0
	11	CGTAGCGCCGTGATCCTAAATGG	1	0	0
	12	CATTAGGATCACGGCGTACGG	1	0	0
	13	GGTCCAATATTGAAGCCCATGG	1	0	0
	14	GATCCATGGGCTTCAATATTGGG	1	0	0
	15	AGATCCATGGGCTTCAATATTGG	1	0	0
	16	GCTTCTACCATAAGATCCATGGG	1	0	0
	17	CGCTTCTACCATAAGATCCATGG	1	0	0
	18	GCATTGCAAAAATTGCCGTGG	1	0	0
	19	ATGACCTGAGAATTAAATTATGG	1	0	0
	20	CCATGCACTCCCAGACATCGTGG	1	0	0
	21	GCACTGGTGCAGGTGGAACTCGG	1	0	0
	22	ACACGTTGCACTGGTGCAGGTGG	1	0	0
	23	CGAACACGTTGCACTGGTGCAGGTGG	1	0	0
	24	ACGAACACGTTGCACTGGTGCAGGTGG	1	0	0
	25	TGTAGACGAACACGTTGCACTGG	1	0	0
	26	GCGCATGTCACACAGGCGGATGG	1	0	0
	27	AGGAGCGCATGTCACACAGGCGG	1	0	0
	28	CCGAGGAGCGCATGTCACACAGG	1	0	0
	29	CCTGTGTGACATGCGCTCCTCGG	1	0	0
	Gen	#	<b>ADN secuencia diana</b>		
			<b>No coincidencia</b>		
			<b>0 bp</b>	<b>1 bp</b>	<b>2 bp</b>

PD-1	1	CGACTGGCCAGGGCGCTGTGGG	1	0	0	
	2	ACCGCCCAGACGACTGCCAGGG	1	0	0	
	3	CACCGCCCAGACGACTGCCAGG	1	0	0	
	4	<b>GTCTGGCGGTGCTACAACCTGGG</b>	1	0	0	
	5	CTACAACCTGGCTGGCGGCCAGG	1	0	0	
	6	<b>CACCTACCTAAGAACCATCCTGG</b>	1	0	0	
	7	CGGTCAACCACGAGCAGGGCTGGG	1	0	0	
	8	GCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGG	1	0	0	
	9	CGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGG	1	0	0	
	10	CAGCTTGTCCGTCTGGTGCTGG	1	0	0	
	11	AGGCGGCCAGCTGTCCGTCTGG	1	0	0	
	12	CCGGGCTGGCTGCGGTCCCTCGGG	1	0	0	
	13	CGTTGGGCAGTTGTGTGACACGG	1	0	0	
CTLA-4	Gen	#	ADN secuencia diana	No coincidencia		
				0 bp	1 bp	2 bp
	1	CATAAAGCCATGGCTGCCTTGG	1	0	0	
	2	CCTTGGATTTCAGCGGCACAAGG	1	0	0	
	3	CCTTGTGCCGCTGAAATCCAAGG	1	0	0	
	4	CACTCACCTTGCAGAACAGACAGG	1	0	0	
	5	TTCCATGCTAGCAATGCACGTGG	1	0	0	
	6	GGCCACGTGCATTGCTAGCATGG	1	0	0	
	7	GGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGG	1	0	0	
	8	AGGTCCGGGTGACAGTGCTTCGG	1	0	0	
	9	CCGGGTGACAGTGCTTCGGCAGG	1	0	0	
	10	CTGTGGCAACCTACATGATGG	1	0	0	
	11	<b>CAACTCATTCCCCATCATGTAGG</b>	1	0	0	
	Gen	#	ADN secuencia diana	No coincidencia		
				0 bp	1 bp	2 bp
	1	<b>GGCTAGGAGTCAGCGACATATGG</b>	1	0	0	
	2	<b>GCTAGGAGTCAGCGACATATGGG</b>	1	0	0	
	3	<b>CTAGGAGTCAGCGACATATGGGG</b>	1	0	0	

DGK $\zeta$	4	<b>GTACTGTGTAGCCAGGATGCTGG</b>	1	0	0	
	5	<b>ACGAGCACTCACCAAGCATCCTGG</b>	1	0	0	
	6	AGGCTCCAGGAATGTCCCGCGAGG	1	0	0	
	7	ACTTACCTCGCGGACATTCTGG	1	0	0	
	8	CACCCCTGGGCACTTACCTCGCGG	1	0	0	
	9	GTGCCGTACAAAGGTTGGCTGGG	1	0	0	
	10	GGTGCCGTACAAAGGTTGGCTGG	1	0	0	
	11	CTCTCCTCAGTACCAACAGCAAGG	1	0	0	
	12	CCTGGGGCCTCCGGGCGCGGAGG	1	0	0	
	13	AGTACTCACCTGGGGCCTCCGGG	1	0	0	
	14	AGGGTCTCCAGCGGCCCTCTGG	1	0	0	
	15	GCAAGTACTTACGCCCTCTGGG	1	0	0	
	16	TTGCGGTACATCTCCAGCCTGGG	1	0	0	
	17	TTTGCCTGACATCTCCAGCCTGG	1	0	0	
	Gen	#	<b>ADN secuencia diana</b>	No coincidencia		
				0 bp	1 bp	2 bp
	1	GCAAAACCTGTCCACTCTTATGG	1	0	0	
	2	TTGGTGCCATAAGAGTGGACAGG	1	0	0	
	3	<b>GGTGCAAGTTCTTATATGTTGG</b>	1	0	0	
	4	<b>ACCTGATGCATATAATAATCAGG</b>	1	0	0	
	5	ACCTGATTATTATATGCATCAGG	1	0	0	
	6	CAGAGCACCAGAGTGCCGTCTGG	1	0	0	
	7	AGAGCACCAGAGTGCCGTCTGGG	1	0	0	
	8	AGAGTGCCGTCTGGGTCTGAAGG	1	0	0	
	9	AGGAAGGCCGTCCATTCTCAGGG	1	0	0	
	10	GGATAGAACCAACCATGTTGAGG	1	0	0	
	11	TCTGTTGCCCTAACATGGTTGG	1	0	0	
	12	TTAGTCTGTTGCCCTAACATGG	1	0	0	
	13	GTCTGGCAAATGGGAGGGTGTGG	1	0	0	
	14	CAGAGGTTCTGTCTGGCAAATGG	1	0	0	
	15	TTGTAAGCCAGAGGTTCTGTCTGG	1	0	0	

Tet2	16	ACTTCTGGATGAGCTCTCTCAGG	1	0	0
	17	AGAGCTCATCCAGAAGTAATGG	1	0	0
	18	TTGGTGTCTCCATTACTCTGG	1	0	0
	19	TTCTGGCTTCCCTTCATACAGGG	1	0	0
	20	CAGGACTCACACGACTATTCTGG	1	0	0
	21	CTACTTCTTGTAAAGTCAGG	1	0	0
	22	GACTTTACACAAGAAAGTAGAGG	1	0	0
	23	GTCTTCTCCATTAGCCTTTGG	1	0	0
	24	AATGGAGAAAGACGTAACCTCGG	1	0	0
	25	ATGGAGAAAGACGTAACCTCGGG	1	0	0
	26	TGGAGAAAGACGTAACCTCGGGG	1	0	0
	27	TTTGGTTGACTGCTTCACCTGG	1	0	0
	28	TCACTCAAATCGGAGACATTGG	1	0	0
	29	ATCTGAAGCTCTGGATTTCAAGG	1	0	0
	30	GCTTCAGATTCTGAATGAGCAGG	1	0	0
	31	CAGATTCTGAATGAGCAGGAGGG	1	0	0
	32	AAGGCAGTGCTAATGCCTAATGG	1	0	0
	33	GCAGAAACTGTAGCACCATTAGG	1	0	0
	34	ACCGCAATGGAAACACAATCTGG	1	0	0
	35	TGTGGTTTCTGCACCGCAATGG	1	0	0
	36	CATAAATGCCATTAACAGTCAGG	1	0	0
	37	ATTAGTAGCCTGACTGTTAATGG	1	0	0
	38	CGATGGGTGAGTGATCTCACAGG	1	0	0
	39	ACTCACCCATCGCATAACCTCAGG	1	0	0
	40	CTCACCCATCGCATAACCTCAGGG	1	0	0
Gen	#	ADN secuencia diana	No coincidencia		
			0 bp	1 bp	2 bp
	1	AGCAACAGGAGGAGTTGCAGAGG	1	0	0
	2	CCAGTAGGATCAGCAACAGGAGG	1	0	0
	3	CTCCTGTTGCTGATCCTACTGGG	1	0	0
	4	GGCCCAGTAGGATCAGAACAGG	1	0	0

5	TTGCTGATCCTACTGGGCCCTGG	1	0	0
6	TGGCAACAGCTTGCAGCTGTGGG	1	0	0
7	CTTGGGTCCCCGTCTGCCCGGG	1	0	0
8	GTCCCCTGCTTGCCCGGGACCGG	1	0	0
9	CTCCGGTCCCAGGGCAAGCAGGG	1	0	0
10	TCTCCGGTCCCAGGGCAAGCAGGG	1	0	0
11	GTCTCCGGTCCCAGGGCAAGCAGG	1	0	0
12	GCTTGCAGGGACCGGAGACAGG	1	0	0
13	GGTGGCCTGTCTCCGGTCCCAGG	1	0	0
14	CGGTGGCCTGTCTCCGGTCCCAGG	1	0	0
15	CATATTGGTGGCCTGTCTCCGG	1	0	0
16	ATCTAGGTACTCATATTGGTGG	1	0	0
17	<b>ATAATCTAGGTACTCATATTGG</b>	1	0	0
18	TTATGATTCCCTGCCAGAACGG	1	0	0
19	ATTTCTGGAGGCTCCGTTCTGG	1	0	0
20	ACTGACACCACTCCTCTGACTGG	1	0	0
21	CTGACACCACTCCTCTGACTGGG	1	0	0
22	ACCACTCCTCTGACTGGCCTGG	1	0	0
23	AACCCCTGAGTCTACCACTGTGG	1	0	0
24	CTCCACAGTGGTAGACTCAGGGG	1	0	0
25	GCTCCACAGTGGTAGACTCAGGG	1	0	0
26	GGCTCCACAGTGGTAGACTCAGG	1	0	0
27	CCTGCTGCAAGGCGTTACTGG	1	0	0
28	CCAGTAGAACGCCCTGCAGCAGG	1	0	0
29	CGTTCTACTGGCCTGGATGCAGG	1	0	0
30	TCTACTGGCCTGGATGCAGGAGG	1	0	0
31	CCACGGAGCTGGCCAACATGGGG	1	0	0
32	CGTGGACAGGTTCCCCATGTGG	1	0	0
33	GTCCACGGATTCAAGCAGCTATGG	1	0	0
34	GACCACTCAACCAGTGCCACGG	1	0	0
35	GGAGTGGTCTGTGCCCTCCGTGGG	1	0	0

PSGL-1	36	GGCACAGACAACCTGACTGACGG	1	0	0
	37	GACAACCTGACTGACGGCCACGG	1	0	0
	38	AACTGACTGACGGCCACGGAGG	1	0	0
	39	CACAGAACCCAGTGCCACAGAGG	1	0	0
	40	GGTAGTAGGTTCCATGGACAGGG	1	0	0
	41	TGGTAGTAGGTTCCATGGACAGGG	1	0	0
	42	TCTTTGGTAGTAGGTTCCATGG	1	0	0
	43	ATGGAACCTACTACCAAAAGAGG	1	0	0
	44	AACAGACCTCTTGGTAGTAGG	1	0	0
	45	GGGTATGAACAGACCTCTTGG	1	0	0
	46	TGTGTCTCTGTTACTCACAAGG	1	0	0
	47	GTGTCTCTGTTACTCACAAGGG	1	0	0
	48	GTAGTTGACGGACAAATTGCTGG	1	0	0
	49	TTTGTCCGTCAACTACCCAGTGG	1	0	0
	50	TTGTCCGTCAACTACCCAGTGGG	1	0	0
	51	TGTCCGTCAACTACCCAGTGGGG	1	0	0
	52	GTCCGTCAACTACCCAGTGGGGG	1	0	0
	53	CTCTGTGAAGCAGTGCCTGCTGG	1	0	0
	54	CCTGCTGCCATCTTAATCTTGG	1	0	0
	55	CCAAGATTAGGATGGCCAGCAGG	1	0	0
	56	GGCCATCTTAATCTTGGCGCTGG	1	0	0
	57	CACCAGCGCCAAGATTAGGATGG	1	0	0
	58	AGTGCACACGAAGAAGATAGTGG	1	0	0
	59	TATCTTCTCGTGTGCACTGTGG	1	0	0
	60	CTTCGTGTGCACTGTGGTGTGG	1	0	0
	61	GGCGGTCCGCCCTCTCCGCAAGG	1	0	0
	62	GCGGTCCGCCCTCTCCGCAAGGG	1	0	0
	63	AATTACGCACGGGTACATGTGG	1	0	0
	64	TGGGGGAGTAATTACGCACGGG	1	0	0
	65	GTGGGGGAGTAATTACGCACGGG	1	0	0
	66	GGTGGGGGAGTAATTACGCACGG	1	0	0

67	TAATTACTCCCCACCGAGATGG	1	0	0	
68	AGATGCAGACCATCTCGTGGGG	1	0	0	
69	GAGATGCAGACCATCTCGTGGGG	1	0	0	
70	TGAGATGCAGACCATCTCGTGG	1	0	0	
71	GGATGAGATGCAGACCATCTCGG	1	0	0	
72	ATCTCATCCCTGTTGCCTGATGG	1	0	0	
73	TCATCCCTGTTGCCTGATGGGGGG	1	0	0	
74	CTCACCCCCATCAGGCAACAGGG	1	0	0	
75	GAGGGCCCCCTCACCCCCATCAGG	1	0	0	
76	GGGCCCTTGCCACAGCCAATGGG	1	0	0	
77	CCCTCTGCCACAGCCAATGGGGG	1	0	0	
78	CCCCCATTGGCTGTGGCAGAGGG	1	0	0	
79	GCCCCCATTGGCTGTGGCAGAGGG	1	0	0	
80	GGACAGGCCCCCATTGGCTGTGG	1	0	0	
81	CCGGGCTTGGCCTGGACAGGG	1	0	0	
82	CTGTCCAAGGCCAAGAGCCGGG	1	0	0	
83	TGGCGTCAGGCCGGGCTTTGG	1	0	0	
84	CGGGCCTGACGCCAGAGCCAGG	1	0	0	
Gen	#	ADN secuencia diana	No coincidencia		
			0 bp	1 bp	2 bp
FAS	1	CAACAACCATGCTGGGCATCTGG	1	0	0
	2	GAGGGTCCAGATGCCAGCATGG	1	0	0
	3	<b>CATCTGGACCCCTCCTACCTCTGG</b>	1	0	0
	4	AGGGCTACCAGAGGTAGGAGGG	1	0	0
	5	<b>GGAGTTGATGTCAGTCACTTGGG</b>	1	0	0
	6	TGGAGTTGATGTCAGTCACTTGG	1	0	0
	7	AGTGAATGACATCAACTCCAAGG	1	0	0
	8	<b>GTGACTGACATCAACTCCAAGGG</b>	1	0	0
	9	ACTCCAAGGGATTGGAATTGAGG	1	0	0
	10	CTTCCTCAATTCCAATCCCTTGG	1	0	0
	11	TACAGTTGAGACTCAGAACTTGG	1	0	0

12	TTGGAAGGCCTGCATCATGATGG	1	0	0	
13	AGAATTGCCATCATGATGCAGG	1	0	0	
14	GACAGGGCTTATGGCAGAATTGG	1	0	0	
<b>15</b>	<b>TGTAACATACCTGGAGGACAGGG</b>	1	0	0	
16	GTGTAACATACCTGGAGGACAGG	1	0	0	
Gen	#	ADN secuencia diana	No coincidencia		
			0 bp	1 bp	2 bp
KDM6A	1	CGTACCTGTGCAACTCCTGTTGG	1	0	0
	2	GATCTACTGGAATTCTTAATGGG	1	0	0
	3	GAGTCAGCTGTTGGCCCATTAGG	1	0	0
	4	CTGCCTACAAACTCAGTCTCTGG	1	0	0
	5	GGGCAGGCAGGACGGACTCCAGG	1	0	0
	6	GGAGTCCGTCCTGCCTGCCCTGG	1	0	0
	7	GAGTCCGTCCTGCCTGCCCTGGG	1	0	0
	8	GAAAAGGGTCCATTGGCCAAAGG	1	0	0
	9	GCCTGCAGAAAAGGGTCCATTGG	1	0	0
	10	TTGATGTGCTACAGGAAACATGG	1	0	0
	11	AGCGTTCTTGATGTGCTACAGGG	1	0	0
	12	CAGCGTTCTTGATGTGCTACAGG	1	0	0
	13	CTGTAGCACATCAAGAACGCTGG	1	0	0
	14	TGTAGCACATCAAGAACGCTGGG	1	0	0
	15	ATAGGCAATAATCATATAACAGG	1	0	0
	16	AGTGCCTTCGCTGCAGGTAAGG	1	0	0
	17	GAGTGAGTGCCTCGCTGCAGG	1	0	0
	18	GTCAGGTTGTGCGGTTATGAGG	1	0	0
	19	CGCTGCTGGTCAGGTTGTGCGG	1	0	0
	<b>20</b>	<b>AAACCTGACCAGCAGCGCAGAGG</b>	1	0	0
	21	CCAGCAGCGCAGAGGAGCCGTGG	1	0	0
	22	CCACGGCTCCTCTGCGCTGCTGG	1	0	0
	23	CCAACATCTAACTCCACTCAGG	1	0	0
	24	CCTGAGTGGAGTTAGATAGTTGG	1	0	0

[Tabla 4] La actividad de cada ARNsg en las células Jurkat para la secuencia objetivo

Gen	#	Transfección Cas9/ARNsg				Transfección Cas9/ARNsg			
		Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)
A20	1	58003	46	55	0.20%	63455	17711	9469	42.80%
	2	40652	0	18	0.00%	46245	12025	6331	39.70%
	3	40652	0	18	0.00%	41702	301	92	0.90%
	4	40652	0	18	0.00%	4	2	2	0.00%
	5	40652	0	18	0.00%	52838	36339	4989	78.20%
	6	40652	0	18	0.00%	10641	5864	3460	87.60%
	7	40652	0	18	0.00%	40168	10298	4194	36.10%
	8	40652	0	18	0.00%	43044	9494	13398	53.20%
	9	40652	0	18	0.00%	46853	6629	2620	19.70%
	10	40652	0	18	0.00%	44573	17644	5168	51.20%
	11	63969	37	103	0.20%	61003	26844	22740	81.30%
	12	63969	37	103	0.20%	63321	949	1464	3.80%
DGK $\alpha$	#	Transfección Cas9/ARNsg				Transfección Cas9/ARNsg			
		Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)
	1	61246	0	4	0.00%	70438	4171	793	7.00%
	2	61246	0	4	0.00%	55262	7413	662	14.60%
	3	61246	0	4	0.00%	62354	19424	1546	33.60%
	4	59349	0	44	0.10%	58402	20072	5137	43.20%
	5	59349	0	44	0.10%	60718	14921	2484	28.70%
	6	59349	0	44	0.10%	67024	18760	2365	31.50%
	7	49807	0	0	0.00%	49459	26142	2877	58.70%
	8	49807	0	0	0.00%	65141	29740	3324	50.80%
	9	49807	0	0	0.00%	50760	30324	3742	67.10%
	10	49807	0	0	0.00%	61315	8953	4772	22.40%
	11	49807	0	0	0.00%	78876	61415	8416	88.50%
	12	49807	0	0	0.00%	64641	12255	1780	21.70%

Gen	#	Transfección Cas9/ARNsg				Transfección Cas9/ARNsg			
		Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)
EGR2	1	37189	0	0	0.00%	53321	11060	4974	30.10%
	2	37189	0	0	0.00%	48475	6809	1965	18.10%
	3	37189	0	0	0.00%	43800	8688	7796	37.60%
	4	37189	0	0	0.00%	43670	2921	569	8.00%
	5	37189	0	0	0.00%	34730	3002	497	10.10%
	6	37189	0	0	0.00%	46018	10502	1408	25.90%
	7	37189	0	0	0.00%	48537	5271	2475	16.00%
	8	37189	0	0	0.00%	36551	6457	686	19.50%
	9	37189	0	0	0.00%	37903	6210	1671	20.80%
	10	37189	0	0	0.00%	44855	9524	2320	26.40%
	11	37189	0	0	0.00%	39615	9368	2622	30.30%
	12	37189	0	0	0.00%	43995	2542	563	7.10%
	13					46228	289	62	0.76%
	14					50220	1323	821	4.27%
	15					33478	5638	1156	20.29%
	16					20489	1731	483	10.81%
	17					26353	3835	495	16.43%
	18					23901	1456	896	9.84%
	19					24352	3956	1672	23.11%
	20					11	0	0	0.00%
	21					34764	1522	359	5.41%
	22					31546	91	0	0.29%
	23					42734	10	0	0.02%
	24					32492	59	0	0.18%
	25					32243	1917	304	6.89%
	26					39333	868	328	3.04%
	27					36373	806	556	3.74%
	28					45819	2	26	0.06%

	29					53425	1159	584	3.26%
	30					36877	169	47	0.59%
	31					36317	0	76	0.21%
	32					37941	829	122	2.51%
	33					47730	167	2	0.35%
	34					38753	347	62	1.06%
PPP2R2 D	Gen	#	Transfección Cas9/ARNsg			Transfección Cas9/ARNsg			
			Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)	Guías Totales	Ins	Del
	5	38644	0	31	0.10%	48997	2891	240	6.40%
	6	50653	2	19	0.00%	48327	7669	1403	18.80%
	7	36764	0	0	0.00%	54465	670	70	1.40%
	8	36764	0	0	0.00%	45004	11382	1569	28.80%
	9	36764	0	0	0.00%	54094	17825	3635	39.70%
	10	36764	0	0	0.00%	47800	19253	3432	47.50%
	11	36764	0	0	0.00%	50362	966	129	2.20%
	12	36764	0	0	0.00%	42667	12810	2318	35.50%
	13					67258	1380	1050	3.61%
	14					69925	13321	3599	24.20%
	15					1E+05	21836	3254	24.10%
	16					77282	19219	7372	34.41%
	17					66732	3687	2227	8.86%
	18					96593	9524	1111	11.01%
	19					63082	11415	4155	24.68%
	20					57937	4360	676	8.69%
	21					67752	20314	4900	37.22%
	22					72814	2244	1198	4.73%
	23					79305	14047	1175	19.19%
	24					73629	2914	571	4.73%
	25					85222	5472	1905	8.66%

26					73094	1937	288	3.04%	
27					94017	9895	6171	17.09%	
28					93118	8847	2464	12.15%	
29					77821	5007	1962	8.96%	
Transfección Cas9/ARNsg					Transfección Cas9/ARNsg				
Gen	#	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)
	1	68258	581	105	1.00%	77910	29123	7725	47.30%
PD-1	2	68258	581	105	1.00%	77866	1270	3816	6.50%
	3	68258	581	105	1.00%	66362	912	94	1.50%
	4	68258	581	105	1.00%	55936	41594	10324	92.80%
	5	68258	581	105	1.00%	65077	2554	192	4.20%
	6	68258	581	105	1.00%	71898	50678	10542	85.10%
	7	68258	581	105	1.00%	83902	17154	3246	24.30%
	8	68258	581	105	1.00%	79724	28304	7542	45.00%
	9	68258	581	105	1.00%	65936	10471	649	16.90%
	10	68258	581	105	1.00%	66937	0	29	0.00%
	11	68258	581	105	1.00%	77994	1135	754	2.40%
	12	68258	581	105	1.00%	67631	0	8	0.00%
	13	68258	581	105	1.00%	67161	30099	8037	56.80%
Transfección Cas9/ARNsg					Transfección Cas9/ARNsg				
Gen	#	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)
	7	68230	0	0	0	51173	3216	714	7.70%
CTLA-4	10	53694	3	18	0	40995	11760	1803	33.10%
	11	53694	3	18	0	55767	33107	3935	66.40%
	12	53333	0	0	0	54992	19469	8396	50.70%
		Transfección Cas9/ARNsg					Transfección Cas9/ARNsg		

Gen	#	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)
DGK $\zeta$	1	26039	3	2	0.00%	25450	10061	2453	49.20%
	2	26039	3	2	0.00%	24907	17380	2591	80.20%
	3	26039	3	2	0.00%	21950	14819	3291	82.50%
	4	26039	3	2	0.00%	20959	17708	1027	89.40%
	5	26039	3	2	0.00%	29570	26290	2120	96.10%
	6	37268	0	0	0.00%	32463	3663	1878	17.10%
	7	37268	0	0	0.00%	34154	6884	1706	25.20%
	8	37268	0	0	0.00%	32920	13190	4952	55.10%
	9	22544	7	12	0.10%	40374	5391	1209	16.30%
	10	22544	7	12	0.10%	28637	879	702	5.50%
	11	21780	0	0	0.00%	27636	9279	1859	40.30%
	12	21780	0	0	0.00%	20548	9474	2164	56.60%
	13	21780	0	0	0.00%	19161	9909	3016	67.50%
	14	53786	0	6	0.00%	36736	13	45	0.20%
	15	24528	0	10	0.00%	24319	12791	1446	58.50%
	16	24528	0	10	0.00%	20768	1520	140	8.00%
	17	24528	0	10	0.00%	26158	301	56	1.40%
Gen	Transfección Cas9/ARNsg				Transfección Cas9/ARNsg				
	#	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)
	1	42428	375	573	2.23%	48887	35150	5438	83.02%
	2	42428	375	573	2.23%	44082	852	1852	6.13%
	3	42428	375	573	2.23%	49662	24418	7469	64.21%
	4	42428	375	573	2.23%	39571	20708	6428	68.58%
	5	42428	375	573	2.23%	52562	11325	2524	26.35%
	6	38575	7	14	0.10%	38990	3873	6433	26.43%
	7	38575	7	14	0.10%	36884	8795	1143	26.94%
	8	38575	7	14	0.10%	34674	5096	1843	20.01%

Tet2

9	38575	7	14	0.10%	38693	16101	4895	54.26%
10					17614	4770	780	31.51%
11					19411	1855	1416	16.85%
12					14049	6887	1565	60.16%
13					16272	2960	2087	31.02%
14					18553	110	79	1.02%
15					18062	1434	591	11.21%
16					12053	2969	2423	44.74%
17					14802	738	444	7.99%
18					16943	395	154	3.24%
19					18051	2953	1070	22.29%
20					14729	3041	474	23.86%
21					18590	1074	320	7.50%
22					19329	3304	1481	24.76%
23					17420	36	19	0.32%
24					20994	5582	1354	33.04%
25					16860	2573	370	17.46%
26					15137	1509	998	16.56%
27					16035	635	185	5.11%
28					14636	2734	1750	30.64%
29					18893	133	45	0.94%
30					15959	0	0	0.00%
31					22627	216	126	1.51%
32					15361	368	361	4.75%
33					14501	1358	1939	22.74%
34					3225	171	21	5.95%
35					20968	725	209	4.45%
36					15689	147	155	1.92%
37					17405	239	18	1.48%
38					20122	166	134	1.49%
39					12585	370	106	3.78%

	40					15027	344	378	4.80%
Gen	#	Transfección Cas9/ARNsg			Transfección Cas9/ARNsg				
		Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)
PSGL-1	5	29368	0	9	0.03%	36584	8978	2453	31.25%
	6	29368	0	9	0.03%	35183	6859	639	21.31%
	7	33707	125	13	0.41%	24237	14697	2248	69.91%
	9	33707	125	13	0.41%	23911	9948	2001	49.97%
	10	33707	125	13	0.41%	30152	804	207	3.35%
	11	33707	125	13	0.41%	28425	95	6	0.36%
	12	33707	125	13	0.41%	25153	8931	1355	40.89%
	15	33707	125	13	0.41%	24798	2996	414	13.75%
	16	33707	125	13	0.41%	23116	8737	1192	42.95%
	17	33707	125	13	0.41%	19094	10638	2066	66.53%
	27	29168	0	3	0.41%	29561	9316	1202	35.58%
	29	29168	0	3	0.01%	36720	5836	396	16.97%
	30	29168	0	3	0.01%	41685	3815	976	11.49%
FAS	#	Transfección Cas9/ARNsg			Transfección Cas9/ARNsg				
		Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)
	1					33594	14802	6170	62.43%
	2					24634	7187	2668	40.01%
	3					32994	21062	10555	95.83%
	4					30374	1328	529	6.11%
	5					40549	33991	4118	93.98%
	6					51209	7460	1737	17.96%
	7					24583	8997	9498	75.23%
	8					28815	20681	6053	92.78%
	9					29188	17689	4990	77.70%
	10					25433	10120	9482	77.07%

	11				29184	15700	7500	79.50%	
	12				25410	18254	1737	78.67%	
	13				28564	18560	1575	70.49%	
	14				2482	1241	325	63.09%	
	<b>15</b>				<b>29819</b>	<b>14067</b>	<b>10479</b>	<b>82.32%</b>	
	16				31325	8422	3600	38.38%	
<b>Gen</b>	Transfección Cas9/ARNsg				Transfección Cas9/ARNsg				
	#	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)	Guías Totales	Ins	Del	Relación Indel(%)
<b>KDM6A</b>	1					33935	4337	1753	17.95%
	2					42016	10713	3625	34.13%
	3					56988	1195	951	3.77%
	4					25006	3298	1295	18.37%
	5					38511	43	16	0.15%
	6					20361	598	340	4.61%
	7					32084	2785	1161	12.30%
	8					31373	1616	523	6.82%
	9					5215	199	228	8.19%
	10					32955	4524	1097	17.06%
	11					38820	5726	1940	19.75%
	12					24536	72	12	0.34%
	13					42251	2640	475	7.37%
	14					44333	2018	628	5.97%
	15					33618	722	290	3.01%
	16					36221	466	250	1.98%
	17					40214	1357	261	4.02%
	18					31381	1958	714	8.51%
	19					40205	345	151	1.23%
	<b>20</b>					<b>32494</b>	<b>9665</b>	<b>1761</b>	<b>35.16%</b>
	21					37911	1286	381	4.40%
	22					30751	677	103	2.54%

	23				38635	8932	2445	29.45%
	24				44475	1263	978	5.04%

## 3.2. Detección de ARNsg en células T primarias humanas

Basándose en los resultados de la actividad de ARNsg en las células Jurkat obtenidos en el Ejemplo 3.1 anterior, se seleccionaron ARNsgs con actividad relativamente alta en células Jurkat (véase negrita en la Tabla 3 y la Tabla 4) para ser probados en células T primarias humanas.

5 Se transfirieron ARNg simples o duales y Cas9 a células T primarias humanas. Las secuencias diana CRISPR/Cas9 probadas se muestran en la Tabla 5, y las relaciones de indel por parte de los ARNsg se resumen en la Tabla 6, respectivamente.

[Tabla 5] Secuencias diana y no coincidencias en células T primarias humanas

Gen	#	ADN secuencia diana	SEQ ID NO	No coincidencia		
				0 bp	1 bp	2 bp
A20	6	GGGC GTTCAGGACA CAGACTTGG	SEQ ID NO 6	1	0	0
	11	GGCTTCCACAGACA CACCCATGG	SEQ ID NO 1	1	0	0
DGK $\alpha$	7	ATTGGGATGTGTCT GAGCTGAGG	SEQ ID NO 19	1	0	0
	8	ATGAAAGAGATTGA CTATGATGG	SEQ ID NO 20	1	0	0
	9	CTCTGTCTCTCAAGC TGAGTGGG	SEQ ID NO 21	1	0	0
	11	CTCTCAAGCTGAGT GGGTCCGGG	SEQ ID NO 23	1	0	0
	8+11	ATGAAAGAGATTGA CTATGATGG + CTCTCAAGCTGAGT GGGTCCGGG	SEQ ID NO 20 + SEQ ID NO 23	1	0	0
	9+11	CTCTGTCTCTCAAGC TGAGTGGG + CTCTCAAGCTGAGT GGGTCCGGG	SEQ ID NO 21 + SEQ ID NO 23	1	0	0
EGR2	1	TTGACATGACTGGA GAGAAGAGG	SEQ ID NO 25	1	0	0
PPP2R2D	10	GTAGCGCCGTGATC CTAAATGGG	SEQ ID NO 64	1	0	0
PD-1	4	GTCTGGCGGTGCT ACAACCTGGG	SEQ ID NO 87	1	0	0
	6	CACCTACCTAAGAA CCATCCTGG	SEQ ID NO 89	1	0	0
	1	GGCTAGGAGTCAGC GACATATGG	SEQ ID NO 109	1	0	0
	2	GCTAGGAGTCAGCG ACATATGGG	SEQ ID NO 110	1	0	0

DGK $\zeta$	3	CTAGGAGTCAGCGA CATATGGGG	SEQ ID NO 111	1	0	0
	4	GTACTGTGTAGCCA GGATGCTGG	SEQ ID NO 112	1	0	0
	5	ACGAGCACTCACCA GCATCCTGG	SEQ ID NO 113	1	0	0

[Tabla 6] Actividad de cada ARNg en la secuencia diana en células inmunes T primarias humanas

Gen	#	Transfección Cas9/ARNsg				Transfección Cas9/ARNsg			
		Guías Totales	Ins	Del	Relación indel(%)	Guías Totales	Ins	Del	Relación indel(%)
A20	6	32158	0	26	0.10%	31976	190	3865	12.68%
	11	32158	0	26	0.10%	30008	354	3324	12.26%
DGK $\alpha$	7	35903	15	7	0.10%	29446	332	4465	16.29%
	8	35903	15	7	0.10%	40656	395	13739	34.76%
	9	35903	15	7	0.10%	48602	353	3263	7.44%
	11	35903	15	7	0.10%	43261	1222	17621	43.56%
	8+11	35903	15	7	0.10%	42504	184	21684	51.45%
	9+11	35903	15	7	0.10%	42025	41	5546	13.29%
EGR2	1	55074	26	67	0.20%	42275	986	5176	14.58%
PPP2R2D	10	35903	15	7	0.10%	46205	1505	5532	15.23%
PD-1	4	31063	0	13	0.00%	62882	8104	23113	49.64%
	6	31063	0	13	0.00%	93252	2431	8707	11.94%
DGK $\zeta$	1	20278	0	11	0.10%	56415	1384	3898	9.36%
	2	20278	0	11	0.10%	49114	2390	4923	14.89%
	3	20278	0	11	0.10%	65225	6738	3929	16.35%
	4	20278	0	11	0.10%	36502	1303	3477	13.10%
	5	20278	0	11	0.10%	28580	2945	10392	46.67%

5 De manera similar, con base en los resultados de la actividad de ARNsg en células Jurkat obtenidos en el Ejemplo 3.1 anterior, se seleccionó el ARNsg PSGL-1 # 17 que tiene una actividad relativamente alta en células Jurkat para probar su actividad en células T primarias humanas.

Además, las células T primarias humanas activadas se transfecaron con 4 ug de proteína SpCas9; y 1 ug de ARNsg transcripto y tratado con AP *in vitro* mediante electroporación (Neon, Thermo Scientific). Cinco días

después, se aisló y extrajo el ADNg de cada célula T, y se analizó la eficiencia de indel mediante secuenciación profunda direccionada (FIG. 18 A). Además, se analizó la expresión de PSGL-1 en la superficie de las células T mediante citometría de flujo (citometría de flujo Attune, Thermo Scientific) para confirmar una inactivación de PSGL-1 (FIG. 18B, C).

5 Las FIGs. 17a a 17c muestran los resultados del análisis para la detección de ARNsg hPSGL-1 en células Jurkat. Estas figuras son gráficos que muestran la eficiencia de indel y el grado de células Jurkat que no expresan PSGL-1 (células negativas a hPSGL-1) después del inactivación (17a); y el nivel de expresión de PSGL-1 en la superficie de las células Jurkat después del inactivación (17b, 17c).

10 La FIG. 18 muestra los resultados de los experimentos de inactivación de hPSGL-1 (KO) en células T primarias humanas, que muestran (A) la eficiencia de indel, (B) el grado de células T que no expresan PSGL-1 después de la inactivación y (C) el grado de expresión de PSGL-1 en la superficie de las células T después de la inactivación. Como resultado, se confirmó que PSGL-1 fue inactivado efectivamente a través de la proteína Cas9 y la administración del complejo ARNsg, por lo tanto, PSGL-1, que es una proteína de superficie, no pudo observarse mediante citometría de flujo.

15 **Ejemplo 4: Activación de células Jurkat y promoción de la secreción de citoquinas**

En las células Jurkat en las que se introducen la proteína Cas9 y el ARNsg, la secuencia de ADN genómico correspondiente a la región diana del ARNsg introducido se escinde, y la región alrededor de la secuencia de ADN escindida se muta por delección, inserción y/o sustitución a través de NHEJ, lo que da como resultado la inactivación del gen en el que se encuentra la secuencia de ADN escindida.

20 20 Las células Jurkat transfectadas con proteína Cas9 y ARNsg mediante electroporación como se describe en el Ejemplo 1 se cultivaron durante 7 días después de la electroporación y se activaron utilizando dynabeads CD3 (Miltenyi Biotec) o dynabeads CD3/28 (Miltenyi Biotec).

Después de 24 horas, se analizaron la expresión de CD25, que es el receptor de IL-2, y el nivel de liberación de IFN-gamma mediante citometría de flujo y ELISA, respectivamente.

25 25 En primer lugar, se midió el nivel de expresión de CD25, un receptor de IL-2, mediante citometría de flujo. Las células Jurkat transfectadas con proteína Cas9 y ARNsg se cultivaron durante 7 días después de cada introducción y se reestimularon utilizando dynabeads CD3 o CD3/28 (Miltenyi Biotec) en una relación de 3: 1 (perla: células; número) y luego se midió la expresión de CD25.

30 30 El análisis fenotípico se realizó 1 día después de la activación celular. Las células reestimuladas (activadas) con perlas se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato) complementada con 1% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) y se tiñeron con anticuerpo anti-CD25 conjugado con PE (BD Bioscience) durante 30 minutos a 4 °C.

35 35 Las células obtenidas se lavaron y resuspendieron en PBS, seguido de citometría de flujo en BD ACCURI C6 (BD Biosciences) y se midió el nivel de expresión de CD25 mediante la intensidad de fluorescencia media (MFI).

A modo de comparación, se realizó citometría de flujo de la misma manera en células de tipo salvaje en las que no se introdujeron la proteína Cas9 ni el ARNsg, y en células con las que no se trataron las dynabeads CD3 o CD3/28.

El nivel de expresión de CD25 obtenido (CD25 MFI) se muestra en la FIG. 1 a FIG. 4.

40 40 La FIG. 1 muestra el MFI CD25 en células donde se inactivó el gen DGK-alfa utilizando ARNsg (# 11; denotado DGK-alfa # 11) para DGK-alfa,

La FIG. 2 muestra el MFI CD25 en células donde se inactivó el gen A20 utilizando ARNsg (# 11; denotado como A20 # 11) para A20,

45 45 La FIG. 3 muestra el MFI CD25 en células donde se inactivó el gen EGR2 utilizando ARNsg (# 1; denotado EGR2 # 1) para EGR2, y

La FIG. 4 muestra el MFI CD25 en células donde se inactivó el gen PPP2R2D utilizando ARNsg (# 10; denotado PPP2R2D # 10) para PPP2R2D, respectivamente.

50 50 Como se muestra en las FIGS. 1 a 4, en el caso de células no tratadas con CD3 o CD3/28 dynabeads, la presencia o ausencia de inactivación de los genes no afectó el nivel de expresión de CD25, mientras que en el caso de células tratadas con CD3 o CD3/28 dynabeads, se confirmó que el nivel de expresión de CD25 aumentó notablemente cuando los genes fueron inactivados en comparación con el tipo salvaje.

Además, se probaron mediante ELISA los niveles de secreción de IFN-gamma, un tipo de citoquina.

Como se describió anteriormente, después de reestimular las células Jurkat con CD3 o CD3 / 28 dynabeads se activaron durante 36 h, se recolectó el medio de cultivo y se diluyó a una relación de 1/100 o 1/200 (p/v) usando un tampón diluyente (provisto por el kit ELISA, Biolegend), y luego se desarrolló el color usando un kit ELISA (BioLegend) y se cuantificó usando un espectrofotómetro (MULTISCAN GO, Thermo Scientific).

- 5 A modo de comparación, se realizó una prueba ELISA de la misma manera en células de tipo salvaje en las que no se introdujeron la proteína Cas9 ni el ARNsg.

Los resultados obtenidos se muestran en la FIG. 5.

- La Figura 5 muestra: un nivel de IFN-gamma en un medio de cultivo celular en el que se inactivó el gen DGK-alfa utilizando ARNsg (# 11; denotado como DGK-alfa # 11) para DGK alfa; niveles de IFN-gamma en medio de cultivo celular en el que se inactivó el gen A20 utilizando ARNsg (# 11; denotado como A20 # 11) para A20; un nivel de IFN-gamma en medio de cultivo celular en el que se inactivó el gen EGR2 utilizando ARNsg (# 1; denotado como EGR2 # 1) para EGR2 (unidades de nivel de IFN-gamma: pg / ml).

Como se muestra en la FIG. 5, se confirmó que cuando se inactivaron los genes, la cantidad de secreción de IFN-gamma aumentó significativamente en comparación con el tipo salvaje.

15 **Ejemplo 5: Activación de células T primarias humanas y mejora de secreción de citoquinas**

En referencia al método descrito en el Ejemplo 4 anterior, las células T primarias humanas transfectadas con proteína Cas9 y ARNsg se activaron con perlas CD3 (relación perla:célula de 1:1, 2:1 y 3:1, respectivamente). Después de 2 días, se midieron los niveles de secreción de IFN-gamma e IL-2 mediante ELISA (kit ELISA de IFN-gamma o IL-2; Biolegend).

- 20 Los resultados obtenidos se muestran en la FIG. 6 y FIG.7.

La Figura 6 muestra: un nivel de IFN-gamma en el medio de cultivo celular en el que se inactivó el gen DGK-alfa utilizando ARNsg (# 11; denotado como DGK-alfa # 11) para DGK-alfa; un nivel de IFN-gamma en el medio de cultivo celular en el que se inactivó el gen DGK-alfa utilizando ARNsg (utilizando la combinación con # 8 y # 11; denotado como DGK-alfa # 8 + 11); un nivel de IFN-gamma en el medio de cultivo celular en el que se inactivó el gen DGK-zeta utilizando ARNsg (# 5; denotado como DGK-zeta # 5) para DGK-zeta; y un nivel de IFN-gamma en el medio de cultivo celular en el que se inactivó el gen A20 utilizando ARNsg (# 11; denotado como A20 # 11) para A20 (unidades de nivel de IFN-gamma: pg / ml).

- 25 La Figura 7 muestra: los niveles de IL-2 en el medio de cultivo celular en el que se inactivó el gen DGK-alfa utilizando DGKalfa # 11; los niveles de IL-2 en el medio de cultivo celular en el que se inactivó el gen DGK-alfa utilizando DGK-alfa # 8 + 11; los niveles de IL-2 en el medio de cultivo celular en el que se inactivó el gen DGK-zeta utilizando DGK-zeta # 5; y (unidad de nivel de IL-2: pg / ml) en el medio de cultivo celular en el que se inactivó el gen A20 utilizando A20 # 11 (unidad de nivel de IL-2: pg / ml).

En las Figuras 6 y 7, se utilizó "AAVSI" como control negativo para las células en las que se escindió el sitio AAVS1 con el sistema CRISPR.

- 30 35 Como se muestra en las FIGS. 6 y 7, cuando se inactivaron los genes, la cantidad de secreción de citoquinas tales como IFN-gamma e IL-2 aumentó significativamente en comparación con el tipo salvaje.

Estos resultados, que mostraron un aumento en la expresión de CD25 y la secreción de citoquinas en células Jurkat y células T primarias humanas, indican que la señal de activación mediada por TCR aumentó cuando se inactivaron los genes y la función inmune de las células T puede mejorarse mediante el aumento de la actividad.

40 **Ejemplo 6: Activación de células CAR-T y mejora de la secreción de citoquinas**

- 45 Las células T de sangre periférica humana (células pan-T) se adquirieron de STEMCELL TECHNOLOGIES. Para el cultivo celular se utilizó el medio X-VIVO 15 complementado con 50 U/mL de hIL-2 y 5 ng/mL de hIL-7. Se utilizaron Anti-CD3 / 28 Dynabeads (ThermoFisher Scientific) para activar las células, con una relación de perlas a células de 3:1.

Después de 24 horas de activación, las células T se mezclaron con lentivirus 139-CAR durante 48 horas en placas recubiertas con retronectina. 139-CAR es un CAR capaz de reconocer específicamente EGFRvIII e inducir una respuesta inmune. Posteriormente, se introdujeron en las células 40 µg de proteína Cas9 recombinante de *S. pyogenes* (Toolgen, Corea) y 10 µg de tracr/ARNcr sintetizado químicamente (Integrated DNA Technologies) mediante electroporación con 4D-Nucleofector (Lonza).

50 Para los experimentos *in vitro*, las células cancerosas U87vIII previamente teñidas con Cell Trace (ThermoFisher Scientific) se co-cultivaron con 139 CAR-T en relaciones apropiadas. En este momento, el cultivo se realizó con o sin 10 ng/mL de TGF-β1 o 0.5 µg/mL de PGE2. Después del cocultivo con líneas de

células cancerosas, las células se tiñeron con 7-aminoactinomicina D (7-AAD) para experimentos de prueba de citotoxicidad. Las muestras teñidas se recolectaron en un citómetro de enfoque acústico Attune NxT y se analizaron con FlowJo.

5 La citotoxicidad se calculó mediante la fórmula  $[(\% \text{ de muestra de lisis} - \% \text{ de lisis mínimo}) / (\% \text{ de lisis máx} [100\%] - \% \text{ lisis mínimo})] \times 100\%$ . Además, los sobrenadantes de los co-cultivos también fueron analizados mediante el kit ELISA (Biolegend) para la determinación del contenido de IL-2 e IFN-γ. Para el experimento de proliferación celular de células 139 CAR-T, las células 139 CAR-T teñidas con CellTrace se co-cultivaron con la línea celular de cáncer objetivo U87vIII y luego se midió el grado de dilución de Cell Trace usando citometría de flujo en células 139 CAR-T.

10 De acuerdo con el diseño experimental (FIG. 8a, A), el efecto Indel de DGKa y DGKζ fue del 75.9 % y 93.5 %, respectivamente, en células 139 CAR-T administradas con un único complejo Cas9/ribonucleoproteína ARNg (RNP) dirigido a DGKa o DGKζ (FIG. 8a, B).

15 Se introdujeron en las células dos ARNg dirigidos a DGKa y DGKζ, respectivamente, mediante electroporación para producir células 139 CAR-T doblemente negativas para DGKa y DGKζ. Como resultado, los efectos Indel de DGKa y DGKζ fueron del 49.2% y del 92.4%, respectivamente (FIG. 8a, B).

No se confirmaron efectos significativos fuera del objetivo en el ARNg respectivo de DGKa y DGKζ utilizando la secuenciación profunda dirigida (FIG. 8b).

20 Además, se observó que las células 139 CAR-T DGKa, DGKζ, y DGKaζ KO (inactivación) tienen una citotoxicidad, una capacidad de producción de citoquinas y una capacidad proliferativa significativamente incrementada, en comparación con las células 139 CAR-T de tipo salvaje (FIGS. 9a A,B y FIG. 9b).

25 De maner interesante, las células 139 CAR-T DGKaζ KO mostraron una liberación de citoquinas significativamente incrementada en comparación con las células 139 CAR-T KO individuales para DGKa o DGKζ, lo que se cree que es un efecto sinérgico de DGKa y DGKζ. Se considera que el aumento de la función efectora de dichas células 139 CAR-T KO de DGKs se atribuye al aumento de la señal CD3-terminal, es decir, al aumento de ERK 1 / 2 y a la alta expresión de CAR después de la exposición al antígeno (FIG. 10A, B).

30 Además, a pesar de las señales fuertemente activadas en células 139 CAR-T KO de DGKs, no se observó ningún aumento de citoquinas basales en ausencia de células cancerosas diana, lo que sugiere una alta seguridad de los KO de DGKs (FIG. 11A). Además, la expresión de PD-11 y TIM-33, que son marcadores de agotamiento, no aumentó en las células 139 CAR-T KO de DGKs en comparación con las células 139 CAR-T (FIG. 11B). Estos resultados sugieren que la KO de DGKs no promueve el agotamiento de las células T incluso después de una exposición prolongada al antígeno (FIG. 11B).

35 El efecto anticancerígeno de las células 139 CAR-T se vio notablemente afectado por el tratamiento con inhibidores inmunosupresores de la señalización 1 tal como TGF-β1 y PGE2, mientras que en el caso de las células 139 CAR-T KO de DGKaζ, se confirmó que la citotoxicidad y la liberación de citoquinas se mantuvieron incluso en presencia de factores inhibidores de la citólisis (FIG. 12A, B).

40 Estos resultados indican que la función de las células T se puede activar inactivando el gen DGK usando CRISPR / Cas9.

45 En otras palabras, se confirmó que la inactivación del gen DGK puede mejorar la señal terminal CD3, mejorando así la función anticancerígena y la proliferación de células CAR-T.

40 Además, las células CAR-T con inactivación (KO) de DGKaζ (dos tipos de isoformas no mostraron un aumento significativo en los marcadores de agotamiento y fueron menos sensibles a los factores inmunosupresores de citólisis tales como TGF-β y prostaglandina E2 (PGE2).

45 De esta forma, se confirmó que KO de DGK por CRISPR/Cas9 puede mejorar el aumento de la función efectora de las células T.

#### 45 **Ejemplo 7: Activación de células NK (Asesinas naturales) y mejoramiento de secreción de citoquinas**

##### 7.1 Línea celular NK 92 y cultivo de células NK primarias humanas

Las líneas celulares NK92 se adquirieron de ATCC (CRL-2407), las células NK primarias se adquirieron de STEMCELL TECHNOLOGY y se cultivaron de acuerdo con el protocolo proporcionado.

50 Las células NK92 se cultivaron en medio RPMI 1640 (WellGene) que contenía 10% de FCS (suero bovino fetal), complementado con 100 µg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, 2 mM UltraGlutamina I, 200-300 U/ml de IL-2 y 10 U/ml de IL-15.

##### 7.2 Introducción por electroporación

Para inactivar DGK $\alpha$  y DGK $\zeta$  en la línea celular NK92, se realizó una electroporación con un electroporador Neon (Thermo Fisher Scientific) a 1200 V, 10 ms y 3 pulsos. Para las células NK primarias, se utilizaron 1200 V, 20 ms y 3 pulsos.

5 Se incubaron 4  $\mu$ g de proteína Cas9 recombinante de *S. pyogenes* (Toolgen, Corea) y 1  $\mu$ g de tracr/ARNcr sintetizado químicamente (Integrated DNA Technologies) durante 20 minutos para obtener un complejo Cas9 RNP.

Se agregaron (pusieron en contacto)  $2 \times 10^5$  células NK92 resuspendidas en tampón R al complejo Cas9 RNP preincubado para realizar la electroporación. Posteriormente las células fueron sembradas a una concentración de  $4 \times 10^5$  células/mL en el medio.

10 Las secuencias de direccionamiento de ARNcr utilizadas en los experimentos fueron las siguientes:

DGK $\alpha$ : CTCTCAAGCTGAGTGGTCC

DGK $\zeta$ : ACGAGCACTCACCAGCATCC.

### 7.3 Ensayos de inducir muerte *in vitro*

15 Para analizar la citotoxicidad de las células NK92 y las células NK primarias, las células se co-cultivaron con células Raji teñidas con CellTrace Far Red (Invitrogen) o células  $1 \times 10^5$  K562 en placas de 96 con fondo en U. Después del co-cultivo durante 18 horas, las células fueron recolectadas y teñidas con 7-AAD y luego analizadas por citometría de flujo. Todos los experimentos de citotoxicidad se realizaron 3 veces.

20 Los resultados se muestran en la FIG. 13. Se confirmó que la eficiencia de inactivación de DGK $\alpha$  (eficiencia de KO) en células NK92 y células NK primarias fue excelente (Figs. 13 A y B). Además, la actividad de inducción de muerte de NK-92 se confirmó a través de la medición de células Raji 7-AAD-positivas, lo que indica que la citotoxicidad aumentó con la inactivación de DGK $\alpha$ .

En particular, estos resultados confirman que la función inmune puede manipularse eficazmente contra las células NK, que son conocidas por ser difíciles de manipular genéticamente.

## Ejemplo 8: Activación de células NKT (Asesinas Naturales) y mejoramiento de secreción de citoquinas

25 8.1 Cultivo de células NKT

Las PBMC humanas se adquirieron de STEMCELL TECHNOLOGY (Canadá).

Estas células se sembraron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI complementado con 10% FBS al que se le añaden 1000 U/ml de interferón- $\gamma$  (Pepro Tech). Se añadieron al medio de cultivo 50 ng/ml de OKT-3 anti-humano (Biolegend) durante 5 días y 400 U/ml de IL-2 (Pepro Tech) durante 20 días.

30 8.2 Introducción por electroporación

Para inactivar DGK $\alpha$ , DGK $\zeta$  y PD1 en la línea celular NKT, se realizó una electroporación con un electroporador Neon (Thermo Fisher Scientific) a 1550 V, 10 ms y 3 pulsos.

35 Se incubaron 4  $\mu$ g de proteína Cas9 recombinante de *S. pyogenes* (Toolgen, Corea) y 1  $\mu$ g de tracr/ARNcr sintetizado químicamente (Integrated DNA Technologies) durante 20 minutos para obtener un complejo Cas9 RNP.

Se agregaron (pusieron en contacto)  $2 \times 10^5$  células NKT resuspendidas en tampón R al complejo Cas9 RNP preincubado para realizar la electroporación. Posteriormente, las células fueron sembradas a una concentración de  $4 \times 10^5$  células/mL en el medio.

Las secuencias de direccionamiento de ARNcr utilizadas en los experimentos fueron las siguientes:

40 DGK $\alpha$ : CTCTCAAGCTGAGTGGTCC

DGK $\zeta$ : ACGAGCACTCACCAGCATCC.

PD-11: GTCTGGCGGTGCTACAACTGGG

### 8.3 Ensayos de inducción de muerte *in vitro*

45 Para analizar la citotoxicidad de las células NKT, estas se co-cultivaron con células  $2 \times 10^{44}$  U87vIII teñidas con CellTrace Far Red (Invitrogen) en placas de 96 pocillos con fondo en U. Después del co-cultivo durante 18 horas, las células fueron recolectadas y teñidas con 7-AAD y luego analizadas por citometría de flujo. Todos los experimentos de citotoxicidad se realizaron 3 veces.

Como resultado, se confirmó que la inactivación de DGKa y DGKζ en células NKT humanas se realizó de manera eficiente mediante el sistema CRISPR/Cas9 como se muestra en la FIG. 14.

La eficiencia de indel se confirmó mediante secuenciación profunda (FIG. 14A) y las células NKT tratadas con CRISPR/Cas9 se analizaron mediante tinción con azul tripán para confirmar el crecimiento celular (FIG. 14B) y la viabilidad celular se mantuvieron bien (Viabilidad = Número de células viables / Número total de células). Además, a través de transferencia Western, se confirmó que la inactivación de DGKa y DGKζ también ocurrió bien a nivel de proteína (FIG. 14 D)

Además, como se muestra en la FIG. 15, se confirmó que la inactivación de DGKa y DGKζ mejora la función efectora de las células NKT

10 Las células U87vIII, H460 y K562 se trataron con Cell Trace (Thermo fisher) y se cultivaron durante 18 horas en una relación de E: T (relación célula efectora: célula diana) de 20: 1 en una placa de 96 pocillos. El análisis del nivel de apoptosis de las células cancerosas 7-AAD positivas mediante citometría de flujo reveló que la inactivación de DGKa y DGKζ aumentó la actividad de inducción de muerte de NKT de las células NKT correspondientes. La inactivación de cada uno de DGKa y DGKζ también tuvo un efecto de aumento de la actividad de inducción de muerte, pero además se confirmó que la actividad de inducción de muerte mejoró aún más cuando los dos genes se inactivaron simultáneamente (FIG. 15 A).

20 Por otra parte, la secreción de IFN se midió mediante ELISA (IFN-kit, Biolegend) y los resultados mostraron que la inactivación de DGKa y DGKζ aumentó la capacidad de liberación de IFN de las células correspondientes. Aunque la inactivación respectiva de DGKa y DGKζ también tuvo el buen efecto de mejorar la secreción de IFN, se confirmó que la secreción de IFN se mejoró aún más cuando ambos genes se inactivaron simultáneamente (FIG. 15B).

25 Además, como se muestra en la FIG. 16, se confirmó que la inactivación de PD-1 mediada por CRISPR / Cas9 en células NKT humanas mejoró la función efectora de las células NKT. La inactivación de PD-1 se indujo utilizando CRISPR-Cas9 en células NKT, y la eficiencia de la inactivación de PD-1 se analizó mediante secuenciación profunda dirigida. Además, se co-cultivaron células U87vIII y células NKT para confirmar la función de las células NKT como efectores anticancerígenos a través de la inactivación de PD-1. Las células U87vIII se trataron con Cell Trace (Thermo fisher) durante 18 horas en una relación de E: T (célula efectora: célula diana)= 50: 1 durante 18 horas en una placa de 96 pocillos, y las células cancerosas 7-AAD positivas se analizaron mediante citometría de flujo para determinar su actividad de inducción de muerte.

30 Como resultado, se confirmó la alta eficiencia de indel en el gen PD-1 mediante CRISPR/Cas9 (FIG. 16A), mejorando así la citotoxicidad (FIG. 16B)

En general, los resultados anteriores muestran que la inactivación de genes inmunomoduladores mediados por CRISPR/Cas9, tales como DGK, puede tener un efecto significativo de mejora inmunológica en diversos tipos de células inmunes.

35 Estos efectos biológicos de la inactivación del gen DGK muestra que las células inmunes, incluidas las células T, las células NK y las NKT, etc., pueden desarrollarse como agentes inmunoterapéuticos en forma de células clínicamente aplicables mediante la mejora de las funciones inmunes.

[Aplicabilidad industrial]

40 Se puede obtener una terapia celular inmune eficaz mediante el sistema inmunitario modificado en el que las funciones se manipulan artificialmente de acuerdo con los factores inmunorreguladores manipulados artificialmente y las células que los contienen.

45 Por ejemplo, cuando los factores inmunorreguladores se controlan artificialmente mediante el método o la composición de la presente memoria descriptiva, se pueden mejorar las eficacias inmunes involucradas en la supervivencia, proliferación, persistencia, citotoxicidad, liberación y/o infiltración de citoquinas, etc. de las células inmunes.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para la producción de una célula inmune diseñada artificialmente que tiene al menos un gen inmunorregulador diseñado artificialmente seleccionado entre el gen *Dgk $\alpha$*  y el gen *Dgk $\zeta$* , que comprende:
  - uno o más ácidos nucleicos guía o ácidos nucleicos que los codifican; y
- 5 una proteína editora o un ácido nucleico que los codifica, en donde la proteína editora es proteína Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes*, en donde el ácido nucleico guía y la proteína editora son capaces de formar un complejo de proteína editora-ácido nucleico guía, y el complejo de proteína editora-ácido nucleico guía es capaz de inducir una o más indeles en una secuencia de ácido nucleico de uno o más del gen *Dgk $\alpha$*  y el gen *Dgk $\zeta$*  de una célula inmune, y
- 10 en donde el ácido nucleico guía tiene una secuencia capaz de direccionarse a una secuencia diana seleccionada entre las SEQ ID NO: 19, 20, 21 y 23 en una región de exón del gen *Dgk $\alpha$* , o la secuencia diana seleccionada entre las SEQ ID NO: 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123 en una región de exón del gen *Dgk $\zeta$* .
2. La composición para la producción de una célula inmune diseñada artificialmente según la reivindicación 1,
- 15 en donde el ácido nucleico guía y la proteína editora están en forma de ribonucleoproteína.
3. La composición para la producción de una célula inmune diseñada artificialmente según la reivindicación 1, en donde la composición comprende
  - el ácido nucleico guía que tiene la secuencia capaz de direccionarse a la secuencia diana seleccionada entre las SEQ ID NO: 19, 20, 21 y 23; y
- 20 el ácido nucleico guía que tiene la secuencia capaz de direccionarse a la secuencia diana seleccionada entre las SEQ ID NO: 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123.
4. Un método para producir una célula inmune diseñada artificialmente que tiene al menos un gen inmunorregulador diseñado artificialmente seleccionado entre el gen *Dgk $\alpha$*  y el gen *Dgk $\zeta$* , que comprende:
  - entrar en contacto con una célula inmune aislada de un cuerpo humano para:
    - uno o más ácidos nucleicos guía, o ácidos nucleicos que los codifican, y
    - una proteína editora que es proteína Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes* o un ácido nucleico que la codifica;
    - e inducir uno o más indeles en una secuencia de ácido nucleico de uno o más de los genes *Dgk $\alpha$*  y *Dgk $\zeta$*  de la célula inmune;
  - 30 en donde uno o más indeles están ubicados en una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM) o están ubicados dentro del rango de 1bp a 30 pb continuos adyacentes a un extremo 5' o un extremo 3' de la secuencia PAM, y
  - 35 en donde el ácido nucleico guía tiene una secuencia capaz de direccionarse a una secuencia diana seleccionada entre las SEQ ID NO: 19, 20, 21 y 23 en una región de exón del gen *Dgk $\alpha$* , o la secuencia diana seleccionada entre las SEQ ID NO: 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123 en una región de exón del gen *Dgk $\zeta$* .
5. El método según la reivindicación 4,
- en donde el ácido nucleico guía tiene la secuencia capaz de direccionarse a la secuencia diana seleccionada entre las SEQ ID NO: 19, 20, 21, 23, 109, 110, 111, 112, 113, 116, 120, 121 y 123.
- 40 6. El método según la reivindicación 4, en el que el paso de entrar en contacto se lleva a cabo mediante uno o más métodos seleccionados entre electroporación, liposoma, plásmido, vectores virales, nanopartículas y método de proteína de dominio de translocación de proteínas.
7. El método según la reivindicación 6, en el que el vector viral es al menos uno seleccionado del grupo de un retrovirus, un lentivirus, un adenovirus, un virus adenoasociado, un virus vaccinia, un poxvirus y un virus del herpes simple.

【Figura】

【FIG. 1】

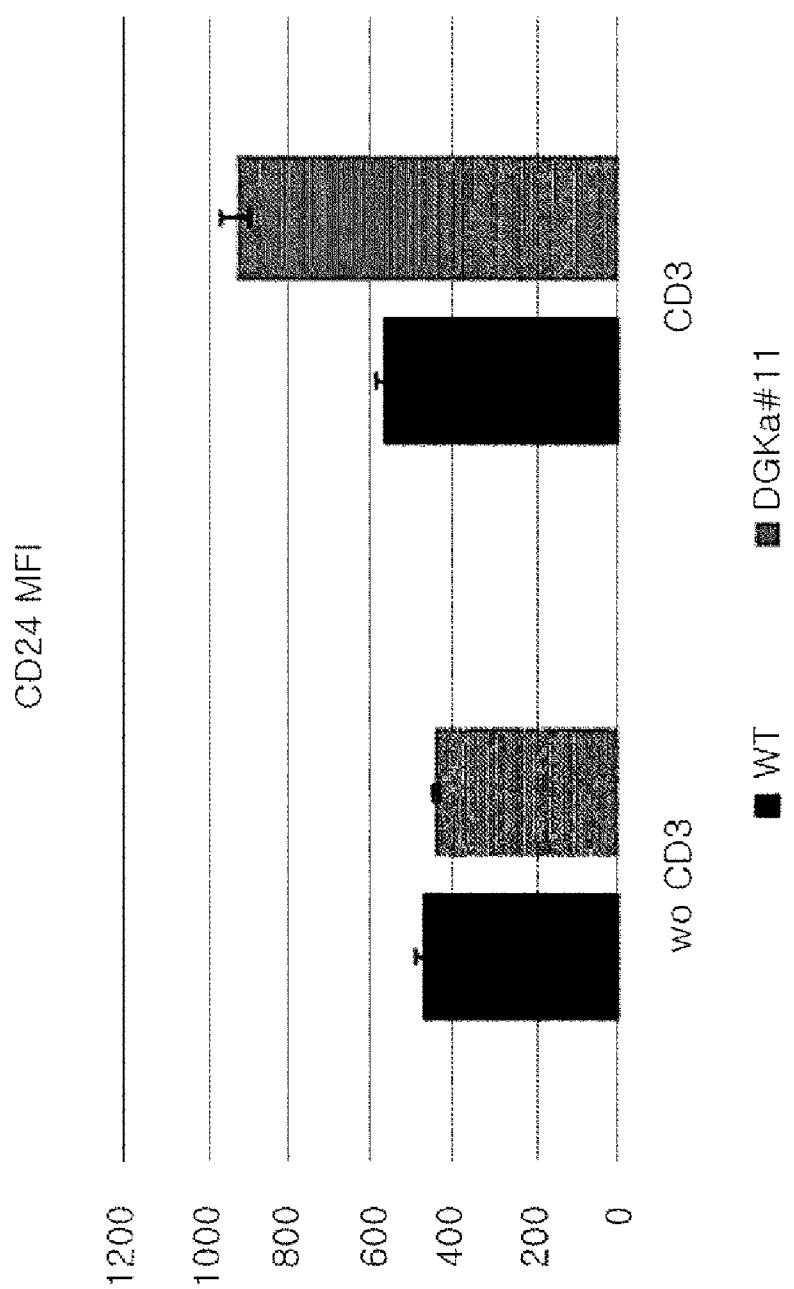
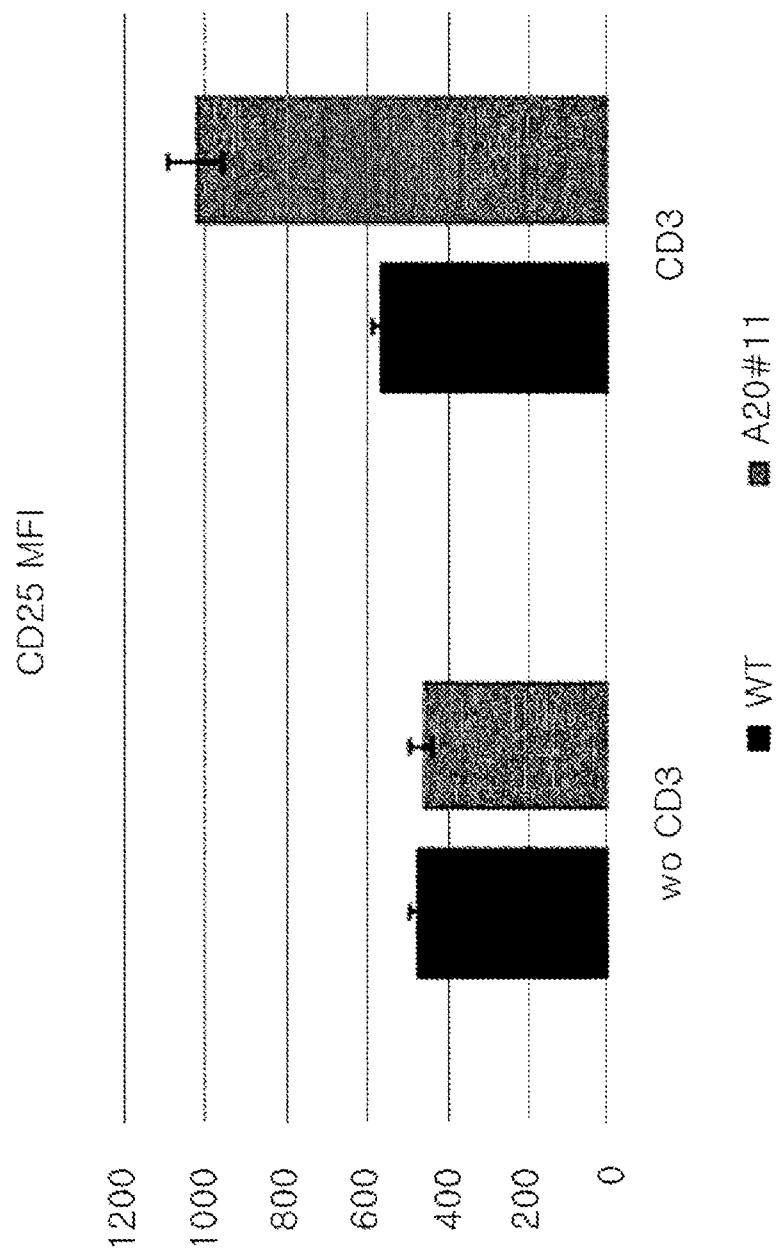
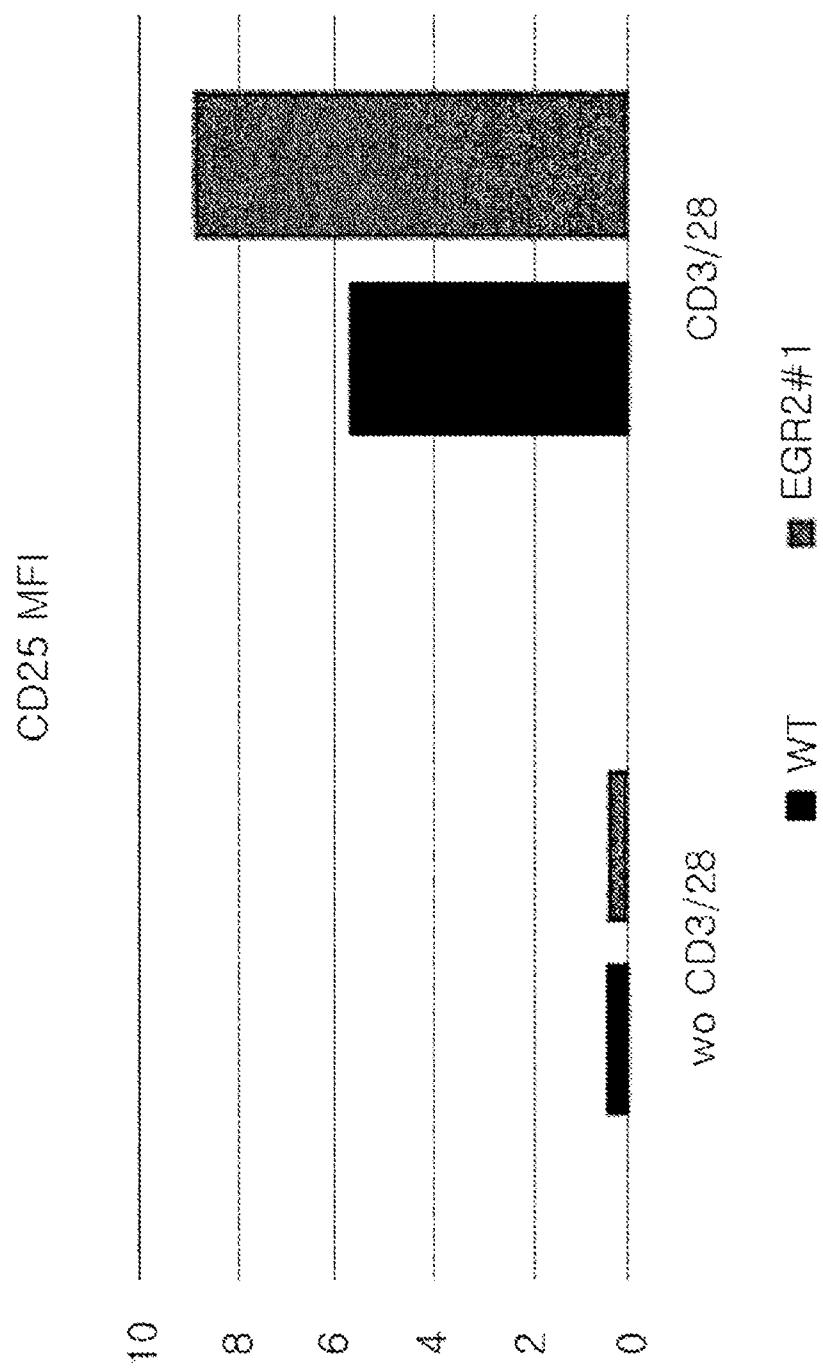


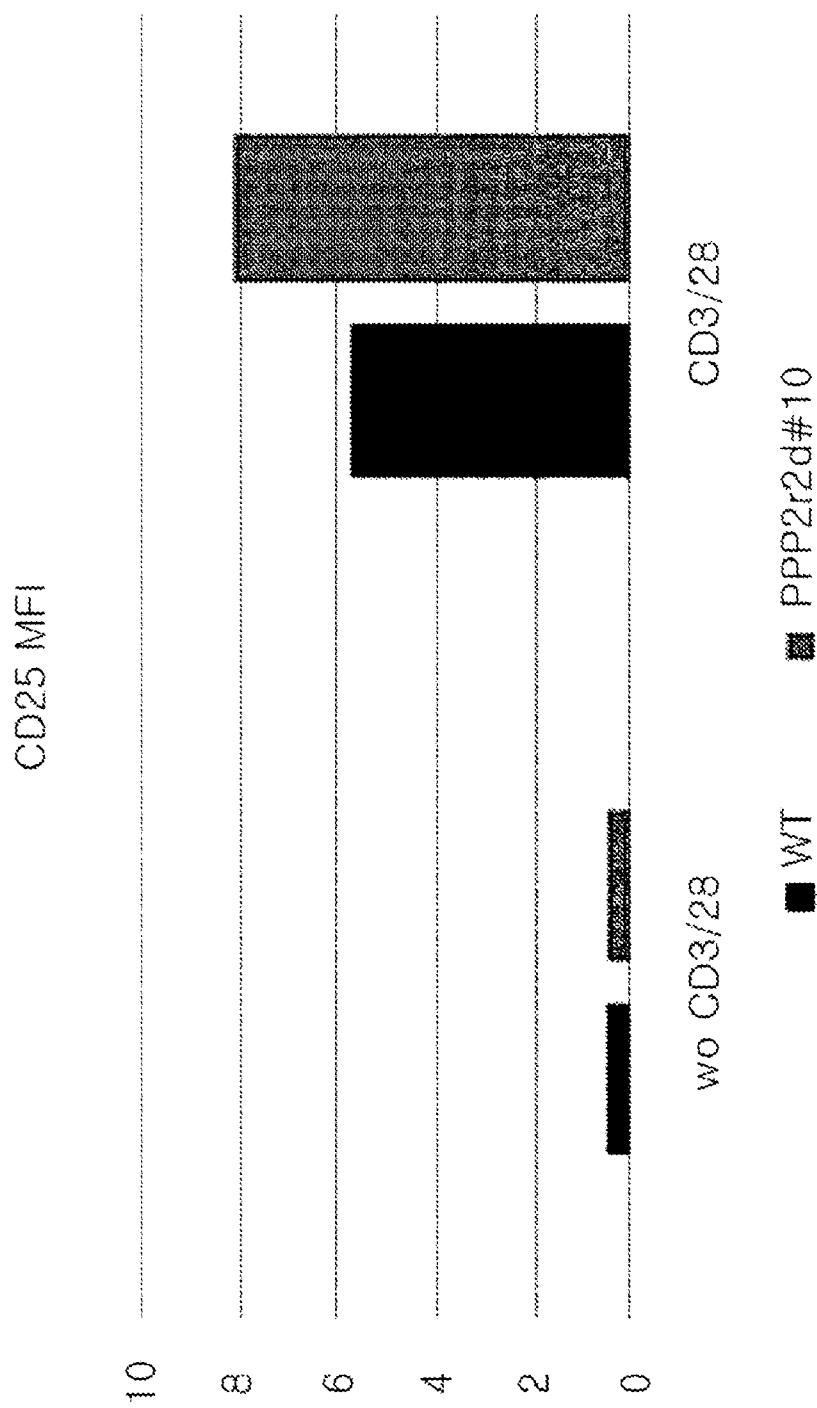
FIG. 21



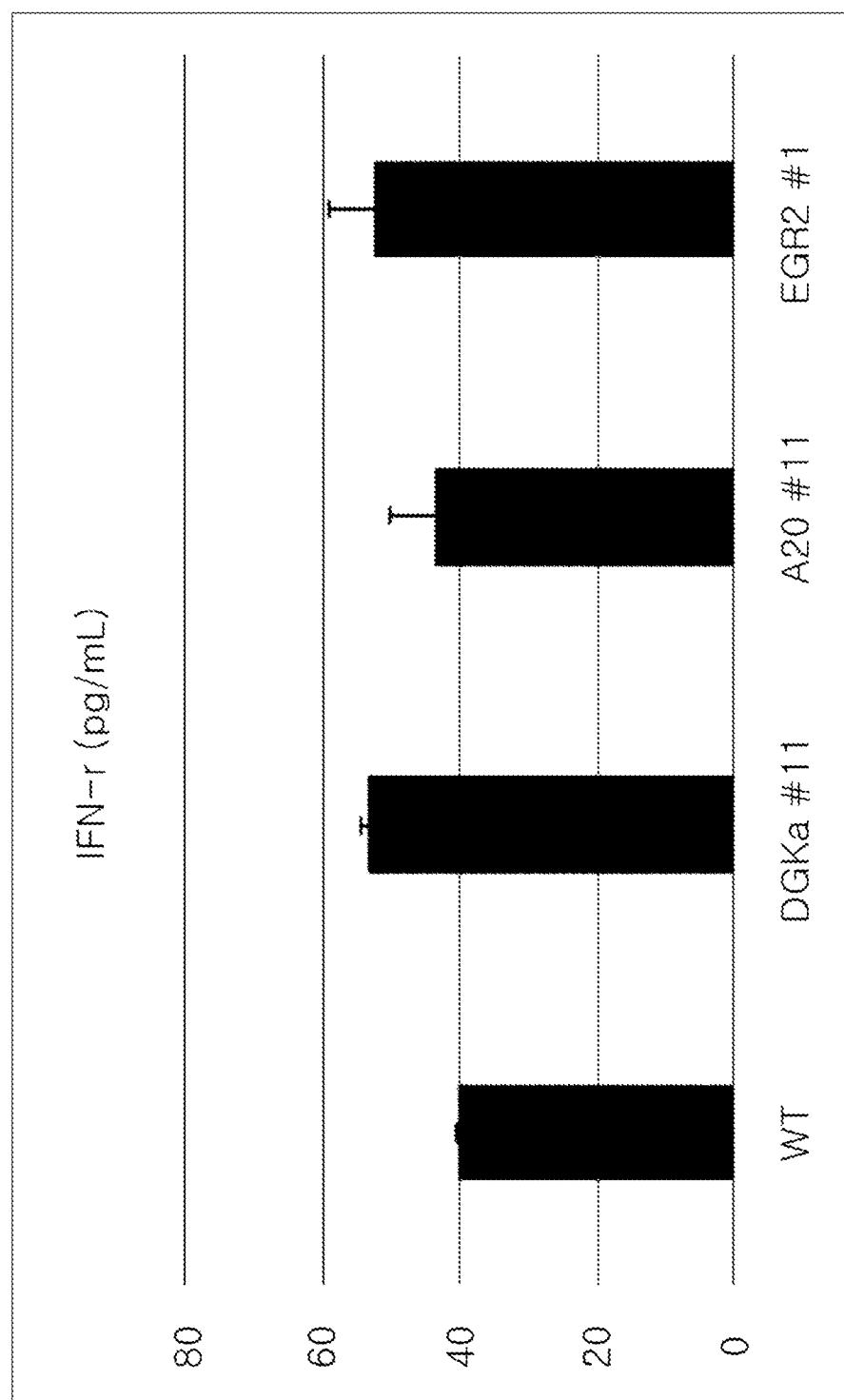
【FIG. 3】



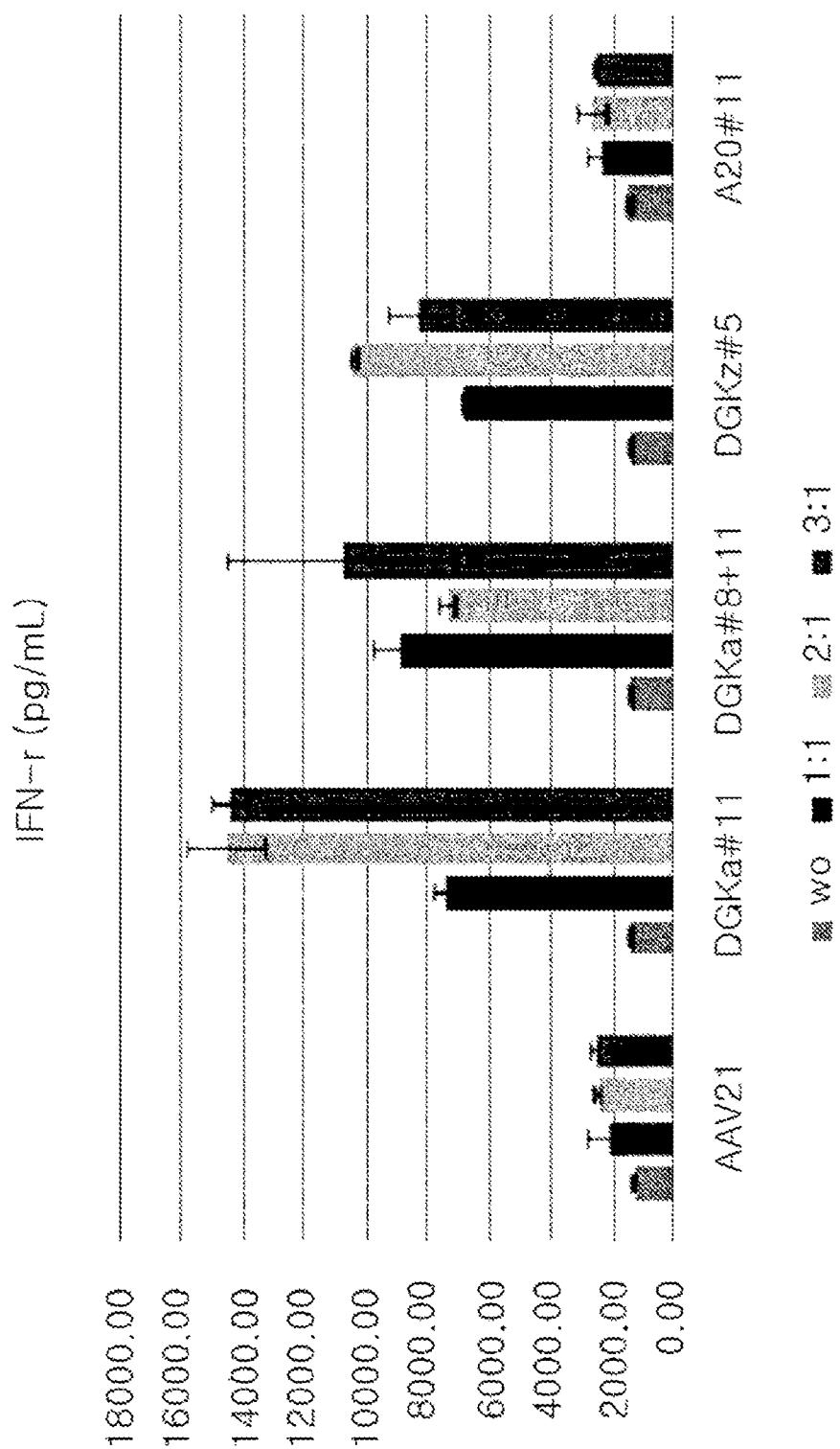
【FIG. 4】



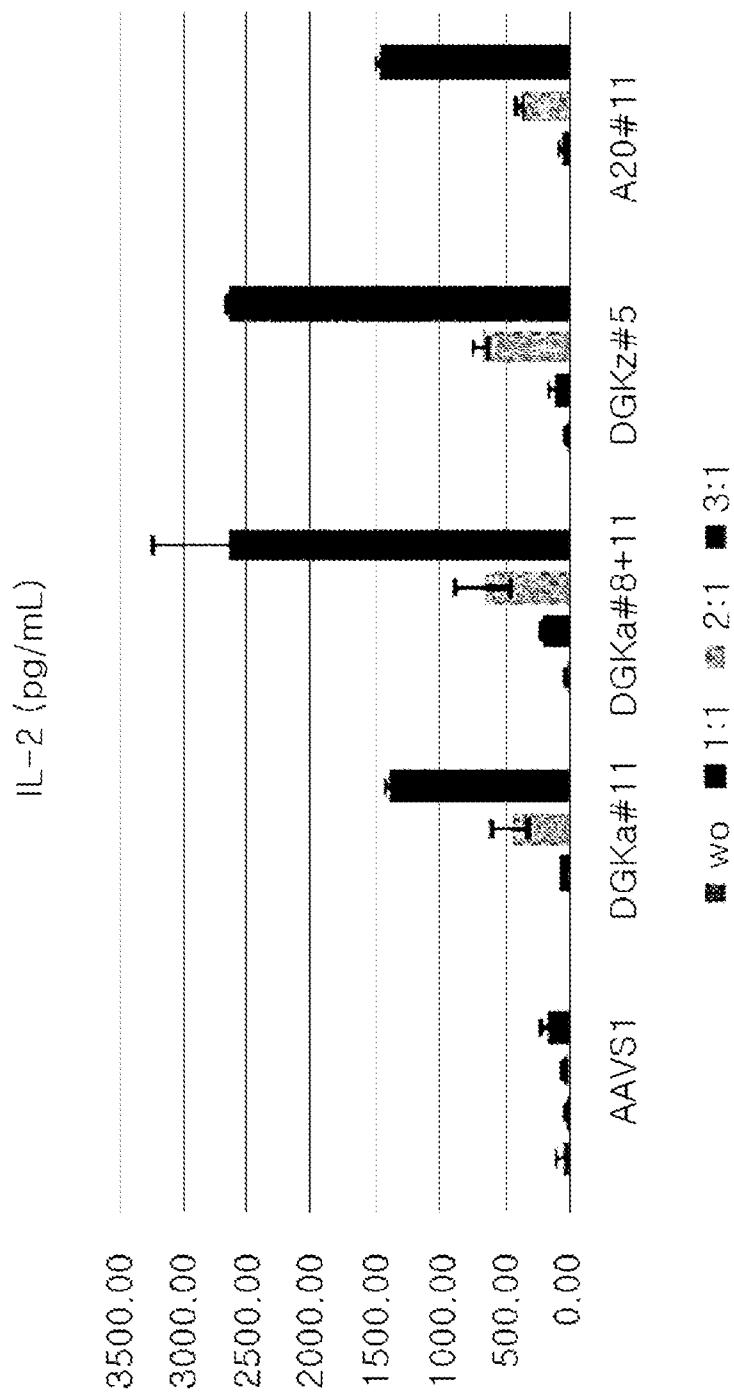
【FIG. 5】



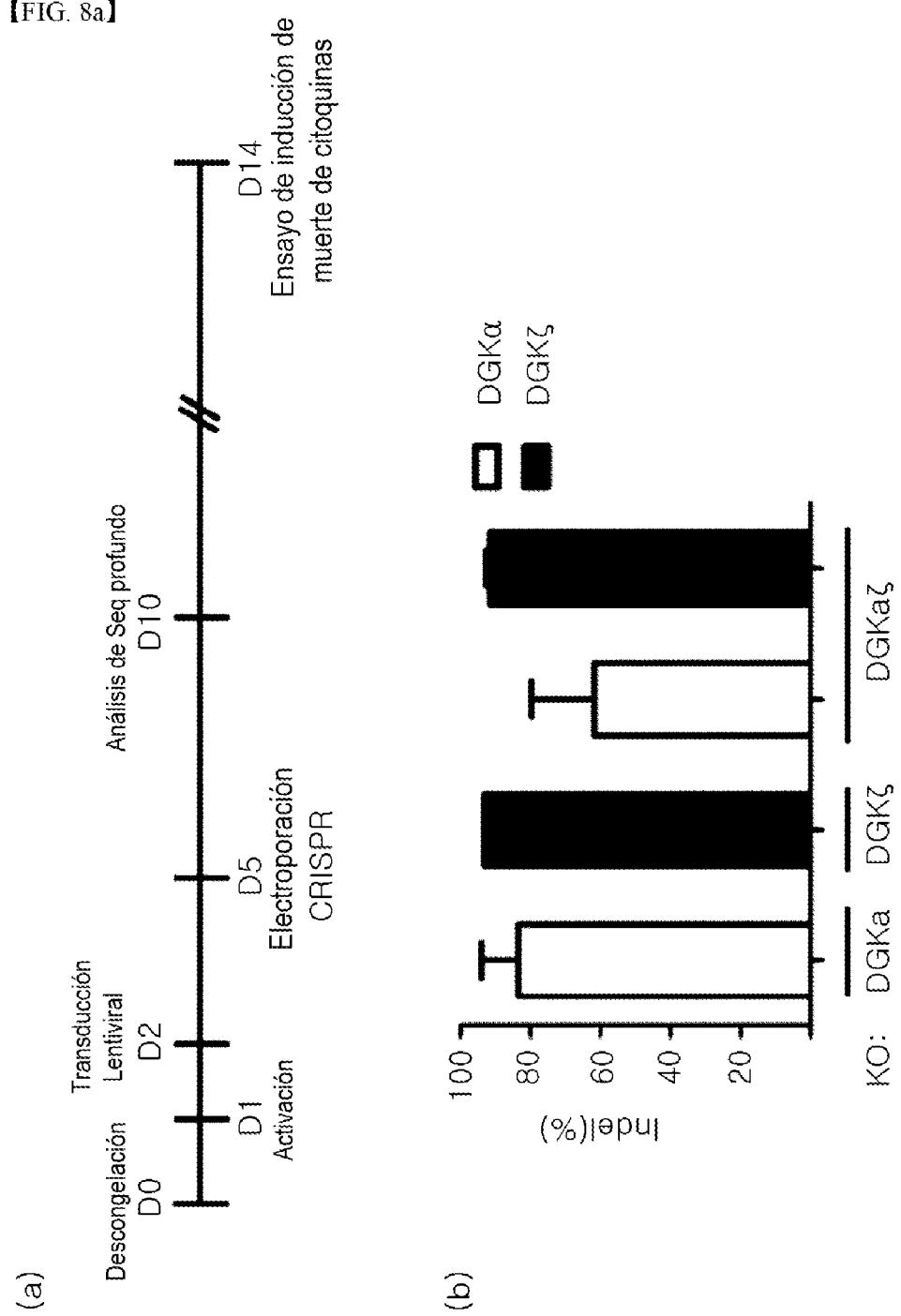
[FIG. 6]



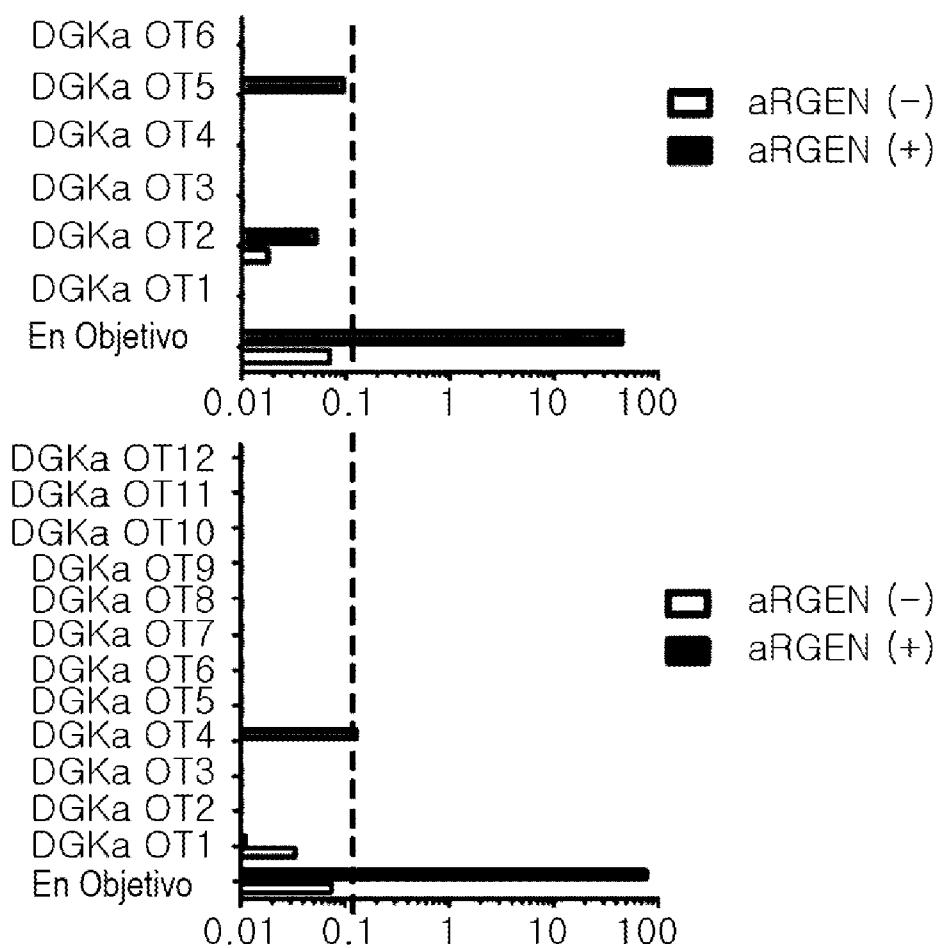
【FIG. 7】



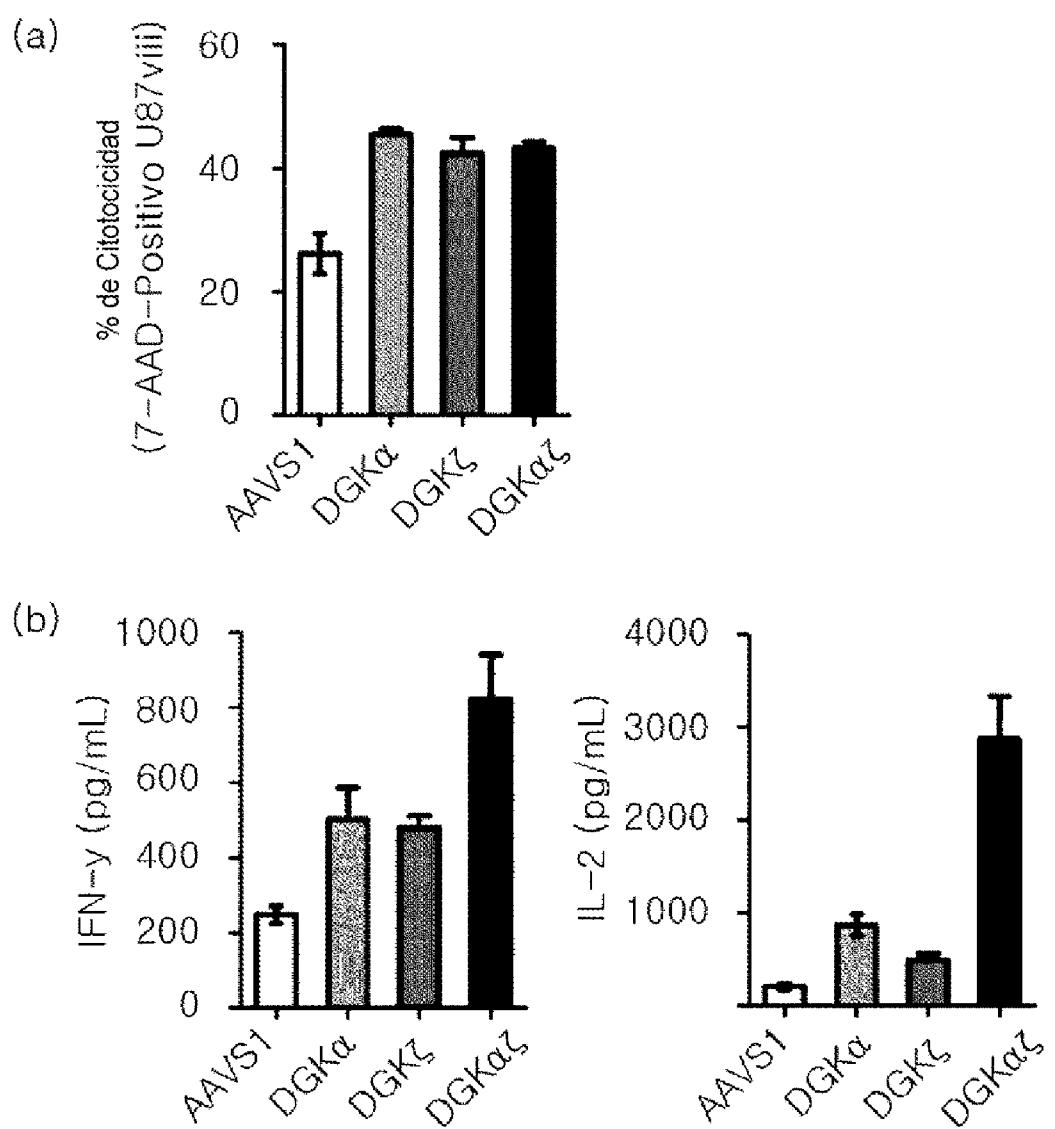
【FIG. 8a】



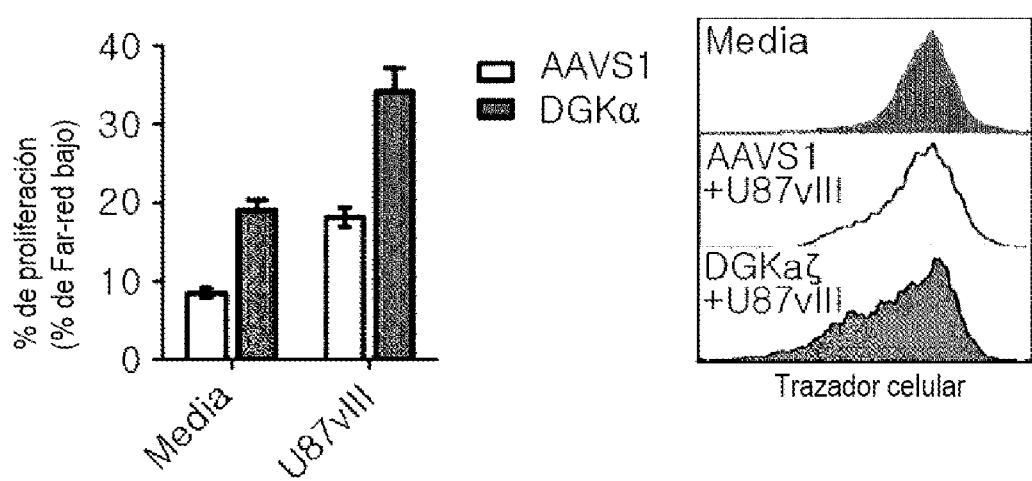
[FIG. 8b]



[FIG. 9a]

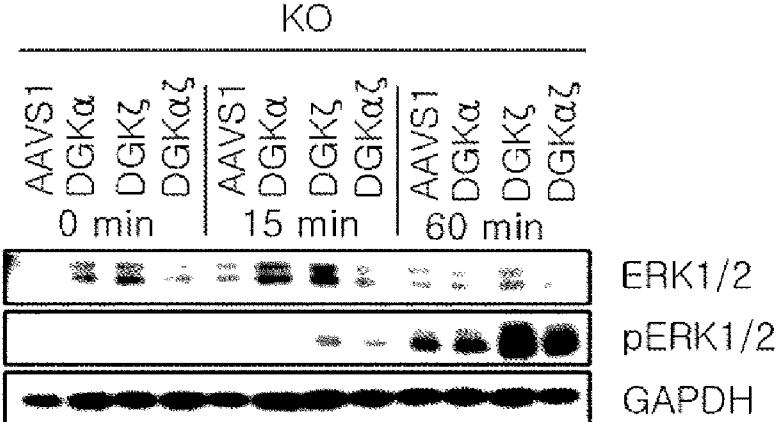


[FIG. 9b]

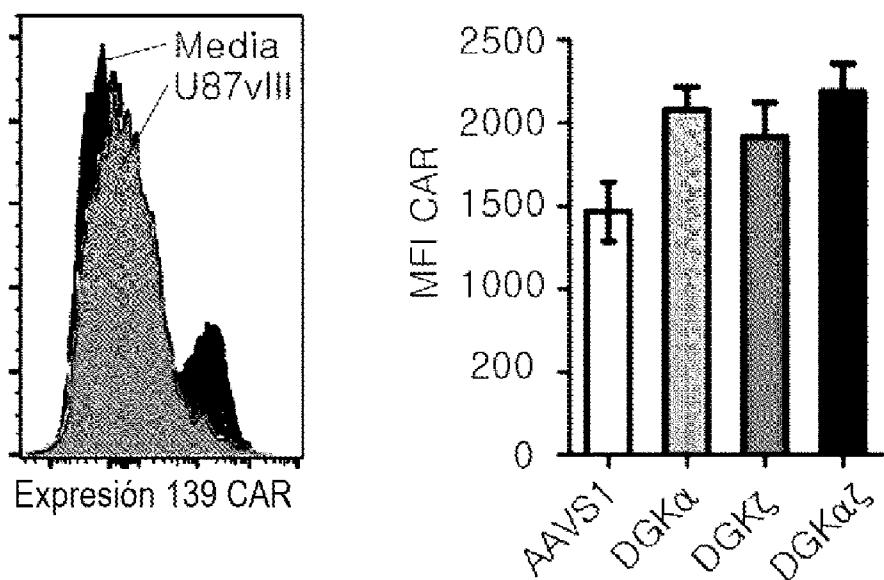


【FIG. 10】

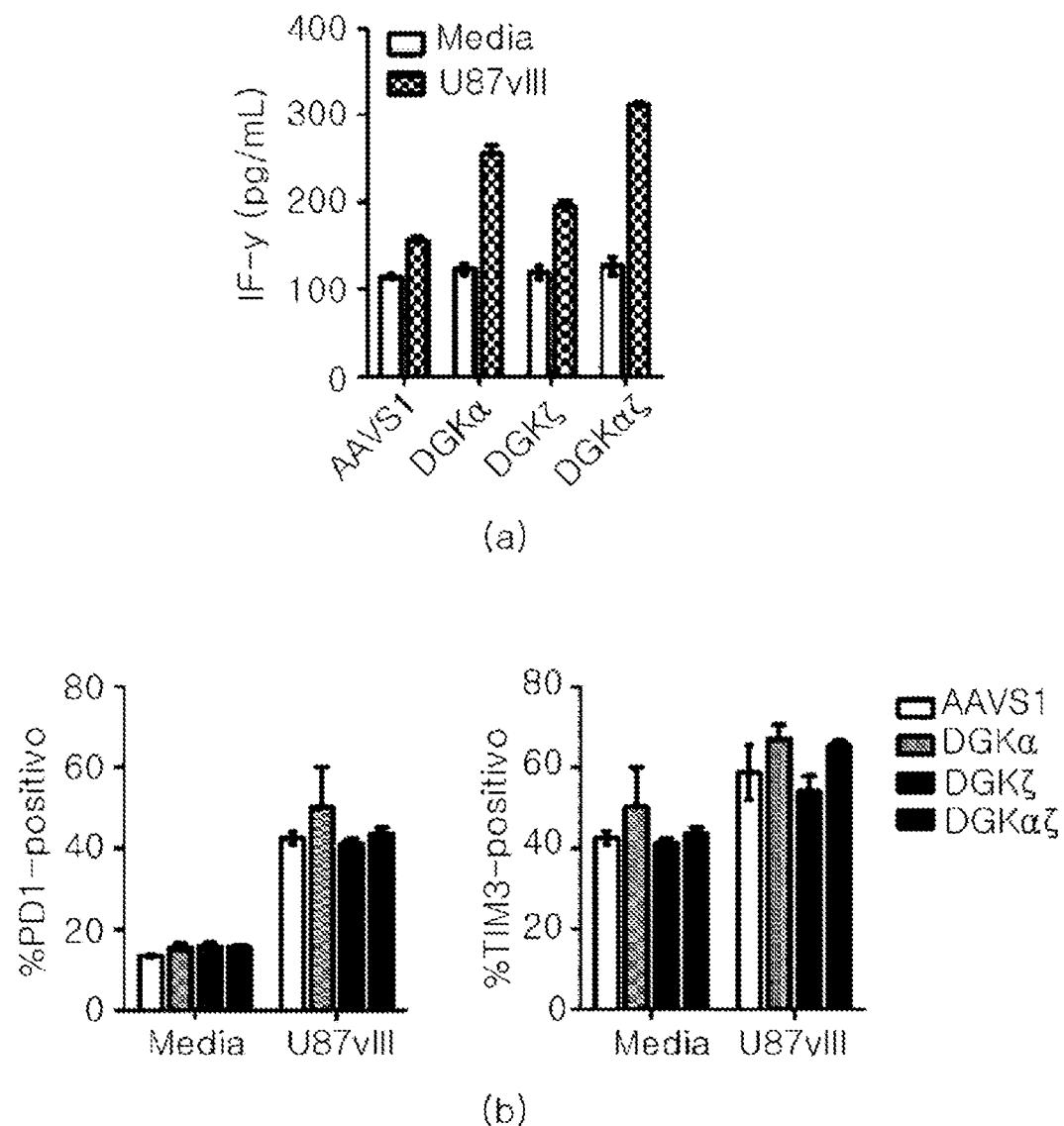
(a)



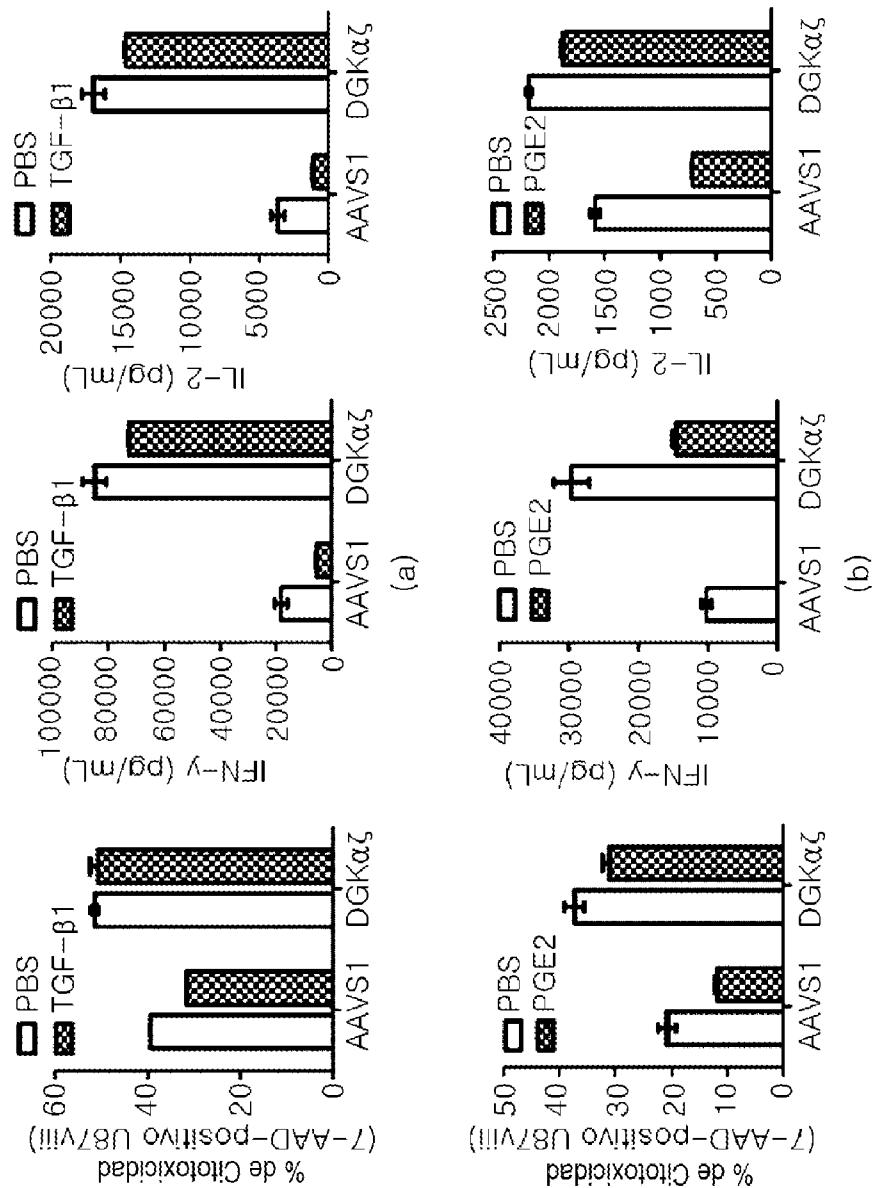
(b)



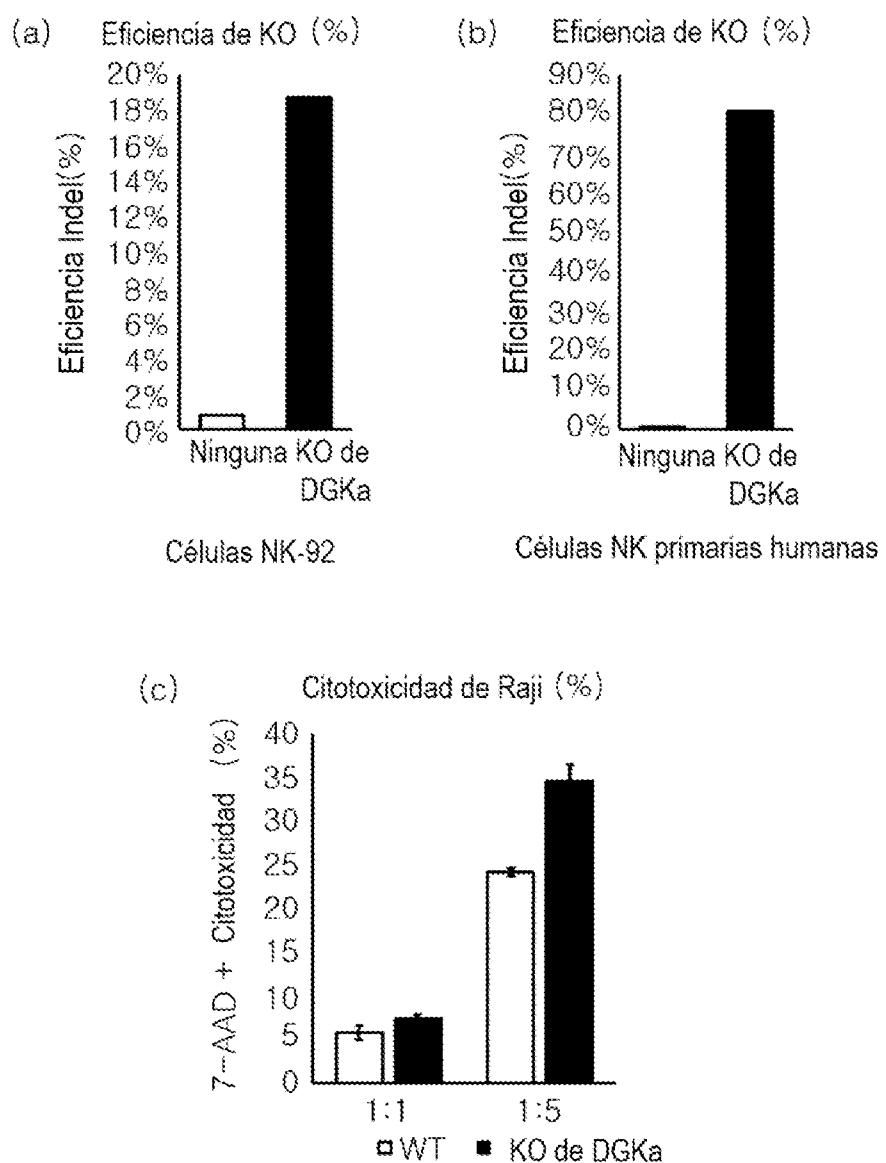
[FIG. 11]



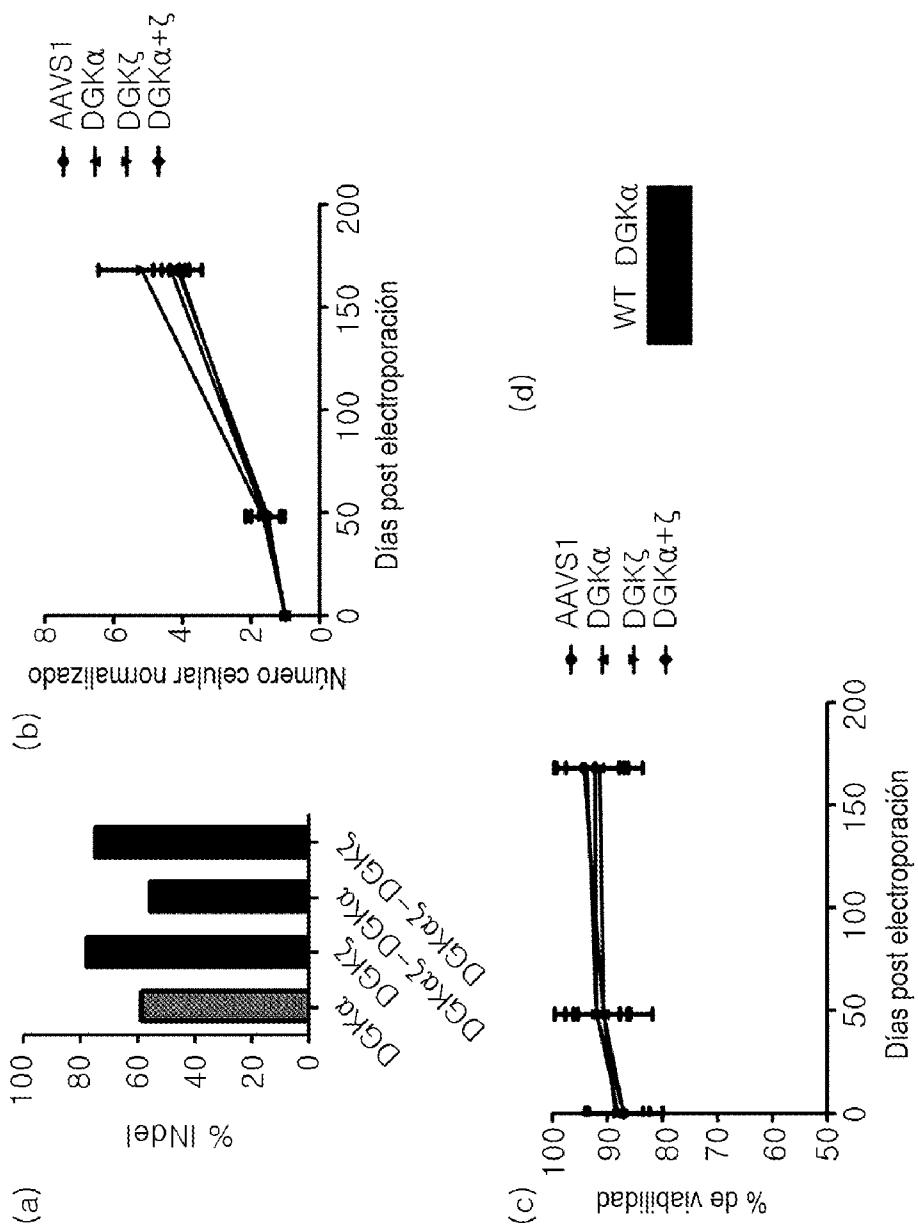
[FIG. 12]



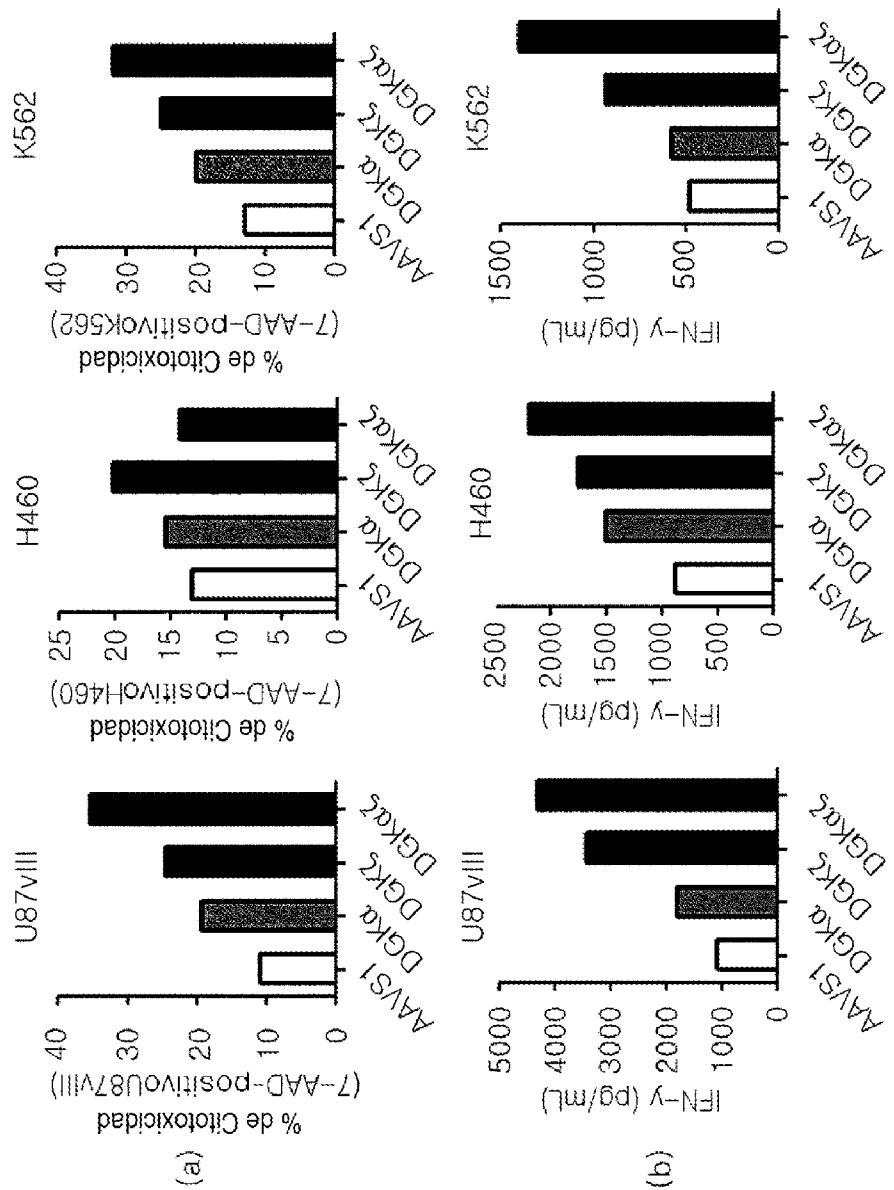
[FIG. 13]



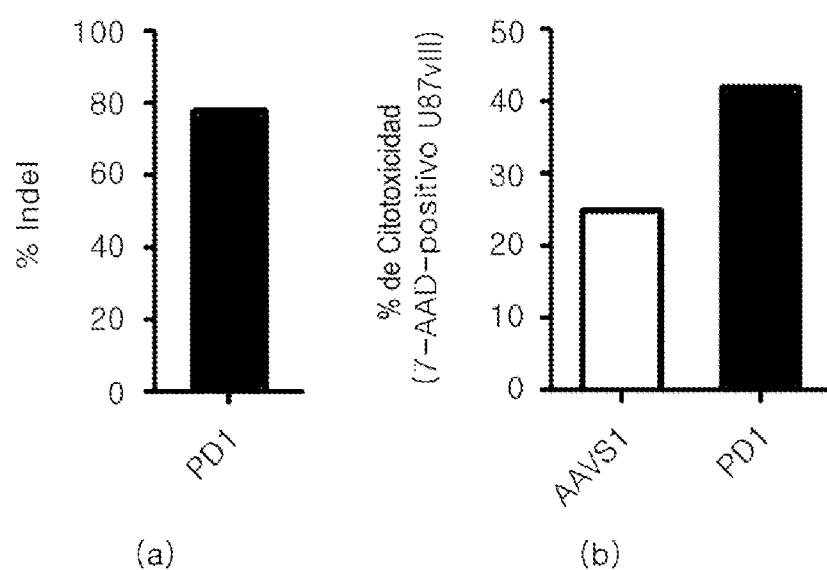
[FIG. 14]



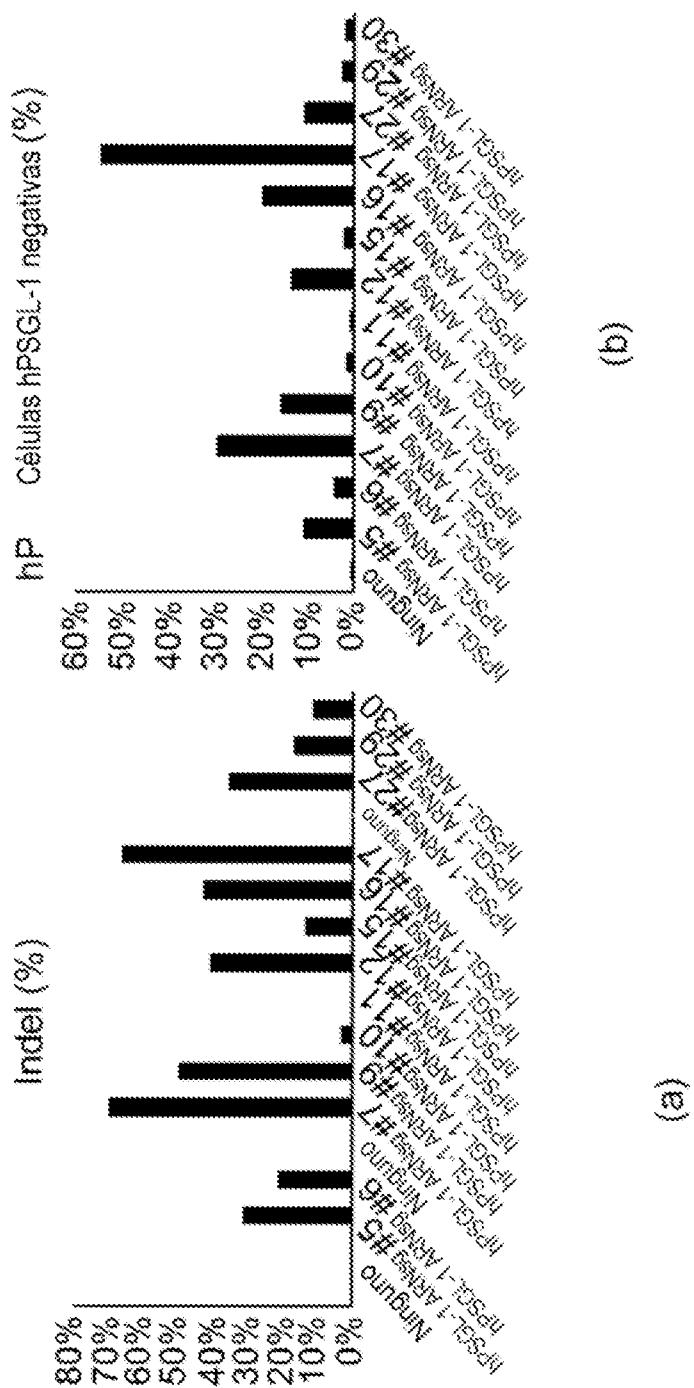
[FIG. 15]



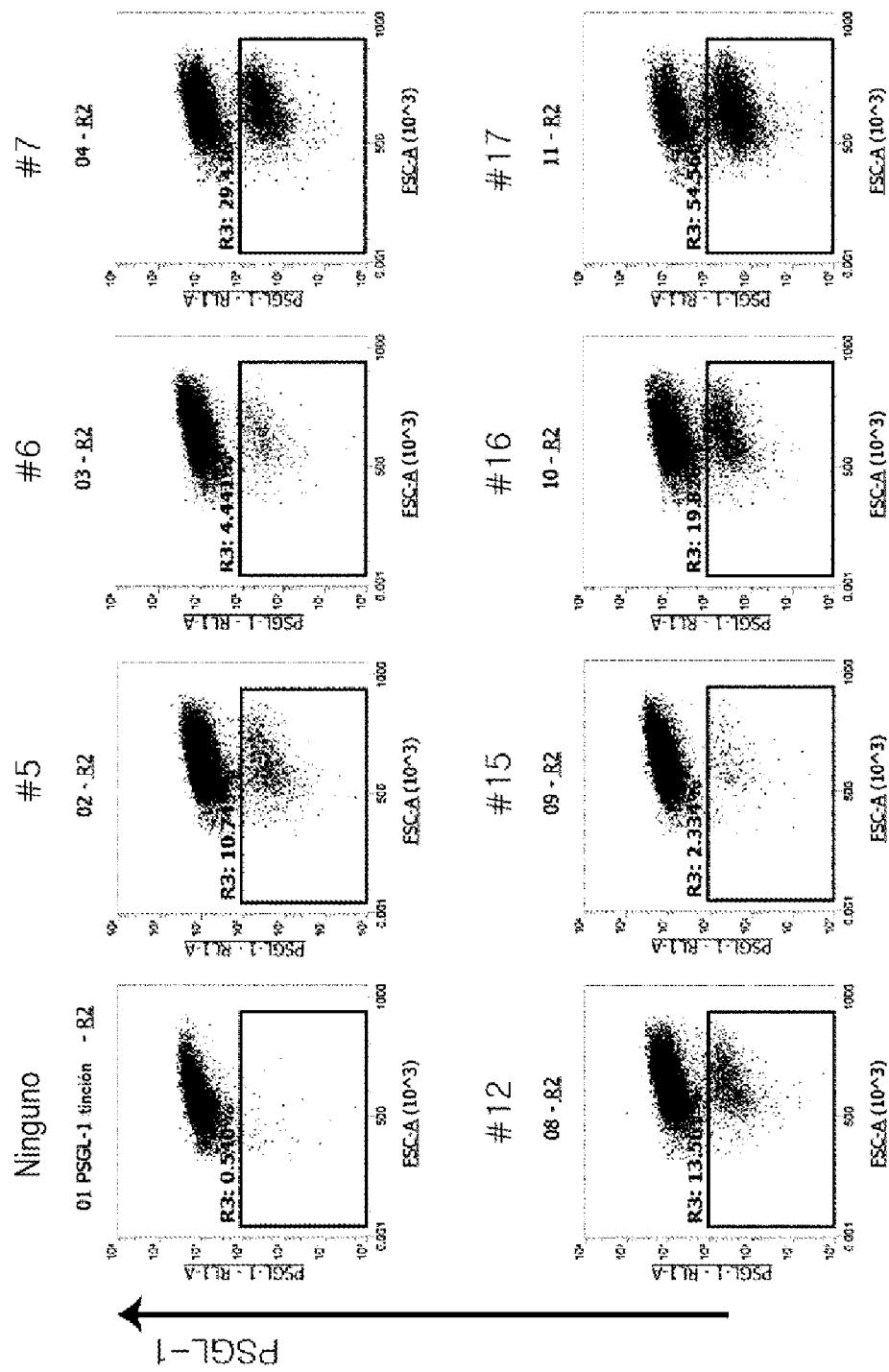
【FIG. 16】



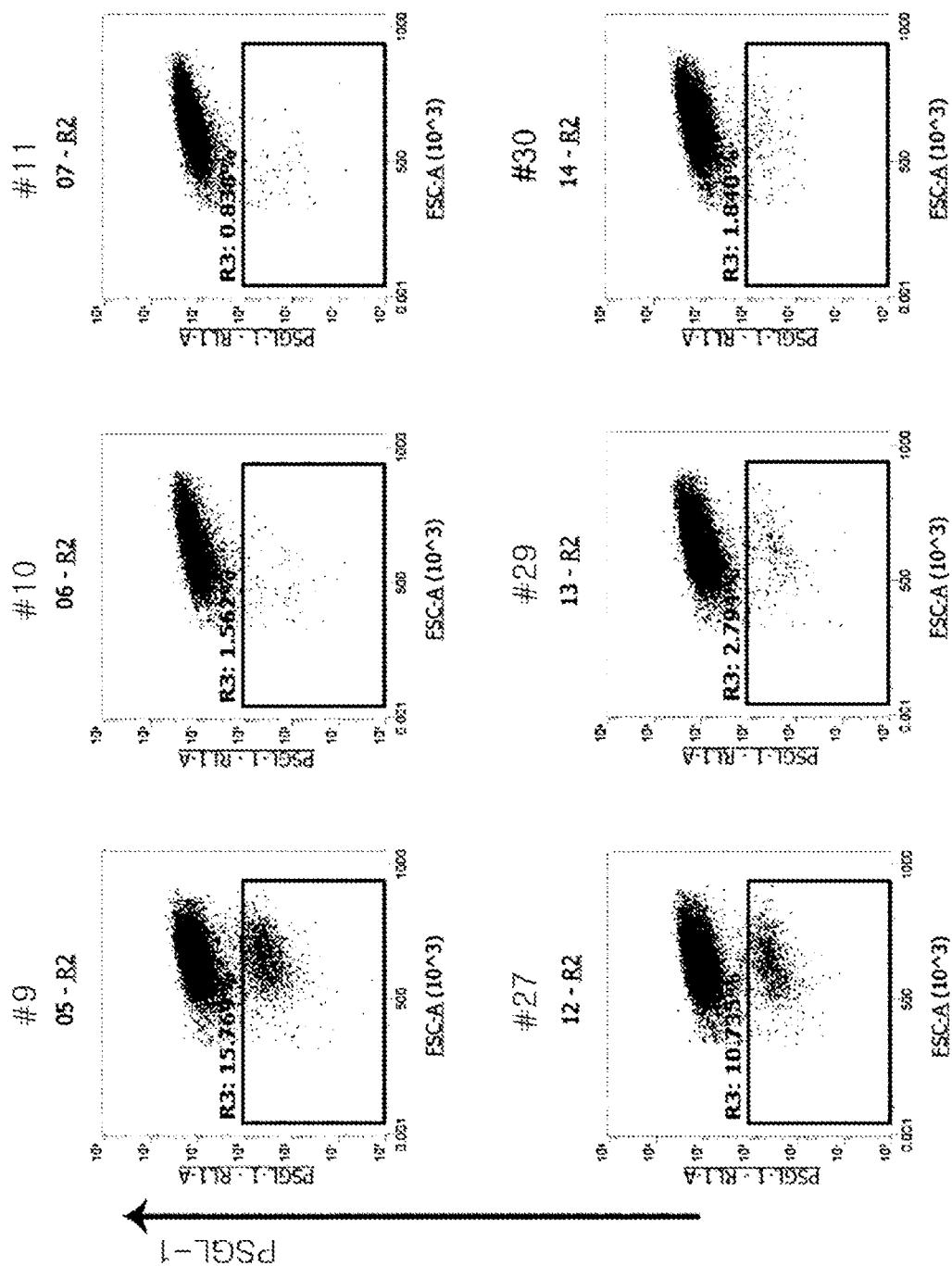
[FIG. 17a]



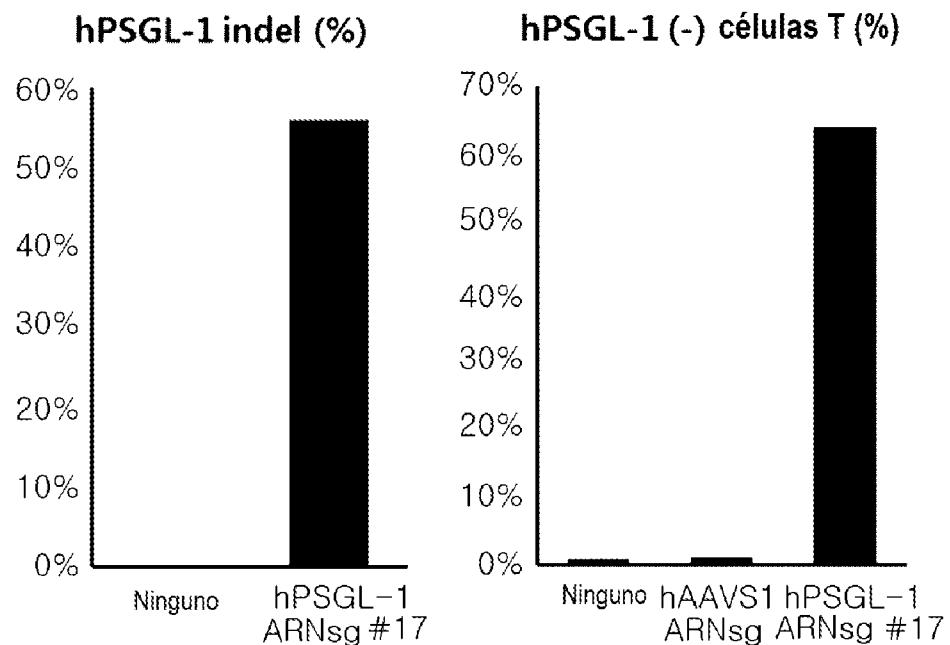
【FIG. 17b】



[FIG. 17c]



[FIG. 18]



(a)

(b)

