



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 959 815**

⑮ Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2016** PCT/US2016/052889
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2017** WO17053431
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2016** E 16849508 (3)
⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2023** EP 3353298

⑮ Título: **Edición génica selectiva de alelo y usos de la misma**

⑯ Prioridad:

21.09.2015 US 201562221407 P
02.05.2016 US 201662330827 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2024

⑯ Titular/es:

ARCTURUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
10628 Science Center Drive Suite 250
San Diego, CA 92121, US

⑯ Inventor/es:

CHIVUKULA, PADMANABH;
WILKIE-GRANTHAM, RACHEL y
TACHIKAWA, KIYOSHI

⑯ Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 959 815 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

Edición génica selectiva de alelo y usos de la misma

5 Campo técnico de la invención

Esta invención se refiere a los campos de productos biofarmacéuticos y terapéuticos para editar genes y regular la expresión génica. Más en particular, la presente invención se refiere a métodos y composiciones para editar o alterar un polinucleótido, incluyendo polinucleótidos genómicos y, en última instancia, para editar genes *in vivo* y modular, alterar, activar o reprimir la expresión génica.

Antecedentes de la invención

15 La edición génica que es específica para un sitio predeterminado se puede realizar con la nucleasa Cas9 guiada por diana y métodos de reparación de polinucleótidos. Usando la endonucleasa Cas9 guiada por diana, ambas cadenas de ADN bícatenario se pueden cortar cerca de un sitio diana para crear una rotura de doble cadena.

20 La especificidad de diana de Cas9 está determinada por una molécula guía, que forma un complejo de Cas9 con la diana polinucleotídica. Las secuencias diana polinucleotídicas, normalmente de 17-20 bases de longitud, deben estar flanqueadas por un motivo adyacente a protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés) en 3'. La estructura de PAM está determinada por la especie de bacteria de la que procede Cas9. Fortuitamente, se pueden encontrar secuencias diana adecuadas que contienen un PAM en la mayoría de los genes de interés en la mayoría de las especies. En una variación, la molécula guía se puede preparar como una única cadena de ARN que tiene una secuencia complementaria a la diana, que está unida a una secuencia de ARN crispr-tracr procedente de bacterias que forma complejos con Cas9.

25 En algunas modalidades, después de formar una rotura de doble cadena en el ADNbc en un sitio específico, la rotura se puede reparar para lograr la edición del ADN. Una rotura de doble cadena se puede reparar mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) para generar inserciones y eliminaciones aleatorias. Una rotura de doble cadena también se puede reparar mediante reparación dirigida por homología (HDR, por sus siglas en inglés) utilizando una plantilla de ADN exógena para generar inserciones, eliminaciones y sustituciones controladas.

30 Un inconveniente importante de la edición génica con Cas9 es que la molécula guía puede tener una eficacia limitada para un polinucleótido diana. La especificidad y actividad de una molécula guía pueden ser impredecibles. Las moléculas guía para la edición con Cas9 pueden variar ampliamente en eficacia, y algunas guías que de otro modo siguen el esquema estructural pueden resultar ineficaces.

35 Otro inconveniente de la edición génica con Cas9 es que la molécula guía puede carecer de selectividad para un alelo diana. Las variaciones en el genoma pueden contribuir a patologías. En genética médica se han identificado algunos alelos relacionados con fenotipos de enfermedad. La incapacidad de dirigirse a alelos concretos es un inconveniente importante de los métodos actuales de edición génica.

40 Otros inconvenientes de la edición génica con sistemas CRISPR-Cas incluyen la aparición de mutaciones inespecíficas.

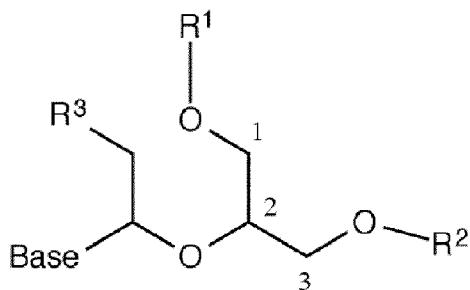
45 45 Lo que se necesita son moléculas guía estables y eficaces para la edición génica, así como composiciones y métodos para su uso en el tratamiento de enfermedades.

50 50 Existe una necesidad urgente de nuevas moléculas para guiar la edición génica con Cas9, y para la selectividad alélica y la reducción de actividad inespecífica.

55 El documento WO2015/048577 se refiere a métodos y componentes relacionados con CRISPR para editar o suministrar una carga útil a una secuencia de ácido nucleico diana.

55 Breve sumario

60 La presente invención proporciona un compuesto guía dirigido a un ADN genómico, que comprende una cadena guía diana de 14-24 monómeros contiguos unidos a un ARN CRISPR (ARNcr), en donde el compuesto guía dirige la edición génica con CRISPR selectiva de alelo del ADN genómico, en donde los monómeros comprenden monómeros UNA y monómeros de ácido nucleico, en donde cada monómero UNA tiene independientemente una estructura de



donde R¹ y R² son cada uno independientemente H o un enlace fosfodiéster, Base es una nucleobase y R³ es -OR⁴, -SR⁴, -NR⁴₂, -NH(C=O)R⁴, morfolino, morfolin-1-ilo, piperazin-1-ilo, o 4-alcanoil-piperazin-1-ilo, en donde cada R⁴ se

5 selección de forma independiente entre H, alquillo, un colesterol, una molécula lipídica, una poliamina, un aminoácido y un polipéptido, y en donde el compuesto guía comprende una secuencia de bases dirigida a dirigir la edición génica con CRISPR del ADN genómico. Las moléculas guía pueden ser muy eficaces para la edición génica con CRISPR. Las composiciones de la presente invención se pueden usar para la edición génica *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

10 Esta invención contempla además métodos *in vitro* para la edición génica con una enzima Cas guiada por nuevas moléculas guía selectivas de alelo. En algunas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención se pueden utilizar para realizar la edición génica con sistemas CRISPR-Cas con una aparición reducida de mutaciones inespecíficas.

15 Las moléculas guía de la presente invención pueden proporcionar una edición génica eficaz utilizando Cas9. Las moléculas guía de la presente invención pueden ser activas para la edición génica para seleccionar entre variaciones alélicas en función de uno o más polimorfismos de nucleótidos. Otras ventajas de las moléculas guía de esta divulgación incluyen efectos inespecíficos reducidos.

20 En algunas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención pueden presentar un nivel extraordinario y sorprendente de selectividad alélica para dirigirse al ADN genómico y generar roturas de doble cadena mediante la edición génica con CRISPR/Cas. En determinadas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención pueden proporcionar una actividad inespecífica reducida y una mayor eficiencia de la edición génica.

25 Los compuestos de la invención también se pueden usar en métodos para la edición génica con Cas guiada por moléculas guía, junto con la reparación génica mediante cualquier mecanismo, incluidos los mecanismos de reparación NHEJ y HDR.

30 Las moléculas guía de la presente invención pueden aumentar ventajosamente la eficiencia de la ingeniería génica dirigida por Cas.

En algunas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención pueden aumentar ventajosamente la eficiencia de la ingeniería génica dirigida por Cas9 y proporcionar una alta frecuencia de mutagénesis dirigida a través de NHEJ.

35 En realizaciones adicionales, las moléculas guía de la presente invención pueden aumentar ventajosamente la eficiencia de la ingeniería génica dirigida por Cas9 y proporcionar una integración exacta del ADN utilizando HDR para cualquier diana genómica.

40 En algunos aspectos, las moléculas guía de la presente invención pueden potenciar la unión de Cas9 y la escisión de ADN *in vivo*.

45 Esta invención proporciona además nuevas moléculas para su uso como agentes terapéuticos para diversas enfermedades y afecciones. Las moléculas de la presente invención se pueden usar como principios farmacéuticos activos en composiciones para su uso en mejorar, prevenir o tratar diversas enfermedades y afecciones.

50 En algunos aspectos, la presente invención proporciona moléculas guía que tienen estructuras que pueden incluir diversas combinaciones de grupos enlazadores, monómeros formadores de cadenas, nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados, o nucleótidos modificados químicamente, así como determinados nucleótidos naturales. Estas moléculas guía pueden presentar selectividad alélica para el direccionamiento al ADN genómico. Esta divulgación proporciona moléculas guía que se pueden utilizar para realizar la edición génica con CRISPR-Cas con mutaciones inespecíficas reducidas.

55 Las realizaciones de la presente invención se establecen en el conjunto de reivindicaciones adjunto e incluyen lo siguiente: El compuesto guía anterior, en donde la secuencia de bases de la cadena guía diana tiene hasta tres desemparejamientos del ADN genómico.

El compuesto guía anterior, en donde el compuesto guía contiene de uno a cinco monómeros UNA.

El compuesto guía anterior, en donde los monómeros de ácido nucleico se seleccionan de nucleótidos naturales, nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados, nucleótidos modificados químicamente y combinaciones de los mismos.

El compuesto guía anterior, en donde uno o más de los monómeros de ácido nucleico es un ribonucleótido de 2'-O-metilo, un nucleótido de 2'-O-metil purina, un ribonucleótido de 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido de 2'-desoxi-2'-fluoro, un ribonucleótido de 2'-desoxi, un nucleótido de 2'-desoxipurina, un nucleótido de base universal, un nucleótido de 5'-C-metilo, un resto de monómero desoxibásico invertido, un nucleótido estabilizado en el extremo 3', un nucleótido de 3'-glicerilo, un nucleótido abásico invertido en 3', una timidina invertida en 3', un nucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés), un nucleótido de 2'-O,4'-C-metileno-(D-ribofuranosilo), un nucleótido 2'-metoxietoxi (MOE), un nucleótido de 2'-metil-tio-etilo, 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido de 2'-O-metilo, un 2'-O-metoxietoxi restringido en 2',4' (cMOE), un 2'-O-etilo (cEt), un nucleótido de 2'-amino, un nucleótido de 2'-O-amino, un nucleótido de 2'-C-alilo, un nucleótido 2'-O-alilo, un nucleótido de N⁶-metiladenosina, un nucleótido con base 5-(3-amino)propiluridina modificada, un nucleótido con base 5-(2-mercaptopropil)uridina modificada, un nucleótido con base 5-bromouridina modificada, un nucleótido con base 8-bromoguanosina modificada, un nucleótido con base 7-deazaadenosina modificada, un nucleótido sustituido con 2'-O-aminopropilo, o un nucleótido con un grupo 2'-OH sustituido por un 2'-R, un 2'-OR, un 2'-halógeno, un 2'-SR, o un 2'-amino, donde R puede ser H, alquilo, alquenilo o alquinilo.

El compuesto guía anterior, en donde uno o más de los tres últimos monómeros en cada extremo del compuesto guía está conectado mediante un enlace fosforotioato, uno fosforotioato quiral o uno fosforoditioato.

El compuesto guía anterior, en donde el compuesto guía dirige roturas de doble cadena en un gen seleccionado de TTR, BIRCS, CDK16, STAT3, CFTR, F9, KRAS y CAR.

El compuesto guía anterior, en donde el ADN genómico contiene un polimorfismo de un solo nucleótido relacionado con la enfermedad diana.

El compuesto guía anterior, en donde el compuesto guía dirige roturas de doble cadena en un alelo relacionado con enfermedad.

El compuesto guía anterior, en donde el compuesto guía dirige roturas de doble cadena en un alelo relacionado con enfermedad seleccionado de V30M TTR, G284R ColA1, L132P Keratin12, R135T Keratin12, G85R SOD1, G272V Tau, P301L Tau, V337M Tau, R406W Tau, Q39STOP beta-globina, ADNmt T8993G/C, G719S EGFR y G12C Kras.

El compuesto guía anterior, que comprende 30-300 monómeros contiguos.

El compuesto guía anterior, en donde la edición génica con CRISPR utiliza Cas9.

El compuesto guía anterior, en donde el compuesto guía dirige la edición génica con una actividad inespecífica reducida.

El compuesto guía anterior, en donde el compuesto guía dirige más roturas de doble cadena en un alelo relacionado con enfermedad que en el mismo alelo natural.

Un compuesto guía anterior hibridado con un ARNtracr.

El compuesto guía anterior, en donde el ARNtracr procede de *S. pneumonia*, *S. pyogenes*, *N. meningitidis*, o *S. thermophiles*.

Un compuesto guía anterior hibridado con un ARNtracr y en forma de complejo con una proteína de edición génica asociada a CRISPR.

El compuesto guía anterior, en donde la proteína de edición génica asociada a CRISPR es Cas9.

Un compuesto guía dirigido a un ADN genómico, en donde el compuesto guía es una cadena de monómeros y dirige la edición génica con CRISPR del ADN genómico, comprendiendo el compuesto guía una cadena guía diana, un ARNcr CRISPR y un ARNtracr CRISPR como una cadena sencilla, en donde la cadena guía diana tiene una longitud de 14-24 monómeros contiguos, en donde los monómeros comprenden monómeros UNA y monómeros de ácido nucleico, y en donde el compuesto guía comprende una secuencia de bases dirigidas a la edición génica con CRISPR directa del ADN genómico.

El compuesto guía anterior, en donde el compuesto guía dirige la edición génica en un complejo CRISPR/Cas9.

Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos guía anteriores y un transportador farmacéuticamente aceptable. El transportador farmacéuticamente aceptable puede comprender un vector vírico o un vector no vírico. El transportador farmacéuticamente aceptable puede comprender liposomas.

5 Las realizaciones de la presente invención incluyen métodos *in vitro* para editar un ADN genómico en una célula, en donde la célula comprende una enzima de edición génica con CRISPR inducible o constitutiva, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una composición anterior.

10 El método anterior, en donde la edición altera el ADN o reprime la transcripción del ADN. El método anterior, en donde la edición se logra con una actividad inespecífica reducida. El método anterior, en donde la enzima de edición génica con CRISPR se cotransfecta con una composición anterior.

15 El compuesto guía anterior puede ser para su uso en un método para editar un ADN genómico en un sujeto *in vivo*, en donde el sujeto comprende una enzima de edición génica con CRISPR inducible o constitutiva, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición anterior. La edición puede alterar el ADN o reprimir la transcripción del ADN. La edición se puede conseguir con una actividad inespecífica reducida. La enzima de edición génica con CRISPR puede cotransfектarse con una composición anterior.

20 Esta invención contempla además una composición como se describe anteriormente para su uso en un método para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad asociada con un ADN genómico diana en un sujeto que lo necesita, en donde el sujeto comprende una enzima de edición génica con CRISPR inducible o constitutiva, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición anterior.

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1: La figura 1 ilustra un complejo de edición génica con CRISPR-Cas con una estructura de "guía sencilla".

Figura 2: La figura 2 ilustra un complejo de edición génica con CRISPR-Cas.

30 Figura 3: Edición génica selectiva de alelo de un sitio genómico de transtiretina (TTR) con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9. La figura 3 muestra que las moléculas guía-U UNA1 y UNA2 dirigieron la escisión de un ADN de TTR genómico de 357 pb en una posición predeterminada mostrada por la aparición de productos de 275 pb y 82 pb. Tal como se muestra en la figura 3, las moléculas guía-U de la presente invención presentaron una edición génica selectiva de alelo sorprendentemente alta de la V30M TTR humana con respecto a la TTR natural. Esto indica la capacidad de reducir la actividad inespecífica. Además, en las mismas condiciones, una guía comparativa (ARNg) CRISPR/Cas9 cr/tracr que tenía la misma secuencia de nucleobases y estructura que la molécula guía-U, pero que carecía de un monómero UNA, mostró cierta selectividad por la V30M TTR humana sobre la TTR natural.

40 Figura 4: La figura 4 muestra que las moléculas guía-U UNA1 y UNA2 de la presente invención proporcionaron edición selectiva de V30M TTR sobre TTR natural en un sistema CRISPR/Cas9. Las moléculas guía-U UNA1 y UNA2 produjeron altos niveles de roturas de doble cadena en V30M TTR (barra sombreada), pero sorprendentemente pocas roturas de doble cadena en TTR natural (barra negra). Por lo tanto, las moléculas guía-U UNA1 y UNA2 de la presente invención fueron extraordinariamente activas para la edición génica selectiva de alelo de TTR humana. Esto indica la capacidad de reducir la actividad inespecífica. El control negativo no contenía ninguna guía de CRISPR/tracr.

50 Figura 5: Las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de TTR humana. El sorprendente nivel de selectividad alélica para la edición génica de TTR humana se muestra en la figura 5. Las moléculas guía-U UNA1 y UNA2 proporcionaron altos índices de selectividad de 8,7 y 9,5, respectivamente. Esto indica la capacidad de reducir la actividad inespecífica. Además, en las mismas condiciones, una guía CRISPR/Cas9 cr/tracr (ARNg) que tiene la misma secuencia de nucleobases y estructura que las moléculas guía-U, pero que carece de monómero UNA, presentó una relación de selectividad de 1,4. Por lo tanto, las moléculas guía-U UNA1 y UNA2 fueron extraordinariamente activas para la edición génica de TTR humana con selectividad alélica de V30M TTR sobre TTR natural.

55 Figura 6: La figura 6 muestra el espectro de indel (inserción, eliminación) para una guía de ARNg comparativa (estructura de guía que no es UNA) para la evaluación de la edición del genoma de V30M TTR mediante descomposición de trazas de secuencia (TIDE, por sus siglas en inglés).

60 Figura 7: La figura 7 muestra el espectro de indel para guía-UNA (UNA1) para la evaluación de la edición del genoma de V30M TTR mediante descomposición de trazas de secuencia (TIDE).

65 Figura 8: La figura 8 muestra el espectro de indel para una guía de ARNg comparativa (estructura de guía que no es UNA) para la evaluación de la edición del genoma de TTR natural mediante descomposición de trazas de secuencia (TIDE).

Figura 9: La figura 9 muestra el espectro de indel para guía-UNA (UNA1) para la evaluación de la edición del genoma de TTR natural mediante descomposición de trazas de secuencia (TIDE).

5 Figura 10: Edición génica selectiva de alelo de un sitio genómico de transtiretina (TTR) con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9. La figura 10 muestra que una molécula guía-U UNA3 dirigió la escisión de un ADN de TTR genómico de 357 pb en una posición predeterminada mostrada por la aparición de productos de 271 pb y 86 pb. Tal como se muestra en la figura 10, la molécula guía-U de la presente invención mostró edición génica selectiva de alelo de V30M TTR humana sobre TTR natural. Esto indica la capacidad de reducir la actividad inespecífica. 10 Además, en las mismas condiciones, una guía CRISPR/Cas9 (ARNg) que tiene la misma secuencia de nucleobases y estructura que la molécula guía-U, pero que carece de monómero UNA, mostró cierta selectividad.

15 Figura 11: La figura 11 muestra que una molécula guía-U UNA3 de la presente invención proporcionó edición selectiva de V30M TTR sobre TTR natural en un sistema CRISPR/Cas9. La molécula guía-U UNA3 produjo altos niveles de roturas de doble cadena en V30M TTR (barra sombreada), pero sorprendentemente pocas roturas de doble cadena en TTR natural (barra negra). Por lo tanto, la molécula guía-U UNA3 de la presente invención fue extraordinariamente activa para la edición génica selectiva de alelo de TTR humana. Esto indica la capacidad de reducir la actividad inespecífica. El control negativo no contenía ninguna guía de CRISPR/tracr.

20 Figura 12: Las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de TTR humana. El sorprendente nivel de selectividad alélica para la edición génica de TTR humana se muestra en la figura 12. La molécula guía-U UNA3 proporcionó un alto índice de selectividad de 4,7. Esto indica la capacidad de reducir la actividad inespecífica. Además, en las mismas condiciones, una guía CRISPR/Cas9 (ARNg) que tiene la misma secuencia de nucleobases y estructura que la molécula guía-U, pero que carece de monómero UNA, 25 mostró un índice de selectividad de 1,3. Por lo tanto, la molécula guía-U UNA3 fue extraordinariamente activa para la edición génica de TTR humana con selectividad alélica de V30M TTR sobre TTR natural.

30 Figura 13: La figura 13 muestra una representación esquemática de la estructura de un receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés). ScFv es un fragmento variable de cadena sencilla. V_H es una región variable de cadena pesada. V_L es una región variable de cadena ligera. TM es un dominio transmembrana. SD es un dominio de señalización.

35 Figura 14: La figura 14 muestra un esquema de un método para introducir un gen de CAR en un gen CD2 constitutivo de un linfocito T, en donde el CAR está cadena abajo del CD2. Se realiza una rotura de doble cadena con una molécula guía-U de la presente invención. El gen insertado por recombinación homóloga puede estar compuesto por una sección de CD2, junto con P2A y la sección de CAR. El péptido P2A es un péptido autoescindible que se puede utilizar para generar dos productos genéticos separados, la proteína CD2 y la proteína CAR. El receptor de la proteína CAR puede llevar la especificidad de un mAb contra células cancerosas de un 40 sujeto en una estrategia de inmunoterapia adoptiva para destruir las células cancerosas del sujeto.

45 Figura 15: La figura 15 muestra un esquema de un método para introducir un gen de CAR en un gen CD2 constitutivo de un linfocito T, en donde el CAR está cadena arriba del CD2.

Descripción detallada

45 La presente invención proporciona una gama de nuevos agentes y composiciones para su uso en aplicaciones terapéuticas y de edición génica. Las moléculas de la presente invención se pueden usar como componentes guía para composiciones que aprovechan las modalidades de edición génica con CRISPR. Las moléculas y composiciones de la presente invención pueden usarse para mejorar, prevenir o tratar diversas enfermedades asociadas a genes y sus funcionalidades.

Las moléculas guía de la presente invención pueden proporcionar una edición génica eficaz utilizando Cas9 y otras enzimas de edición génica.

55 Las moléculas guía de la presente invención pueden ser activas para edición génica de genes humanos. Se puede unir o hibridar una molécula guía con un ARNtracr para proporcionar una molécula guía/tracr para la edición génica con CRISPR/Cas.

60 Las moléculas guía/tracr de la presente invención pueden suministrarse y transfecirse en células. *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo* para editar un ADN genómico.

Las moléculas guía de la presente invención pueden ser sorprendentemente activas para la edición génica de genes humanos con resultados selectivos de alelo.

65 En algunas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención muestran un nivel extraordinario y sorprendente de selectividad alélica para la edición génica y la generación de roturas de doble cadena en el ADN genómico. Esto

indica la capacidad para reducir ventajosamente la actividad inespecífica.

En algunos aspectos, la capacidad de crear roturas de doble cadena en el ADN genómico incluye la capacidad de alterar, modular o reducir la expresión del ADN en una célula.

- 5 Una célula puede ser una célula eucariota, una célula de mamífero o una célula humana.
- 10 Las moléculas guía de la presente invención se pueden utilizar para la edición génica selectiva de alelo de ADN genómico humano. Esta divulgación proporciona moléculas guía que se pueden utilizar para realizar la edición génica con CRISPR-Cas con mutaciones inespecíficas reducidas.
- 15 En determinadas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de un alelo variante humano sobre un alelo natural correspondiente con un efecto inespecífico reducido.
- 20 En determinadas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de un alelo variante de un gen humano sobre un alelo natural correspondiente, con una selectividad de al menos el 30 % medida por la eficiencia de edición.
- 25 En determinadas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de un alelo variante de un gen humano sobre un alelo natural correspondiente, con una relación de selectividad de al menos 2 medida por la eficiencia de edición.
- 30 En determinadas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de un alelo variante de un gen humano sobre un alelo natural correspondiente, con una relación de selectividad de al menos 3 medida por la eficiencia de edición.
- 35 En determinadas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de un alelo variante de un gen humano sobre un alelo natural correspondiente, con una relación de selectividad de al menos 5 medida por la eficiencia de edición.
- 40 En comparación, en las mismas condiciones, una guía CRISPR/Cas9 que tiene una relación de selectividad de 1 indica falta de selectividad.
- 45 En determinadas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de un alelo variante de un gen humano sobre un alelo natural correspondiente, esencialmente sin actividad inespecífica hacia el alelo natural.
- 50 En determinadas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de un alelo variante de un gen humano sobre un alelo natural correspondiente, con menos del 1 % de actividad inespecífica hacia el alelo natural.
- 55 Las propiedades de los compuestos guía de la presente invención surgen según su estructura molecular y la estructura de la molécula en su totalidad, en su conjunto, puede proporcionar beneficios significativos en función de esas propiedades. Las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar moléculas guía que tienen una o más propiedades que proporcionan ventajosamente una eficacia potenciada en la edición génica con Cas9, así como composiciones o formulaciones para agentes terapéuticos para diversas enfermedades y afecciones, que pueden proporcionar agentes clínicos.
- 60 En el presente documento se proporciona una amplia gama de nuevas moléculas guía, pudiendo incorporar cada una de ellas grupos enlazadores especializados. Los grupos enlazadores pueden estar unidos en una cadena en la molécula guía. Cada grupo enlazador también puede estar unido a una nucleobase.
- 65 En algunos aspectos, un grupo enlazador puede ser un monómero. Los monómeros se pueden unir para formar una

molécula de cadena. En una molécula de cadena de la presente invención, se puede unir un monómero de grupo enlazador en cualquier punto de la cadena.

5 En determinados aspectos, los monómeros del grupo enlazador pueden unirse en una molécula de cadena de la presente invención de modo que los monómeros del grupo enlazador residan cerca de los extremos de la cadena. Los extremos de la molécula de cadena pueden estar formados por monómeros del grupo enlazador.

Como se usa en el presente documento, una molécula de cadena también puede denominarse oligómero.

10 En aspectos adicionales, cada uno de los grupos enlazadores de una molécula de cadena puede estar unido a una nucleobase. La presencia de nucleobases en la molécula de cadena puede proporcionar una secuencia de nucleobases.

15 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona moléculas guía de oligómeros que tienen estructuras de cadena que incorporan nuevas combinaciones de los monómeros del grupo enlazador, junto con determinados nucleótidos naturales, o nucleótidos no naturales, o nucleótidos modificados, o nucleótidos modificados químicamente.

20 Las moléculas guía de oligómeros de la presente invención pueden presentar una secuencia de nucleobases que está dirigida a al menos una parte de un gen. En algunas realizaciones, un oligómero puede dirigirse a al menos una parte de un gen que está conservado o altamente conservado, entre una serie de variantes.

25 En algunos aspectos, la presente invención proporciona moléculas guía de oligómeros activos que corresponden a, o son complementarias, al menos a un fragmento de una molécula de ácido nucleico, y que proporcionan edición de al menos dicho un fragmento presente en una célula.

En algunas realizaciones, la célula puede ser una célula eucariota, una célula de mamífero o una célula humana.

30 Esta invención proporciona estructuras, métodos y composiciones para agentes guía oligoméricos que incorporan los monómeros del grupo enlazador. Las moléculas guía oligoméricas de la presente invención se pueden usar como agentes activos en formulaciones para agentes terapéuticos de edición génica.

35 Esta invención proporciona una variedad de moléculas guía que son útiles para proporcionar efectos terapéuticos debido a su actividad en la edición de un gen. Las moléculas guía de la presente invención están estructuradas para proporcionar actividad de edición génica *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Las moléculas guía de la presente invención se pueden utilizar en cualquier sistema CRISPR/Cas.

40 En determinadas realizaciones, una molécula guía activa puede estructurarse como un oligómero compuesto de monómeros. Las estructuras oligoméricas de la presente invención pueden contener uno o más monómeros del grupo enlazador, junto con determinados nucleótidos.

45 En algunos aspectos, la presente invención proporciona un sistema CRISPR/Cas que tiene una proteína Cas9 y una o más moléculas guía que se dirigen a un gen en una célula eucariota.

Una molécula guía de la presente invención puede tener una secuencia guía fusionada a una secuencia crispr-tracr.

50 En aspectos adicionales, el sistema CRISPR/Cas se puede utilizar para escindir una o ambas cadenas del ADN de la diana génica.

55 La enzima de edición génica con CRISPR, por ejemplo la proteína Cas9, puede proceder de *S. pneumonia*, *S. pyogenes* (por ejemplo, número de registro de UniProtKB Q99ZW2; CAS9_STRP1), *N. meningitidis* y *S. thermophilus*, entre otras especies.

60 Las realizaciones de la presente invención pueden incluir métodos para alterar, modular o reducir la expresión de un producto génico. En algunas realizaciones, una célula eucariota puede contener y expresar una molécula de ADN que tiene una secuencia diana, donde el ADN codifica el producto génico. La célula se puede transfectar con un sistema (Cas) asociado a CRISPR modificado por ingeniería genética, no natural, incluyendo una molécula guía inducible o constitutiva de la presente invención que se hibrida con la secuencia diana. El sistema (Cas) asociado a CRISPR puede incluir además una proteína Cas9 de tipo II inducible o constitutiva. El sistema (Cas) asociado a CRISPR puede incluir además una o más señales de localización nuclear. La molécula guía puede localizar la secuencia diana y dirigir

la proteína Cas para que escinda el ADN, y se puede alterar la expresión de un producto génico. La proteína Cas y la molécula guía no se encuentran juntas de forma natural.

En la técnica se conocen vectores para proporcionar la expresión de una o más secuencias en células de mamíferos.

5 Algunos ejemplos de proteína Cas incluyen Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 y Cas9.

Una proteína de edición génica asociada a CRISPR puede incluir una proteína Cas.

10 Un sistema de edición génica con CRISPR puede incluir polinucleótidos, transcritos y restos implicados en la expresión de o en la dirección de la actividad de genes que codifican una proteína (Cas) asociada a CRISPR, un ARNtracr y una cadena guía. Un sistema CRISPR puede proceder de un organismo particular que tenga un sistema CRISPR endógeno, tal como *Streptococcus pyogenes*. Un sistema de edición génica con CRISPR puede promover la formación de un complejo CRISPR en el sitio de una secuencia de ADN diana.

15 Una proteína Cas9 puede modificarse o mutarse, o puede ser un homólogo u ortólogo para mejorar la expresión en una célula eucariota. Una proteína Cas9 puede optimizarse con codones humanos. En algunas realizaciones, se pueden utilizar moléculas guía emparejadas para dirigirse a diferentes cadenas de un ADNbc con nicasas Cas9 emparejadas. La escisión de ambas cadenas de ADN mediante un par de nicasas Cas9 se puede utilizar para crear

20 una rotura de doble cadena específica de sitio, lo que puede disminuir los efectos inespecíficos sin perder eficiencia en la edición.

Una molécula guía de la presente invención contiene una cadena guía, que también puede denominarse cadena guía diana. La cadena guía puede estar compuesta por una cadena de monómeros, y cada uno de los monómeros puede tener una nucleobase unida. La cadena guía puede tener una secuencia de bases, que tiene suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica diana para hibridar con la secuencia diana. La cadena guía puede dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a la secuencia diana.

25 Una molécula guía de la presente invención puede contener una cadena guía que tiene una secuencia de bases con suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica diana para hibridar con la secuencia diana. La molécula guía puede contener además una porción CRISPR o ARNcr unido a la cadena guía, donde el ARNcr puede unirse a un ARNtracr y dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a la secuencia diana. Por lo tanto, la molécula guía puede ser una cadena guía unida a un ARNcr para formar la molécula guía.

30 35 En algunas realizaciones, la presente invención incluye realizaciones con "guía sencilla" en las que una cadena guía que tiene suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica diana para hibridar con la secuencia diana está unida a una secuencia de ARNcr, que además está unida a una secuencia de ARNtracr, para formar una "molécula guía sencilla", donde la molécula guía sencilla puede dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a la secuencia diana. En la figura 1 se muestra un ejemplo de una realización de "guía sencilla".

40 Una molécula guía de la presente invención, un ARNcr, una cadena guía o un ARNtracr puede contener uno o más nucleótidos no naturales, o nucleótidos modificados, o nucleótidos químicamente modificados.

45 En algunas realizaciones, una molécula guía puede tener de 20 a 120 bases de longitud, o más. En determinadas realizaciones, una molécula guía puede tener una longitud de 20 a 60 bases, o de 20 a 50 bases, o de 30 a 50 bases, o de 39 a 46 bases.

50 En determinadas realizaciones, una secuencia polinucleotídica diana puede tener 5-100 bases de longitud, o 5-50 bases, o 5-30 bases, o 5-25 bases, o 5-24 bases, o 5-23 bases, o 5-22 bases, o 5-21 bases, o 5-20 bases, o 5-19 bases, o 5-18 bases.

55 En determinadas realizaciones, una secuencia polinucleotídica diana puede tener una longitud de 18-30 bases, o de 18-24 bases, o de 18-22 bases.

60 65 En realizaciones adicionales, una secuencia polinucleotídica diana puede tener 16 bases de longitud, o 17 bases, o 18 bases, o 19 bases, o 20 bases, o 21 bases, o 22 bases, o 23 bases, o 24 bases, o 25 bases, o 26 bases, o 27 bases, o 28 bases, o 29 bases, o 30 bases, o 31 bases, o 32 bases, o 33 bases, o 34 bases, o 35 bases.

En realizaciones adicionales, una molécula guía sencilla puede tener de 40 a 200 bases de longitud, o más.

La propiedad de una secuencia guía para dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a una secuencia diana puede determinarse mediante cualquier ensayo conocido en la técnica.

Esta invención contempla además métodos para suministrar uno o más vectores, o uno o más transcritos de los mismos a una célula, así como las células y organismos producidos.

En algunas realizaciones, los componentes de un complejo CRISPR/Cas, incluyendo una molécula guía, se pueden suministrar a una célula, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Se pueden usar métodos de transferencia vírica y no vírica conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos en células de mamíferos. Los ácidos nucleicos pueden suministrarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable, o por ejemplo, encapsulados en un liposoma.

5 La secuencia diana puede ser cualquier secuencia polinucleotídica, endógena o exógena a la célula eucariota. El polinucleótido diana puede ser una secuencia codificante o no codificante. La secuencia diana puede asociarse con una secuencia PAM, como se conoce en la técnica.

10 La secuencia diana puede ser cualquier polinucleótido o gen asociado a enfermedad, tal como se ha establecido en la técnica.

Esta invención contempla además métodos y composiciones para reparar roturas en un polinucleótido o gen.

15 En algunas realizaciones, una rotura en un polinucleótido o gen se puede reparar mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) para generar inserciones y eliminaciones aleatorias. El método puede dar como resultado uno o más cambios en la estructura de una proteína expresada a partir de un gen diana reparado.

20 En realizaciones adicionales, una rotura en un polinucleótido o gen puede repararse mediante reparación dirigida por homología (HDR) utilizando una plantilla polinucleotídica exógena para generar inserciones, eliminaciones y sustituciones controladas. El método puede dar como resultado uno o más cambios en la estructura de una proteína expresada a partir de un gen diana reparado.

25 La reparación de una rotura en un polinucleótido o gen se puede realizar con un oligonucleótido monocatenario en sentido o antisentido, como plantilla de reparación, como se conoce en la técnica.

Realizaciones selectivas de alelo e inespecificidad reducida

30 Esta invención contempla además moléculas guía que son selectivas de alelo para la edición génica y para la generación de roturas de doble cadena en ADN genómico.

En algunos aspectos, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para la edición génica con actividad inespecífica reducida.

35 En aspectos adicionales, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para la edición génica de un alelo variante de un gen humano sobre un alelo natural correspondiente, esencialmente sin actividad inespecífica hacia el alelo natural.

40 En determinadas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de un alelo variante de un gen humano sobre un alelo natural correspondiente, con menos del 1 % de actividad inespecífica hacia el alelo natural.

45 En determinadas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de un alelo variante de un gen humano sobre un alelo natural correspondiente, con menos del 3 % de actividad inespecífica hacia el alelo natural.

50 Una molécula guía selectiva de alelo de la presente invención contiene una cadena guía. La cadena guía puede estar compuesta por una cadena de monómeros, y cada uno de los monómeros puede tener una nucleobase unida. La cadena guía puede tener una secuencia de bases, que tiene suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica diana para hibridar con la secuencia diana. La cadena guía puede dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a la secuencia diana.

55 Una molécula guía de la presente invención que tiene efectos inespecíficos reducidos puede contener una cadena guía. La cadena guía puede estar compuesta por una cadena de monómeros, y cada uno de los monómeros puede tener una nucleobase unida. La cadena guía puede tener una secuencia de bases, que tiene suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica diana para hibridar con la secuencia diana. La cadena guía puede dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a la secuencia diana.

60 Una molécula guía selectiva de alelo de la presente invención puede contener una cadena guía que tiene una secuencia de bases con suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica diana para hibridar con la secuencia diana. La molécula guía puede contener además una porción CRISPR o ARNcr unido a la cadena guía, donde el ARNcr puede unirse a un ARNtracr y dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a la secuencia diana. Por lo tanto, la molécula guía puede ser una cadena guía unida a un ARNcr para formar la molécula guía.

65 Una molécula guía de la presente invención que presenta efectos inespecíficos reducidos puede contener una cadena

guía que tiene una secuencia de bases con suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica diana para hibridar con la secuencia diana. La molécula guía puede contener además una porción CRISPR o ARNcr unido a la cadena guía, donde el ARNcr puede unirse a un ARNtracr y dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a la secuencia diana. Por lo tanto, la molécula guía puede ser una cadena guía unida a un ARNcr para formar la molécula guía.

5 En algunas realizaciones, la presente invención incluye realizaciones con "guía sencilla" selectiva de alelo en las que una cadena guía que tiene suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica diana para hibridar con la secuencia diana está unida a una secuencia de ARNcr, que además está unida a una secuencia de ARNtracr, para formar una "molécula guía sencilla", donde la molécula guía sencilla puede dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a la secuencia diana.

10 En la tabla 1 se muestran ejemplos de secuencias polinucleotídicas diana para moléculas guía de la presente invención. Las secuencias polinucleotídicas diana en la tabla 1 reflejan polimorfismos de un solo nucleótido en 15 determinados genes humanos, que están relacionados con enfermedades.

15 Tabla 1: Secuencias guía diana para polimorfismos de un solo nucleótido en genes humanos

SEQ ID NO:	Gen	Mutación	Cadena	Diana de 20 meros (5'-3')	PAM	Cas9
607	ColA1	G284R	(+)	aagggagaag <u>gccagagatcc</u> cc	NGG	<i>S. pyr</i>
608		G284R	(+)	<u>gccagagatcc</u> ttggaaagacc	NGG	<i>S. pyr</i>
609		G284R	(+)	<u>ccagagatcc</u> ttggaaagacc	NGG	<i>S. pyr</i>
610		G284R	(+)	<u>cagagatcc</u> ttggaaagacc	NGG	<i>S. pyr</i>
611		G284R	(-)	ctggctctccctctcc	NGG	<i>S. pyr</i>
612	Queratina 12	L132P	(+)	aaactatgcaaaat <u>c</u> taat	NNNNG ATT	<i>N. menigitidis</i>
613		R135T	(+)	tgata <u>cattagttcc</u> tacc	NGG	<i>S. pyr</i>
614	SOD1	G85R	(+)	<u>ggc</u> aatgtgactgtgacaaaga (24-meros)	NGG	<i>S. pyr</i>
615	Tau	G272V	(+)	gcaccagccgg <u>gat</u> ccggga	NGG o NGNG	<i>S. thermophilus</i>
616		G272V	(+)	tgaagc <u>accaggccgggagtc</u>	NGG	<i>S. pyr</i>
617		G272V	(+)	ctgaagc <u>accaggccgggagt</u>	NGG	<i>S. pyr</i>
618		G272V	(-)	<u>cgactccggctggtgctc</u>	NGG	<i>S. pyr</i>
619		G272V	(-)	gcac <u>ctcccgactccggc</u>	NGG o NGNG	<i>S. pyr o S. thermophilus</i>
620		G272V	(-)	at <u>ctgcaccccgactcc</u>	NGG	<i>S. pyr</i>
621		P301L	(+)	gataat <u>atcaa</u> acacgt <u>c</u> t	NGG o NGNG	<i>S. pyr o S. thermophilus</i>
622		P301L	(+)	aat <u>atcaa</u> acacgt <u>c</u> ctgg	NGG	<i>S. pyr</i>
623		V337M	(-)	act <u>tccatctggccac</u> ctcc	NGG	<i>S. pyr</i>
624		V337M	(-)	t <u>tc</u> catgtttact <u>ccatc</u>	NGG	<i>S. pyr</i>
625		V337M	(-)	<u>cat</u> ctggcc <u>accctccgtt</u> atg (24-meros)	NNGRR (R = A/G)	SaCas
626		R406W	(-)	gag <u>acattgt</u> gagat <u>gca</u>	NGG o NGNG	<i>S. pyr o S. thermophilus</i>
627	betaglobina	Q39STO P	(+)	tgg <u>tctacc</u> ttgg <u>accc</u> atg	NGG	<i>S. pyr</i>
628		Q39STO P	(+)	<u>t</u> c <u>agagg</u> ttct <u>tg</u> ag <u>gtcc</u> tt	NGG	<i>S. pyr</i>
629		Q39STO P	(+)	cc <u>tggaccc</u> tt <u>agagg</u> ttct	NNGRR	SaCas
630		Q39STO P	(-)	t <u>caaaga</u> ac <u>ctt</u> gg <u>tcca</u>	NGG	<i>S. pyr</i>
631		Q39STO P	(-)	caa <u>agaac</u> ct <u>t</u> gg <u>tcca</u>	NGG	<i>S. pyr</i>
632		Q39STO P	(-)	ct <u>caaaga</u> ac <u>ctt</u> gg <u>tcc</u>	NNGRR	SaCas
633	ADNmt	T8993G /C	(+)	agcggttaggc <u>gtacggcc</u> (c/g)	NGG	<i>S. pyr</i>

(continuación)

SEQ ID NO:	Gen	Mutación	Cadena	Diana de 20 meros (5'-3')	PAM	Cas9
634		T8993G /C	(+)	aggcgtacggcc(<u>c/g</u>)ggctat	NGG	<i>S. pyr</i>
635		T8993G /C	(+)	cgtacggcc(<u>c/g</u>)ggctattgg	NNGRR	SaCas
636		T8993G /C	(+)	cggcc(<u>c/g</u>)ggctattggta	NNGRR	SaCas
637	EGFR	G719S	(+)	aagatcaaagtgt <u>gag</u> tc	NGG o NGGNG	<i>S. pyro o S. thermophilus</i>
638		G719S	(+)	gtgct <u>gag</u> ctccgggtgcgtt	NGG	<i>S. pyr</i>
639		G719S	(+)	<u>gag</u> ctccgggtgcgttcggca	NGG o NGGNG	<i>S. pyro o S. thermophilus</i>
640		G719S	(-)	ag <u>ctc</u> agcac <u>tt</u> gtat <u>ctt</u>	NNGRR	SaCas
641	Kras	G12C		cttgtggtagttggag <u>ctg</u>	NGG	

En la Tabla 1, la posición de la mutación alélica de un solo nucleótido está subrayada.

5

Tabla 2: Números de registro para dianas génicas

Enfermedad	Gen	Número de registro NCBI	Mutación
Distrofia muscular congénita de Ullrich (DMCU)	COL6A1	NM_001848.2	G284R (GGA a AGA)
Distrofia corneal epitelial de Meesmann (DCEM)	KRT12	NM_000223.3	L132P (CTT a CCT) y/o R135T (AGA a ACA)
Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	SOD1	NM_000454.4	G85R (GGC a CGC)
Demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (DFTP-17)	Tau	NM_001123066.3	G272V (GGC a GTC), P301L (CCG a CTG), V37M (GTG a ATG) y/o R406W (CGG a TGG)
b-talasemia	HBB	NM_000518.4	Q39STOP (CAG a TAG)
Debilidad neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP)	MT-ATP6	NC_012920.1	T8993G/C
Cáncer resistente a gefitinib	EGFR	NM_005228.3	G719S

Esta invención contempla moléculas guía que son selectivas de alelo para edición génica y para generación de roturas de doble cadena en polimorfismos de un solo nucleótido relacionados con enfermedades en genes humanos.

10 Esta invención contempla además moléculas guía para edición génica y para generación de roturas de doble cadena en polimorfismos de un solo nucleótido relacionados con enfermedades en genes humanos con actividad inespecífica reducida.

15 Una molécula guía selectiva de alelo de la presente invención contiene una cadena guía. La cadena guía puede estar compuesta por una cadena de monómeros, y cada uno de los monómeros puede tener una nucleobase unida. La cadena guía puede tener una secuencia de bases, que tiene suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica diana que contiene un polimorfismo de un solo nucleótido para hibridar con la secuencia diana. La cadena guía puede dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a la secuencia diana.

20 Una molécula guía selectiva de alelo de la presente invención puede contener una cadena guía que tiene una secuencia de bases con suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica diana que contiene un polimorfismo de un solo nucleótido para hibridar con la secuencia diana. La molécula guía puede contener además una porción CRISPR o ARNcr unido a la cadena guía, donde el ARNcr puede unirse a un ARNtracr y dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a la secuencia diana. Por lo tanto, la molécula guía puede ser una cadena guía unida a un ARNcr para formar la molécula guía.

25 En algunas realizaciones, la presente invención incluye realizaciones con "guía sencilla" selectiva de alelo en las que una cadena guía que tiene suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica diana que contiene un polimorfismo de un solo nucleótido para hibridar con la secuencia diana está unida a una secuencia de ARNcr, que además está unida a una secuencia de ARNtracr, para formar una "molécula guía sencilla", donde la molécula guía sencilla puede dirigir la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a la secuencia diana.

Realizaciones con TTR

30 35 La amiloidosis relacionada con transtiretina (ATTR, por sus siglas en inglés) implica el depósito de proteínas de fibrillas

de amiloide en varios órganos y tejidos, incluyendo los sistemas nerviosos periférico, autónomo y central. La transtiretina (TTR) es una proteína de unión a hormona tiroidea secretada que se une y transporta proteína de unión a retinol y tiroxina sérica en plasma y líquido cefalorraquídeo.

- 5 La patología de ATTR puede incluir muchas mutaciones de TTR. Los síntomas de ATTR con frecuencia incluyen neuropatía y/o miocardiopatía. La neuropatía periférica puede comenzar en las extremidades inferiores, con neuropatía sensorial y motora, y puede progresar a las extremidades superiores. La neuropatía autónoma puede manifestarse por síntomas gastrointestinales e hipotensión ortostática.
- 10 Los pacientes con gen TTR Val-30-Met, la mutación más común, tienen ecocardiogramas normales. Sin embargo, es posible que tengan irregularidades en el sistema de conducción y necesiten un marcapasos. La variante V30M de ATTR puede causar debilidad en las extremidades inferiores, dolor y alteración de la sensación, así como disfunción autónoma. Los depósitos de amiloide vítreos y opacos pueden ser característicos de ATTR.
- 15 Las moléculas guía-U de la presente invención pueden ser activas para la edición génica de TTR humana. Se puede unir o hibridar una molécula guía-U con un ARNtracr para proporcionar una molécula de guía-U/tracr para la edición génica con CRISPR/Cas9.
- Las moléculas guía-U/tracr de la presente invención pueden suministrarse y transfecirse en células *in vitro*, *in vivo*, o 20 *ex vivo* para editar un ADN genómico.
- Las moléculas guía-U de la presente invención pueden ser sorprendentemente activas para la edición génica de TTR humana con resultados selectivos de alelo.
- 25 En algunas realizaciones, una molécula guía-U de la presente invención puede ser activa para la edición génica de TTR humana con actividad inespecífica reducida.
- En algunas realizaciones, las moléculas guía-U de la presente invención muestran un nivel extraordinario y sorprendente de selectividad alélica para generar roturas de doble cadena en V30M TTR sobre TTR natural.
- 30 30 Las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de TTR humana.
- 35 En realizaciones adicionales, las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de V30M TTR humana sobre TTR natural con una relación de selectividad de al menos 3.
- En realizaciones adicionales, las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de V30M TTR humana sobre TTR natural con una relación de selectividad de al menos 5.
- 40 40 En realizaciones adicionales, las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de V30M TTR humana sobre TTR natural con una relación de selectividad de al menos 8.
- Por comparación directa, en las mismas condiciones, una guía CRISPR/Cas9 que tiene la misma secuencia de nucleobases y estructura que la molécula guía-U, pero que carece de monómero UNA, puede tener una relación de 45 selectividad de aproximadamente 1, o menos de 2.
- En aspectos adicionales, las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica de V30M TTR humana sobre TTR natural, esencialmente sin actividad inespecífica hacia el alelo natural.
- 50 50 En determinadas realizaciones, las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica de V30M TTR humana sobre TTR natural, con menos del 1 % de actividad inespecífica hacia el alelo natural.
- En determinadas realizaciones, las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica de V30M TTR humana sobre TTR natural, con menos del 3 % de actividad inespecífica hacia el alelo natural.
- 55 Moléculas guía-U
- 60 Esta invención proporciona además moléculas guía-U que pueden ser muy eficaces para la edición génica con Cas9. Las composiciones y métodos de la presente invención se pueden usar para la edición génica con Cas9 *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.
- Esta invención contempla métodos *in vitro* para la edición génica con Cas9 guiados por nuevas moléculas guía-U.
- 65 Las moléculas guía-U de la presente invención pueden proporcionar una edición génica eficiente utilizando Cas9. Las moléculas guía-U de la presente invención pueden ser activas para la edición génica en un gen TTR. Las

moléculas guía-U de la presente invención pueden ser sorprendentemente activas para la edición génica de TTR humana con resultados selectivos de alelo y pueden presentar efectos inespecíficos reducidos.

5 En algunas realizaciones, las moléculas guía-U de la presente invención muestran un nivel extraordinario y sorprendente de selectividad alélica para generar roturas de doble cadena en V30M TTR sobre TTR natural, indicando efectos inespecíficos reducidos.

10 Esta invención contempla además métodos para la edición génica con Cas9 guiada por nuevas moléculas guía-U, junto con la reparación de genes mediante mecanismos de reparación NHEJ y HDR.

15 10 Las moléculas guía-U de la presente invención pueden aumentar ventajosamente la eficiencia de la ingeniería genética dirigida por Cas9.

15 15 En algunas realizaciones, las moléculas guía-U de la presente invención pueden aumentar ventajosamente la eficiencia de la ingeniería génica dirigida por Cas9 y proporcionar una alta frecuencia de mutagénesis dirigida a través de NHEJ.

20 20 En realizaciones adicionales, las moléculas guía-U de la presente invención pueden aumentar ventajosamente la eficiencia de la ingeniería génica dirigida por Cas9 y proporcionar una integración exacta del ADN utilizando HDR para cualquier diana genómica.

25 25 En algunos aspectos, las moléculas guía-U de la presente invención pueden potenciar la unión de Cas9 y la escisión de ADN *in vivo*.

30 30 En algunas realizaciones, las moléculas de la presente invención pueden usarse para mejorar y/o tratar amiloidosis y enfermedades relacionadas con amiloide, o la enfermedad de Alzheimer.

35 35 Las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar moléculas guía que proporcionan ventajosamente una edición génica eficaz con Cas9, así como composiciones o formulaciones para agentes terapéuticos, que pueden proporcionar agentes clínicos.

40 40 Las propiedades de las moléculas guía de la presente invención surgen según su estructura, y la estructura molecular en su totalidad, en su conjunto, puede proporcionar importantes beneficios y propiedades.

45 45 En algunas realizaciones, se proporciona una amplia gama de nuevas moléculas guía-U, que pueden incorporar uno o más grupos enlazadores. Los grupos enlazadores pueden estar unidos en una cadena en la molécula guía. Cada grupo enlazador también puede estar unido a una nucleobase.

50 50 En algunos aspectos, un grupo enlazador puede ser un monómero. Los monómeros se pueden unir para formar una molécula de cadena. En una molécula de cadena de la presente invención, se puede unir un monómero de grupo enlazador en cualquier punto de la cadena.

55 55 En determinados aspectos, los monómeros del grupo enlazador pueden unirse en una molécula de cadena de la presente invención de modo que los monómeros del grupo enlazador residan cerca de los extremos de la cadena. Los extremos de la molécula de cadena pueden estar formados por monómeros del grupo enlazador.

60 60 En aspectos adicionales, cada uno de los grupos enlazadores de una molécula de cadena puede estar unido a una nucleobase. La presencia de nucleobases en la molécula de cadena puede proporcionar una secuencia de nucleobases.

65 65 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona moléculas oligoméricas que tienen estructuras de cadena que incorporan nuevas combinaciones de los monómeros del grupo enlazador, junto con determinados nucleótidos naturales, o nucleótidos no naturales, o nucleótidos modificados, o nucleótidos modificados químicamente.

60 60 Las moléculas oligoméricas de la presente invención pueden presentar una secuencia de nucleobases que está dirigida a al menos una parte de un polinucleótido o genoma.

65 65 Esta invención proporciona estructuras, métodos y composiciones para agentes oligoméricos que incorporan los monómeros del grupo enlazador. Las moléculas oligoméricas de la presente invención se pueden usar como agentes activos en formulaciones para agentes terapéuticos de edición génica.

Modalidades de acción

Las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar una molécula guía activa, que se puede utilizar para alterar o editar un gen en una célula, modulando así la funcionalidad del gen, la expresión génica o los productos de expresión génica.

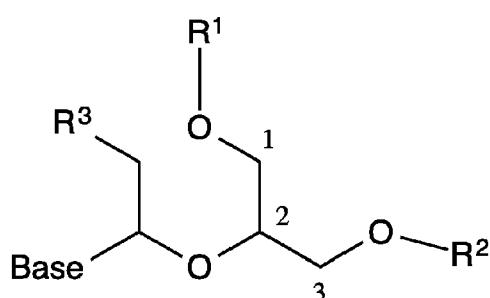
- 5 Esta invención puede proporcionar métodos sólidos y eficientes para la edición génica con una amplia gama de aplicaciones terapéuticas.
- 10 En general, el sistema CRISPR/Cas puede utilizar una molécula guía para reconocer una diana de ADN específica. La enzima Cas puede seleccionarse hacia una diana de ADN específica mediante la acción de la molécula guía. El sistema CRISPR/Cas se puede utilizar para la edición génica eficiente y eficaz utilizando moléculas guía de la presente invención.
- 15 En algunos aspectos, la presente invención proporciona métodos *in vitro* para alterar o modular la expresión de uno o más productos génicos.
- 20 Los métodos de la presente invención pueden utilizar un vector para introducir en una célula eucariota los componentes del sistema de edición génica con endonucleasa guiada CRISPR/Cas9 de tipo II. El vector puede tener una secuencia reguladora unida operativamente a una molécula guía que puede hibridar con una secuencia diana en un gen, y una secuencia reguladora adicional unida operativamente a una endonucleasa Cas9 de tipo II. La molécula guía puede seleccionar la proteína Cas9 para escindir la diana génica. En determinadas realizaciones, el vector puede incluir una señal de localización nuclear.
- 25 Alguna información sobre los vectores se proporciona en, por ejemplo, David V. Goeddel (Editor), *Methods in Enzymology*, Volumen 185: *Gene Expression Technology*, Academic Press, 1990.
- En algunas realizaciones, una molécula guía puede tener una secuencia guía unida a una secuencia crispr-tracr. La secuencia guía puede dirigirse para hibridar una diana génica y la secuencia crispr-tracr puede unirse a Cas9.
- 30 Sin desear quedar ligados a teoría particular alguna, se puede utilizar un sistema CRISPR procariota de tipo II y una proteína (Cas) asociada a CRISPR para la edición génica. En el procariota, el sistema funciona como un sistema de defensa inmunitaria. El gen CRISPR puede consistir en determinadas secuencias repetidas separadas por secuencias espaciadoras que pertenecen a genes extraños diana. Un transcrípto primario de CRISPR se puede procesar en ARN CRISPR (ARNcr). El ARNcr puede consistir en una secuencia repetida conservada y una secuencia o guía espaciadora
- 35 variable que es complementaria a la secuencia del gen diana. El ARN crispr transactivador (ARNtracr) puede ser una secuencia de ARN corta que es complementaria a la repetición CRISPR y sirve para procesar el ARNcr. El complejo formado por ARNcr, ARNtracr y Cas9 se une a una secuencia diana mediante emparejamiento de bases y causa escisión de ADN de doble cadena específica de secuencia.
- 40 En realizaciones adicionales, una molécula guía de la presente invención puede abarcar estructuras que incorporan secuencias relacionadas con ARNcr y ARNtracr.
- Un complejo CRISPR/Cas puede incluir una secuencia guía hibridada con una secuencia diana y formando complejo con una proteína Cas. El complejo CRISPR/Cas puede proporcionar la escisión de una o ambas cadenas de la secuencia diana, o a lo largo de unos pocos pares de bases de la secuencia diana o cerca de la secuencia diana.
- 45 Los componentes del complejo CRISPR/Cas, incluida la proteína Cas, la secuencia guía y la secuencia tracr pueden estar cada uno de ellos unidos operativamente a secuencias reguladoras separadas en vectores separados.
- 50 Los componentes del complejo CRISPR/Cas pueden expresarse a partir de secuencias reguladoras iguales o diferentes, y pueden combinarse en un único vector.
- Puede usarse un vector para proporcionar una o más secuencias guía.
- 55 Como se usa en el presente documento, el término "Cas" se refiere a cualquier proteína Cas conocida en la técnica que sea operable para la edición génica usando una molécula guía.
- En algunas realizaciones, se pueden usar una o más secuencias guía simultáneamente para edición génica.
- 60 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos y composiciones para inactivar genes, para amplificar genes, para reparar mutaciones asociadas con la inestabilidad genómica y para corregir defectos conocidos en un genoma.
- En algunas realizaciones, se puede disminuir la expresión de uno o más productos génicos del gen diana.
- 65 En determinadas realizaciones, se puede aumentar la expresión de uno o más productos génicos del gen diana.

En algunas modalidades, un sistema CRISPR/Cas puede utilizar una molécula guía de la presente invención para la interferencia genómica de CRISPR.

- 5 En determinados aspectos, un sistema CRISPR/Cas puede utilizar una molécula guía de la presente invención para reprimir la expresión génica. Se puede utilizar una proteína Cas9 catalíticamente inactiva para suprimir la expresión génica interfiriendo con la transcripción del gen. Una molécula guía de la presente invención puede dirigir Cas9 inactiva hacia una secuencia genómica, actuando como represor. La molécula guía puede coexpresarse.
- 10 En determinadas realizaciones, la unión de un dominio efector que tiene función reguladora a una Cas9 inactiva puede proporcionar una represión transcripcional estable y eficiente. La unión de un dominio represor o un dominio regulador transcripcionales que tiene función reguladora a una Cas9 inactiva puede suprimir la expresión de un gen endógeno diana.
- 15 En algunas realizaciones, una molécula guía de la presente invención puede ser relativamente corta, hasta 14 o 16 nt de longitud, para permitir que una Cas9 activa se una a secuencias diana específicas sin escindir el ADN, actuando por tanto como represor.
- 20 En aspectos adicionales, un sistema CRISPR/Cas puede utilizar una molécula guía de la presente invención para activar la expresión génica. Se puede unir un activador transcripcional a una Cas9 inactiva. El activador transcripcional puede aumentar la expresión génica, mientras que Cas9 inactiva se dirige con una molécula guía de la presente invención.

Monómeros UNA

- 25 Como se usan en el presente documento los nucleomonómeros desbloqueados (monómeros UNA), son pequeñas moléculas orgánicas basadas en una estructura de 1,2,3-tri-*il*-trisoxipropano como se muestra a continuación:

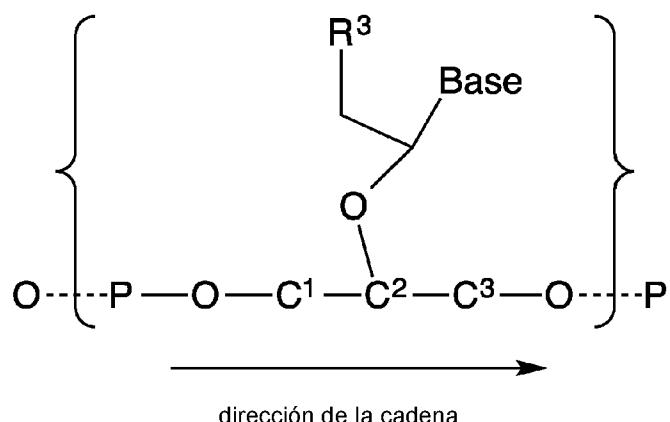


30 MONÓMERO UNA

donde R¹ y R² son cada uno independientemente H o un enlace fosfodiéster, Base es una nucleobase y R³ es un grupo funcional que se describe a continuación.

- 35 Desde otro punto de vista, los átomos principales del monómero UNA se pueden dibujar en notación IUPAC de la siguiente manera:

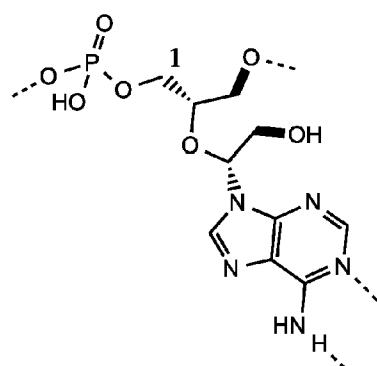
unidad de monómero UNA



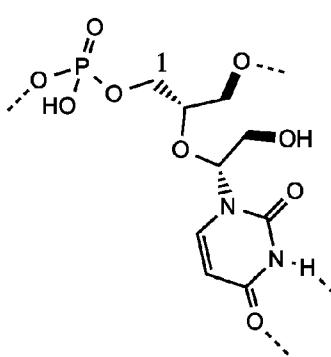
donde la dirección de progreso de la cadena oligomérica es desde el extremo 1 al extremo 3 del resto de propano.

Los ejemplos de nucleobase incluyen uracilo, timina, citosina, 5-metilcitosina, adenina, guanina, inosina y análogos de nucleobases naturales y no naturales.

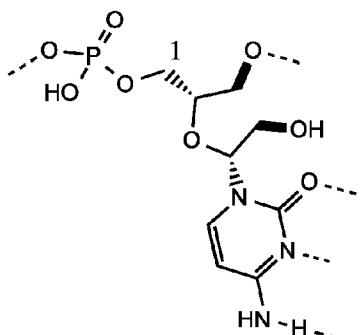
- 5 En general, debido a que los monómeros UNA no son nucleótidos, pueden presentar al menos cuatro formas en un oligómero. En primer lugar, un monómero UNA puede ser un monómero interno en un oligómero, donde el monómero UNA está flanqueado por otros monómeros en ambos lados. En esta forma, el monómero UNA puede participar en el emparejamiento de bases cuando el oligómero es una doble hélice, por ejemplo, y hay otros monómeros con nucleobases en la doble hélice.
- 10 Se muestran a continuación ejemplos de monómeros UNA como monómeros internos flanqueados tanto en la posición propano-1-ilo como en la posición propano-3-ilo, donde R³ es OH.



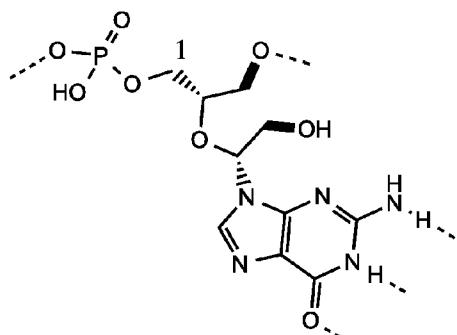
15 UNA-A



UNA-U



UNA-C

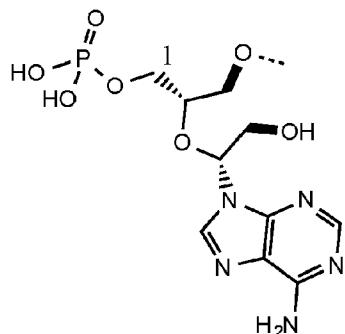


UNA-G

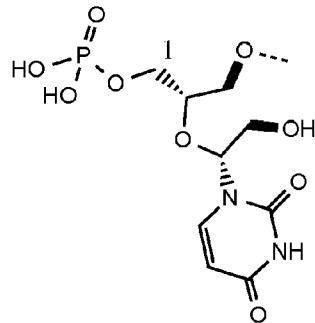
- 20 En segundo lugar, un monómero UNA puede ser un monómero en un saliente de una doble hélice oligomérica, donde el monómero UNA está flanqueado por otros monómeros en ambos lados. En esta forma, el monómero UNA no participa en el emparejamiento de bases. Debido a que los monómeros UNA son estructuras orgánicas flexibles, a diferencia de los nucleótidos, el saliente que contiene un monómero UNA será un terminador flexible para el oligómero.

- 25 Un monómero UNA puede ser un monómero terminal en un saliente de un oligómero, donde el monómero UNA está unido a un solo monómero en la posición propano-1-ilo o en la posición propano-3-ilo. En esta forma, el monómero UNA no participa en el emparejamiento de bases. Debido a que los monómeros UNA son estructuras orgánicas flexibles, a diferencia de los nucleótidos, el saliente que contiene un monómero UNA puede ser un terminador flexible para el oligómero.
- 30

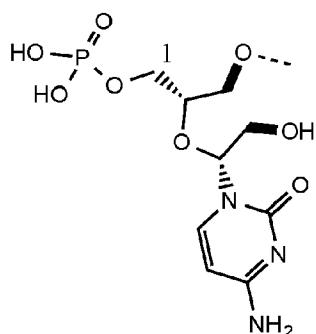
A continuación se muestran ejemplos de un monómero UNA como monómero terminal unido en la posición propano-3-ilo.



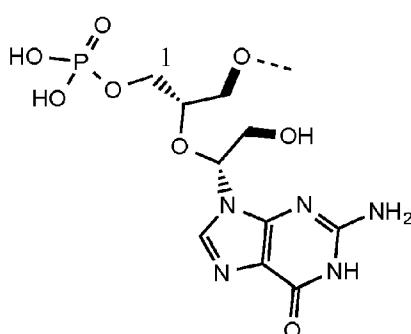
UNA-A terminal



UNA-U terminal



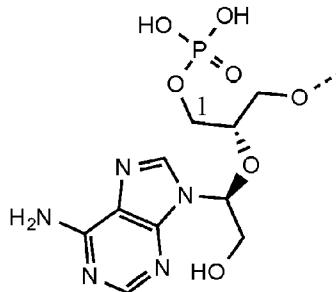
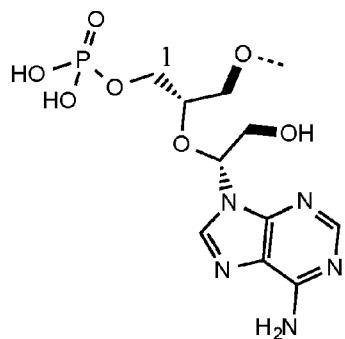
UNA-C terminal



UNA-G terminal

Debido a que un monómero UNA puede ser una molécula flexible, un monómero UNA como monómero terminal puede adoptar conformaciones muy diferentes. A continuación se muestra un ejemplo de una conformación de monómero UNA con energía minimizada como monómero terminal unido en la posición propano-3-ilo.

10



Formas terminales de UNA-A: el enlace discontinuo muestra la unión de propano-3-ilo

Por lo tanto, los oligómeros UNA que tienen un monómero UNA terminal tienen una estructura significativamente 15 diferente a la de los agentes de ácido nucleico convencionales. En cambio, la conformabilidad de un monómero UNA terminal puede proporcionar oligómeros UNA con diferentes propiedades.

Entre otras cosas, la estructura del monómero UNA le permite unirse a nucleótidos naturales. Un oligómero UNA 20 puede ser una cadena compuesta de monómeros UNA, así como diversos nucleótidos que pueden estar basados en nucleósidos naturales.

El grupo funcional R^3 de un monómero UNA como se usa en el presente documento es $-OR^4-SR^4$, $-NR^4_2$, $-NH(C=O)R^4$, morfolino, morfolin-1-ilo, piperazin-1-ilo, o 4-alcanoil-piperazin-1-ilo, donde R^4 es igual o diferente para cada aparición, y se selecciona de H, alquilo, un colesterol, una molécula lipídica, una poliamina, un aminoácido o un polipéptido.

25 Los monómeros UNA son moléculas orgánicas. Los monómeros UNA no son monómeros de ácidos nucleicos ni nucleótidos, ni son nucleósidos naturales o nucleósidos naturales modificados.

Un oligómero UNA de la presente invención es una molécula de cadena sintética. Un oligómero UNA de la presente

invención no es un ácido nucleico, ni un oligonucleótido.

En algunas realizaciones, como se ha mostrado anteriormente, un monómero UNA puede ser UNA-A (denominado A), UNA-U (denominado U), UNA-C (denominado C) y UNA-G (denominado G).

5 Las denominaciones que pueden usarse en el presente documento incluyen mA, mG, mC y mU, que se refieren a los ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo.

10 Las denominaciones que pueden usarse en el presente documento incluyen minúsculas c y u, que se refieren a los ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo.

Las denominaciones que pueden usarse en el presente documento incluyen dT, que se refiere a un nucleótido 2'-desoxi T.

15 Monómeros adicionales para compuestos quía

Como se usa en el presente documento, en el contexto de secuencias oligoméricas, el símbolo X representa un monómero UNA.

20 Como se usa en el presente documento, en el contexto de secuencias oligoméricas, el símbolo N representa cualquier monómero de nucleótido natural o un monómero de nucleótido modificado.

Como se usa en el presente documento, en el contexto de secuencias oligoméricas, el símbolo Q representa un monómero de nucleótido no natural, modificado o químicamente modificado.

25 Cuando aparece un monómero Q en una cadena de una doble hélice y no está emparejado con la otra cadena, el monómero puede tener cualquier base unida. Cuando un monómero Q aparece en una cadena de una doble hélice y se empareja con un monómero en la otra cadena, el monómero Q puede tener cualquier base unida que sea complementaria al monómero en la posición emparejada correspondiente en la otra cadena.

30 Los ejemplos de monómeros de ácidos nucleicos incluyen nucleótidos no naturales, modificados y químicamente modificados, incluyendo cualquiera de dichos nucleótidos conocidos en la técnica.

35 Los ejemplos de monómeros de nucleótidos no naturales, modificados y químicamente modificados incluyen cualquiera de dichos nucleótidos conocidos en la técnica, por ejemplo, ribonucleótidos de 2'-O-metilo, nucleótidos de 2'-O-metil purina, ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro, nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoropirimidina, ribonucleótidos de 2'-desoxi, nucleótidos de 2'-desoxipurina, nucleótidos de base universal, nucleótidos de 5-C-metilo y restos de monómeros desoxiabásicos invertidos.

40 Los ejemplos de monómeros de nucleótidos no naturales, modificados y químicamente modificados incluyen nucleótidos estabilizados en el extremo 3', nucleótidos de 3'-glicerilo, nucleótidos abásicos invertidos en 3' y timidina invertida en 3'.

45 Los ejemplos de monómeros de nucleótidos no naturales, modificados y químicamente modificados incluyen nucleótidos de ácido nucleico bloqueados (LNA), nucleótidos de 2'-O,4'-C-metilen-(D-ribofuranosil), nucleótidos de 2'-metoxietoxi (MOE), nucleótidos de 2'-metil-tio-etilo, 2'-desoxi-2'-fluoro y nucleótidos de 2'-O-metilo.

50 Los ejemplos de monómeros de nucleótidos no naturales, modificados y químicamente modificados incluyen ADN modificados con 2'-O-metoxietilo (cMOE) y 2'-O-etilo (cEt) restringidos en 2',4'.

55 Los ejemplos de monómeros de nucleótidos no naturales, modificados y químicamente modificados incluyen nucleótidos de 2'-amino, nucleótidos de 2'-O-amino, nucleótidos de 2'-C-alilo y nucleótidos de 2'-O-alilo.

60 Los ejemplos de monómeros de nucleótidos no naturales, modificados y químicamente modificados incluyen nucleótidos de N⁶-metiladenosina.

Los ejemplos de monómeros de nucleótidos no naturales, modificados y químicamente modificados incluyen monómeros de nucleótidos con bases modificadas 5-(3-amino)propiluridina, 5-(2-mercaptop)etiluridina, 5-bromouridina; 8-bromoguanosina o 7-deazaadenosina.

65 Los ejemplos de monómeros de nucleótidos no naturales, modificados y químicamente modificados incluyen nucleótidos sustituidos con 2'-O-aminopropilo.

Los monómeros de nucleótidos no naturales, modificados y químicamente modificados incluyen reemplazar el grupo 2'-OH de un nucleótido con un 2'-R, un 2'-OR, un 2'-halógeno, un 2'-SR, o un 2'-amino, donde R puede ser H, alquilo, alquenilo o alquinilo.

Una molécula guía de la presente invención, un ARNcr, una cadena guía, o un ARNtracr pueden contener uno o más de los nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados, o nucleótidos químicamente modificados mostrados anteriormente.

5 En algunos aspectos, un compuesto guía de la presente invención puede describirse mediante una secuencia de bases unidas y siendo formas sustituidas o modificadas de la misma. Como se usa en el presente documento, las formas sustituidas o modificadas incluyen monómeros UNA sustituidos de forma diferente, así como monómeros de 10 ácidos nucleicos modificados o sustituidos de forma diferente, como se describe con más detalle en el presente documento.

Algunos ejemplos de nucleótidos modificados se dan en Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, 1984.

15 Compuestos guía-U compuestos de monómeros UNA

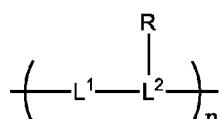
Aspectos de la presente invención pueden proporcionar estructuras y composiciones para moléculas guía-U para edición génica que son compuestos oligoméricos que contienen monómeros UNA.

20 Los agentes oligoméricos guía-U pueden incorporar uno o más monómeros UNA. Las moléculas oligoméricas de la presente invención se pueden usar como agentes activos en formulaciones para agentes terapéuticos de edición génica.

25 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos oligoméricos guía-U que tienen una estructura que incorpora nuevas combinaciones de monómeros UNA con determinados nucleótidos naturales, nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados o nucleótidos modificados químicamente.

30 En aspectos adicionales, los compuestos oligoméricos guía-U de la presente invención pueden ser moléculas farmacológicamente activas. Se puede utilizar una guía-U de la presente invención como principio farmacéutico activo para la edición génica.

Una molécula guía-U de la presente invención puede tener la estructura de Fórmula I



Fórmula I

35 en donde L^1 es un enlace, n es de 39 a 46, y para cada aparición L^2 es un grupo enlazador UNA que tiene la fórmula $-\text{C}^1\text{---C}^2\text{---C}^3-$, donde R está unido a C^2 y tiene la fórmula $-\text{OCH}(\text{CH}_2\text{R}^3)\text{R}^5$, donde R^3 es $-\text{OR}^4$, $-\text{SR}^4$, $-\text{NR}^4_2$, $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{R}^4$, morfolino, morfolin-1-ilo, piperazin-1-ilo, o 4-alcanoil-piperazin-1-ilo, donde R^4 es igual o diferente para cada aparición y es H, alquilo, un colesterol, una molécula lipídica, una poliamina, un aminoácido o un polipéptido, y donde R^5 es una nucleobase, o $\text{L}^2(\text{R})$ es un azúcar tal como una ribosa y R es una nucleobase, o L^2 es un azúcar modificado tal como una ribosa modificada y R es una nucleobase. En determinadas realizaciones, el alquilo es metilo, etilo, propilo o isopropilo. En determinadas realizaciones, una nucleobase puede ser una nucleobase modificada. L^1 puede ser un enlace fosfodiéster. En realizaciones adicionales, $-\text{OCH}(\text{CH}_2\text{R}^3)\text{R}^5$ puede ser $-\text{SCH}(\text{CH}_2\text{R}^3)\text{R}^5$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{R}^3)\text{R}^5$, más o $-(\text{SO}_2)\text{CH}(\text{CH}_2\text{R}^3)\text{R}^5$.

45 Una molécula guía-U de la presente invención puede tener una secuencia guía que es complementaria a una secuencia diana de un genoma, donde pueden aparecer hasta tres desemparejamientos.

50 La diana de una molécula guía-U puede ser un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la diana puede ser cualquier ADN genómico de un sujeto. Una molécula guía-U puede estar activa para la edición génica con un sistema CRISPR/Cas9.

55 En algunos aspectos, una molécula guía-U de la presente invención puede tener cualquier número de enlaces intermonómeros de fosforotioato en cualquier posición en cualquier cadena.

En algunas realizaciones, uno cualquiera o más de los enlaces intermonómeros de una molécula guía-U puede ser un enlace fosfodiéster, un fosforotioato que incluye ditioatos, un fosforotioato quiral y otras formas químicamente modificadas.

60 Por ejemplo, el símbolo "N" puede representar cualquier nucleótido que sea complementario al monómero en la diana.

El símbolo "X" en una cadena u oligómero representa un monómero UNA. Cuando un monómero UNA aparece en

una cadena de una molécula guía-U y se empareja con un diana, el monómero UNA puede tener cualquier base unida que sea complementaria al monómero en la cadena diana.

- 5 Cuando una molécula guía-U termina en un monómero UNA, la posición terminal tiene un extremo 1, o la posición terminal tiene un extremo 3, según la numeración posicional que se muestra anteriormente. Por ejemplo, la molécula guía-U SEQ ID NO:1 1-ÜGCACGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜÜ-3 tiene un monómero UNA-U en el extremo 1 a la izquierda y un monómero UNA-U en el extremo 3 a la derecha.
- 10 En algunas realizaciones, una molécula guía-U de la presente invención puede tener uno o más monómeros UNA en el extremo 1 de la cadena, y uno o más monómeros UNA en el extremo 3 de la cadena.
- En determinadas realizaciones, una molécula guía-U de la presente invención puede tener una longitud de 39-46 monómeros.
- 15 Una molécula guía-U de la presente invención para editar un gen puede tener una cadena con una longitud de 39-46 monómeros, donde los monómeros pueden ser monómeros UNA y monómeros de ácido nucleico.
- Una molécula guía-U puede dirigirse a un gen diana y puede presentar efectos inespecíficos reducidos en comparación con los ARN guía convencionales para la edición génica con CRISP/Cas9.
- 20 20 Los sitios inespecíficos, en función de la homología de secuencia con la diana, se pueden determinar construyendo un plásmido informador replicado episómicamente con la secuencia diana o inespecífica. El indicador puede cotransfектarse con las moléculas guía-U en células de mamíferos. Los plásmidos pueden aislarse para realizar un ensayo de endonucleasa I T7. Como alternativa, la secuenciación de sitios inespecíficos se puede realizar con PCR utilizando un conjunto de cebadores que flanquean el posible lugar inespecífico.
- Una molécula guía-U puede dirigirse a un gen diana y puede presentar una mayor eficiencia en la edición génica en comparación con los ARN guía convencionales para la edición génica con CRISP/Cas9.
- 30 30 Con una molécula guía-U de la presente invención, la tasa promedio de mutación de una diana genómica puede ser al menos un 10 %, o al menos un 15 %, o al menos un 20 %, o al menos un 25 %, o al menos un 30 %, o al menos un 40 %, o al menos un 50 %, o al menos un 60 %, o al menos un 70 %, o al menos un 80 %, o al menos un 90 %.
- 35 Una molécula guía-U de esta divulgación puede comprender nucleótidos de ácido nucleico naturales y modificaciones de los mismos que son compatibles con la actividad de edición génica.
- Como se usa en el presente documento, el término cadena se refiere a una cadena sencilla de monómeros contigua, teniendo la cadena cualquier número de monómeros internos y dos monómeros terminales, donde cada monómero terminal está unido a un monómero interno en un lado y no está unido a un monómero en el otro lado, para que termine la cadena.
- 40 Los monómeros de una molécula guía-U pueden unirse mediante enlaces fosfodiéster, enlaces fosforotioato, enlaces con huecos y otras variaciones.
- 45 En algunas realizaciones, una molécula guía-U puede incluir desemparejamientos en complementariedad entre la secuencia guía y la secuencia diana. En realizaciones adicionales, una molécula guía-U puede tener 1, 2 o 3 desemparejamientos con la diana.
- 50 La diana de una molécula guía-U puede ser un ácido nucleico diana de un gen diana.
- 55 En determinadas realizaciones, una molécula guía-U puede ser una cadena sencilla que se pliega sobre sí misma e hibrida consigo misma para formar una región bicatenaria que tiene un bucle enlazador en un extremo.
- En algunas realizaciones, una molécula guía-U de la presente invención puede tener una cadena con una longitud de 39-46 monómeros, donde cualquier monómero que no sea un monómero UNA puede ser un monómero Q.
- 60 En algunas realizaciones, una molécula guía-U de la presente invención puede tener una cadena con una longitud de 39-46 monómeros, donde cualquier monómero que no sea un monómero UNA puede ser un monómero Q, y donde el número de monómeros Q es inferior a veinte.
- En algunas realizaciones, una molécula guía-U de la presente invención puede tener una cadena con una longitud de 39-46 monómeros, donde cualquier monómero que no sea un monómero UNA puede ser un monómero Q, y donde el número de monómeros Q es inferior a doce.
- 65 En algunas realizaciones, una molécula guía-U de la presente invención puede tener una cadena con una longitud de 39-46 monómeros, donde cualquier monómero que no sea un monómero UNA puede ser un monómero Q, y donde el

número de monómeros Q es inferior a diez.

En algunas realizaciones, una molécula guía-U de la presente invención puede tener una cadena con una longitud de 39-46 monómeros, donde cualquier monómero que no sea un monómero UNA puede ser un ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo.

Edición génica

En algunas realizaciones, las moléculas guía de la presente invención se pueden usar para editar cualquier porción diana de un gen TTR, cuando la diana está flanqueada por un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) en 3'.

Ejemplos de genes y/o polinucleótidos que pueden editarse con las moléculas guía de la presente invención incluyen TTR, que puede estar relacionado con neuropatía amiloide y amiloidosis.

En determinadas realizaciones, los compuestos guía de la invención son para su uso en métodos para prevenir, tratar o mejorar la amiloidosis hereditaria relacionada con transtiretina.

Composiciones farmacéuticas

En algunos aspectos, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto oligomérico y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéutica puede ser susceptible de administración local o sistémica. En algunos aspectos, una composición farmacéutica puede ser susceptible de cualquier modalidad de administración. En determinados aspectos, la administración puede ser administración intravenosa, subcutánea, pulmonar, intramuscular, intraperitoneal, dérmica, oral o nasal.

Las realizaciones de la presente invención incluyen composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto oligomérico en una formulación lipídica.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede comprender uno o más lípidos seleccionados entre lípidos catiónicos, lípidos aniónicos, esteroles, lípidos pegilados, y cualquier combinación de los anteriores.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica puede estar sustancialmente exenta de liposomas.

En realizaciones adicionales, una composición farmacéutica puede incluir liposomas o nanopartículas.

En el documento WO/2015/074085 se proporcionan algunos ejemplos de lípidos y composiciones lipídicas para el suministro de una molécula activa de la presente invención.

En realizaciones adicionales, una composición farmacéutica puede contener un compuesto oligomérico dentro de un vector vírico o bacteriano.

Una composición farmacéutica de la presente divulgación puede incluir transportadores, diluyentes o excipientes como se conoce en la técnica. Se describen ejemplos de composiciones farmacéuticas, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro ed. 1985).

Ejemplos de excipientes para una composición farmacéutica incluyen antioxidantes, agentes de suspensión, agentes dispersantes, conservantes, agentes tamponantes, agentes de tonicidad y tensioactivos.

Una dosis eficaz de un agente o formulación farmacéutica de la presente invención puede ser una cantidad que sea suficiente para provocar la edición génica *in vivo*.

Una dosis eficaz de un agente o formulación farmacéutica de la presente invención puede ser una cantidad que sea suficiente para provocar una tasa promedio de mutación de una diana genómica. *in vivo* de al menos el 10 %, o al menos el 15 %, o al menos el 20 %, o al menos el 25 %, o al menos el 30 %, o al menos el 40 %, o al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos al menos el 70 %, o al menos el 80 %, o al menos el 90 %.

Una dosis terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad de un agente o formulación que sea suficiente para provocar un efecto terapéutico. Una dosis terapéuticamente eficaz puede administrarse en una o más administraciones separadas y por diferentes vías.

Una dosis terapéuticamente eficaz, tras la administración, puede dar como resultado niveles séricos de un agente activo de 1-1000 pg/ml, o 1-1000 ng/ml, o 1-1000 µg/ml, o más.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un agente activo. *in vivo* puede ser una dosis de 0,001-0,01 mg/kg de peso

corporal, o 0,01-0,1 mg/kg, o 0,1-1 mg/kg, o 1-10 mg/kg, o 10-100 mg/kg.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un agente activo *in vivo* puede ser una dosis de 0,001 mg/kg de peso corporal, o 0,01 mg/kg, o 0,1 mg/kg, o 1 mg/kg, o 2 mg/kg, o 3 mg/kg, o 4 mg/kg, o 5 mg/kg, o más.

5

Enfermedades autosómicas dominantes

Los ejemplos de enfermedades y/o afecciones para las que se pueden utilizar las moléculas guía de la presente invención incluyen las de la tabla 3.

10

Tabla 3: Enfermedades autosómicas dominantes

Enfermedad autosómica dominante	Edad / Notas	Gen relacionado
Síndrome acropectoral		
Porfiria aguda intermitente	Edad adulta. Los ataques se tratan con carga de glucosa o hemina. Estos son tratamientos específicos que reducen la producción de intermediarios de la vía hemo en el hígado.	Gen HMBS
Adermatoglifia		
Osteodistrofia hereditaria de Albright		
Síndrome de Arakawa II		
Síndrome de exceso de aromatasa	~8-18 años	Mutaciones en el gen de la aromatasa
Ataxia cerebelosa autosómica dominante		
Síndrome de Axenfeld		
Miopatía de Bethlem		
Síndrome de Birt-Hogg-Dubé	Complicaciones hepáticas, disfunción hepática progresiva, hipertensión portal con várices, hiperesplenismo y rara vez insuficiencia hepática manifiesta con cirrosis. Cáncer de hígado.	Desconocido, aleatorio
Displasia de Bumerang		
Síndrome branquio-oto-renal		
Síndrome de Buschke-Ollendorff		
Enfermedad de Camurati-Engelmann	Aparece en la infancia y se considera hereditaria. La enfermedad progresiona lentamente	Mutaciones en el gen TGFB1
Enfermedad del núcleo central	El síndrome de Reye aparece casi exclusivamente en niños. Insuficiencia hepática aguda/coma, muerte.	Desconocido, posible daño a las mitocondrias celulares
Enfermedad del colágeno		
Colagenopatía, de los tipos II y XI		
Atrofia muscular espinal distal congénita		
Distrofia corneal estromal congénita		
Síndrome de Costello		
Síndrome de Currarino	Desde el nacimiento hasta los 64 años	Mutación en el gen de homeosecuencia HLXB9
Enfermedad de Darier		
Enfermedad de De Vivo		
Atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana		
Dermatopatía pigmentosa reticular		
Síndrome de DiGeorge		
Disfibrinogenemia	Edad adulta (20 años)	Mutación que controla la producción de fibrinógeno hepático

(continuación)

Enfermedad autosómica dominante	Edad / Notas	Gen relacionado
Fibrilación auricular familiar		
Hipercolesterolemia familiar	Afección hereditaria que causa niveles altos de colesterol LDL, desde el nacimiento y ataques cardíacos a una edad temprana.	Mutaciones en APOB, LDLR, LDLRAP1 y PCSK9
Pubertad precoz familiar limitada al varón		
Síndrome de Feingold		
Síndrome de Felty	50 años, 60 años	Desconocido
Síndrome de Flynn-Aird		
Síndrome de Gardner	Desde el nacimiento hasta los 5 años	Mutaciones en el gen APC
Síndrome de Gillespie		
Síndrome de plaquetas grises		
Síndrome de cefalopolisindactilia de Greig		
Síndrome de Hajdu-Cheney		
Hawkinsinuria		
Síndrome de Hay-Wellis		
Eliptocitosis hereditaria		
Telangiectasia hemorrágica hereditaria	Dependiente de la edad, adolescencia o posterior. Malformación arteriovenosa (MAV) es uno de los signos/síntomas, predominantemente los pulmones (50 %), hígado (30-70 %), cerebro (10 %).	Mutaciones en el gen ACVRL1
Displasia mucoepitelial hereditaria		
Esferocitosis hereditaria	Los casos agudos pueden amenazar con causar hipoxia por anemia y kernícterus agudo por hiperbilirrubinemia, particularmente en recién nacidos.	Mutaciones en el gen ANK1. (además, SPTB, SPTA, SLC4A1, EPB42)
Síndrome de Holt-Oram		
Miocardiopatía hipertrófica		
Hipoalfalipoproteinemia		
Síndrome de Jackson-Weiss		
Eritema queratolítico de invierno		
Displasia de Kniest		
Síndrome de Kostmann		
Síndrome de Langer-Giedion		
Síndrome de Larsen		
Síndrome de Liddle		
Síndrome de Marfan		
Síndrome de Marshall		
Nefropatía quística medular		
Metacondromatosis		
Síndrome de Miller-Dicker		
Síndrome de MOMO		
Moniletrix		
Neoplasia endocrina múltiple		
Neoplasia endocrina múltiple de tipo 1		
Neoplasia endocrina múltiple de tipo 2		
Neoplasia endocrina múltiple de tipo 2b		
Mielocatexis		
Distrofia miotónica		
Síndrome de Naegeli-Franceschetti-Jadassohn		
Síndrome onicorrotuliano		

(continuación)

Enfermedad autosómica dominante	Edad / Notas	Gen relacionado
Síndrome de Noonan		
Distrofia muscular oculofaríngea		
Paquioniquia congénita		
Síndrome de Pallister-Hall		
Síndrome de PAPA		
Síndrome papilorenal		
Enanismo paraestremático		
Anomalía de Pelger-Huet		
Síndrome de Peutz-Jeghers	La edad promedio del primer diagnóstico es 23 años, pero las lesiones pueden ser identificadas al nacer por un pediatra astuto	Mutaciones en el gen STK11
Piebaldismo		
Displasia esquelética platispondílica letal, de tipo Torrance		
Síndrome de pterigón poplíteo		
Porfiria cutánea tardía	Aduldez tardía entre los 30 y 40 años.	Mutaciones hereditarias en UROD (20 %).
RASopatía		
Distrofia corneal de Reis-Bucklers		
Síndrome de Romano-Ward		
Síndrome de Rosselli-Gulienetti		
Síndrome de Roussy-Levy		
Síndrome de Rubinstein-Taybi		
Síndrome de Saethre-Chotzen		
Síndrome de Schmitt-Gillenwater Kelly		
Síndrome de QT corto		
Síndrome de Singleton-Merten		
Atrofia muscular espinal con predominio en las extremidades inferiores		
Ataxia espinocerebelosa		
Ataxia espinocerebelosa de tipo-6		
Displasia espondiloepimetafisaria, de tipo Strudwick		
Displasia espondiloepifisaria congénita		
Displasia espondiloperiférica		
Síndrome de Stickler		
Síndrome de Tietz		
Síndrome de Timothy		
Síndrome de Treacher Collins		
Esclerosis tuberosa	Hamartomas hepáticos. Esencialmente el hamartoma hepático, la displasia embrionaria y las características tumorales, desde el punto de vista quirúrgico se mantendrán como enfermedad hepática clasificada como benigna.	Esclerosis tuberosa, mutación de TSC1 o TSC2
Enfermedad de Upington		

(continuación)

Enfermedad autosómica dominante	Edad / Notas	Gen relacionado
Porfiria variaegada	Las imágenes del hígado a partir de los 50 años en aquellos que han experimentado elevaciones persistentes de porfobilinógeno o porfirinas pueden detectar carcinoma hepatocelular temprano.	Mutaciones en el gen PPOX
Distrofia macular viteliforme		
Enfermedad de Von Hippel-Lindau		
Enfermedad de Von Willebrand	Edad 5-14 años, de 1-4 años y de 15-29 años. Edad 75+ años y edad < 1 año rara.	Mutaciones en el gen VWF
Síndrome de Wallis-Zieff-Goldblatt		
Síndrome de WHIM		
Nevus esponjoso blanco		
Síndrome de Worth		
Zaspopatía		
Síndrome de Timmermann-Laband		
Síndrome de Zori-Stalker-Williams		

Protocolo para la evaluación de la edición del gen mTTR mediante ensayo con T7

5 Las células Hepa 1-6 que expresan TTR de ratón natural se transfectaron con el reactivo LIPOFECTAMINE MESSENGERMAX con ARNm de Cas9 4 horas antes de la transfección con la guía-UNA o guía comparativa, siendo cada una de ellas una unidad ARNcr:ARNtracr hibridada previamente dirigida al exón 2 de mTTR. 48 h después de la transfección, se aisló ADN genómico y se amplificó un fragmento de 459 pb de mTTR utilizando cebadores

10 SEQ ID NO: 2

5' CTGGTGC AC AGC AGTGC ATCT3' y

15 SEQ ID NO: 3

5'CCTCTCTGAGCCCTCTAGCTGGTA3'.

15 Después, el producto de la PCR se calentó a 98 °C durante 5 minutos y luego se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente para la formación de heterodúplex. Luego se realizó el ensayo con endonucleasa T7 para evaluar la edición génica. Se utilizó el programa informático de análisis Image J para determinar el porcentaje de Indels generados utilizando la fórmula % de Indel = 100 x (1-(Área del fragmento de ADN 1 escindido/Área total)^{1/2}).

20 Evaluación ELISA de la inactivación de la proteína mTTR secretada mediante edición génica con CRISPR/Cas9

Las células Hepa 1-6 que expresan TTR de ratón natural se transfectaron con el reactivo LIPOFECTAMINE MESSENGERMAX con ARNm de Cas9 4 horas antes de la transfección con la guía-UNA o guía comparativa, siendo cada una de ellas una ARNcr:ARNtracr hibridada previamente dirigida al exón 2 de mTTR. 48 h después de la transfección, se recogió el sobrenadante y se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (kit ELISA de prealbúmina de ratón, Genway) para cuantificar la cantidad de proteína TTR de ratón secretada.

Evaluación *in vivo* de la edición génica mediante ensayo con T7

30 El ARNm de Cas9 mRNA y la guía-UNA o guía comparativa, siendo cada uno de ellos una ARNcr: ARNtracr hibridada previamente dirigida al exón 2 de mTTR, se encapsularon con nanopartículas lipídicas por separado y luego se mezclaron para una administración única mediante inyección en la vena de la cola a 10 mg/kg de ARN total. Seis días después de la dosificación, se sacrificaron ratones Balb/c hembra de 6-8 semanas de edad y se aisló el ADN genómico y se amplificó un fragmento de 459 pb de mTTR utilizando cebadores

35 SEQ ID NO: 4

5' CTGGTGC AC AGC AGTGC ATCT3'

y

40 SEQ ID NO: 5

5' CCTCTCTGAGCCCTCTAGCTGGTA3'.

Después, el producto de la PCR se calentó a 98 °C durante 5 minutos y luego se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente para la formación de heterodúplex. Luego se realizó el ensayo con endonucleasa T7 para evaluar la edición génica. Se utilizó el programa informático de análisis Image J para determinar el porcentaje de Indels generados utilizando la fórmula % de Indel = 100 x (1-(Área del fragmento de ADN 1 escindido/Área total)^{1/2}).

5 Evaluación ELISA *in vivo* de la inactivación de la proteína mTTR secretada mediante edición génica con CRISPR/Cas9

10 El ARNm de Cas9 mRNA y la guía-UNA o guía comparativa, siendo cada uno de ellos una ARNcr: ARNtracr hibridada previamente dirigida al exón 2 de mTTR, se encapsularon con nanopartículas lipídicas por separado y luego se mezclaron para una administración única mediante inyección en la vena de la cola a 10 mg/kg de ARN total. Se recogió suero 2, 4, y 6 días después de la administración de la dosis, de ratones Balb/c hembra de 6-8 semanas de edad y se determinó la cantidad de proteína TTR de ratón secretada mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (kit ELISA de prealbúmina de ratón, Genway).

15 Edición génica con CRISPR/Cas9 dirigida a TTR de ratón

En la tabla 4 se muestra una secuencia guía de 20 meros para V30M mTTR.

Tabla 4: Secuencia guía de 20 meros para V30M mTTR

SEQ ID NO:	SECUENCIA
6	3'-GGA-CGAC <u>CAT</u> CTGCACCGACATT-5' (GEN V30M mTTR)

20 El CAT subrayado en la Tabla 4 muestra la mutación V30M.

25 Se sintetizó una molécula guía-U, en donde la molécula contenía la secuencia guía de 20 meros para V30M y una secuencia CRISPR de *S. pyogenes*.

25 En la tabla 5 se muestran ejemplos de una molécula guía-U diana de 20 meros de longitud para la región V30M de mTTR. Las moléculas de la tabla 5 contienen la guía-U diana unida a un ARNcr, como se muestra en la figura 2.

Tabla 5: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar la región V30M de mTTR

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
7	Ü*mU*mU*ACAGCCACGUCUACAGCGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU
8	mU*Ü*mU*ACAGCCACGUCUACAGCGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU
9	mU*mU*Ü*ACAGCCACGUCUACAGCGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU
10	mU*mU*mU*ACAGCCACGUCUACAGCGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*Ü

30 En la Tabla 5, N (= A, U, C, G) denomina un monómero de ARN, mN denomina un monómero de 2'-O-metil-ARN, * denota un enlace 3'-fosforotioato, y Ü, Ü, Ç, Ç denotan monómeros UNA.

35 **Ejemplos**

35 **Ejemplo 1:** Edición selectiva de alelo de un sitio genómico de TTR con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9.

40 Para este experimento, se generó un producto de PCR de 357 pb a partir de ADN genómico de TTR humano, número de registro NC_000018.10, usando los cebadores:

SEQ ID NO: 11

Directo (ítrón 1): 5'-tgtttctctacacccagggcac-3'

SEQ ID NO: 12

45 Inverso (exón 2): 5'-gcaaaccacagctagaggagagga-3'.

Se identificaron secuencias guía de 20 meros de longitud que se dirigían a las regiones 269-288 y 269-286, respectivamente, de la región codificante de TTR humana.

50 En la tabla 6 se muestra una secuencia guía de 20 meros para V30M hTTR.

Tabla 6: Secuencia guía de 20 meros para V30M hTTR

SEQ ID NO:	SECUENCIA
13	3'-CGGUAGUUACACCGGUACGU-5' (GUÍA DE DIANA)
14	5'-CCT-GCCATCAATGTGGCCATGCA-3' (GEN V30M TTR)
15	3'-GGA-CGGTAGTTACACCGGTACGT-5' (GEN V30M TTR)

En la Tabla 6, las posiciones subrayadas muestran la mutación V30M. En la Tabla 6, la SEQ ID NO: 13 también se

puede escribir en la dirección 5' a 3', y aparece en las moléculas guía-U de la tabla 7 escritas en la dirección 5' a 3'.

Se sintetizó una molécula guía-U, en donde la molécula contenía la secuencia guía de 20 meros para V30M y una secuencia CRISPR de *S. pyogenes*.

5 En la tabla 7 se muestran ejemplos de moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para la región V30M de hTTR. Las moléculas de la tabla 7 contienen la guía-U diana unida a un ARNcr, como se muestra en la figura 2.

Tabla 7: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar la región V30M de hTTR

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
16	ÜGCAUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUGC
17	ÜGCAUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUGC
18	UGÜAUUGCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUGC
19	UGCÄAUUGCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUGC
20	UGCAUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUGC
21	UGCAUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUGC
22	UGCAUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUGC
23	UGCAUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUGC
24	ÜmGmCAUUGCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUmGmCmU
25	mUÜmCAUUGCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUmGmCmU
26	mUmGÜCAUUGCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUmGmCmU
27	mUmGmCÄAUUGCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUmGmCmU
28	mUmGmCAUUGCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUmGmC
29	mUmGmCAUUGCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAUmGÜmC
30	mUmGmCAUUGCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAÜmGmCmU
31	mUmGmCAUUGCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAÜmGmCmU
32	Ü*mG*mC*AUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU
33	mU*Ü*mC*AUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU
34	mU*mG*Ü*C*AUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU
35	mU*mG*mC*ÄUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU
36	mU*mG*mC*AUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAU*mG*mC
37	mU*mG*mC*AUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAU*mG*Ü*mU
38	mU*mG*mC*AUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAU*Ü*mC*mU
39	mU*mG*mC*AUGGCCACAUUGAUGGCGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU

10 En la Tabla 7, N (= A, U, C, G) denota un monómero de ARN, mN denota un monómero de 2'-O-metil-ARN, * denota un enlace 3'-fosforotioato, y Ü, Ü, Ü, Ü denotan monómeros UNA.

15 Una molécula guía-U en la tabla 7 estaba activa para la edición génica de TTR humana. Se realizó un ensayo para la edición génica de TTR humana con el producto de PCR de 357 pb. En este ensayo, la molécula guía-U está previamente hibridada con un ARNtracr para proporcionar la guía-U/tracr para la edición génica con CRISPR/Cas9.

20 En el ensayo, se transfectaron células 293 que expresaban TTR humana con V30M y células 293 que expresaban TTR humana natural utilizando el reactivo LIPOFECTAMINE MESSENGER MAX con ARNm de Cas9 4 horas antes de la transfección con guía-U/tracr. 48 h después de la transfección, se aisló el ADN genómico y se realizó el ensayo con endonucleasa T7.

25 La figura 3 muestra que usando las moléculas guía-U UNA1 (SEQ ID NO:32) y UNA2 (SEQ ID NO:35), se realizaron roturas de doble cadena en el producto de PCR de 357 pb para dar productos de escisión de 275 pb y 82 pb.

La molécula guía-U SEQ ID NO:32 fue sorprendentemente activa para la edición génica de TTR humana con resultados selectivos de alelo. La molécula guía-U SEQ ID NO:32 mostró un nivel extraordinario de selectividad alélica para generar roturas de doble cadena en V30M TTR sobre TTR natural.

30 Tal como se muestra en la figura 4, la molécula guía-U SEQ ID NO:32 proporcionó una edición del 26 % de V30M TTR, pero solo aproximadamente un 3 % de edición de TTR natural, donde la edición representa el grado de roturas de doble cadena. Por lo tanto, la molécula guía-U SEQ ID NO:32 fue sorprendente y extraordinariamente activa para la edición génica de TTR humana con resultados selectivos de alelo. Este ejemplo indica la capacidad de reducir la actividad inespecífica.

35 La molécula guía-U SEQ ID NO:35 fue sorprendentemente activa para la edición génica de TTR humana con resultados selectivos de alelo. La molécula guía-U SEQ ID NO:35 mostró un nivel extraordinario de selectividad alélica para generar roturas de doble cadena en V30M TTR sobre TTR natural.

40 Tal como se muestra en la figura 4, la molécula guía-U SEQ ID NO:35 proporcionó una edición del 19 % de V30M

TTR, pero solo aproximadamente un 2 % de edición de TTR natural, donde la edición representa el grado de roturas de doble cadena. Por lo tanto, la molécula guía-U SEQ ID NO:35 fue sorprendente y extraordinariamente activa para la edición génica de TTR humana con resultados selectivos de alelo. Este ejemplo indica la capacidad de reducir la actividad inespecífica.

5 Estos resultados muestran que las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de TTR humana. El sorprendente nivel de selectividad alélica para la edición génica de TTR humana se muestra en la figura 5. La molécula guía-U SEQ ID NO:32 proporcionó una alta relación de selectividad de 8,7. Además, la molécula guía-U SEQ ID NO:35 proporcionó una alta relación de selectividad de 9,5.

10 Además, en las mismas condiciones, una guía de CRISPR/Cas9 que tiene la misma secuencia de nucleobases y estructura que la molécula guía-U SEQ ID NO: 32 y 35, pero que carece de monómero UNA, tenía un índice de selectividad de 1,43.

15 También se realizó la evaluación de la edición del genoma mediante descomposición de trazas de secuencia. Se transfecaron células 293 que expresaban TTR humana natural o con V30M mediante el reactivo LIPOFECTAMINE MESSENGERMAX con ARNm de Cas9 4 horas antes de la transfección con la guía comparativa o guía-UNA (UNA1), estando cada una de ellas hibridada previamente con ARNtracr y se dirigió a la mutación V30M. de hTTR. 48 h después de la transfección, se aisló ADN genómico y se amplificó un fragmento de hTTR de 1048 pb. El producto de PCR se purificó y luego se secuenció mediante Sanger.

20 Los archivos de datos de secuenciación se importaron a TIDE (Seguimiento de Indels por descomposición) (véase, por ejemplo, Brinkman, 2014, Nucl. Acids Res., Vol. 42, N.º 22, págs. 1-8) y se alinearon con la secuencia de control para determinar la abundancia relativa de nucleótidos aberrantes después del sitio de ruptura esperado para generar 25 el espectro de inserciones y eliminaciones (indels) y sus frecuencias.

25 La figura 6 muestra el espectro de indel (inserción, eliminación) para una guía de ARNg comparativa (estructura de guía que no es UNA) para la evaluación de la edición del genoma de V30M TTR mediante descomposición de trazas de secuencia (TIDE, por sus siglas en inglés). La eficiencia total fue del 38,5 %.

30 La figura 7 muestra el espectro de indel para guía-UNA (UNA1) para la evaluación de la edición del genoma de V30M TTR mediante descomposición de trazas de secuencia (TIDE). La eficiencia total fue del 33,4 %.

35 La figura 8 muestra el espectro de indel para una guía de ARNg comparativa (estructura de guía que no es UNA) para la evaluación de la edición del genoma de TTR natural mediante descomposición de trazas de secuencia (TIDE). La eficiencia total fue del 26,6 %. Por lo tanto, la selectividad de la guía de ARNg comparativa fue $38,5/26,6 = 1,4$ para V30M TTR sobre TTR natural.

40 La figura 9 muestra el espectro de indel para guía-UNA (UNA1) para la evaluación de la edición del genoma de TTR natural mediante descomposición de trazas de secuencia (TIDE). La eficiencia total fue del 2,1 %. Por lo tanto, la selectividad de la guía-UNA (UNA1) fue $33,4/2,1 = 15,9$ para V30M TTR sobre TTR natural.

45 Estos resultados muestran que las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de TTR humana. Las moléculas guía-U de la presente invención mostraron un nivel sorprendentemente alto de selectividad alélica para la edición génica de TTR humana.

Ejemplo 2. Edición selectiva de alelo de un sitio genómico de TTR con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9.

En la tabla 8 se muestra una secuencia guía de 20 meros para V30M hTTR.

50

Tabla 8: Secuencia guía de 20 meros para V30M hTTR

SEQ ID NO:	SECUENCIA
40	3'-AGUUACACCGGUACGUACAC-5' (GUÍA DE DIANA)
41	5'-CCA-TCAATGTGGCCATGCATGTG-3' (GEN V30M TTR)
42	3'-GGT-AGTTACACCGGTACGTACAC-5' (GEN V30M TTR)

En la Tabla 8, la SEQ ID NO: 40 también se puede escribir en la dirección 5' a 3', y aparece en las moléculas guía-U de la tabla 9 escrita en la dirección 5' a 3'.

55 Como se usa en el presente documento, el término "1 o 5' a 3'" se refiere a guías-U que tienen un monómero UNA en el extremo izquierdo (1 a 3', por ejemplo SEQ ID NO:43) o un nucleótido en el extremo más izquierdo (5' a 3', por ejemplo, SEQ ID NO:44).

60 Se sintetizó una molécula guía-U, en donde la molécula contenía la secuencia guía de 20 meros para V30M y una secuencia CRISPR de *S. pyogenes*.

En la tabla 9 se muestran ejemplos de moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para la región V30M de hTTR.

Tabla 9: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar la región V30M de hTTR

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
43	ČACAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAUGC
44	CĀCAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAUGC
45	CAČAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAUGC
46	CACĀUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAUGC
47	CACAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAUGC
48	CACAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAUGC
49	CACAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAUGC
50	CACAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAUGC
51	ČmAmCAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUUmGmCmU
52	mCĀmCAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUUmGmCmU
53	mCmĀCAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUUmGmCmU
54	mCmAmCĀUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUUmGmCmU
55	mCmAmCAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUUmGmCmU
56	mCmAmCAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUUmGmCmU
57	mCmAmCAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUUmGmCmU
58	mCmAmCAUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUUmGmCmU
59	Č*mA*mC*AUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU
60	mC*Ā*mC*AUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU
61	mC*mA*Č*AUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU
62	mC*mA*mC*ĀUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU
63	mC*mA*mC*AUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*Ū
64	mC*mA*mC*AUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAU*mG*Č*mU
65	mC*mA*mC*AUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAU*Ĝ*mC*mU
66	mC*mA*mC*AUGCAUGGCCACAUUGAGUUUUAGAGCUAU*mG*mC*mU

5 En la Tabla 9, N (= A, U, C, G) denota un monómero de ARN, mN denota un monómero de 2'-O-metil-ARN, * denota un enlace 3'-fosforotioato, y Ā, Ū, Č, Ĝ denominan monómeros UNA.

Una molécula guía-U en la tabla 9 estaba activa para la edición génica de TTR humana. Se realizó un ensayo para la edición génica de TTR humana con el producto de PCR de 357 pb. En este ensayo, la molécula guía-U está previamente hibridada con un ARNtracr para proporcionar la una guía-U/tracr para la edición génica con CRISPR/Cas9.

En el ensayo, se transfecaron células 293 que expresaban TTR humana con V30M y células 293 que expresaban TTR humana natural utilizando el reactivo LIPOFECTAMINE MESSENGER MAX con ARNm de Cas9 4 horas antes de la transfección con guía-U/tracr. 48 h después de la transfección, se aisló el ADN genómico y se realizó el ensayo con endonucleasa T7.

La figura 10 muestra que usando la molécula guía-U UNA3 (SEQ ID NO:61), se realizó una rotura de doble cadena en el producto de PCR de 357 pb para proporcionar productos de escisión de 271 pb y 86 pb.

20 La molécula guía-U SEQ ID NO:61 fue sorprendentemente activa para la edición génica de TTR humana con resultados selectivos de alelo. La molécula guía-U SEQ ID NO:61 mostró un nivel extraordinario de selectividad alélica para generar roturas de doble cadena en V30M TTR sobre TTR natural.

25 Tal como se muestra en la figura 11, la molécula guía-U SEQ ID NO:61 proporcionó una edición del 14 % de V30M TTR, pero solo aproximadamente un 3 % de edición de TTR natural, donde la edición representa el grado de roturas de doble cadena. Por lo tanto, la molécula guía-U SEQ ID NO:62 fue sorprendente y extraordinariamente activa para la edición génica de TTR humana con resultados selectivos de alelo. Este ejemplo indica la capacidad de reducir la actividad inespecífica.

30 Estos resultados muestran que las moléculas guía-U de la presente invención se pueden usar para la edición génica selectiva de alelo de TTR humana. El sorprendente nivel de selectividad alélica para la edición génica de TTR humana se muestra en la figura 12. La molécula guía-U SEQ ID NO:61 proporcionó una alta relación de selectividad de 4,7.

35 Por lo tanto, la molécula guía-U SEQ ID NO:62 fue extraordinariamente activa para la edición génica de TTR humana con selectividad alélica de V30M TTR sobre TTR natural. Este ejemplo indica la capacidad de reducir la actividad inespecífica.

Ejemplo 3: Edición de un sitio genómico de BIRC5 con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9.

En células tumorales, puede expresarse survivina (inhibidor baculovírico de la apoptosis que contiene repeticiones 5, BIRC5 humana, NG_029069.1), especialmente en cáncer de mama y de pulmón, y generalmente no está presente en las células normales. La survivina puede ser un oncogén y su sobreexpresión en células cancerosas puede provocar resistencia a la apoptosis y una mayor supervivencia.

5 Se identificaron secuencias guía de 20 meros de longitud que se dirigían a determinadas regiones de BIRC5 humana. El ID del gen EntreZ para estas secuencias es 332.

10 Las secuencias guía de 20 meros para BIRC5 se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Secuencias guía de 20 meros para BIRC5

SEQ ID NO:	SECUENCIA DIANA 5' --> 3'
67	GAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
68	CAAGAACUGGCCUUCUUGG
69	GCAGGCGCAGCCCUCCAAGA
70	UUCUGCUUCAAGGAGCUGGA
71	CCAGUUUCAAAAUUCACCA
72	CAAUAAGAAGAAAGAAUUUG

Se sintetiza una molécula guía-U, en donde la molécula contiene la secuencia diana de 20 meros y una secuencia CRISPR de *S. pyogenes*.

15 En la Tabla 11 se muestran ejemplos de moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para BIRC5.

Tabla 11: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar BIRC5

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
73	GAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
74	UUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
75	UUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
76	UUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
77	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
78	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
79	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
80	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
81	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
82	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
83	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
84	CAAGAACUGGCCUUCUUGGGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
85	UCAAGAACUGGCCUUCUUGGGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
86	UCAAGAACUGGCCUUCUUGGGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
87	UCAAGAACUGGCCUUCUUGGGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
88	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
89	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
90	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
91	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
92	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
93	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
94	mUUGAUGC GGUGGUCCUUGAGAGAA
95	GCAGGCGCAGCCCUCCAAGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
96	UUGCAGGCGCAGCCCUCCAAGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
97	UUGCAGGCGCAGCCCUCCAAGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
98	UUGCAGGCGCAGCCCUCCAAGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
99	mUUGCAGGCGCAGCCCUCCAAGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
100	mUUGCAGGCGCAGCCCUCCAAGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
101	mUUGCAGGCGCAGCCCUCCAAGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
102	mUUGCAGGCGCAGCCCUCCAAGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
103	mUUGCAGGCGCAGCCCUCCAAGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
104	mUUGCAGGCGCAGCCCUCCAAGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
105	mUUGCAGGCGCAGCCCUCCAAGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
106	UUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
107	UUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU
108	UUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGUUUUAGAGCAUUGCUGUCCUU

(continuación)

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
109	U*UUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U
110	mUUUUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUmU
111	mU*UUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
112	mU*U*UUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
113	mU*U*U*UUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*U*mU
114	mU*U*UUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
115	mU*U*UUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
116	mU*U*U*UUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*U*mU
117	CCAGUUUCAAAAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
118	UCCAGUUUCAAAAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
119	UCCAGUUUCAAAAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
120	U*CCAGUUUCAAAAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U
121	mU*CCAGUUUCAAAAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUmU
122	mU*UCCAGUUUCAAAAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
123	mU*U*CCAGUUUCAAAAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
124	mU*U*U*CCAGUUUCAAAAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*U*mU
125	mU*UCCAGUUUCAAAAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
126	mU*U*UCCAGUUUCAAAAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
127	mU*U*U*CCAGUUUCAAAAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*U*mU
128	CAAAUAGAAGAAAAGAAUUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
129	UCAAAUAGAAGAAAAGAAUUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
130	UCAAAUAGAAGAAAAGAAUUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
131	U*CAAAUAGAAGAAAAGAAUUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U
132	mU*CAAAUAGAAGAAAAGAAUUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUmU
133	mU*UCAAAUAGAAGAAAAGAAUUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
134	mU*U*CAAAUAGAAGAAAAGAAUUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
135	mU*U*U*CAAAUAGAAGAAAAGAAUUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*U*mU
136	mU*U*UCAAAUAGAAGAAAAGAAUUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
137	mU*U*UCAAAUAGAAGAAAAGAAUUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*mU
138	mU*U*U*CAAAUAGAAGAAAAGAAUUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*U*mU

En la Tabla 11, N denomina un monómero de ARN, mN denomina un monómero de 2'-O-metil-ARN, * denomina un enlace 3'-fosforotioato, Ú denomina un monómero UNA-U y G denomina un monómero UNA-G.

5

Ejemplo 4: Edición de un sitio genómico de CDK16 con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9.

La proteína codificada por CDK16 pertenece a la subfamilia cdc2/cdkx de la familia de proteínas cinasas ser/thr (CDK16 humana, NG_012517.1). CDK16 puede estar asociada con cascadas de transducción de señales en células terminalmente diferenciadas, en la exocitosis y en el transporte de carga secretora desde el retículo endoplásmico. Los defectos y las variantes del número de copias de CDK16 se han asociado con diversas enfermedades, incluyendo discapacidad intelectual y trastornos relacionados.

Se identificaron secuencias guía de 20 meros de longitud que se dirigían a determinadas regiones de CDK16 humana. El ID del gen EntreZ para estas secuencias es 5127.

Las secuencias guía de 20 meros para CDK16 se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Secuencias guía de 20 meros para CDK16

SEQ ID NO:	SECUENCIA DIANA 5' --> 3'
139	CGUGCAGAACGAAGUUCCCC
140	UGGAGACUGCACCUCAUCG
141	UGAUCUCCUUGAGUGCCACA
142	UGAUGUUCCCCACAGUCAUCC
143	AGUAGUCCGUGGACCCAAGC
144	CUACCCCAAGUACCGAGCCG

20

Se sintetiza una molécula guía-U, en donde la molécula contiene la secuencia diana de 20 meros y una secuencia CRISPR de *S. pyogenes*.

En la Tabla 13 se muestran ejemplos de moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para CDK16.

Tabla 13: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar CDK16

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
145	CGUGCAGAACGAAGUUCCCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
146	ÜCGUGCAGAACGAAGUUCCCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
147	ÜÜCGUGCAGAACGAAGUUCCCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜÜ
148	Ü*ÜCGUGCAGAACGAAGUUCCCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜ*Ü
149	mUÜCGUGCAGAACGAAGUUCCCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
150	mU*ÜCGUGCAGAACGAAGUUCCCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
151	mU*Ü*ÜCGUGCAGAACGAAGUUCCCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
152	mU*Ü*ÜCGUGCAGAACGAAGUUCCCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
153	mU*ÜÜCGUGCAGAACGAAGUUCCCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
154	mU*ÜÜÜCGUGCAGAACGAAGUUCCCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
155	mU*ÜÜÜÜCGUGCAGAACGAAGUUCCCC GUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
156	UGGAGACUGCACCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
157	ÜUGGAGACUGCACCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
158	ÜÜUGGAGACUGCACCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
159	Ü*ÜGGAGACUGCACCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜ*Ü
160	mUÜUGGAGACUGCACCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
161	mU*ÜUGGAGACUGCACCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
162	mU*Ü*ÜUGGAGACUGCACCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
163	mU*Ü*Ü*ÜUGGAGACUGCACCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
164	mU*ÜÜUGGAGACUGCACCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
165	mU*ÜÜÜUGGAGACUGCACCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
166	mU*ÜÜÜÜUGGAGACUGCACCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
167	UGAUCUCCUUGAGUGCCACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
168	ÜUGAUCUCCUUGAGUGCCACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
169	ÜÜUGAUCUCCUUGAGUGCCACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
170	Ü*ÜUGAUCUCCUUGAGUGCCACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
171	mUÜUGAUCUCCUUGAGUGCCACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
172	mU*ÜUGAUCUCCUUGAGUGCCACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
173	mU*Ü*ÜUGAUCUCCUUGAGUGCCACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
174	mU*Ü*Ü*ÜUGAUCUCCUUGAGUGCCACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
175	mU*ÜÜUGAUCUCCUUGAGUGCCACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
176	mU*ÜÜÜUGAUCUCCUUGAGUGCCACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
177	mU*ÜÜÜÜUGAUCUCCUUGAGUGCCACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
178	UGAUGUUCCCACAGCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
179	ÜUGAUGUUCCCACAGCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
180	ÜÜUGAUGUUCCCACAGCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
181	Ü*ÜUGAUGUUCCCACAGCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
182	mUÜUGAUGUUCCCACAGCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
183	mU*ÜUGAUGUUCCCACAGCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
184	mU*Ü*ÜUGAUGUUCCCACAGCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
185	mU*Ü*Ü*ÜUGAUGUUCCCACAGCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
186	mU*ÜÜUGAUGUUCCCACAGCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
187	mU*ÜÜÜUGAUGUUCCCACAGCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
188	mU*ÜÜÜÜUGAUGUUCCCACAGCUAUCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
189	AGUAGUCCGUGGACCCAAAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
190	ÜAGUAGUCCGUGGACCCAAAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
191	ÜAGUAGUCCGUGGACCCAAAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
192	Ü*ÜAGUAGUCCGUGGACCCAAAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
193	mUÜAGUAGUCCGUGGACCCAAAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
194	mU*ÜAGUAGUCCGUGGACCCAAAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
195	mU*Ü*ÜAGUAGUCCGUGGACCCAAAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
196	mU*Ü*Ü*ÜAGUAGUCCGUGGACCCAAAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
197	mU*ÜÜAGUAGUCCGUGGACCCAAAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
198	mU*ÜÜÜAGUAGUCCGUGGACCCAAAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
199	mU*ÜÜÜÜAGUAGUCCGUGGACCCAAAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
200	CUACCCCAAGUACCGAGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
201	ÜCUACCCCAAGUACCGAGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
202	ÜÜCUACCCCAAGUACCGAGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ

(continuación)

203	Ú*CUACCCCAAGUACCGAGCGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÚ*Ú
204	mUÚCUACCCCAAGUACCGAGCGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚmU
205	mU*ÚCUACCCCAAGUACCGAGCGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚ*mU
206	mU*Ú*CUACCCCAAGUACCGAGCGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ú*mU
207	mU*Ú*U*CUACCCCAAGUACCGAGCGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*Ú*mU
208	mU*Ú*U*ÚCUACCCCAAGUACCGAGCGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ*Ú*mU
209	mU*Ú*U*ÚCUACCCCAAGUACCGAGCGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ*Ú*mU
210	mU*Ú*U*ÚCUACCCCAAGUACCGAGCGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*Ú*mU

En la Tabla 13, N denomina un monómero de ARN, mN denomina un monómero de 2'-O-metil-ARN, * denomina un enlace 3'-fosforotioato, Ú denomina un monómero UNA-U y Ȑ denomina un monómero UNA-G.

5

Ejemplo 5: Edición de un sitio genómico de STATS con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9.

El transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STATS) es un mediador transcripcional para muchas citocinas (STAT3 humano, NG_007370.1). STAT3 pertenece a la familia de proteínas STAT, que se activan en respuesta a proteínas de señalización extracelular, incluida la familia de interleucinas (IL)-6 (p. ej., IL-5, IL-6, IL-11), entre otras. STAT3 puede estar asociado en diversos trastornos autoinmunitarios, tal como enteropatía inflamatoria (EI), así como enfermedades hepáticas, gliosis y astrocitos reactivos, y otras enfermedades y afecciones.

Se identificaron secuencias guía de 20 meros de longitud que se dirigían a determinadas regiones de STATS humano. El ID del gen EntreZ para estas secuencias es 6774.

Las secuencias guía de 20 meros para STAT3 se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Secuencias guía de 20 meros para STATS

SEQ ID NO:	SECUENCIA DIANA 5' --> 3'
211	AGAGCUGAUGGAGCUGCUCC
212	ACUGCUGGUCAAUCUCUCC
213	CUCUCUCCGGACAUCUGA
214	GAGACCGAGGUGUAUCACCA
215	AACCUGGGAUCAAGUGGCCG
216	GAAGGUGCUGAACCCUCAGC

20

Se sintetiza una molécula guía-U, en donde la molécula contiene la secuencia diana de 20 meros y una secuencia CRISPR de *S. pyogenes*.

25

En la Tabla 15 se muestran ejemplos de moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para STAT3.

Tabla 15: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar STATS

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
217	AGAGCUGAUGGAGCUGCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
218	ÚAGAGCUGAUGGAGCUGCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ
219	ÚÁGAGCUGAUGGAGCUGCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ
220	Ú*ÁGAGCUGAUGGAGCUGCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ú
221	mUÚAGAGCUGAUGGAGCUGCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚmU
222	mU*ÚAGAGCUGAUGGAGCUGCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚ*mU
223	mU*Ú*AGAGCUGAUGGAGCUGCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ú*mU
224	mU*Ú*U*AGAGCUGAUGGAGCUGCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*Ú*mU
225	mU*Ú*U*AGAGCUGAUGGAGCUGCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ*mU
226	mU*Ú*ÚAGAGCUGAUGGAGCUGCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ*mU
227	mU*Ú*Ú*AGAGCUGAUGGAGCUGCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ú*Ú*mU
228	ACUGCUGGUCAAUCUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
229	ÚACUGCUGGUCAAUCUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ
230	ÚACUGCUGGUCAAUCUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ
231	Ú*ÁCUGCUGGUCAAUCUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ú
232	mUÚACUGCUGGUCAAUCUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚmU
233	mU*ÚACUGCUGGUCAAUCUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚ*mU
234	mU*Ú*ACUGCUGGUCAAUCUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ú*mU
235	mU*Ú*U*ACUGCUGGUCAAUCUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*Ú*mU
236	mU*Ú*ÚACUGCUGGUCAAUCUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ*mU
237	mU*Ú*ÚACUGCUGGUCAAUCUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ*mU

(continuación)

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
238	mU*Ü*Ü*ACUGCUGGUCAUCUCUCCCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCU*Ü*Ü*mU
239	CUCUCUUCGGACAUCUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCU
240	ÜCUCUCUUCGGACAUCUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ
241	ÜCUCUCUUCGGACAUCUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ
242	Ü*ÜCUCUCUUCGGACAUCUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü
243	mUÜCUCUCUUCGGACAUCUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜmU
244	mU*ÜCUCUCUUCGGACAUCUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
245	mU*Ü*CUCUCUUCGGACAUCUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*mU
246	mU*Ü*ÜCUCUCUUCGGACAUCUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
247	mU*ÜÜCUCUCUUCGGACAUCUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜÜ*mU
248	mU*Ü*ÜCUCUCUUCGGACAUCUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
249	mU*Ü*Ü*CUCUCUUCGGACAUCUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
250	GAGACCGAGGUGUAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCU
251	ÜGAGACCGAGGUGUAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ
252	ÜGAGACCGAGGUGUAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ
253	Ü*GAGACCGAGGUGUAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü
254	mUÜGAGACCGAGGUGUAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜmU
255	mU*ÜGAGACCGAGGUGUAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
256	mU*Ü*ÜGAGACCGAGGUGUAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*mU
257	mU*Ü*Ü*ÜGAGACCGAGGUGUAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*mU
258	mU*ÜÜGAGACCGAGGUGUAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜÜ*mU
259	mU*Ü*ÜGAGACCGAGGUGUAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
260	mU*Ü*Ü*ÜGAGACCGAGGUGUAUCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
261	AACCUGGGAUCAAGUGGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCU
262	ÜAACCUUGGAUCAAGUGGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ
263	ÜAACCUUGGAUCAAGUGGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ
264	Ü*AACCUUGGAUCAAGUGGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü
265	mUÜAACCUUGGAUCAAGUGGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜmU
266	mU*ÜAACCUUGGAUCAAGUGGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
267	mU*Ü*AACCUUGGAUCAAGUGGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
268	mU*Ü*Ü*AACCUUGGAUCAAGUGGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
269	mU*ÜÜAACCUUGGAUCAAGUGGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜÜ*mU
270	mU*Ü*ÜAACCUUGGAUCAAGUGGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
271	mU*Ü*Ü*AACCUUGGAUCAAGUGGCCGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
272	GAAGGUGUCUGAACCCUCAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCU
273	ÜGAAGGUGUCUGAACCCUCAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ
274	ÜGAAGGUGUCUGAACCCUCAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ
275	Ü*GAAGGUGUCUGAACCCUCAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü
276	mUÜGAAGGUGUCUGAACCCUCAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜmU
277	mU*ÜGAAGGUGUCUGAACCCUCAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
278	mU*Ü*ÜGAAGGUGUCUGAACCCUCAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
279	mU*Ü*Ü*ÜGAAGGUGUCUGAACCCUCAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜ*Ü*mU
280	mU*ÜÜGAAGGUGUCUGAACCCUCAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜÜ*mU
281	mU*Ü*ÜÜGAAGGUGUCUGAACCCUCAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜÜ*mU
282	mU*Ü*Ü*ÜGAAGGUGUCUGAACCCUCAGCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCUÜÜ*mU

En la Tabla 15, N denomina un monómero de ARN, mN denomina un monómero de 2'-O-metil-ARN, * denomina un enlace 3'-fosforotioato, Ü denomina un monómero UNA-U y ÜG denomina un monómero UNA-G.

5

Ejemplo 6: Edición de un sitio genómico de CFTR con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9.

- La fibrosis quística (FQ) es un trastorno genético que afecta sustancialmente al sistema respiratorio, causando revestimientos mucosos anormalmente gruesos en los pulmones. La enfermedad puede provocar infecciones pulmonares mortales y también puede provocar diversas obstrucciones del páncreas, dificultando la digestión. Los síntomas de la FQ incluyen tos persistente, sibilancias o dificultad para respirar y apetito excesivo pero poco aumento de peso. El deterioro es inevitable, lo que da lugar a debilidad y eventualmente a la muerte. En los Estados Unidos, se informa que la incidencia de FQ es de 1 de cada 3.500 nacimientos.
- 10 Un individuo que padece la enfermedad hereda un gen CFTR de fibrosis quística defectuoso de cada parente. El gen CFTR defectuoso produce la proteína defectuosa reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, que no regula adecuadamente el movimiento de sal y agua dentro y fuera de las células. El resultado es moco pegajoso, espeso en las vías respiratorias, sistemas digestivo y reproductivo, así como aumento de sal en el sudor.

Hay más de mil posibles mutaciones del gen CFTR.

Se identificaron secuencias guía de 20 meros de longitud que se dirigían a determinadas regiones de CFTR humano (CFTR humano, NG_016465.4). El ID del gen EntreZ para estas secuencias es 1080.

5

Las secuencias guía de 20 meros para CFTR se muestran en la tabla 16.

Tabla 16: Secuencias guía de 20 meros para CFTR

SEQ ID NO:	SECUENCIA DIANA 5' --> 3'
283	GGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
284	ACUCCCAGAUUAGCCCCAUG
285	AAGGACAGCCUUCUCUCAA
286	UGCUGAUCAACGCGUGAUGC
287	CUAUUCCUUUUGCUUUGAAG
288	UUCAUUGACAUGCCAACAGA

10 Se sintetiza una molécula guía-U, en donde la molécula contiene la secuencia diana de 20 meros y una secuencia CRISPR de *S. pyogenes*.

En la tabla 17 se muestran ejemplos de moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para CFTR.

15

Tabla 17: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar CFTR

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
289	GGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
290	ÜGGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
291	ÜGGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜÜ
292	Ü*GGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜ*Ü
293	mUÜGGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
294	mU*ÜGGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
295	mU*Ü*GGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
296	mU*Ü*Ü*GGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
297	mU*ÜÜGGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
298	mU*Ü*ÜGGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
299	mU*Ü*Ü*GGUAUAUGUCUGACAAUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
300	ACUCCCAGAUUAGCCCCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
301	ÜACUCCCAGAUUAGCCCCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
302	ÜACUCCCAGAUUAGCCCCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜÜ
303	Ü*ACUCCCAGAUUAGCCCCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜ*Ü
304	mUÜACUCCCAGAUUAGCCCCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
305	mU*ÜACUCCCAGAUUAGCCCCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
306	mU*Ü*ACUCCCAGAUUAGCCCCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
307	mU*Ü*Ü*ACUCCCAGAUUAGCCCCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
308	mU*ÜÜACUCCCAGAUUAGCCCCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
309	mU*Ü*ÜACUCCCAGAUUAGCCCCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
310	mU*Ü*Ü*ACUCCCAGAUUAGCCCCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
311	AAGGACAGCCUUCUCUCAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
312	ÜAAGGACAGCCUUCUCUCAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
313	ÜAAGGACAGCCUUCUCUCAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜÜ
314	Ü*AAGGACAGCCUUCUCUCAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜ*Ü
315	mUÜAAGGACAGCCUUCUCUCAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
316	mU*ÜAAGGACAGCCUUCUCUCAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
317	mU*Ü*ÜAAGGACAGCCUUCUCUCAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
318	mU*Ü*Ü*ÜAAGGACAGCCUUCUCUCAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
319	mU*ÜÜAAGGACAGCCUUCUCUCAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
320	mU*Ü*ÜÜAAGGACAGCCUUCUCUCAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
321	mU*Ü*Ü*ÜÜAAGGACAGCCUUCUCUCAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
322	UGCUGAUCAACGCGUGAUGCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
323	ÜUGCUGAUCAACGCGUGAUGCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
324	ÜÜUGCUGAUCAACGCGUGAUGCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜÜ
325	Ü*ÜUGCUGAUCAACGCGUGAUGCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜ*Ü
326	mUÜUGCUGAUCAACGCGUGAUGCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
327	mU*ÜUGCUGAUCAACGCGUGAUGCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU

(continuación)

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
328	mU*Ü*UGCUGAUACACGCUGAUGC GG UUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ü*mU
329	mU*Ü*UGCUGAUACACGCUGAUGC GG UUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ü*mU
330	mU*Ü*UGCUGAUACACGCUGAUGC GG UUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
331	mU*Ü*UGCUGAUACACGCUGAUGC GG UUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
332	mU*Ü*UGCUGAUACACGCUGAUGC GG UUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ü*Ü*mU
333	CUAUUCCC UUUGUCUUGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
334	ÜCUAUUCCC UUUGUCUUGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
335	ÜCUAUUCCC UUUGUCUUGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
336	Ü*ÜCUAUUCCC UUUGUCUUGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü
337	mUÜCUAUUCCC UUUGUCUUGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
338	mU*ÜCUAUUCCC UUUGUCUUGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
339	mU*Ü*CUAUUCCC UUUGUCUUGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
340	mU*Ü*Ü*CUAUUCCC UUUGUCUUGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ü*Ü*mU
341	mU*Ü*ÜCUAUUCCC UUUGUCUUGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
342	mU*Ü*ÜCUAUUCCC UUUGUCUUGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
343	mU*Ü*Ü*Ü*CUAUUCCC UUUGUCUUGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ü*Ü*mU
344	UUCAUUGACAUGCCAACAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
345	ÜUUCAUUGACAUGCCAACAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
346	ÜUUCAUUGACAUGCCAACAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
347	Ü*ÜUUCAUUGACAUGCCAACAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü
348	mUÜUUCAUUGACAUGCCAACAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
349	mU*ÜUUCAUUGACAUGCCAACAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
350	mU*Ü*ÜUUCAUUGACAUGCCAACAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
351	mU*Ü*Ü*ÜUUCAUUGACAUGCCAACAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
352	mU*Ü*ÜUUCAUUGACAUGCCAACAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
353	mU*Ü*ÜUUCAUUGACAUGCCAACAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
354	mU*Ü*Ü*ÜUUCAUUGACAUGCCAACAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU

En la Tabla 17, N denomina un monómero de ARN, mN denomina un monómero de 2'-O-metil-ARN, * denomina un enlace 3'-fosforotioato, Ü denomina un monómero UNA-U y Ü denomina un monómero UNA-G.

5

Ejemplo 7: Edición de un sitio genómico del Factor IX (F9) con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9.

La deficiencia del factor IX causa hemofilia B. Existen más de 100 mutaciones conocidas del factor IX.

10 Se identificaron secuencias guía de 20 meros de longitud que se dirigían a determinadas regiones del F9 humano (F9 humano, NG_007994.1). El ID del gen EntreZ para estas secuencias es 2158.

Las secuencias guía de 20 meros para F9 se muestran en la tabla 18.

15

Tabla 18: Secuencias guía de 20 meros para F9

SEQ ID NO:	SECUENCIA DIANA 5' --> 3'
355	CUAAAAGGCAGAUGGUGAUG
356	CUUCCAUACAUUCUCUCUCA
357	AAAGGGACACCAACAUCAU
358	AAGUCGUAUACCCUCAGUAC
359	GGUGGAGAAGAUGCCAAACC
360	UUCUGUGCUGGCUUCCAUAGA

Se sintetiza una molécula guía-U, en donde la molécula contiene la secuencia diana de 20 meros y una secuencia CRISPR de *S. pyogenes*.

20 En la Tabla 19 se muestran ejemplos de moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para F9.

Tabla 19: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar F9

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
361	CUAAAAGGCAGAUGGUGAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
362	ÜCUAAAAGGCAGAUGGUGAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
363	ÜCUAAAAGGCAGAUGGUGAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
364	Ü*ÜCUAAAAGGCAGAUGGUGAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü
365	mUÜCUAAAAGGCAGAUGGUGAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU

(continuación)

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
366	mU*ÜCUAAAAGGCAGAUGGUGAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
367	mU*Ü*CUAAAAGGCAGAUGGUGAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*mU
368	mU*Ü*U*CUAAAAGGCAGAUGGUGAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ü*Ü*mU
369	mU*ÜÜCUAAAAGGCAGAUGGUGAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜÜ*mU
370	mU*Ü*Ü*ÜCUAAAAGGCAGAUGGUGAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
371	mU*Ü*Ü*Ü*CUAAAAGGCAGAUGGUGAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ü*Ü*mU
372	CUUCCAUACAUUCUCUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
373	ÜCUUCCAUACAUUCUCUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
374	ÜCUUCCAUACAUUCUCUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
375	Ü*ÜCUUCCAUACAUUCUCUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
376	mUÜCUUCCAUACAUUCUCUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
377	mU*ÜÜCUUCCAUACAUUCUCUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
378	mU*Ü*Ü*ÜCUUCCAUACAUUCUCUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*mU
379	mU*Ü*Ü*Ü*ÜCUUCCAUACAUUCUCUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
380	mU*ÜÜCUUCCAUACAUUCUCUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
381	mU*Ü*Ü*ÜCUUCCAUACAUUCUCUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
382	mU*Ü*Ü*Ü*Ü*ÜCUUCCAUACAUUCUCUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ü*Ü*mU
383	AAAGGGACACCAACAAUCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
384	ÜAAAGGGACACCAACAAUCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
385	ÜAAAGGGACACCAACAAUCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
386	Ü*ÜAAAGGGACACCAACAAUCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
387	mUÜAAAGGGACACCAACAAUCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
388	mU*ÜÜAAAGGGACACCAACAAUCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
389	mU*Ü*ÜAAAGGGACACCAACAAUCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*mU
390	mU*Ü*Ü*ÜAAAGGGACACCAACAAUCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
391	mU*ÜÜAAAGGGACACCAACAAUCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
392	mU*Ü*ÜÜAAAGGGACACCAACAAUCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
393	mU*Ü*Ü*ÜAAAGGGACACCAACAAUCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
394	AAGUCGAUAUCCCUCAGUACGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
395	ÜAAGUCGAUAUCCCUCAGUACGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
396	ÜAAGUCGAUAUCCCUCAGUACGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
397	Ü*ÜAAGUCGAUAUCCCUCAGUACGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
398	mUÜAAGUCGAUAUCCCUCAGUACGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
399	mU*ÜÜAAGUCGAUAUCCCUCAGUACGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
400	mU*Ü*ÜAAAGUCGAUAUCCCUCAGUACGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*mU
401	mU*Ü*Ü*ÜAAAGUCGAUAUCCCUCAGUACGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
402	mU*ÜÜAAAGUCGAUAUCCCUCAGUACGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
403	mU*Ü*ÜÜAAAGUCGAUAUCCCUCAGUACGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
404	mU*Ü*Ü*ÜAAAGUCGAUAUCCCUCAGUACGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
405	GGUGGAGAAGAUGCCAACCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
406	ÜGGUGGAGAAGAUGCCAACCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
407	ÜÜGGUGGAGAAGAUGCCAACCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
408	Ü*ÜGGUGGAGAAGAUGCCAACCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
409	mUÜGGUGGAGAAGAUGCCAACCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
410	mU*ÜÜGGUGGAGAAGAUGCCAACCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
411	mU*Ü*ÜGGUGGAGAAGAUGCCAACCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*mU
412	mU*Ü*Ü*ÜGGUGGAGAAGAUGCCAACCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
413	mU*ÜÜGGUGGAGAAGAUGCCAACCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
414	mU*Ü*ÜÜGGUGGAGAAGAUGCCAACCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*Ü*mU
415	mU*Ü*Ü*ÜÜGGUGGAGAAGAUGCCAACCGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
416	UUCUGUGCUGGCCUUCCAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
417	ÜUUCUGUGCUGGCCUUCCAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
418	ÜÜUUCUGUGCUGGCCUUCCAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
419	Ü*ÜUUCUGUGCUGGCCUUCCAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
420	mUÜUUCUGUGCUGGCCUUCCAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
421	mU*ÜUUCUGUGCUGGCCUUCCAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
422	mU*Ü*ÜUUCUGUGCUGGCCUUCCAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*mU
423	mU*Ü*Ü*ÜUUCUGUGCUGGCCUUCCAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
424	mU*ÜÜUUCUGUGCUGGCCUUCCAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
425	mU*Ü*ÜÜUUCUGUGCUGGCCUUCCAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU
426	mU*Ü*Ü*ÜÜUUCUGUGCUGGCCUUCCAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*Ü*mU

En la Tabla 19, N denomina un monómero de ARN, mN denomina un monómero de 2'-O-metil-ARN, * denomina un enlace 3'-fosforotioato, Ú denomina un monómero UNA-U y G denomina un monómero UNA-G.

5 **Ejemplo 8:** Edición de un sitio genómico de KRAS con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9.

La proteína KRAS es esencial en la señalización del tejido normal y la mutación de un gen KRAS está asociada con muchos cánceres.

10 Se identificaron secuencias guía de 20 meros de longitud que se dirigían a determinadas regiones de KRAS humano (KRAS humano, NG_007524.1). El ID del gen EntreZ para estas secuencias es 3845.

Las secuencias guía de 20 meros para KRAS se muestran en la tabla 20.

15 Tabla 20: Secuencias guía de 20 meros para KRAS

SEQ ID NO:	SECUENCIA DIANA 5' --> 3'
427	CUGAAUUAGCUGUAUCGUCA
428	CAAUGAGGGACCAGUACAU
429	AGAACAAAUAAAAGAGGU
430	AAUCACAUUAAAAGGUAC
431	UUCUC GAACUAUAGUAUAGA
432	GAAUAUGAUCCAACAAUAGA

Se sintetiza una molécula guía-U, en donde la molécula contiene la secuencia diana de 20 meros y una secuencia CRISPR de *S. pyogenes*.

20 En la tabla 21 se muestran ejemplos de moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para KRAS.

Tabla 21: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar KRAS

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
433	CUGAAUUAGCUGUAUCGUCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
434	ÚCUGAAUUAGCUGUAUCGUCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ
435	ÚCUGAAUUAGCUGUAUCGUCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÚÚ
436	Ú*ÚCUGAAUUAGCUGUAUCGUCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÚ*Ú
437	mUÚCUGAAUUAGCUGUAUCGUCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚmU
438	mU*ÚCUGAAUUAGCUGUAUCGUCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚ*mU
439	mU*Ú*CUGAAUUAGCUGUAUCGUCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ú*mU
440	mU*Ú*U*CUGAAUUAGCUGUAUCGUCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*Ú*mU
441	mU*Ú*U*CUGAAUUAGCUGUAUCGUCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*Ú*mU
442	mU*Ú*ÚCUGAAUUAGCUGUAUCGUCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ú*mU
443	mU*Ú*Ú*CUGAAUUAGCUGUAUCGUCAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ú*Ú*mU
444	CAAUGAGGGACCAGUACAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
445	ÚCAAUGAGGGACCAGUACAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ
446	ÚCAAUGAGGGACCAGUACAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÚÚ
447	Ú*ÚCAAUGAGGGACCAGUACAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÚ*Ú
448	mUÚCAAUGAGGGACCAGUACAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚmU
449	mU*ÚCAAUGAGGGACCAGUACAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚ*mU
450	mU*Ú*ÚCAAUGAGGGACCAGUACAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ú*mU
451	mU*Ú*U*ÚCAAUGAGGGACCAGUACAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*Ú*mU
452	mU*ÚÚCAAUGAGGGACCAGUACAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚ*mU
453	mU*Ú*ÚÚCAAUGAGGGACCAGUACAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ú*mU
454	mU*Ú*Ú*ÚCAAUGAGGGACCAGUACAUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ú*Ú*mU
455	AGAACAAAUAAAAGAGGUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
456	ÚAGAACAAAUAAAAGAGGUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚ
457	ÚAGAACAAAUAAAAGAGGUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÚÚ
458	Ú*ÚAGAACAAAUAAAAGAGGUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCÚ*Ú
459	mUÚAGAACAAAUAAAAGAGGUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚmU
460	mU*ÚAGAACAAAUAAAAGAGGUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÚ*mU
461	mU*Ú*AGAACAAAUAAAAGAGGUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ú*mU
462	mU*Ú*U*AGAACAAAUAAAAGAGGUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*U*Ú*mU
463	mU*ÚÚAGAACAAAUAAAAGAGGUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÚÚ*mU
464	mU*Ú*ÚÚAGAACAAAUAAAAGAGGUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ú*mU
465	mU*Ú*Ú*ÚAGAACAAAUAAAAGAGGUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ú*Ú*mU

(continuación)

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
466	AAUCACAUUUUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
467	ÜAAUCACAUUUUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
468	ÜAAUCACAUUUUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
469	Ü*AAUCACAUUUUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü
470	mUÜAAUCACAUUUUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
471	mU*ÜAAUCACAUUUUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*mU
472	mU*Ü*AAUCACAUUUUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*mU
473	mU*Ü*U*AAUCACAUUUUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*U*Ü*mU
474	mU*ÜÜAAUCACAUUUUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
475	mU*Ü*ÜAAUCACAUUUUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*Ü*mU
476	mU*Ü*Ü*AAUCACAUUUUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*Ü*mU
477	UUCUCGAACUAAGUAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
478	ÜUUCUCGAACUAAGUAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
479	ÜUUCUCGAACUAAGUAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
480	Ü*UUCUCGAACUAAGUAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü
481	mUÜUUCUCGAACUAAGUAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
482	mU*ÜUUCUCGAACUAAGUAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
483	mU*Ü*UUCUCGAACUAAGUAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*mU
484	mU*Ü*U*UUCUCGAACUAAGUAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*U*Ü*mU
485	mU*ÜÜUUCUCGAACUAAGUAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
486	mU*Ü*ÜÜUUCUCGAACUAAGUAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
487	mU*Ü*Ü*UUCUCGAACUAAGUAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*Ü*mU
488	GAAUAUGAUCCAACAAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
489	ÜGAAUAUGAUCCAACAAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
490	ÜGAAUAUGAUCCAACAAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
491	Ü*GAAUAUGAUCCAACAAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü
492	mUÜGAAUAUGAUCCAACAAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
493	mU*ÜGAAUAUGAUCCAACAAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
494	mU*Ü*GAAUAUGAUCCAACAAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
495	mU*Ü*U*GAAUAUGAUCCAACAAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*U*Ü*mU
496	mU*ÜÜGAAUAUGAUCCAACAAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
497	mU*Ü*Ü*ÜGAAUAUGAUCCAACAAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
498	mU*Ü*Ü*GAAUAUGAUCCAACAAUAGAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*Ü*mU

En la Tabla 21, N denomina un monómero de ARN, mN denomina un monómero de 2'-O-metil-ARN, * denomina un enlace 3'-fosforotioato, Ü denomina un monómero UNA-U y ï denomina un monómero UNA-G.

5

Ejemplo 9: Edición de un sitio genómico de linfocitos T con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9.

En la figura 13 se muestra una representación esquemática de la estructura de un receptor de antígenos químérico (CAR, por sus siglas en inglés). El CAR es un receptor de linfocitos T artificial que se inserta y expresa en el linfocito T. ScFv es un fragmento variable de cadena sencilla. V_H es una región variable de cadena pesada. V_L es una región variable de cadena ligera. TM es un dominio transmembrana. SD es un dominio de señalización.

El gen CAR se puede insertar en cualquier gen expresado constitutivamente de un linfocito T.

15 Por ejemplo, en una realización, el gen CAR se puede insertar en un gen CD2 (grupo de diferenciación 2). CD2 es una molécula de adhesión celular que se encuentra en la superficie de los linfocitos T, que ayuda a los linfocitos T a adherirse a las células presentadoras de antígenos.

20 La figura 14 muestra un esquema de un método para introducir un gen de CAR en un gen CD2 constitutivo de un linfocito T, en donde el CAR está cadena abajo del CD2. Se realiza una rotura de doble cadena con una molécula guía-U de la presente invención. El gen insertado por recombinación homóloga puede estar compuesto por una sección de CD2, junto con P2A y la sección de CAR. El péptido P2A es un péptido autoescindible que se puede utilizar para generar dos productos genéticos separados, la proteína CD2 y la proteína CAR. El receptor de la proteína CAR puede llevar la especificidad de un mAb contra células cancerosas de un sujeto en una estrategia de inmunoterapia adoptiva para destruir las células cancerosas del sujeto.

La figura 15 muestra un esquema de un método para introducir un gen de CAR en un gen CD2 constitutivo de un linfocito T, en donde el CAR está cadena arriba del CD2.

30 En la tabla 22 se muestran varias secuencias guía de 20 meros para CD2.

Tabla 22: Secuencias guía de 20 meros para CD2

SEQ ID NO:	SECUENCIA
499	GGGUACCCGUCGUUUU-5' (GUÍA-U)
500	5'-CCT-CCCCATGGGCAGCAGAAA-3' (GEN CD2)
501	3'-GGA-GGGTACCCGTCGTCTTT-5' (GEN CD2)
502	AAGACGACCAUUGAACACA-5' (GUÍA-U)
503	5'-CCT-TTCTGCTGGTAACCTGTG-3' (GEN CD2)
504	3'-GGA-AAGACGACCACTGAACACA-5' (GEN CD2)
505	GGGTCTGGAGCTCAAGTCG-5' (GUÍA-U)
506	5'-CCT-CCCCAGACCTCGAGTCAGC-3' (GEN CD2)
507	3'-GGA-GGGTCTGGAGCTCAAGTCG-5' (GEN CD2)
508	GAUUAUUUUUUUCUAUCUUU-5' (GUÍA-U)
509	5'-CCT-CTAATTAAAAAGATAGAAA-3' (GEN CD2)
510	3'-GGA-GATTAATTTTCTATCTT-5' (GEN CD2)

5 Se identificaron secuencias guía de 20 meros de longitud que se dirigían a determinadas regiones de CD2 humana.

Las secuencias guía de 20 meros para CD2 se muestran en la tabla 23.

Tabla 23: Secuencias guía de 20 meros para CD2

SEQ ID NO:	SECUENCIA DIANA 5' --> 3'
511	UUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
512	ACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCC
513	GCTGAACCTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCC
514	UUUCUAUCUUUUUUAAUUAG

10 Se sintetiza una molécula guía-U, en donde la molécula contiene la secuencia diana de 20 meros y una secuencia CRISPR de *S. pyogenes*.

En la Tabla 24 se muestran ejemplos de moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para CD2.

15

Tabla 24: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar CD2

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
515	UUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
516	ÜUUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜ
517	ÜÜUUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜ
518	Ü*ÜUUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCÜ*Ü
519	mUÜUUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
520	mU*ÜUUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
521	mU*Ü*ÜUUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ü*mU
522	mU*Ü*Ü*ÜUUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ü*Ü*mU
523	mU*Ü*ÜUUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
524	mU*Ü*ÜUUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
525	mU*Ü*Ü*ÜUUUCUGCUGCCCCAUGGGGGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
526	ACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
527	ÜACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
528	ÜACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
529	Ü*ACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
530	mÜACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU
531	mU*ÜACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
532	mU*Ü*ÜACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
533	mU*Ü*Ü*ACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
534	mU*ÜÜACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
535	mU*Ü*ÜÜACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜ*mU
536	mU*Ü*Ü*ACACAAGUUCACCAGCAGAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ*mU
537	GCTGAACCTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
538	ÜGCTGAACCTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
539	ÜGCTGAACCTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU
540	Ü*GCTGAACCTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUÜ
541	mUÜGCTGAACCTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUÜmU

(continuación)

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
542	mU*ŪGCTGAACTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUŪ*mU
543	mU*Ū*UGCTGAACTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ū*mU
544	mU*Ū*U*GCTGAACTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ū*Ū*mU
545	mU*ŪŪGCTGAACTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUŪ*mU
546	mU*Ū*Ū*UGCTGAACTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ū*mU
547	mU*Ū*Ū*GCTGAACTCGAGGTCTGGGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ū*Ū*mU
548	ŪUUUAUCUUUUUUUUUUUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
549	ŪUUUCUAUCUUUUUUUUUUUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
550	ŪUUUCUAUCUUUUUUUUUUUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUŪ
551	Ū*UUUCUAUCUUUUUUUUUUUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUŪ
552	mUŪUUUCUAUCUUUUUUUUUUUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUŪ*mU
553	mU*ŪUUUCUAUCUUUUUUUUUUUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUŪ*mU
554	mU*Ū*UUUCUAUCUUUUUUUUUUUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU*Ū*mU
555	mU*Ū*Ū*UUUCUAUCUUUUUUUUUUUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ū*Ū*mU
556	mU*Ū*ŪUUUCUAUCUUUUUUUUUUUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUUŪ*mU
557	mU*Ū*ŪUUUCUAUCUUUUUUUUUUUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ū*Ū*mU
558	mU*Ū*Ū*UUUCUAUCUUUUUUUUUUUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCU*Ū*Ū*mU

En la Tabla 24, N denomina un monómero de ARN, mN denomina un monómero de 2'-O-metil-ARN, * denomina un enlace 3'-fosforotioato, Ū denomina un monómero UNA-U y Ĝ denomina un monómero UNA-G.

5

Ejemplo 10: Protocolo de descomposición de trazas de secuencia (TIDE).

Se transfecaron células 293 que expresaban TTR humana natural o con V30M mediante el reactivo LIPOFECTAMINE MESSENGERMAX con ARNm de Cas9 4 horas antes de la transfección con la guía comparativa o guía-UNA (UNA1), estando cada una de ellas hibridada previamente con ARNtracr y se dirigió a la mutación V30M. de hTTR. 48 h después de la transfección, se aisló ADN genómico y se amplificó un fragmento de 1048 pb de hTTR utilizando cebadores

SEQ ID NO:559 5'ACAACGGTAAGAAGGAGTGAC3' y
SEQ ID NO:560 5' CCTGGGTTTGGGTGATCC3'.

15

El producto de PCR se purificó y luego se secuenció con Sanger usando los cebadores SEQ ID NO: 561 5'TCGACACTTACGTTCCCTGAT3' o SEQ ID NO: 562 5'CATACTGACCTCTGCCTAC3'.

20

Ejemplo 11: Edición de un sitio genómico de TTR con una molécula guía-U para CRISPR/Cas9.

Se identificaron secuencias guía de 20 meros de longitud que se dirigían a determinadas regiones de TTR humano, número de registro NC_000018.10.

Las secuencias guía de 20 meros para hTTR se muestran en la tabla 25.

Tabla 25: Secuencias guía de 20 meros para hTTR

SEQ ID NO:	SECUENCIA DIANA 5' --> 3'
563	TAAGGTGGTGCCGACAGTAG-5' (GUÍA - V122I)
564	5'-CCT-ATTCCACCCACGGCTGTCATC-3' (GEN V122I TTR)
565	3'-GGA-TAAGGTGGTGCCGACAGTAG-5' (GEN V122I TTR)
566	GTCAACACTCGGGTACGCCG-5' (GUÍA - L55P)
567	5'-CCT-CAGTTGTGAGCCCATGCGGC-3' (GEN L55P TTR)
568	3'-GGA-GTCAACACTCGGGTACGCCG-5' (GEN L55P TTR)
569	GTCTGTGTTATGGTCAGGT-5' (GUÍA)
570	5'-CCT-CAGACACAAATACCAGTCCA-3' (GEN SP TTR)
571	3' -GGA-GTCTGTGTTATGGTCAGGT-5' (GEN SP TTR)

30

Se sintetiza una molécula guía-U, en donde la molécula contiene la secuencia diana de 20 meros y una secuencia CRISPR de *S. pyogenes*.

En la tabla 26 se muestran ejemplos de moléculas guía-U de longitud diana de 20 meros para V122I hTTR.

Tabla 26: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar la región V1221 de hTTR

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
572	GATGACAGCCGUGGGUGGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
573	ŪGAUGACAGCCGUGGGUGGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ
574	ŪGAUGACAGCCGUGGGUGGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ
575	Ū*GAUGACAGCCGUGGGUGGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū
576	mUŪUGAUGACAGCCGUGGGUGGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪmU
577	mU*ŪUGAUGACAGCCGUGGGUGGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*mU
578	mU*Ū*UGAUGACAGCCGUGGGUGGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
579	mU*Ū*U*GAUGACAGCCGUGGGUGGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
580	mU*ŪŪGGGAUGACAGCCGUGGGUGGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
581	mU*Ū*ŪGAUGACAGCCGUGGGUGGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
582	mU*Ū*Ū*GAUGACAGCCGUGGGUGGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*Ū*mU

En la tabla 27 se muestran ejemplos de moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para la región L55P de hTTR.

5 Tabla 27: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar la región L55P de hTTR

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
583	GCCGCAUGGGCUCACAACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
584	ŪGCCGCAUGGGCUCACAACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ
585	ŪGCCGCAUGGGCUCACAACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ
586	Ū*GCCGCAUGGGCUCACAACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū
587	mUŪUGCCGCAUGGGCUCACAACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪmU
588	mU*ŪUGCCGCAUGGGCUCACAACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*mU
589	mU*Ū*UGCCGCAUGGGCUCACAACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
590	mU*Ū*U*GCCGCAUGGGCUCACAACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
591	mU*ŪŪGCCGCAUGGGCUCACAACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
592	mU*Ū*ŪGCCGCAUGGGCUCACAACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
593	mU*Ū*Ū*GCCGCAUGGGCUCACAACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*Ū*mU

En la tabla 28 se muestran ejemplos de moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para la región SP de hTTR.

6 Tabla 28: Moléculas guía-U diana de 20 meros de longitud para editar la región SP de hTTR

SEQ ID NO:	ESTRUCTURA DE GUÍA-U (1 o 5' a 3')
594	UGGACUGGUUUUUGUGUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUU
595	ŪUGGACUGGUUUUUGUGUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ
596	ŪŪGGACUGGUUUUUGUGUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ
597	Ū*ŪGGACUGGUUUUUGUGUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū
598	mUŪUUUGGACUGGUUUUUGUGUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪmU
599	mU*ŪUUUGGACUGGUUUUUGUGUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*mU
600	mU*Ū*UUUGGACUGGUUUUUGUGUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
601	mU*Ū*Ū*UGGACUGGUUUUUGUGUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
602	mU*ŪŪUGGACUGGUUUUUGUGUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
603	mU*Ū*ŪUGGACUGGUUUUUGUGUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*mU
604	mU*Ū*Ū*ŪUGGACUGGUUUUUGUGUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUCCUŪ*Ū*Ū*mU

10 **Ejemplo 12:** Un ejemplo de un ARNcr para una molécula guía-U para la edición génica con CRISPR/Cas es la SEQ ID NO:605 5'-GUUUUAGAGCUAUGCU-3'.

15 **Ejemplo 13:** Un ejemplo de un ARNtracr, como se ha usado anteriormente, para un sistema guía-U para la edición génica con CRISPR/Cas es:

SEQ ID NO: 606

5' -mA*mG*mC*mAmUmAmGmCmAAGUUAAAUAAGGCUAGGUCAUCAmCmUmUm
GmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU-3'.

20 Se entiende que la presente invención no se limita a una determinada metodología, protocolos, materiales y reactivos descritos, ya que estos pueden variar.

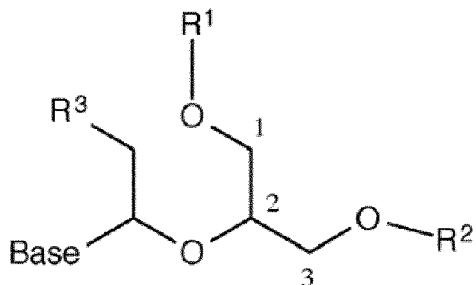
25 Debe señalarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Del mismo modo, los términos "un" (o "una"), "uno/a o más" y "al menos uno/a" se pueden usar indistintamente en el presente documento. También cabe señalar que las expresiones "comprende", "que comprende", "que contiene/n", "que

incluye/n" y "que tiene/n" se pueden usar indistintamente.

Sin más detalles, se cree que un experto en la materia puede, basándose en la descripción anterior, utilizar la presente invención en su extensión más completa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto guía dirigido a un ADN genómico, que comprende una cadena guía diana de 14-24 monómeros contiguos unidos a un ARN CRISPR (ARNcr), en donde el compuesto guía dirige la edición génica con CRISPR selectiva de alelo del ADN genómico, en donde los monómeros comprenden monómeros UNA y monómeros de ácido nucleico, en donde cada monómero UNA tiene independientemente una estructura de



- 10 10 donde R¹ y R² son cada uno independientemente H o un enlace fosfodiéster, Base es una nucleobase y R³ es -OR⁴, -SR⁴, -NR⁴₂, -NH(C=O)R⁴, morfolino, morfolin-1-ilo, piperazin-1-ilo, o 4-alcanoil-piperazin-1-ilo, en donde cada R⁴ se selecciona de forma independiente entre H, alquilo, un colesterol, una molécula lipídica, una poliamina, un aminoácido y un polipéptido, y en donde el compuesto guía comprende una secuencia de bases dirigida a dirigir la edición génica con CRISPR del ADN genómico.

- 15 15 2. El compuesto guía de la reivindicación 1, en donde

- (a) el compuesto guía dirige roturas de doble cadena en el gen humano TTR y la cadena guía diana comprende 16-20 monómeros contiguos de 5'-UGCAUGGCCACAUUGAUGGC-3' (SEQ ID NO: 13), en donde el ARNcr está unido en el extremo 3' extremo de la cadena guía diana y de formas sustituidas o modificadas de la misma, opcionalmente en donde el compuesto guía comprende la SEQ ID NO:32; o
 (b) en donde el compuesto guía dirige roturas de doble cadena en el gen humano TTR y la cadena guía diana comprende 16-20 monómeros contiguos de 5'-CACAUUGCAUGGCCACAUUGA-3' (SEQ ID NO: 40), en donde el ARNcr está unido en el extremo 3' extremo de la cadena guía diana y de formas sustituidas o modificadas de la misma, opcionalmente en donde el compuesto guía comprende la SEQ ID NO:61.

- 25 3. El compuesto guía de la reivindicación 1, en donde el ARNcr es 5'-GUUUUAGAGCUAUGC-3' (SEQ ID NO:605), y formas sustituidas o modificadas de la misma.

- 30 4. El compuesto guía de la reivindicación 1, en donde:

- (a) la secuencia de bases de la cadena guía diana tiene hasta tres desemparejamientos del ADN genómico, o
 (b) el compuesto guía contiene de uno a cinco monómeros UNA, o
 (c) los monómeros de ácido nucleico se seleccionan entre nucleótidos naturales, nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados, nucleótidos modificados químicamente y combinaciones de los mismos, o
 (d) uno o más de los monómeros de ácido nucleico es un ribonucleótido de 2'-O-metilo, un nucleótido de 2'-O-metil purina, un ribonucleótido de 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido de 2'-desoxi-2'-fluoro, un ribonucleótido de 2'-desoxi, un nucleótido de 2'-desoxipurina, un nucleótido de base universal, un nucleótido de 5-C-metilo, un resto de monómero desoxibásico invertido, un nucleótido estabilizado en el extremo 3', un nucleótido de 3'-glicerilo, un nucleótido abásico invertido en 3', una timidina invertida en 3', un nucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés), un nucleótido de 2'-O,4'-C-metileno-(D-ribofuranosilo), un nucleótido de 2'-metoxietoxi (MOE), un nucleótido de 2'-metil-tio-etilo, 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido de 2'-O-metilo, un 2'-O-metoxietoxi restringido en 2',4' (cMOE), un 2'-O-etilo (cEt), un nucleótido de 2'-amino, un nucleótido de 2'-O-amino, un nucleótido de 2'-C-alilo, un nucleótido de 2'-O-alilo, un nucleótido de N⁶-metiladenosina, un nucleótido con base 5-(3-amino)propiluridina modificada, un nucleótido con base 5-(2-mercaptopropil)uridiluridina modificada, un nucleótido con base 5-bromouridina modificada, un nucleótido con base 8-bromoguanosina modificada, un nucleótido con base 7-deazaadenosina modificada, un nucleótido sustituido con 2'-O-aminopropilo, o un nucleótido con un grupo 2'-OH sustituido por un 2'-R, un 2'-OR, un 2'-halógeno, un 2'-SR, o un 2'-amino, donde R puede ser H, alquilo, alquenilo, o alquinilo, o
 (e) uno o más de los tres últimos monómeros en cada extremo del compuesto guía están conectados mediante un enlace fosforotioato, fosforotioato quiral o fosforoditioato.

- 50 5. El compuesto guía de la reivindicación 1, en donde:

- 55 (a) el compuesto guía dirige roturas de doble cadena en un gen seleccionado de TTR, BIRC5, CDK16, STAT3, CFTR, F9, KRAS y CAR; o

- (b) el compuesto guía dirige la edición génica con una actividad inespecífica reducida; o
(c) el compuesto guía dirige más roturas de doble cadena en un alelo relacionado con una enfermedad que en el mismo alelo natural; o
(d) el compuesto guía dirige las roturas de doble cadena en un alelo relacionado con una enfermedad, preferentemente en donde el alelo relacionado con la enfermedad se selecciona de V30M TTR, G284R ColAI, L132P Keratin12, R135T Keratin12, G85R SOD1, G272V Tau, P301L Tau, V337M Tau, R406W Tau, Q39STOP beta-globina, ADNmt T8993G/C, G719S EGFR y G12C Kras.
- 5 6. El compuesto guía de la reivindicación 1, en donde el ADN genómico contiene un polimorfismo de un solo nucleótido relacionado con la enfermedad diana.
- 10 7. El compuesto guía de la reivindicación 1, que comprende 30-300 monómeros contiguos.
8. El compuesto guía de la reivindicación 1, en donde la edición génica con CRISPR utiliza Cas9.
- 15 9. Un compuesto guía de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 hibridado con un ARNtracr.
10. El compuesto guía de la reivindicación 9, en donde:
- 20 (a) el ARNtracr procede de *S. pneumonia*, *S. pyogenes*, *N. meningitidis*, o *S. thermophiles*; o
(b) el ARNtracr es la SEQ ID NO:606; o
(c) el compuesto guía forma un complejo con una proteína de edición génica asociada a CRISPR, preferentemente en donde la proteína de edición génica asociada a CRISPR es Cas9.
- 25 11. El compuesto guía de la reivindicación 1 dirigido a un ADN genómico, en donde el compuesto guía es una cadena de monómeros y dirige la edición génica con CRISPR del ADN genómico, comprendiendo el compuesto guía una cadena guía diana, un ARNcr CRISPR y un ARNtracr CRISPR como una cadena sencilla, en donde la cadena guía diana tiene una longitud de 14-24 monómeros contiguos, en donde los monómeros comprenden monómeros UNA y monómeros de ácido nucleico, y en donde el compuesto guía comprende una secuencia de bases dirigidas a dirigir la edición génica con CRISPR del ADN genómico, preferentemente en donde el compuesto guía dirige la edición génica en un complejo CRISPR/Cas9.
- 30 12. Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos guía de la reivindicación 9 y un transportador farmacéuticamente aceptable, preferentemente en donde:
- 35 (a) el transportador farmacéuticamente aceptable comprende un vector vírico o un vector no vírico, o
(b) el transportador farmacéuticamente aceptable comprende liposomas.
- 40 13. Un método *in vitro* para editar un ADN genómico en una célula, en donde la célula comprende una enzima de edición génica con CRISPR inducible o constitutiva, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una composición según la reivindicación 12, preferentemente en donde:
- 45 (a) la edición altera el ADN o reprime la transcripción del ADN, o
(b) la edición se logra con una actividad inespecífica reducida, o
(c) la enzima de edición génica con CRISPR se cotransfecta con la composición.
14. Una composición según la reivindicación 12 para su uso en prevenir, tratar o mejorar una enfermedad asociada con un ADN genómico diana en un sujeto que lo necesita, en donde el sujeto comprende una enzima de edición génica con CRISPR inducible o constitutiva.

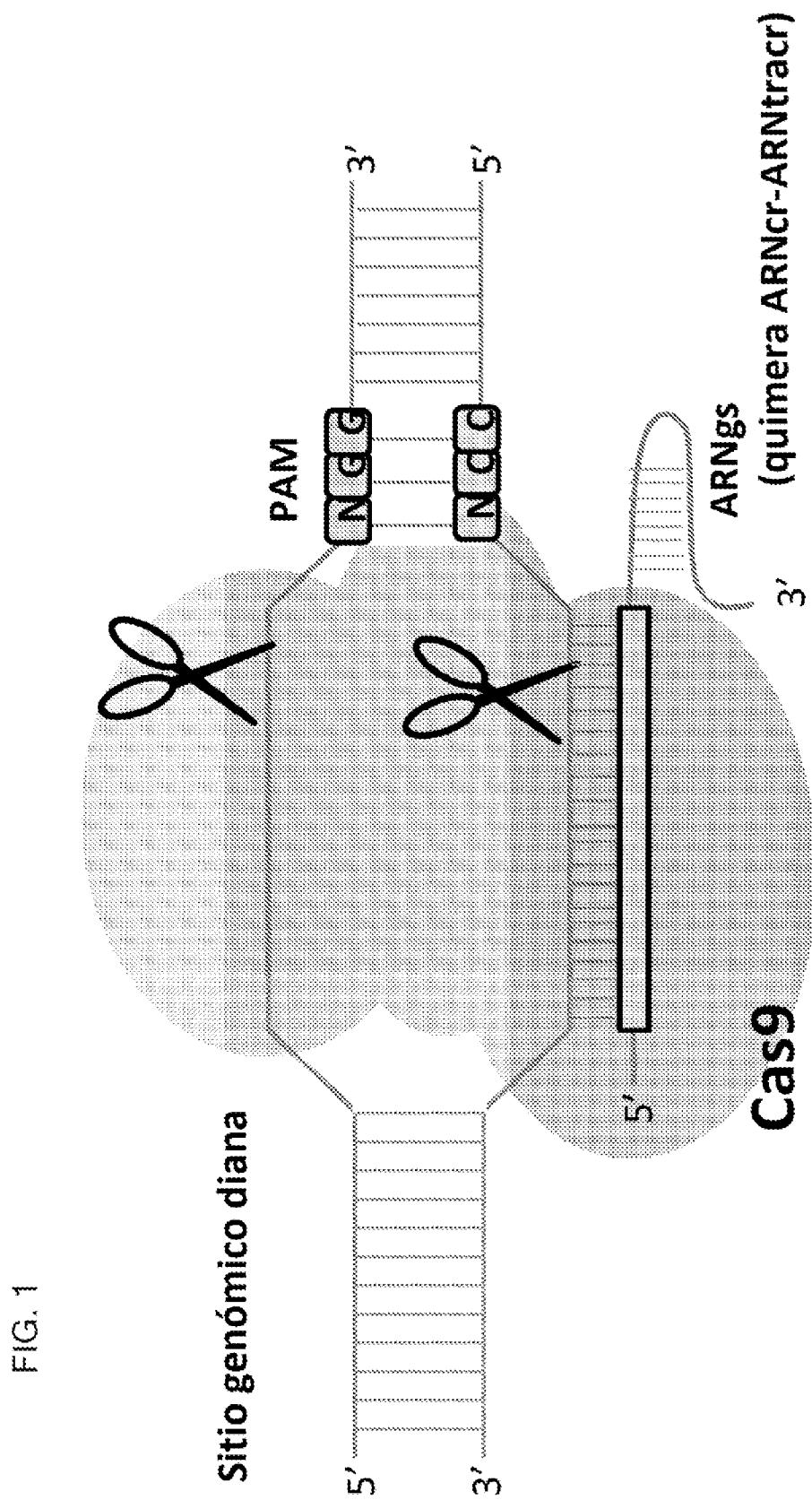
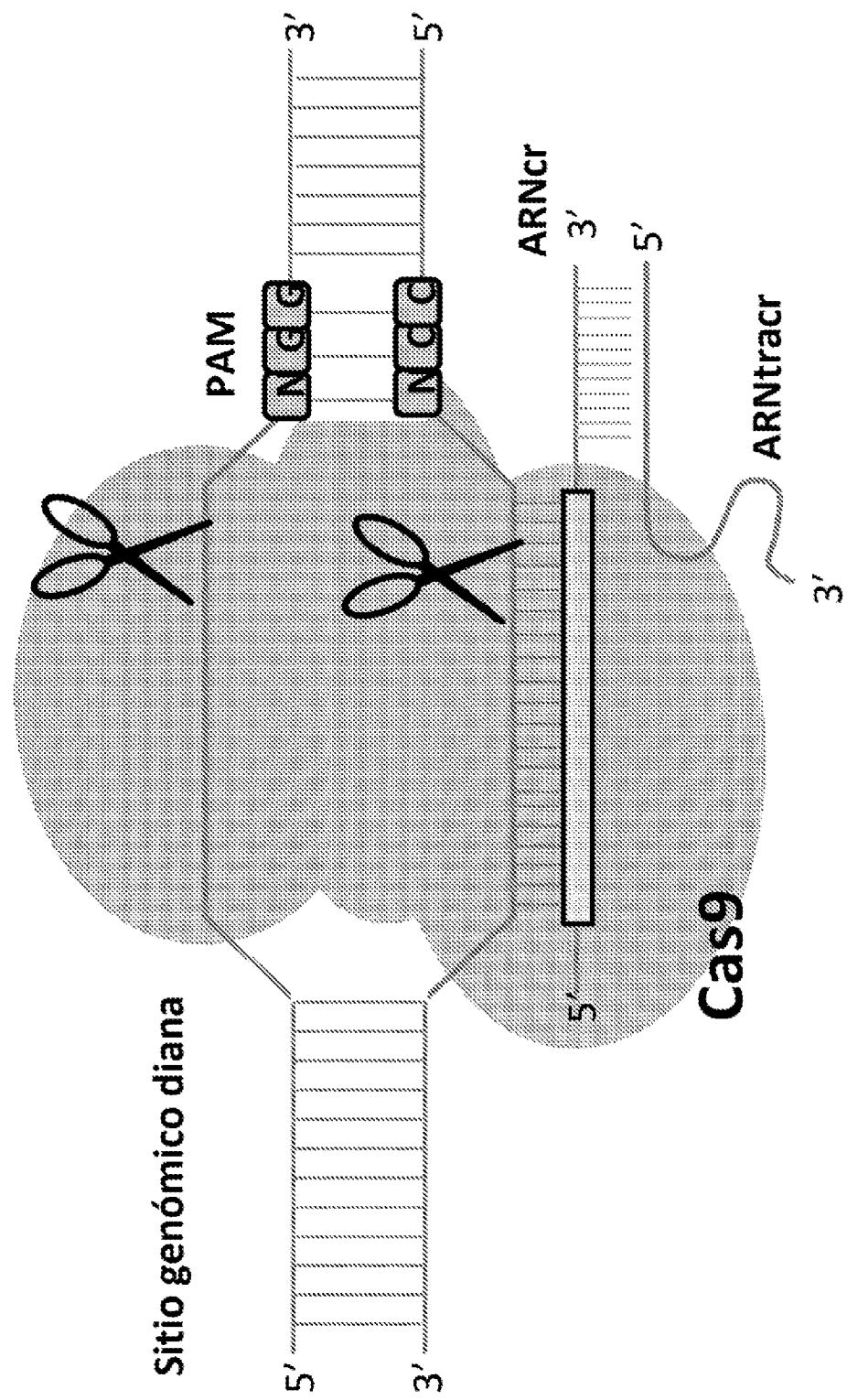


FIG. 2



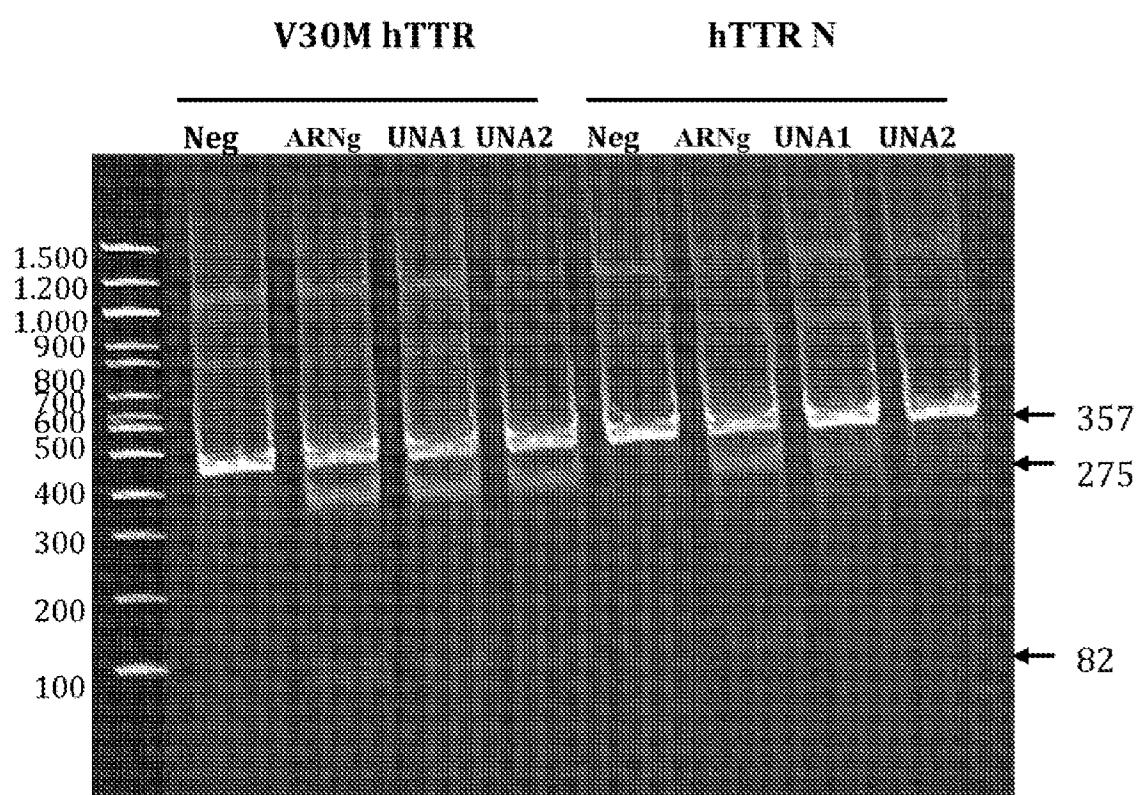


FIG. 3

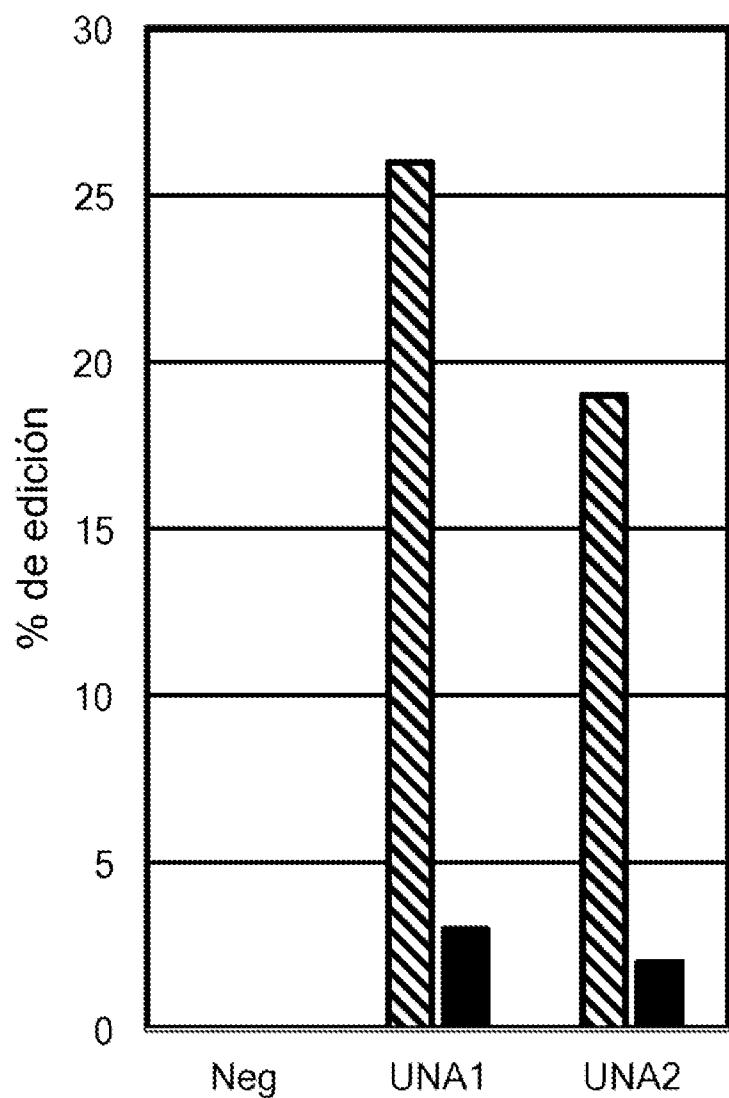


FIG. 4

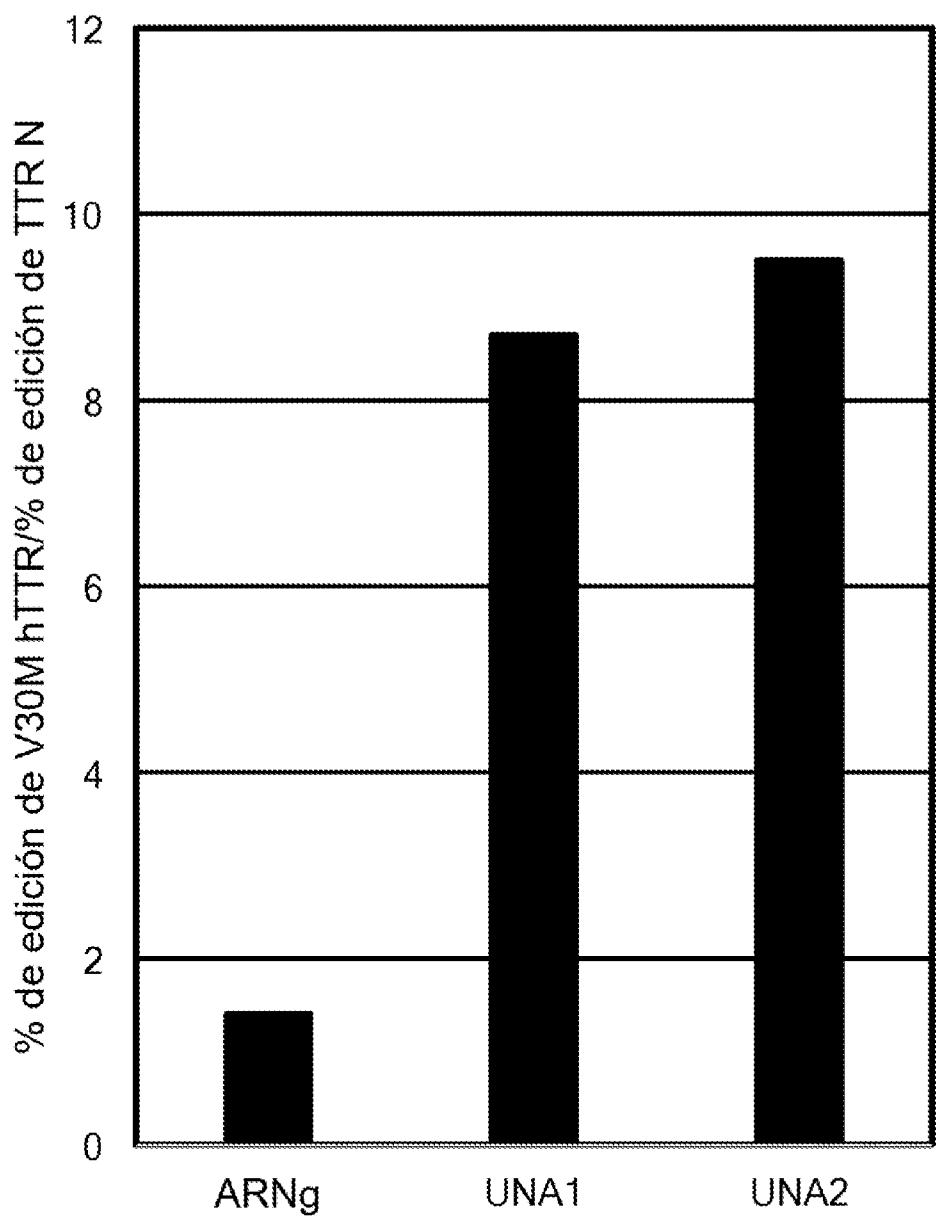


FIG. 5

FIG. 6

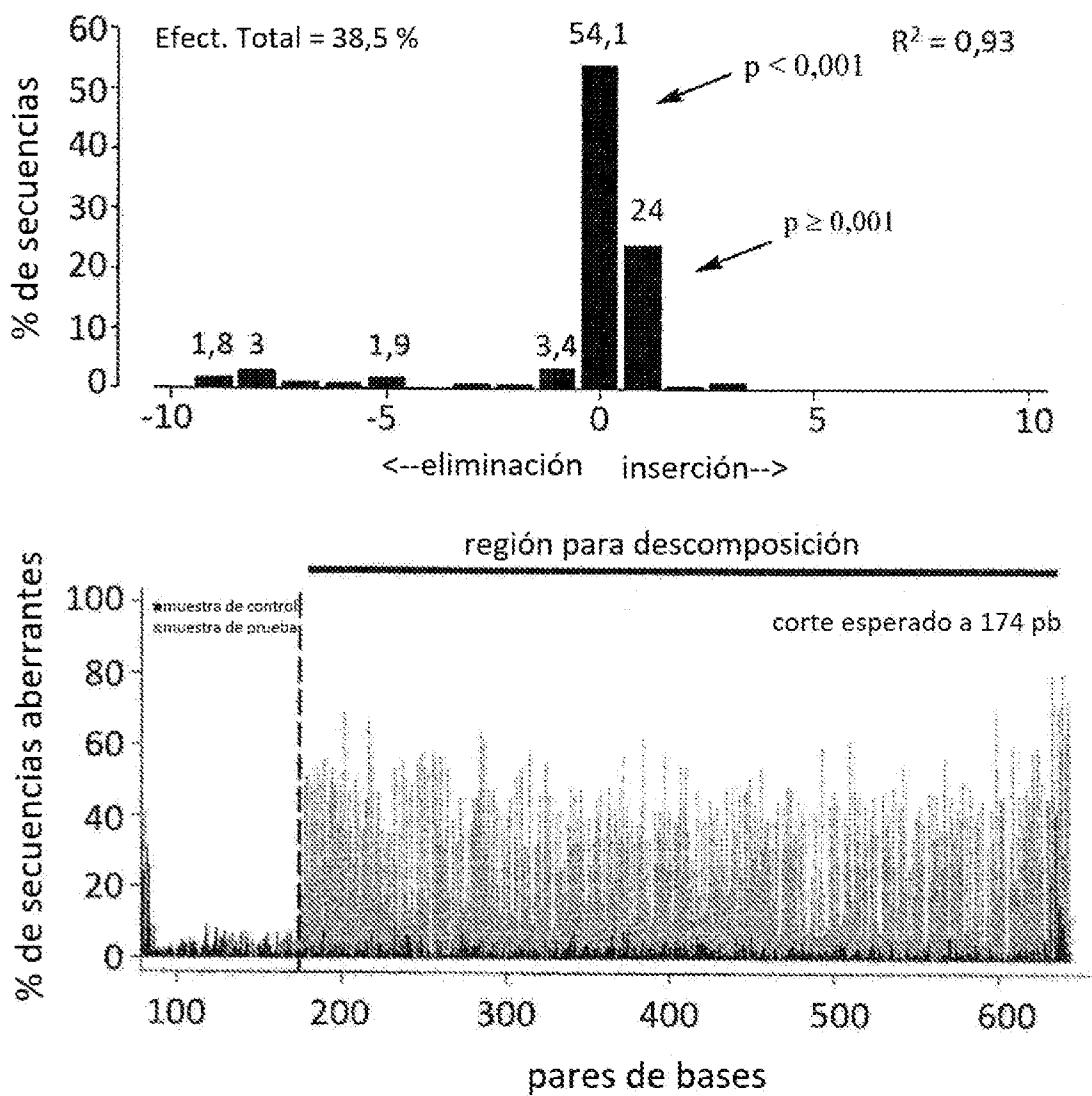


FIG. 7

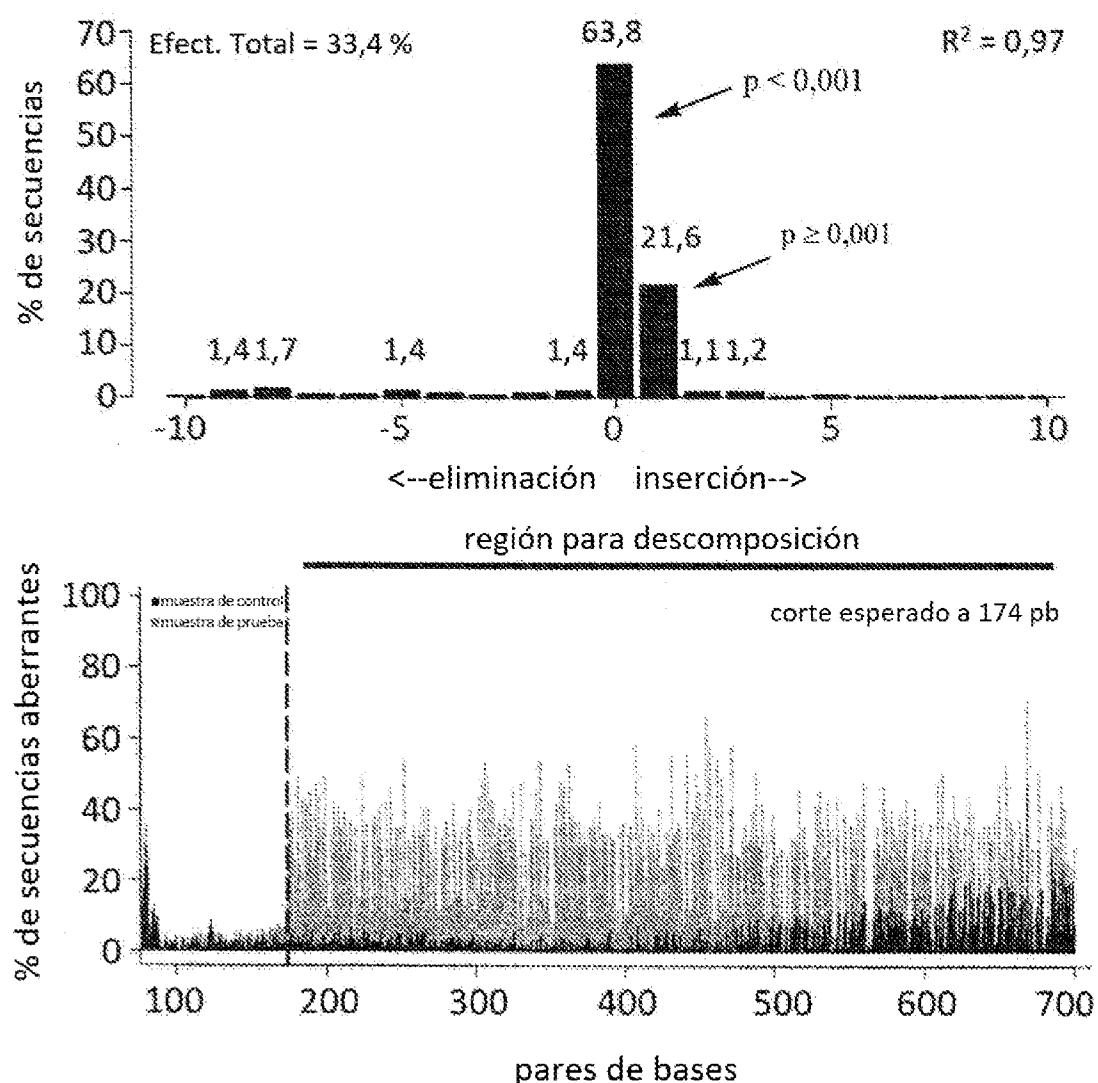


FIG. 8

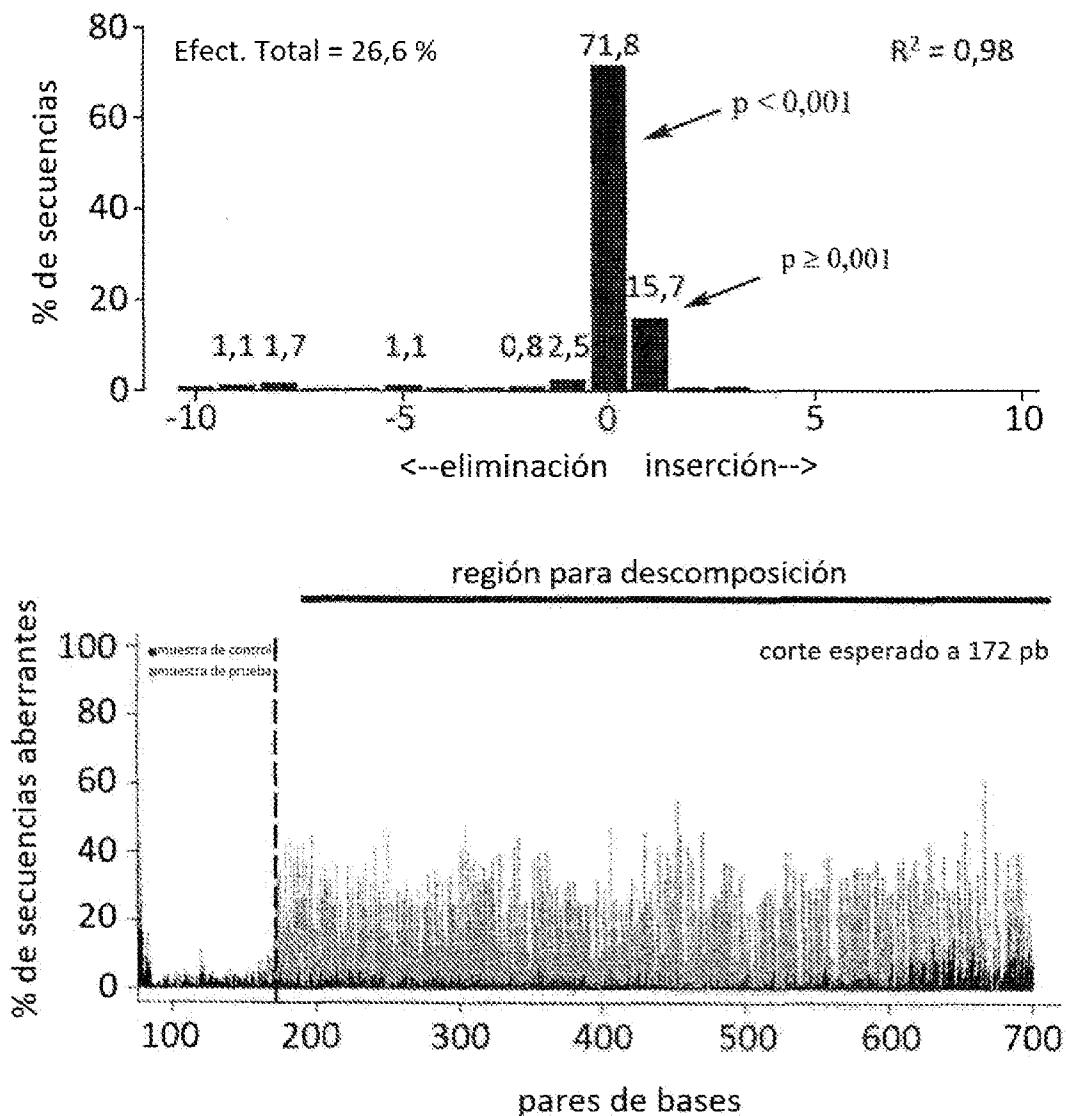
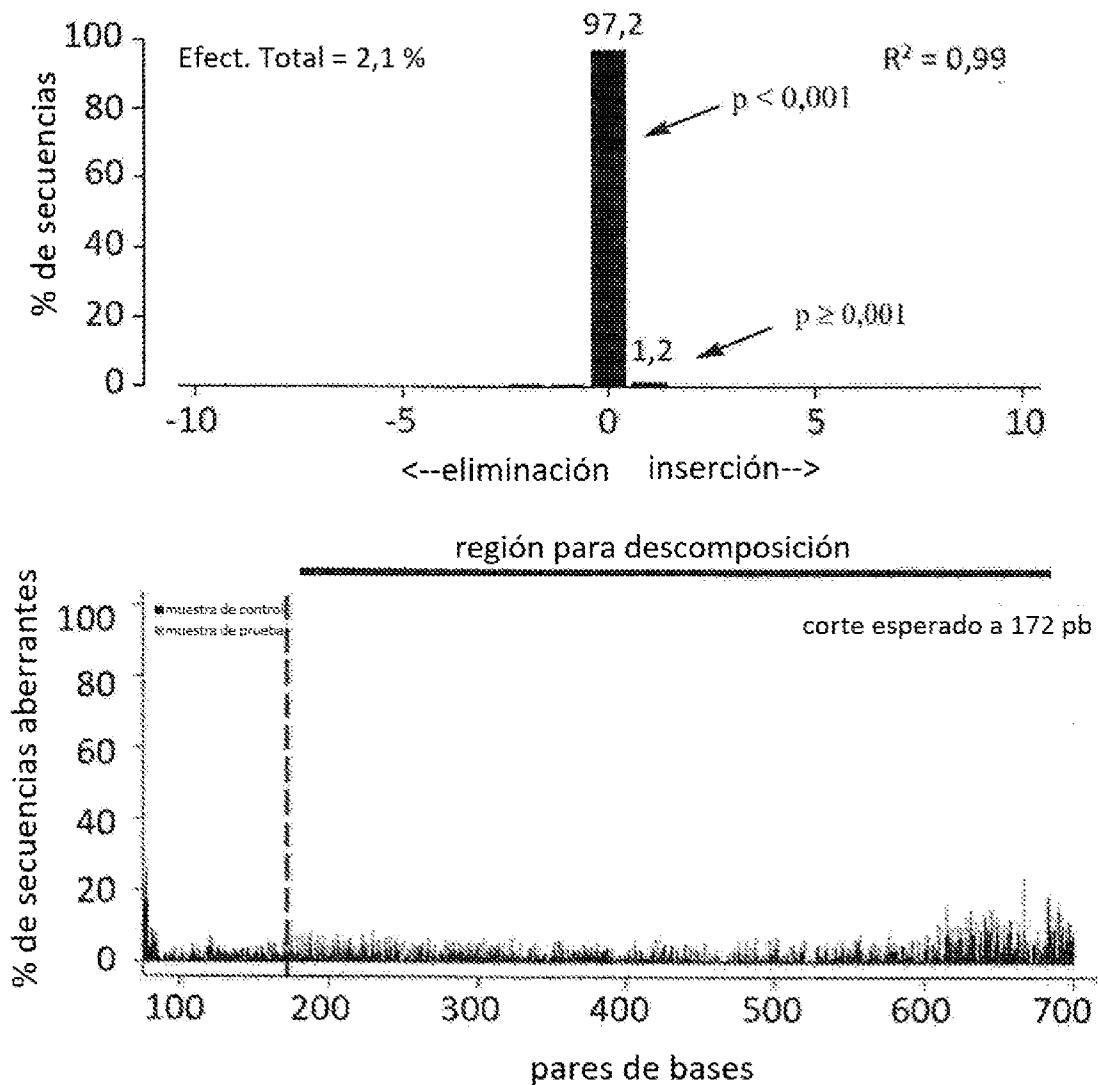


FIG. 9



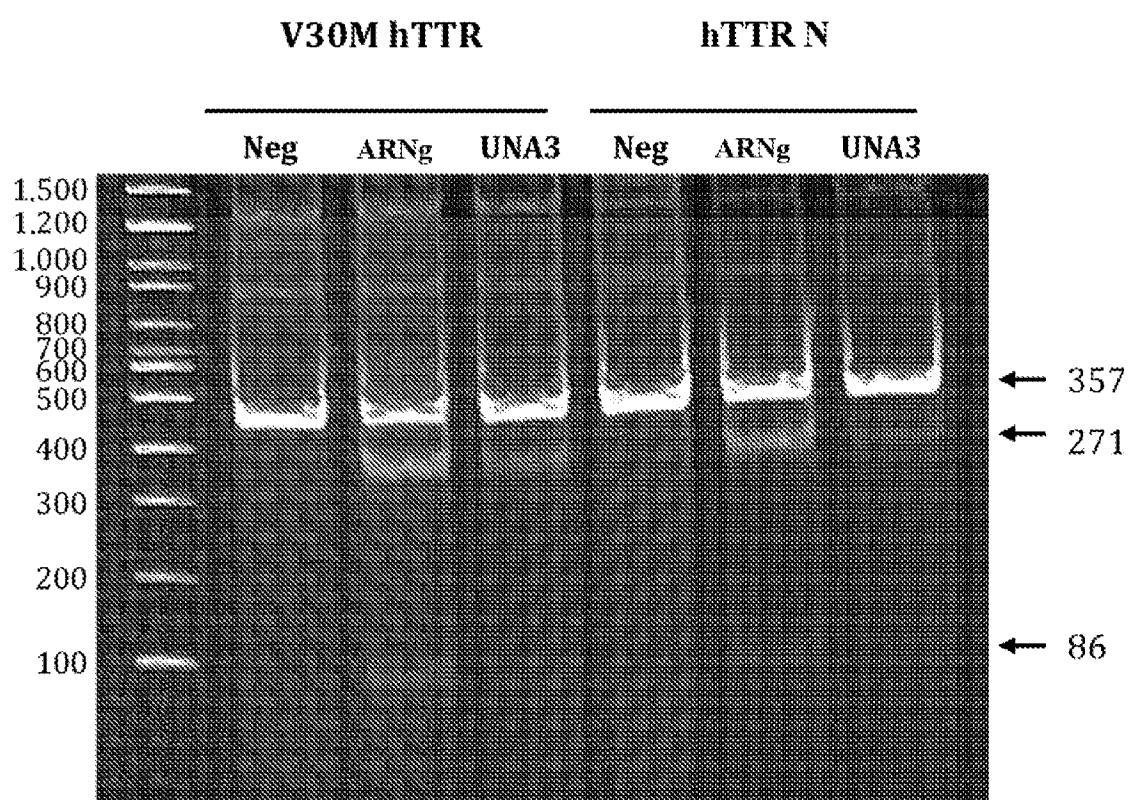


FIG. 10

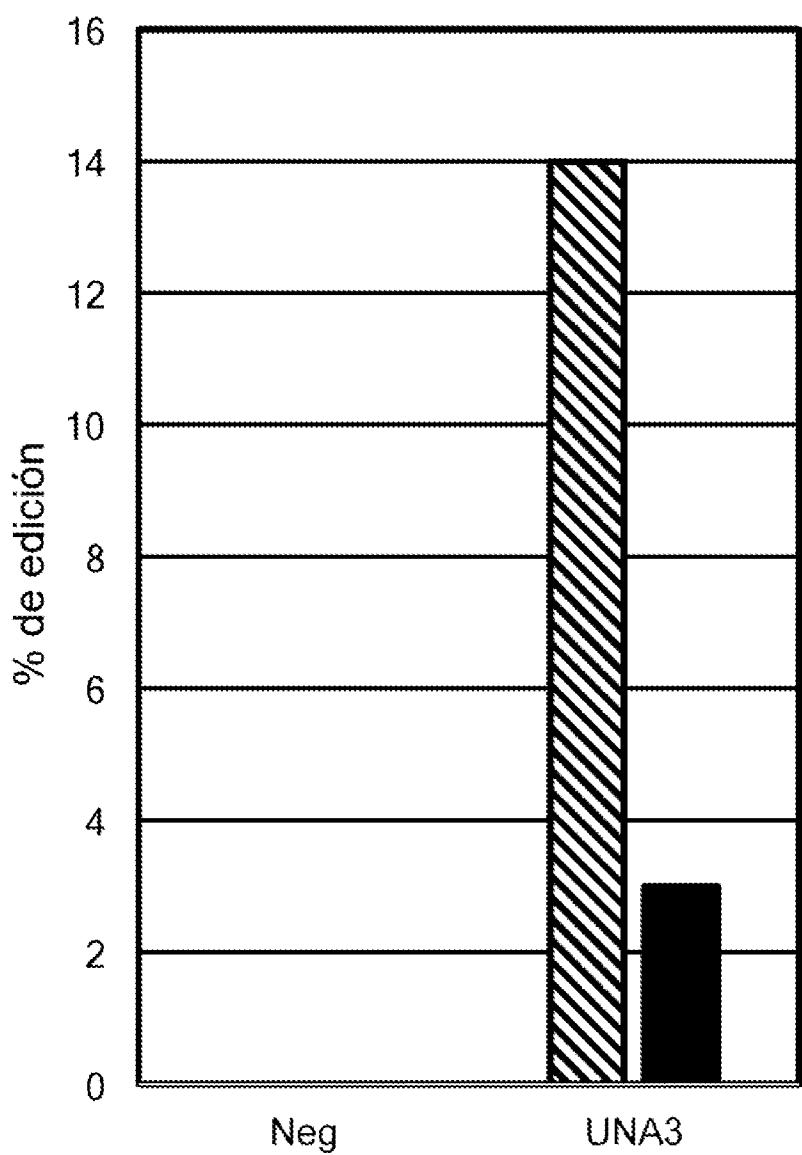


FIG. 11

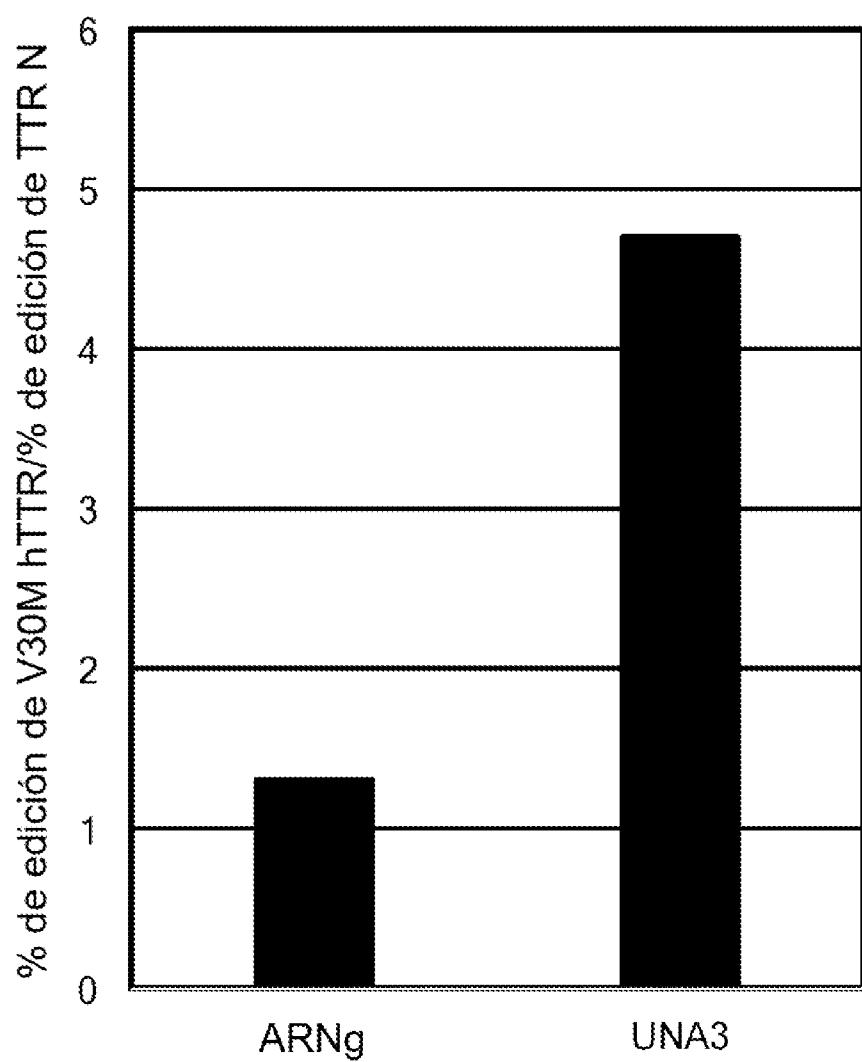


FIG. 12

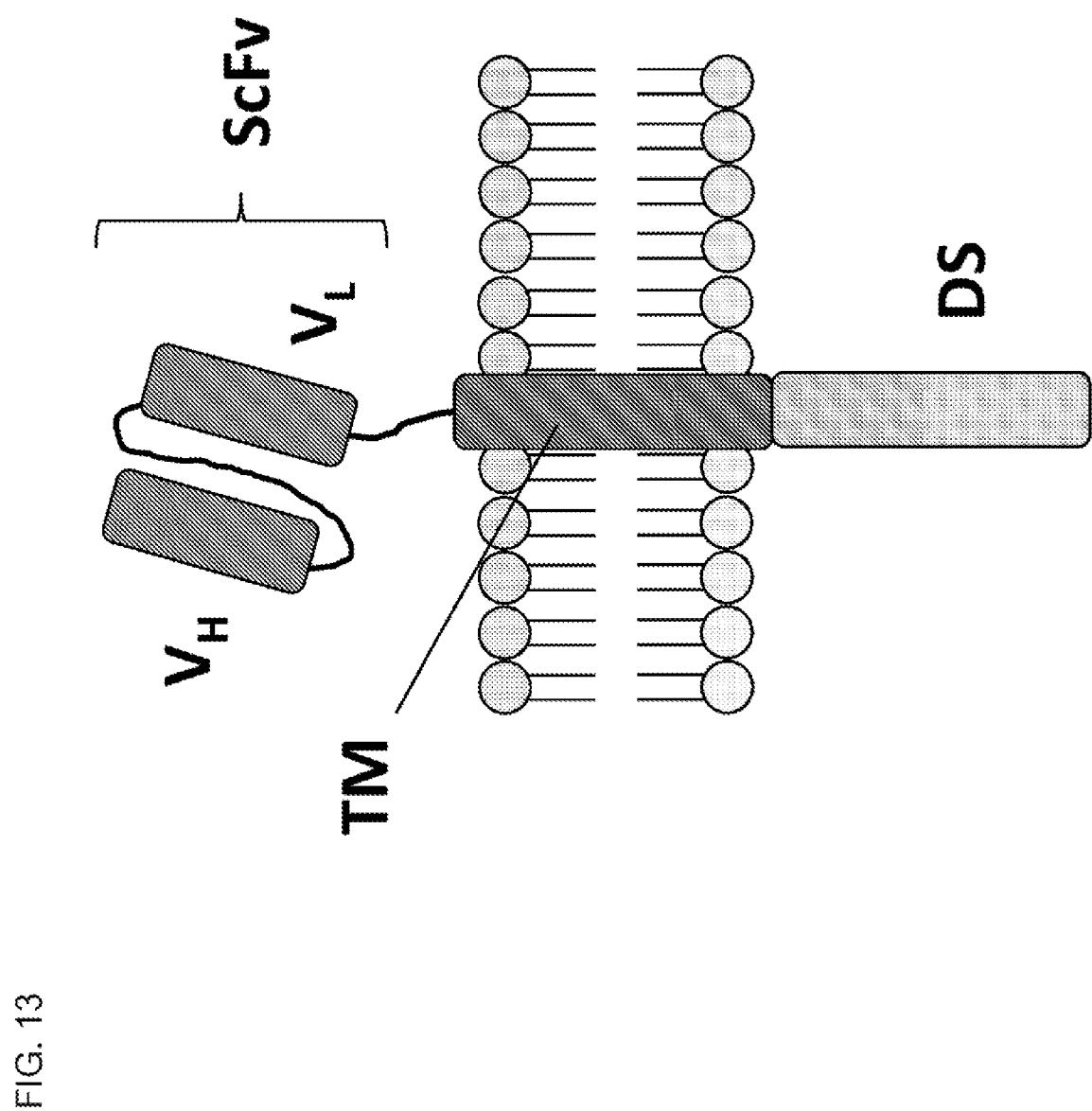


FIG. 14

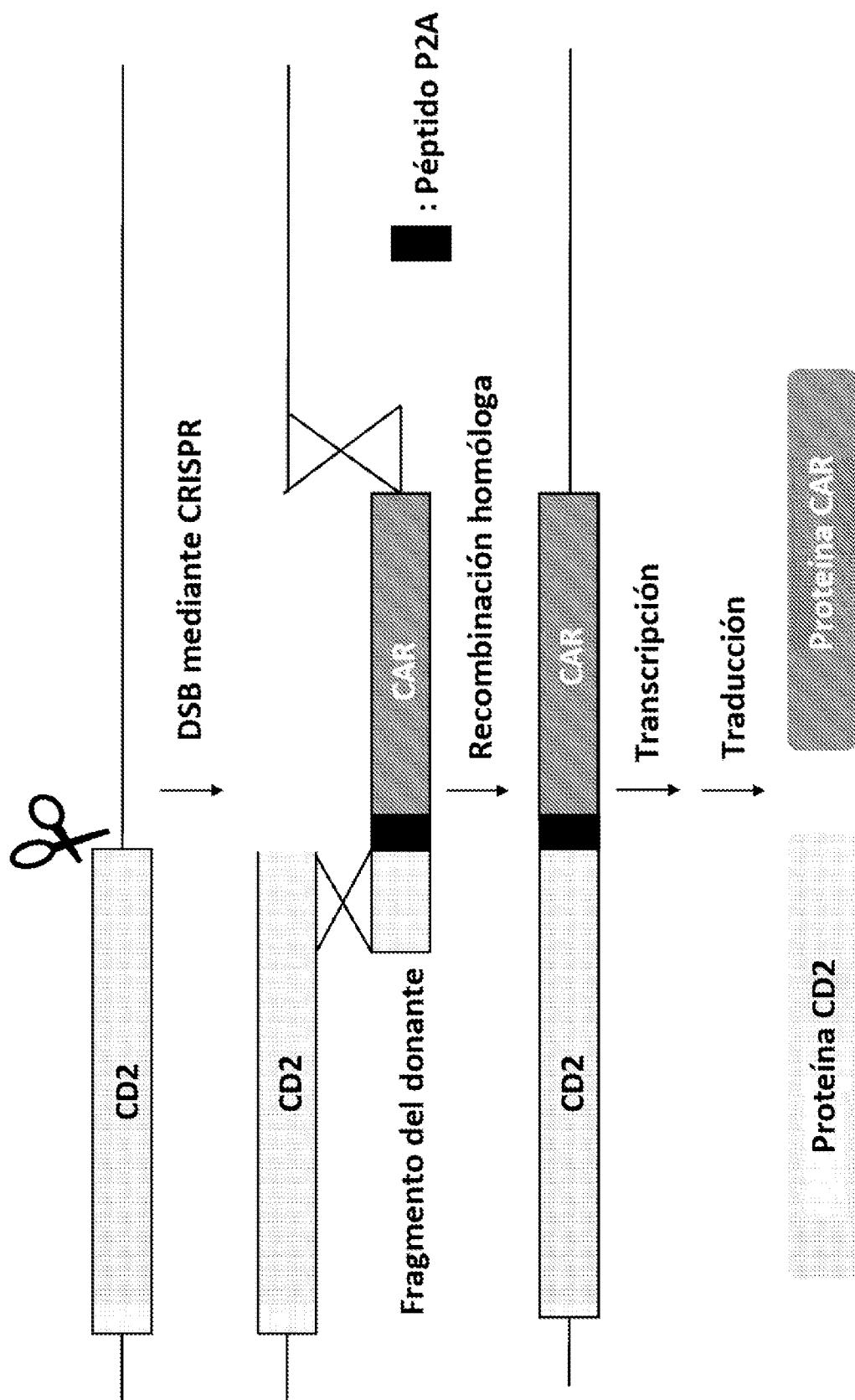


FIG. 15

