



MD/EP 3445388 T2 2024.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3445388 (13) T2

(51) Int. Cl:A61K 38/46 (2006.01.01)
C12N 9/22 (2006.01.01)
C12N 15/10 (2006.01.01)
C12N 15/113 (2010.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0261 (22) Data de depozit: 2017.04.18 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17727373.7, 2017.04.18 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3445388, 2019.02.27 (31) Numărul cererii prioritare: 201662324024 P; 201662382522 P; 201662429428 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.04.18; 2016.09.01; 2016.12.02 (33) Țara cererii prioritare: US; US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 07/2024, 2024.07.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 16/2024, 2024.04.17 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 03/2019, 2019.03.31
(71) Solicitant: VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED, US (72) Inventatori: COWAN Chad Albert, US; LUNDBERG Ante Sven, US; CHAKRABORTY Tirtha, US; LIN Michelle I-ching, US; MISHRA Bibhu Prasad, US; PAIK Elizabeth Jae-eun, US; KERNYTSKY Andrew, US; BORLAND Todd Douglass, US (73) Titular: VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED, US (74) Mandatar autorizat: SOCOLOVA Sofia	

(54) Materiale și metode pentru tratamentul hemoglobinopatiilor

(57) Rezumat:

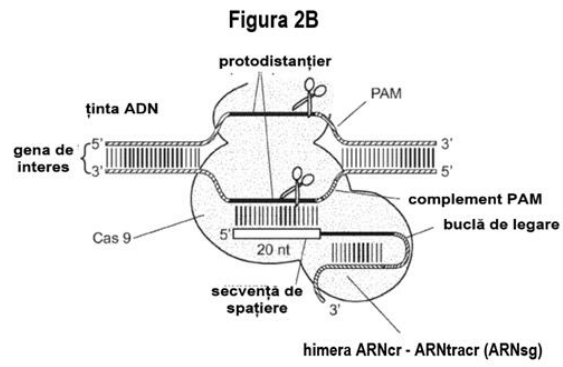
1
Materiale și metode pentru
tratamentul unui pacient care suferă de
hemoglobinopatii, atât *ex vivo*, cât și *in vivo*, și
materiale și metode pentru deleția, modularea
sau inactivarea unei secvențe de control
transcripțional al unei gene BCL11A într-o
celulă, prin editarea genomului.

Revendicări: 13

Figuri: 40

2

MD/EP 3445388 T2 2024.07.31



(54) Materials and methods for treatment of hemoglobinopathies

(57) Abstract:

1
Materials and methods for treating a patient with a hemoglobinopathy, both *ex vivo* and *in vivo*, and materials and methods for deleting, modulating, or inactivating a transcriptional control sequence of a BCL11A

2
gene in a cell by genome editing.
Claims: 13
Fig.: 40

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****Domeniu MATERIALE ȘI METODE PENTRU TRATAMENTUL HEMOGLOBINOPATIILOR**

Prezenta invenție furnizează materiale și metode pentru tratamentul pacienților care suferă de hemoglobinopatii, atât *ex vivo*, cât și *in vivo*. În plus, prezenta invenție furnizează materiale și metode pentru deleția, modularea sau inactivarea unei secvențe de control transcripțional a unei gene limfom 11A cu celule B (BCL11A) într-o celulă, prin editarea genomului.

Lista de secvențe

Această invenție conține o listă de secvențe într-o formă care poate să fie citită de calculator (denumire fișier: 160077PCT Sequence Listing; 14.446.299 de octeți - fișier text ASCII; creat la 7 aprilie 2017).

Cunoștințe de Bază ale Invenției

Hemoglobinopatiile includ anemiile de origine genetică, care au drept rezultat scăderea producției și/sau distrugerea crescută a globulelor roșii. Aceste tulburări includ, de asemenea, defecte genetice care au drept rezultat producerea de hemoglobine anormale având asociată o incapacitate de a menține concentrația de oxigen. Multe dintre aceste tulburări sunt denumite β -hemoglobinopatii din cauza insuficienței de a produce proteina β -globinei normală în cantități suficiente sau insuficienței de a produce proteina β -globinei normală în întregime. De exemplu, β -talasemiile rezultă dintr-un defect parțial sau complet în ceea ce privește exprimarea genei β -globinei, conducând la hemoglobină adultă (HbA) deficitară sau absentă. Anemia falciformă apare ca urmare a unei mutații punctuale a genei structurale a β -globinei, care conduce la declanșarea unei hemoglobine anormale (HbS) (Atweh, Semin.Hematol. 38(4):367-73 (2001)). Hemoglobinopatiile au drept rezultat o reducere a capacității transportului de oxigen în sânge, ceea ce poate să conducă la simptome precum: oboseală, amețeli și dificultăți de respirație, în special atunci când sunt executate exerciții fizice.

În cazul pacienților care sunt diagnosticați că suferă de hemoglobinopatie, în prezent, sunt disponibile numai câteva tratamente simptomatice, cum ar fi transfuzia de sânge, pentru a crește nivelul de oxigen din sânge.

Ingineria genomului se referă la strategiile și tehnicile utilizate pentru modificarea specifică țintită a informațiilor genetice (genomului) organismelor vii. Ingineria genomului este un domeniu de cercetare foarte activ datorită gamei largi de aplicații posibile, în special, în domeniile sănătății umane; de exemplu, corectarea unei gene care poartă o mutație dăunătoare sau pentru explorarea funcției unei gene. Primele tehnologii dezvoltate pentru a insera o transgenă într-o celulă vie au fost, adesea, limitate de natura aleatorie a inserării noii secvențe în genom. Inserțiile aleatorii în genom pot avea ca rezultat perturbarea reglării normale a genelor învecinate, ducând la efecte nedorite severe. În plus, tehnologiile de integrare aleatorie oferă o slabă reproductibilitate, deoarece nu există nicio garanție că secvența ar fi inserată în același loc, în două celule diferite. Strategiile recente de inginerie a genomului, cum ar fi ZFN-urile, TALEN-urile, HE-urile și MegaTAL-urile, permit modificarea unei zone specifice a ADN-ului, crescând astfel precizia corectării sau precizia inserției în comparație cu primele tehnologii. Aceste platforme mai noi oferă un grad mult mai larg de reproductibilitate, dar au încă limitările lor.

În ciuda eforturilor care au fost întreprinse de cercetători și profesioniștii din domeniul medical din întreaga lume, care au încercat să abordeze hemoglobinopatiile, rămâne încă o necesitate stringentă aceea de a dezvolta tratamente sigure și eficiente pentru hemoglobinopatii.

Rezumat

Prezenta dezvoltare prezintă o abordare care se adresează bazei genetice a hemoglobinopatiilor. Prin utilizarea instrumentelor de inginerie a genomului pentru a crea modificări permanente ale genomului care pot șterge, modula sau inactiva o secvență de control transcripțional a genei BCL11A cu un singur tratament, terapia rezultată poate să amelioreze efectele hemoglobinopatiilor.

Prezenta invenție este definită prin revendicările care sunt anexate.

În prezenta dezvoltare sunt furnizate metode celulare, *ex vivo* și *in vivo* pentru a crea modificări permanente ale genomului prin deleția, modularea sau inactivarea unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A, care poate fi utilizată pentru tratarea hemoglobinopatiilor. De asemenea, în prezenta dezvoltare sunt furnizate componente, kit-uri și compoziții pentru aplicarea unor astfel de metode. De asemenea, sunt descrise celule produse prin astfel de metode. Exemple de hemoglobinopatii pot fi anemia cu celule falciforme și talasemia (α , β , δ , γ și combinații ale acestora).

În prezenta dezvoltare este furnizată o metodă pentru editarea unei gene limfom 11A cu celule B (BCL11A) într-o celulă umană prin editarea genomului, metodă care cuprinde etapa de introducere în celula umană a uneia sau a mai multor endonucleaze ale acidului dezoxiribonucleic (ADN) pentru a

determina una sau mai multe ruperi monocatenare (SSB-uri) sau ruperi dublu-catenare (DSB-uri), în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A, care are drept rezultat deleția, modularea sau inactivarea permanentă a unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A. Secvența de control transcripțional poate să fie localizată în cel de-al doilea intron al genei BCL11A. Secvența de control transcripțional poate să fie localizată într-un situs de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) al genei BCL11A.

De asemenea, în prezenta dezvoltare este descrisă o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient (de exemplu, un pacient uman) care suferă de un tip de hemoglobinopatie, metodă care cuprinde etapele de: crearea unei celule stem pluripotente induse specifice pacientului (iPSC); editarea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A a celulei iPSC; diferențierea iPSC editată genomic într-o celulă progenitoare hematopoietică; și implantarea celulei progenitoare hematopoietice în pacient.

Etapă de creare a unei celule stem pluripotente induse specifice pacientului (iPSC) poate să cuprindă: izolarea unei celule somatice de la pacient; și introducerea unui set de gene asociate cu pluripotența în celula somatică pentru a determina celula somatică să devină o celulă stem pluripotentă. Celula somatică poate să fie un fibroblast. Setul genelor asociate pluripotenței poate să fie una sau mai multe dintre genele selectate din grupul constând din OCT4, SOX2, KLF4, Lin28, NANOG și cMYC.

Etapă de editare în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe ADN, care codifică un element reglator al genei BCL11A a iPSC poate să cuprindă introducerea în iPSC a uneia sau a mai multor endonucleaze ale acidului dezoxiribonucleic (ADN) pentru a determina una sau mai multe ruperi monocatenare (SSB-uri) sau dublu-catenare (DSB-uri) în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A care are drept rezultat deleția permanentă, modularea permanentă sau inactivarea permanentă a unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A.

Etapă de diferențiere a iPSC editată de genom într-o celulă progenitoare hematopoietică poate să cuprindă unul sau mai multe dintre următoarele: tratament cu o combinație de molecule mici, livrarea de factori de transcripție (de exemplu, factori de transcripție master) sau livrarea de factori de transcripție care codifică ARNm (de exemplu, factori de transcripție master).

Etapă de implantare a celulei progenitoare hematopoietice în pacient poate să cuprindă implantarea celulei progenitoare hematopoietice în pacient prin transplant, prin injecție locală, prin perfuzie sistemică sau prin combinații ale acestora.

De asemenea, în prezenta dezvoltare este descrisă o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient (de exemplu, un pacient uman) care suferă de un tip de hemoglobinopatie, metodă care cuprinde etapele de: izolarea unei celule stem mezenchimală de la pacient; editarea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A a celulei stem mezenchimală; diferențierea celulei stem mezenchimală editată genomic într-o celulă progenitoare hematopoietică; și implantarea celulei progenitoare hematopoietice în pacient.

Celula stem mezenchimală poate să fie izolată din măduva osoasă sau din sângele periferic al pacientului. Etapa de izolare a unei celule stem mezenchimală de la pacient poate să cuprindă aspirarea măduvei osoase și izolarea celulelor mezenchimale utilizând medii de centrifugare cu gradient de densitate.

Etapă de editare în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A a celulei stem mezenchimală poate să cuprindă introducerea în celula stem mezenchimală a uneia sau a mai multor endonucleaze ale acidului dezoxiribonucleic (ADN) pentru a determina una sau mai multe ruperi monocatenare (SSB-uri) sau dublu-catenare (DSB-uri) în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A, care are drept rezultat deleția permanentă, modularea permanentă sau inactivarea permanentă a unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A.

Etapă de diferențiere a celulei stem mezenchimală editată genomic într-o celulă progenitoare hematopoietică poate să cuprindă unul sau mai multe dintre următoarele: tratament cu o combinație de molecule mici, livrarea factorilor de transcripție (de exemplu, factorii de transcripție master) sau livrarea factorilor de transcripție care codifică ARNm (de exemplu, factori de transcripție master).

Etapă de implantare a celulei progenitoare hematopoietice în pacient poate să cuprindă implantarea celulei progenitoare hematopoietice în organismul pacientului prin transplant, prin injecție locală, prin perfuzie sistemică sau prin combinații ale acestora.

De asemenea, în prezenta dezvoltare este descrisă o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient (de exemplu, un pacient uman) care suferă de un tip de hemoglobinopatie, metodă care cuprinde etapele de: izolarea unei celule progenitoare hematopoietice de la pacient; editarea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN, care codifică un element reglator al

genei BCL11A a celulei progenitoare hematopoietice; și implantarea celulei progenitoare hematopoietice editată genomic în organismul pacientului.

Metoda poate să cuprindă, în plus, tratarea pacientului cu factorul de stimulare a coloniilor de granulocite (GCSF) înainte de etapa de izolare a unei celule progenitoare hematopoietice de la pacient.

5 Etapa de tratament a pacientului cu factorul de stimulare a coloniilor de granulocite (GCSF) poate să fie efectuată în combinație cu Plerixaflor.

Etapa de izolare a unei celule progenitoare hematopoietice de la pacient poate să cuprindă izolarea celulelor CD34+.

Etapa de editare în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A a celulei progenitoare hematopoietice poate să cuprindă introducerea în celula progenitoare hematopoietică a unuia sau a mai multor endonucleaze ale acidului dezoxiribonucleic (ADN) pentru a determina una sau mai multe ruperi monocatenare (SSB-uri) sau dublu-catenare (DSB-uri) în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A, care are drept rezultat deleția permanentă, modularea permanentă sau inactivarea permanentă a unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A.

10

15

Etapa de implantare a celulei progenitoare hematopoietice editată genomic în organismul pacientului poate să cuprindă implantarea celulei progenitoare hematopoietice editată genomic în pacient prin transplant, prin injecție locală, prin perfuzie sistemică sau prin combinații ale acestora.

De asemenea, în prezenta dezvăluire este descrisă o metodă *in vivo* pentru tratamentul unui pacient (de exemplu, un pacient uman) care suferă de un tip de hemoglobinopatie, metodă care cuprinde etapa de editare a unei gene BCL11A într-o celulă a pacientului.

20

Etapa de editare a unei gene BCL11A într-o celulă a pacientului poate să cuprindă introducerea în celulă a uneia sau a mai multor endonucleaze ale acidului dezoxiribonucleic (ADN) pentru a determina una sau mai multe ruperi monocatenare (SSB-uri) sau dublu-catenare (DSB-uri) în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A, care are drept rezultat deleția permanentă, modularea permanentă sau inactivarea permanentă a unui control transcripțional al genei BCL11A. Celula poate să fie o celulă de măduvă osoasă, o celulă progenitoare hematopoietică, o celulă CD34+ sau combinații ale acestora.

25

Una sau mai multe endonucleaze ADN pot fi endonucleazele Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (de asemenea, cunoscută sub denumirea de Csn1 și Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, sau Cpf1; un omolog al acestora, o recombinare a moleculei naturale a acestora, versiuni cu codon optimizat ale acestora sau versiuni modificate ale acestora și combinații ale acestora.

30

35

Metoda poate să cuprindă introducerea în celulă a uneia sau a mai multor polinucleotide care codifică una sau mai multe endonucleaze ADN. Metoda poate să cuprindă introducerea în celulă a unuia sau a mai multor acizi ribonucleici (ARN-uri), care codifică una sau mai multe endonucleaze ADN. Una sau mai multe polinucleotide sau unul sau mai multe ARN-uri pot să fie una sau mai multe polinucleotide modificate sau unul sau mai multe ARN-uri modificate. Una sau mai multe endonucleaze ADN pot să fie una sau mai multe proteine sau polipeptide. Una sau mai multe proteine sau polipeptide pot să fie flancate la N-terminal, la C-terminal sau atât la N-terminal, cât și la C-terminal de unul sau de mai multe semnale de localizare nucleară (NLS-uri). Una sau mai multe proteine sau polipeptide pot să fie flancate de două NLS-uri, un NLS situat la N-terminal și cel de-al doilea NLS situat la C-terminal. Unul sau mai multe NLS-uri pot să fie un NLS SV40.

40

45

Metoda poate să cuprindă, în plus, introducerea în celulă a unuia sau a mai multor acizi ribonucleici ghid (ARNg). Unul sau mai mulți ARNg pot să fie ARN ghid cu o singură moleculă (ARNsg). Unul sau mai mulți ARNg sau unul sau mai mulți ARNsg pot să fie unul sau mai mulți ARNg modificați, unul sau mai mulți ARNsg modificați sau combinații ale acestora. Unul sau mai mulți ARNsg modificați pot să cuprindă trei resturi de 2'-O-metil-fosforotioat la sau în vecinătatea fiecăruia dintre extremitățile sale 5' și 3'. ARNsg modificat poate să fie secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959. Una sau mai multe endonucleaze ADN pot să fie pre-complexate cu unul sau mai mulți ARNg, cu unul sau mai mulți ARNsg sau cu combinații ale acestora pentru a forma una sau mai multe ribonucleoproteine (RNP-uri). Raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza ADN în RNP poate să fie 1:1. ARNsg poate să cuprindă secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959, endonucleaza ADN poate să fie *Cas9 din specia S. pyogenes* care cuprinde un NLS SV40 N-terminal și NLS SV40 C-terminal și raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza ADN poate să fie 1:1. Cererea de brevet de invenție U.S. 201505044772, care se referă la o proteină Cas de fuziune chimeră, prezintă secvența de acid nucleic SECV ID NO: 71.959. Numita secvență este, de asemenea, dezvăluită în publicația cererii de

50

55

brevet de invenție internațională WO2015183025, care se referă la o metodă de analiză a unui genotip utilizând un sistem CRISPR/Cas.

Metoda poate să cuprindă, în plus, introducerea în celulă a unei matrițe donor de polinucleotidă care cuprinde o genă BCL11A de tip sălbatic sau un ADNc care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată.

Metoda poate să cuprindă, în plus, introducerea în celulă a unui acid ribonucleic ghid (ARNg) și a unei matrițe donor de polinucleotidă care cuprinde o genă BCL11A de tip sălbatic sau un ADNc care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată. Una sau mai multe endonucleaze ADN pot să fie una sau mai multe endonucleaze Cas9 sau Cpf1, care determină o rupere monocatenară (SSB) sau una dublu-catenară (DSB) la un locus din interiorul sau din vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A, care facilitează inserția unei noi secvențe din matrița donor de polinucleotidă în ADN-ul cromozomial la locus, ceea ce are drept rezultat inserția, modularea sau inactivarea permanentă a secvenței de control transcripțional a ADN-ului cromozomial proximal de locus. ARNg-ul poate să cuprindă o secvență distanțier care este complementară unui segment al locusului. Proximal poate să însemne nucleotide atât în amonte cât și în aval în raport cu locusul.

Metoda poate să cuprindă, în plus, introducerea în celulă a unuia sau a mai multor acizi ribonucleici ghid (ARNg) și a unei matrițe donor de polinucleotidă care cuprinde o genă BCL11A de tip sălbatic sau un ADNc care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată. Una sau mai multe endonucleaze ADN pot să fie una sau mai multe endonucleaze Cas9 sau Cpf1, care determină sau generează o pereche de ruperi monocatenare (SSB-uri) și/sau ruperi dublu-catenare (DSB-uri), prima rupere la un locus 5' și cea de-a doua rupere la un locus 3', în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A, care facilitează inserția unei noi secvențe din matrița donor de polinucleotidă în ADN-ul cromozomial între locusul 5' și locusul 3', care are drept rezultat inserția, modularea sau inactivarea secvenței de control transcripțional a ADN-ului cromozomial între locusul 5' și locusul 3'. Un ARN ghid poate să formeze o pereche de ruperi monocatenare (SSB-uri) sau de ruperi-dublu catenare (DSB-uri). ARN-ul monocatenar ghid poate să cuprindă o secvență distanțier care este complementară fie locusului 5', fie locusului 3'. În mod alternativ, metoda poate să cuprindă un prim ARN ghid și un al doilea ARN ghid. Primul ARN ghid poate să cuprindă o secvență distanțier care este complementară unui segment al locusului 5' și cel de-al doilea ARN ghid poate să cuprindă o secvență distanțier care este complementară unui segment al locusului 3'. Matrița de donor poate să fie monocatenară sau dublu-catenară. Secvența de control transcripțional modificată poate să fie localizată în cel de-al doilea intron al genei BCL11A. Secvența de control transcripțional modificată poate să fie localizată într-un situs de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) al genei BCL11A.

Unul sau doi ARNg-uri pot să fie unul sau doi ARN-uri ghid cu o singură moleculă (ARNsg). Unul sau doi ARNg-uri sau unul sau doi ARNsg-uri pot să fie unul sau doi ARNg-uri modificați sau unul sau doi ARNsg-uri modificați. Un singur ARNsg modificat poate să cuprindă trei resturi de 2'-O-metil-fosforotioat la sau în vecinătatea fiecăreia dintre extremitățile sale 5' și 3'. Un singur ARNsg modificat poate să fie secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959. Una sau mai multe endonucleaze Cas9 pot să fie pre-complexate cu unul sau doi ARNg-uri sau cu unul sau doi ARNsg-uri pentru a forma una sau mai multe ribonucleoproteine (RNP). Una sau mai multe endonucleaze Cas9 pot să fie flancate la N-terminal, la C-terminal sau la ambele N-terminal și C-terminal de unul sau de mai multe semnale de localizare nucleară (NLS-uri). Una sau mai multe endonucleaze Cas9 pot să fie flancate de două NLS-uri, un NLS situat la N-terminal și cel de-al doilea NLS situat la C-terminal. Unul sau mai multe NLS-uri pot să fie NLS SV40. Raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza Cas9 din ribonucleoproteina (RNP) poate să fie 1:1. Un singur ARNsg poate să cuprindă secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71 959, endonucleaza Cas9 poate să fie Cas9 din specia *S. pyogenes* care cuprinde un semnal de localizare nucleară (NLS) SV40 N-terminal și un semnal de localizare nucleară (NLS) SV40 C-terminal și raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza Cas9 poate să fie 1:1.

Inserția poate să fie realizată prin repararea direcționată pe omologie (HDR).

Ruperile SSB, DSB, la locusul 5' și/sau la locusul 3' pot să fie localizate în cel de-al doilea intron al genei BCL11A. Ruperile SSB, DSB, la locusul 5' și/sau la locusul 3' pot să fie localizate într-un situs de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) al genei BCL11A.

Metoda poate să cuprindă, în plus, introducerea în celulă a unuia sau a mai multor acizi ribonucleici ghid (ARNg-uri). Una sau mai multe endonucleaze ADN pot să fie una sau mai multe endonucleaze Cas9 sau Cpf1, care efectuează sau generează o pereche de ruperi monocatenare (SSB-uri) sau de ruperi dublu-catenare (DSB-uri), prima rupere monocatenară (SSB) sau dublu-catenară (DSB) la un locus 5' și cea de-a doua rupere monocatenară (SSB) sau dublu-catenară (DSB) la un locus 3', în

interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe ADN, care codifică un element reglator al genei BCL11A, care provoacă o deleție a ADN-ului cromozomial între locusul 5' și locusul 3', care are drept rezultat deleția permanentă, modularea permanentă sau inactivarea permanentă a secvenței de control transcripțional a ADN-ului cromozomial între locusul 5' și locusul 3'. Primul ARN ghid poate să cuprindă o secvență distanțier care este complementară unui segment al locusului 5' și cel de-al doilea ARN ghid cuprinde o secvență distanțier care este complementară unui segment al locusului 3'. Un singur ARN ghid poate crea o pereche de ruperi monocatenare (SSB-uri) și dublu-catenare (DSB-uri). ARN-ul ghid poate să cuprindă o secvență distanțier care este complementară fie locusului 5', fie locusului 3'. În mod alternativ, metoda poate să cuprindă un prim ARN ghid și un al doilea ARN ghid. Primul ARN ghid poate să cuprindă o secvență distanțier care este complementară unui segment al locusului 5' și cel de-al doilea ARN ghid poate să cuprindă o secvență distanțier care este complementară unui segment al locusului 3'.

Unul sau mai mulți ARNg-uri pot să fie unul sau mai mulți ARN-uri ghid cu o singură moleculă (ARNsg). Unul sau mai mulți ARNg-uri sau unul sau mai mulți ARNsg-uri pot să fie unul sau mai mulți ARNg-uri modificați sau unul sau mai mulți ARNsg-uri modificați. Un singur ARNsg modificat poate să cuprindă trei resturi de 2'-O-metil-fosforotioat la sau în vecinătatea fiecăreia dintre extremitățile sale 5' și 3'. Un singur ARNsg modificat poate să fie secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959. Una sau mai multe endonucleaze Cas9 pot să fie pre-complexate cu unul sau mai multe ARNg-uri sau cu unul sau mai mulți ARNsg-uri pentru a forma una sau mai multe ribonucleoproteine (RNP-uri). Una sau mai multe endonucleaze Cas9 pot să fie flancate la N-terminal, la C-terminal sau la ambele N-terminal și C-terminal de unul sau de mai multe semnale de localizare nucleară (NLS-uri). Una sau mai multe endonucleaze Cas9 pot să fie flancate de două semnale de localizare nucleară (NLS-uri) un semnal de localizare nucleară (NLS) situat la N-terminal și cel de-al doilea semnal de localizare nucleară (NLS) situat la C-terminal. Unul sau mai multe NLS-uri pot să fie NLS SV40. Raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza Cas9 din ribonucleoproteina (RNP) poate să fie 1:1. Un singur ARNsg poate să cuprindă secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959, endonucleaza Cas9 poate să fie o Cas9 din specia *S. pyogenes* care cuprinde un NLS SV40 N-terminal și un NLS SV40 C-terminal și raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza Cas9 poate să fie 1:1.

Locusul 5' și/sau locusul 3' poate să fie localizat în cel de-al doilea intron al genei BCL11A. Locusul 5' și/sau locusul 3' poate să fie localizat în situs-ul hipersensibil ADN 58+(DHS) al genei BCL11A.

Cas9 sau Cpf1 ARNm, ARNg și matrița donor pot să fie formulate sub formă de nanoparticule lipidice separate sau co-formulate sub formă de nanoparticulă lipidică.

Cas9 sau Cpf1 ARNm pot să fie formulate sub formă de nanoparticulă lipidică, iar ARNg -ul și matrița donor pot să fie livrate în celulă printr-un vector de virus adeno-asociat (AAV).

Cas9 sau Cpf1 ARNm pot să fie formulate într-o nanoparticulă lipidică, iar ARNg poate să fie livrat celulei prin electroporare, iar matrița donor poate să fie livrată în celulă printr-un vector de virus adeno-asociat (AAV).

Una sau mai multe ribonucleoproteine (RNP) pot să fie livrate celulei prin electroporare.

Editarea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A poate să reducă exprimarea genei BCL11A.

Gena BCL11A poate să fie localizată pe Cromozomul 2: 60.451.167 - 60.553.567 (Genome Reference Consortium - GRCh38).

De asemenea, în prezenta dezvoltare sunt furnizați unul sau mai mulți acizi ribonucleici ghid (ARNg-uri) pentru editarea unei gene BCL11A într-o celulă a unui pacient, care suferă de hemoglobinopatie. Unul sau mai mulți ARNg-uri pot să cuprindă o secvență distanțier selectată din grupul care constă din secvențe de acid nucleic din SECV ID NR: de la 1 până la 71 947 din Lista de secvențe. Unul sau mai mulți ARNg-uri pot să fie unul sau mai mulți ARN-uri ghid cu o singură moleculă (ARNsg). Unul sau mai mulți ARNg-uri sau unul sau mai mulți ARNsg-uri -uri pot să fie unul sau mai mulți ARNg-uri modificați sau unul sau mai mulți ARNsg-uri modificați. Unul sau mai mulți ARNsg-uri modificați pot să cuprindă trei resturi de 2'-O-metil-fosforotioat la sau în vecinătatea fiecăreia dintre extremitățile sale 5' și 3'. Unul sau mai mulți ARNsg-uri modificați pot să cuprindă secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959. De asemenea, în prezenta dezvoltare este furnizat un ARN ghid cu o singură moleculă (ARNsg) care cuprinde secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959.

Este evident faptul că invențiile care sunt descrise în prezenta dezvoltare nu sunt limitate la exemplele prezentate în acest Rezumat. Diferite alte aspecte sunt descrise și exemplificate în prezenta dezvoltare.

Descrierea pe Scurt a Desenelor

Diverse aspecte privind materialele și metodele de tratare a hemoglobinopatiilor, dezvăluite și descrise în această specificație, pot să fie mai bine înțelese cu referire la Figurile însoțitoare, în care: Figurile 1A-C prezintă plasmide care cuprind o genă cu codon optimizat pentru endonucleaza Cas9 din specia *S. pyogenes*.

5 Figura 1A este o plasmidă (CTx-1) care cuprinde o genă cu codon optimizat pentru endonucleaza Cas9 din specia *S. pyogenes*. Plasmida CTx-1 cuprinde, de asemenea, o secvență din scheletul de ARNg, care include o secvență distanțier de 20 bp din secvențele enumerate în SECV ID NR: de la 1 până la 29.482 din Lista de secvențe.

10 Figura 1B este o plasmidă (CTx-2) care cuprinde o genă cu codon optimizat diferit pentru endonucleaza Cas9 din specia *S. pyogenes*. Plasmida CTx-2 cuprinde, de asemenea, o secvență din scheletul de ARNg, care include o secvență distanțier de 20 bp din secvențele enumerate în SECV ID NR: de la 1 până la 29.482 din Lista de secvențe.

15 Figura 1C este o plasmidă (CTx-3) care cuprinde încă o altă genă cu codon optimizat diferit pentru endonucleaza Cas9 din specia *S. pyogenes*. Plasmida CTx-3 cuprinde, de asemenea, o secvență din scheletul de ARNg, care include o secvență distanțier de 20 pb din secvențele enumerate în SECV ID NR: de la 1 până la 29.482 din Lista de secvențe.

Figurile 2A-B prezintă sistemul CRISPR/Cas de tip II.

Figura 2A ilustrează sistemul CRISPR/Cas de tip II, care include ARNg.

Figura 2B ilustrează sistemul CRISPR/Cas de tip II, care include ARNsg.

20 Figura 3 prezintă rata pentru editarea ADN-ului în celulele stem hematopoietice și celulele progenitoare CD34+ (HSPC-uri) și fiecare dintre diferitele genotipuri HPFH rezultate.

Figurile 4A-C prezintă reglarea ascendentă în ceea ce privește exprimarea γ -globinei în eritrocite diferențiate din HSPC-urile CD34+ umane editate în vrac (*Bulk*) din sângele periferic mobilizat (mPB).

Figura 4A ilustrează hematopoieza din HSPC-urile CD34+ umane la eritrocite.

25 Figura 4B prezintă raportul $\gamma/18\text{ARNs}$ pentru fiecare dintre deleție/modificare.

Figura 4C prezintă raportul γ/α pentru fiecare dintre deleție/modificare.

Figurile 5A-B prezintă reglarea ascendentă în ceea ce privește exprimarea γ -globinei în eritrocite diferențiate de la toate coloniile cu gene-editate din HSPC-urile CD34+ umane.

Figura 5A prezintă raportul ARNm al globinei γ/α (%) pentru fiecare dintre coloniile cu gene-editate.

30 Figura 5B prezintă raportul ARNm-ului al globinei γ/α (%) pentru fiecare dintre modificările-de genă.

Figura 6 prezintă rata Intronului BCL11A (SPY101) de editare a ADN-ului în coloniile de eritroide derivate din HSPC-uri CD34+ umane.

Figurile 7A-B prezintă corelația dintre genotipul SPY101 și exprimarea γ -globinei în coloniile de celule unice diferențiate din HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane cu gene-editate.

35 Figura 7A prezintă procentul dintre γ -globină și α -globină (HBG/HBA) pentru fiecare dintre coloniile cu gene-editate.

Figura 7B prezintă procentul de globine de tipul- β (HBG/(HBB+HBG)) pentru fiecare dintre coloniile cu gene-editate.

40 Figura 8 prezintă eficacitatea editării pe-țintă a mai multor ARNg-uri în celulele CD34+ derivate din mPB-uri umane.

Figurile 9A-B prezintă testul de captură hibrid utilizat pentru a detecta editarea în afara țintei și rezultatele generate folosind testul de captură hibridă din HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane editate.

Figura 9A prezintă o schemă a unui test de captură hibrid utilizat pentru a detecta activitatea de editare la situsurile-în afara țintei potențiale.

45 Figura 9B prezintă activitatea în afara-țintei observată prin secvențierea capturii hibridă.

Figurile 10A-B prezintă rapoarte ale nivelurilor de ARNm din globină măsurate în celule provenite de la pacienți care suferă de SCD, de la un pacient, care suferă de β -talasemie și de la donori sănătoși.

Figura 10A prezintă rapoarte ale nivelurilor de ARNm din globină măsurate în celule provenite de la pacienții care suferă de SCD în comparație cu celule provenite de la donori sănătoși.

50 Figura 10B prezintă rapoarte ale nivelurilor de ARNm din globină măsurate în celule provenite de la un pacient, care suferă de β -talasemie în comparație cu celulele provenite donori sănătoși.

Figurile 11A-C prezintă strategia de citometrie în flux utilizată pentru a detecta diferite populații de celule modificate genetic precum și rezultatele generate folosind strategia de citometrie în flux.

Figura 11A prezintă subpopulații de HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane, markerii de suprafață asociați și strategia de clasificare prin citometrie în flux.

55 Figura 11B prezintă distribuția similară a tipurilor de celule în condițiile false și editate.

Figura 11C prezintă eficiențele ridicate similare de editare în cadrul subpopulațiilor în comparație cu eficiența de editare în vrac (*bulk*).

Figura 12 prezintă analiza populațiilor de celule CD45RA+ umane în cazul șoarecilor NSG la 8 săptămâni după grefarea HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane. Punctele datelor reprezintă animale individuale și prezintă procentul de celule vii care au fost celule vii CD45RA+ umane.

Figura 13 prezintă eficacitatea medie de editare a unui ARNg SPY101 și a proteinei Cas9 în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane la scară de laborator și clinic relevante.

Figura 14 prezintă o privire de ansamblu asupra designului studiului GLP/Toxicologie.

Figura 15 prezintă o vedere de ansamblu a unei abordări experimentale pentru analiza coloniei de celule în vrac (bulk) și a nivelurilor de proteine și de ARNm-uri de hemoglobină, în populațiile de celule eritroide derivate din HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane cu gene editate CRISPR/Cas9.

Figurile 16A-B prezintă mARN-ul γ -globinei și reglarea ascendentă proteinei în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate în vrac (bulk) modificate, cu diferite editări țintite.

Figura 16A prezintă reglarea ascendentă a ARNm-ului γ -globinei în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB

Figura 16B prezintă reglarea ascendentă proteinei γ -globinei în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate în vrac (bulk), modificate cu diferite editări țintite.

Figura 17 prezintă o reglare în creștere medie a γ -globinei în colonii individuale de HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate modificate cu modificări diferite țintite.

Figurile 18A-B prezintă o corelație dintre genotip și fenotip în coloniile editate țintă 5 și țintă 6 ale HSPC-urilor CD34+ derivate din mPB-uri umane eritroide diferențiate.

Figura 18A include diagramele din partea stângă care indică procentul (%) de colonii cu fiecare genotip și diagramele din partea dreaptă care prezintă procentul de colonii cu fiecare nivel de reglare ascendentă a γ -globinei (exprimat ca raportul $\gamma/(\gamma+\beta)$ ARNm al globinei).

Figura 18B prezintă nivelurile de transcript ARNm, pentru grupuri de colonii cu genotipuri similare.

Figura 19 prezintă o privire de ansamblu asupra unei abordări experimentale pentru analiza în bloc a eficienței editării din ADN-ul genomic, exprimarea hemoglobinei prin ARNm și proteine în populațiile de celule diferențiate eritroide derivate din HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane cu genă- editată prin CRISPR/Cas9.

Figurile 20A-B prezintă procentul de editare genică menținut pe parcursul diferențierii eritroide *ex vivo* a HSPC-urilor CD34+ derivate din mPB editate cu ARNg SPY101 sau ARNg SD2.

Figura 20A prezintă procentul de editare genică menținut pe parcursul diferențierii eritroide *ex vivo* a HSPC-urilor CD34+ derivate din mPB editate cu ARNg SPY101.

Figura 20B prezintă procentul de editare genică menținut pe parcursul diferențierii eritroide *ex vivo* a HSPC-urilor CD34+ derivate din mPB editate cu ARNg SD2.

Figurile 21A-D prezintă creșterea transcriptului γ -globinei reprezentat ca γ/α sau $\gamma/(\gamma+\beta)$ în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB cu genă-editată în zilele a 11-a sau a 15-a de diferențiere post- eritroidă.

Figura 21A prezintă creșterea transcriptului γ -globinei (γ/α) în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB cu genă-editată în ziua a 11-a post-diferențiere.

Figura 21B prezintă creșterea transcriptului γ -globinei (γ/α) în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB cu genă-editată în ziua a 15-a post-diferențiere.

Figura 21C prezintă creșterea transcriptului γ -globinei ($\gamma/(\gamma+\beta)$) în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB cu genă-editată în ziua a 11-a post-diferențiere.

Figura 21D prezintă creșterea transcriptului γ -globinei ($\gamma/(\gamma+\beta)$) în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB cu genă-editată în ziua a 15-a post-diferențiere.

Figurile 22A-B se referă la analiza FACS și la analiza intensității fluorescenței mediane (MFI) care prezintă reglarea ascendentă a γ -globinei în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB cu genă-editată în ziua a 15-a a post-diferențierii eritroide.

Figura 22A se referă la analiza FACS care prezintă reglarea ascendentă a γ -globinei în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB cu genă-editată la interval de 15 zile post-diferențiere eritroidă.

Figura 22B se referă la analiza MFI care prezintă reglarea ascendentă medie a γ -globinei în celulele CD34+ derivate din mPB+ cu genă-editată provenită de la 4 donori post-diferențiere eritroidă.

Figura 23A-D se referă la datele de spectrometrie de masă - cromatografie lichidă (LC-MS) în vrac (bulk), care prezintă reglarea ascendentă a γ -globinei, reprezentată ca γ/α sau $\gamma/(\gamma+\beta)$ în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri cu genă-editată în ziua a 15-a de post-diferențiere eritroidă.

Figura 23A se referă la datele de spectrometrie de masă - cromatografie lichidă (LC-MS) în vrac (bulk), care prezintă reglarea ascendentă a γ -globinei (γ/α) în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri cu genă-editată în ziua a 15-a post-diferențiere.

Figura 23B se referă la datele de spectrometrie de masă - cromatografie lichidă (LC-MS) în vrac (bulk), care prezintă reglarea ascendentă a γ -globinei (γ/α) în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB cu genă-editată

în ziua a 15-a post-diferențiere normalizată la γ -globină (γ/α) în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB transfectate cu ARNg GFP.

Figura 23C se referă la datele de spectrometrie de masă - cromatografie lichidă (LC-MS) în vrac (buk), care prezintă reglarea ascendentă a γ -globinei ($\gamma/(\gamma+\beta)$) în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB cu genă-editată în ziua a 15-a post-diferențiere.

Figura 23D se referă la datele de spectrometrie de masă-cromatografie lichidă (LC-MS) în vrac (buk), care prezintă reglarea γ -globinei ($\gamma/(\gamma+\beta)$) în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri cu genă-editată în ziua a 15-a post-diferențiere normalizată la γ -globină (γ/α) în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB transfectate cu ARNg GFP.

Figura 24 ilustrează designul de momeală de captură hibridă.

Figura 25 prezintă un grafic care ilustrează puterea metodei de captură hibridă pentru detectarea indelilor.

Figura 26 prezintă un rezumat al datelor generate din experimentele de captură hibridă folosind ARNg SPY101.

Figura 27 prezintă un rezumat al datelor generate din experimentele de captură hibridă folosind ARNg SD2.

Figura 28 prezintă un plan de studiu pentru experimentele de grefare.

Figurile 29A-E prezintă datele analizei de sângerare intermediară timp de 8 săptămâni în cazul șoarecilor netratați și al șoarecilor injectați cu celule editate false, celule editate cu ARNg GFP, celule editate cu ARNg SPY101 sau cu celule editate cu ARNg SD2.

Figura 29A prezintă datele de analiză intermediară a sângerării timp de 8 săptămâni în cazul șoarecilor (UnTx) netratați.

Figura 29B prezintă datele de analiză de sângerare intermediară timp de 8 săptămâni în cazul șoarecilor injectați cu celule editate false.

Figura 29C prezintă datele de analiză de sângerare intermediară timp de 8 săptămâni în cazul șoarecilor injectați cu celule editate cu ARNg GFP.

Figura 29D prezintă datele de analiză de sângerare intermediară timp de 8 săptămâni în cazul șoarecilor injectați cu celule editate cu ARNg SPY101.

Figura 29E prezintă datele de analiză de sângerare intermediară timp de 8 săptămâni în cazul șoarecilor injectați cu celule editate cu ARNg SD2.

Figura 30 prezintă datele de analiză intermediară a sângerării medii timp de 8 săptămâni.

Figura 31 prezintă procentul (%) de Indel pentru HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane electroporate cu diferite ARNm Cas9 și ARNg SPY101 (ARNm1-8) în comparație cu HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane electroporate cu proteina Cas9 complexată cu ARNg SPY101 (un complex ribonucleoproteic, RNP).

Figurile 32A-B prezintă numărul de celule normalizate și viabilitatea celulară a HSPC-urilor CD34+ derivate din mPB-uri umane electroporate cu diferite ARNm Cas9 și ARNg SPY101 (ARNm 1-8) în comparație cu HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane electroporate cu proteina Cas9 complexată cu ARNg SPY101 (RNP).

Figura 32A prezintă gradul de creștere a numărului de celule la interval de 48 de ore după electroporare pentru HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane electroporate cu diferite ARNm Cas9 și ARNg SPY101 (ARNm 1-8) în comparație cu HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane electroporate cu proteina Cas9 complexată cu ARNg SPY101 (RNP).

Figura 32B prezintă viabilitatea celulei la interval de 48 de ore post-electroporare pentru HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane electroporate cu diferite mARN-uri Cas9 și SPY101 ARNg (mARN 1-8) în comparație cu HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane electroporate cu proteina Cas9 complexată cu SPY101 ARNg (RNP).

Figurile 33A-C prezintă mai multe constructe RNP Cas9 utilizate pentru optimizarea RNP Cas9 și procentul (%) de Indel asociat cu fiecare dintre constructele Cas9 RNP.

Figura 33A prezintă mai multe constructe Cas9 RNP.

Figura 33B prezintă procentul (%) de Indel pentru fiecare dintre constructele RNP Cas9 folosind 1 μ g Cas9: 1 μ g ARNg SPY101.

Figura 33C prezintă procentul (%) de Indel pentru fiecare dintre constructele RNP Cas9 utilizând 3 μ g Cas9: 3 μ g ARNg SPY101.

Figurile 34A-B prezintă eficiența de editare genică procentuală (%) pentru HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane tratate fie cu ARNm Cas9, fie cu proteină Cas9 (Feldan sau Aldevron) la scară clinică și non-clinică.

Figura 34A prezintă eficiența de editare genică procentuală (%) pentru HSPC CD34+ derivate din mPB-uri umane sau din măduvă osoasă (BM) tratate fie cu ARNm Cas9, fie cu proteină Cas9 (Feldan sau Aldevron) la scară non-clinică.

Figura 34B prezintă eficiența de editare genică procentuală (%) pentru HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane tratate cu proteina Cas9 (Aldevron) la scară clinică.

Figurile 35A-B prezintă eficacitatea SPY101 în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane prin prezentarea raportului ARNm al globinei γ/α în procente (%) și a raportului ARNm al globinei $\gamma/(\gamma+\beta)$ în procente (%) pentru celulele tratate fie cu ARNm Cas9 și cu ARNm SPY101 sau Cas9 proteină (Feldan sau Aldevron) complexată cu ARNg SPY101.

Figura 35A prezintă raportul ARNm al globinei γ/α în procente (%) pentru HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane tratate fie cu ARNm Cas9 și cu ARNg SPY101, fie cu proteină Cas9 (Feldan sau Aldevron) complexată cu ARNg SPY101.

Figura 35B prezintă raportul ARNm al globinei $\gamma/(\gamma+\beta)$ în procente (%), pentru HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane tratate fie cu ARNm Cas9 și cu ARNg SPY101, fie cu proteină Cas9 (Feldan sau Aldevron) complexată cu ARNg SPY101.

Figurile 36A-B prezintă eficacitatea SPY101 în HSPC CD34+ derivate din măduva osoasă prin prezentarea raportului ARNm al globinei γ/α în procente (%) și a raportului ARNm al globinei $\gamma/(\gamma+\beta)$ în procente (%), pentru celulele tratate cu proteina Cas9 (Aldevron), optimizat tehnic vs. neoptimizat) complexat cu ARNg SPY101.

Figura 36A prezintă raportul ARNm γ/α globină în procente (%), pentru HSPC CD34+ derivate din măduva osoasă tratate cu proteina Cas9 complexată cu ARNg SPY101.

Figura 36B prezintă raportul ARNm al globinei $\gamma/(\gamma+\beta)$ în procente (%), pentru HSPC CD34+ derivate din măduva osoasă tratate cu proteină Cas9 complexată cu ARNg SPY101.

Figurile 37A-B prezintă eficacitatea SPY101 în eșantioanele pacienților care suferă de SCD și de β -talasemie.

Figura 37A prezintă raportul mediu ARNm al globinei $\gamma/(\gamma+\beta)$ în procente (%), pentru celulele diferențiate eritroide provenite de la șase pacienți care suferă de SCD și de la doi donori sănătoși care au fost tratați cu ARNg SPY101 și cu proteină Cas9. Toate valorile au fost scăzute din eșantioanele lor de control respective, care s-au tratat cu ARNg GFP și cu proteină Cas9.

Figura 37B prezintă raportul ARNm al globinei γ/α în procente (%), pentru celulele diferențiate eritroide provenite de la un pacient, care suferă de β -talasemie și de la doi donori sănătoși care s-au tratat cu ARNg SPY101 și cu proteină Cas9. Toate valorile au fost scăzute din eșantioanele lor de control respective, care s-au tratat cu ARNg GFP și cu proteină Cas9.

Figurile 38A-B prezintă rata BCL11A Intron (SPY101) a editării ADN-ului atunci când s-a utilizat ARNm Cas9 sau RNP Cas9.

Figura 38A prezintă rata BCL11A Intron (SPY101) a editării ADN-ului atunci când s-a utilizat ARNm Cas9.

Figura 38B prezintă rata BCL11A Intron (SPY101) a editării ADN-ului atunci când s-a utilizat Cas9 RNP.

Figurile 39A-B prezintă că perturbările situsului de legare GATA1 (GBS) provocate de SPY101/RNP Cas9 în coloniile de celule unice derivate din HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate eritroide sunt legate de exprimarea crescută a γ -globinei.

Figura 39A prezintă raportul ARNm al globinei γ/α al coloniilor editate cu SPY101 fără perturbări GBS, fără perturbări GBS mono-alelice sau fără perturbări GBS bi-alelice.

Figura 39B prezintă raportul ARNm al globinei $\gamma/(\gamma+\beta)$ al coloniilor editate cu SPY101 fără perturbări GBS, fără perturbări GBS mono-alelice sau fără perturbări GBS bi-alelice.

Figurile 40A-E prezintă exprimarea crescută a γ -globinei în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane editate cu SPY101/RNP Cas9 diferențiate eritroide conform cu analiza citometriei în flux.

Figura 40A se referă la analiza citometriei în flux, care prezintă exprimarea α -globinei în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate eritroide editate cu SPY101/RNP Cas9 în comparație cu exprimarea α -globinei în GFP ARNg/RNP Cas9 tratat cu HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate eritroide.

Figura 40B se referă la analiza citometriei în flux, care prezintă exprimarea β -globinei în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate eritroide editate cu SPY101/RNP Cas9 în comparație cu exprimarea β -globinei în GFP ARNg/RNP Cas9 tratat cu HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate eritroide.

Figura 40C se referă la analiza citometriei în flux, care prezintă exprimarea γ -globinei în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate eritroide editate cu SPY101/RNP Cas9 în comparație cu exprimarea γ -globinei în GFP ARNg/RNP Cas9 tratat cu HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate eritroide.

Figura 40D prezintă procentul de celule de γ -globină pozitive în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate eritroide editate cu SPY101/RNP Cas9 în comparație cu HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate eritroide tratate cu GFP ARNg/Cas9 RNP.

Figura 40E prezintă intensitatea mediană a fluorescenței (MFI) în HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate eritroide editate cu SPY101/RNP Cas9 în comparație cu HSPC-uri CD34+ derivate din mPB-uri umane diferențiate eritroide tratate cu GFP ARNg/Cas9 RNP.

Scurtă Descriere a Listei de Secvențe

SECV ID NR: de la 1 până la 29.482 sunt secvențe distanțiere de 20 pb pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A cu o endonuclează Cas9 din specia *S. pyogenes*.

SECV ID NR: de la 29.483 până la 32.387 sunt secvențe distanțiere de 20 pb pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A cu o endonuclează Cas9 din *S. aureus*.

SECV ID NR: de la 32.388 până la 33.420 sunt secvențe distanțiere de 20 pb pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A cu o endonuclează Cas9 din *S. thermophilus*.

SECV ID NR: de la 33.421 până la 33.851 sunt secvențe distanțiere de 20 pb pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A cu o endonuclează Cas9 din *T. denticola*.

SECV ID NR: de la 33.852 până la 36.731 sunt secvențe distanțiere de 20 pb pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A cu o endonuclează Cas9 din specia *N. meningitidis*.

SECV ID NR: de la 36.732 până la 71.947 sunt secvențe distanțiere de 22 pb pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A cu endonucleaza Cpf1 din *Acidominococcus*, *Lachnospiraceae* și *Franciscella Novicida*.

SECV ID NR: 71.948 este un eșantion de ARN ghid (ARNg) pentru o endonuclează Cas9 din specia *S. pyogenes*.

SECV ID NR: 71.949 prezintă o familie cunoscută de endonucleaze de origine, așa cum este clasificată după structura sa.

SECV ID NR: 71.950 este ARNg A (CLO1).

SECV ID NR: 71.951 este ARNg B (CLO8).

SECV ID NR: 71.952 este ARNg C (CSO2).

SECV ID NR: 71.953 este ARNg D (CSO6).

SECV ID NR: 71.: 71.954 este ARNg E (HPFH-15).

SECV ID NR: 71.955 este ARNg F (HPFH-4).

SECV ID NR: 71.956 este ARNg G (Kenya02).

SECV ID NR: 71.957 este ARNg H (Kenya17).

SECV ID NR: 71.958 este ARNg I (SD2).

SECV ID NR: 71.959 este ARNg J (SPY101).

SECV ID NR: 71.960-71.962 prezintă secvențele de ARNg eșantion

Descriere Detaliată

Hemoglobina fetală

Hemoglobina fetală (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) este principala proteină de transport de oxigen într-un făt uman și include subunități alfa (α) și gamma (γ). Exprimarea HbF încetează la aproximativ 6 luni după naștere. Hemoglobina adultă (HbA, $\alpha_2\beta_2$) este principala proteină de transport de oxigen la om după aproximativ 34 săptămâni de la naștere și include subunități alfa (α) și beta (β). După 34 de săptămâni, o modificare în dezvoltare are drept rezultat scăderea transcripției genelor γ -globinei și creșterea transcripției genelor β -globinei. Deoarece multe dintre formele de hemoglobinopatie sunt rezultatul eșecului de a produce proteina β -globinei normală în cantități suficiente sau eșecul de a produce proteina β -globinei normală în întregime, exprimarea crescută a γ -globinei (adică, HbF) va ameliora severitatea bolii β -globinice.

Limfomul cu celule-B 11A (BCL11A)

Limfomul cu celule-B 11A (BCL11A) este o genă localizată pe Cromozomul 2 și variază de la 60.451.167 până la 60.553.567 bp (GRCh38). BCL11A este un factor de transcripție degete de zinc (zinc fingers), care reprimă hemoglobina fetală (HbF) și reglează descendent exprimarea HbF începând cu aproximativ 6 săptămâni după naștere. Gena BCL11A conține 4 exoni, care acoperă 102,4 kb de ADN genomic. BCL11A este, de asemenea, sub reglarea transcripției, care include un domeniu de legare în intronul 2 pentru factorul de transcripție principal GATA-1. Legarea GATA-1 îmbunătățește exprimarea

BCL11A care, la rândul său, reprimă exprimarea HbF-ului. Intronul 2 conține mai multe situsuri hipersensibile DNază (DHS), care include situsuri denumite +55, +58 și +62 pe baza distanței în kilobaze de la situsul de pornire a transcripției. Diferite strategii de editare sunt discutate în cele ce urmează pentru a șterge, a modula sau a inactiva secvențele de control transcripțional ale BCL11A. SNP-urile care apar, în mod natural, în această regiune au fost asociate cu descreșterea exprimării BCL11A și cu niveluri crescute de Hb fetală (Orkin și colaboratorii, 2013 Study GWAS). Aceste SNP-uri sunt organizate în jurul a 3 situsuri de hipersensibilitate ADN, DHS55+, DHS58+ și DHS62+. Dintre cele 3 regiuni, regiunea DHS58+, pare să fie regiunea cheie asociată cu niveluri crescute de Hb fetală și, de asemenea, găzduiește o regiune de control transcripțional GATA1.

Abordare terapeutică

Îmbinarea finală non-omologă (NHEJ) poate să fie utilizată pentru a șterge segmente ale secvenței de control transcripțional a BCL11A, fie direct, fie prin altearea situsurilor donor sau acceptor de îmbinare prin clivare de către un ARNg, care țintește mai multe locații, sau de către mai multe ARNg-uri.

Secvența de control transcripțional a genei BCL11A poate să fie, de asemenea, modulată sau inactivată prin inserția unei gene BCL11A de tip sălbatic sau a unui ADNc care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată. De exemplu, donorul pentru modularea sau inactivarea prin reparare direcționată pe omologie (HDR) conține secvența de control transcripțional modificată a genei BCL11A, având brațe de omologie de flancare cu dimensiuni mici sau cu dimensiuni mari pentru a permite împerecherea (annealing). HDR, în esență, este un mecanism fără erori, care utilizează o secvență de ADN omologă furnizată ca matriță în timpul reparării DSB. Rata de reparare direcționată pe omologie (HDR) este o funcție a distanței dintre secvența de control transcripțional și situsul de tăiere, astfel încât alegerea situsurilor țintă suprapuse sau învecinate este importantă. Matrițele pot să includă secvențe suplimentare flancate de regiunile omologe sau pot să conțină o secvență care diferă de secvența genomică, permițând astfel editarea secvenței.

În plus, față de deleția, modularea sau inactivarea secvenței de control transcripțional a genei BCL11A prin NHEJ sau prin HDR, sunt posibile o serie de alte opțiuni. Dacă există deleții având dimensiuni mici sau mari, poate să fie inserat (knocked) un ADNc, care conține o secvență de control transcripțional modificată a genei BCL11A. Un ADNc cu lungime completă poate să fie înlocuit în orice „refugiu de siguranță” -- adică, punctul de inserție non-dăunător, care nu este gena BCL11A însăși, cu sau fără secvențe reglatoare adecvate. Dacă acest construct este inserat (knocked-in) în vecinătatea elementelor de reglare a BCL11A, acesta ar trebui să aibă control fiziologic, similar cu gena normală. Două sau mai multe nucleaze (de exemplu, o pereche) pot să fie utilizate pentru a șterge regiunile secvenței de control transcripțional, deși în mod obișnuit ar trebui să fie furnizat un donor pentru a modula sau inactiva funcția. În acest caz, doi ARNg-uri și o singură secvență donor ar putea să fie furnizați.

În prezenta dezvoltare sunt furnizate metode *ex vivo* și *in vivo* celulare pentru utilizarea instrumentelor de inginerie a genomului pentru a crea modificări permanente ale genomului prin: 1) modularea sau inactivarea secvenței de control transcripțional a genei BCL11A, prin deleții care apar datorită căii NHEJ; 2) modularea sau inactivarea secvenței de control transcripțional a genei BCL11A, prin HDR; 3) modularea sau inactivarea secvenței de control transcripțional a genei BCL11A, prin deleții la cel puțin o porțiune din secvența de control transcripțional și/sau inserarea (knocking-in) unei gene BCL11A de tip sălbatic sau a ADNc-ului care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată în locusul genei sau într-un locus refugiu de siguranță. Astfel de metode folosesc endonucleaze, cum ar fi nucleazele asociate CRISPR (Cas9, Cpf1 și altele asemenea), pentru a șterge, a insera sau a edita definitiv secvența de control transcripțional în interiorul sau în vecinătatea locusului genomic al genei BCL11A sau al altei secvențe ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A. În acest fel, exemplele prezentate în prezenta dezvoltare pot să ajute la deleția, la modularea sau la inactivarea secvenței de control transcripțional a genei BCL11A cu un singur tratament sau cu un număr limitat de tratamente (mai degrabă decât să furnizeze terapii potențiale pe durata de viață a pacientului).

În prezenta dezvoltare sunt furnizate metode pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie. Un aspect al unei astfel de metode este o terapie pe bază de celule *ex vivo*. De exemplu, poate să fie creată o celulă stem pluripotentă indusă specifică pacientului (iPSC). Apoi, ADN-ul cromozomial al acestor celule iPSC poate să fie editat folosind materialele și metodele care sunt descrise în prezenta dezvoltare. Apoi, iPSC-urile editate genomic pot să fie diferențiate în celule progenitoare hematopoietice. În cele din urmă, celulele progenitoare hematopoietice pot să fie implantate în pacient.

Un alt aspect al unei astfel de metode este o terapie bazată pe celule *ex vivo*. De exemplu, o celulă stem mezenchimală poate să fie izolată de la pacient, aceasta poate să fie izolată din măduva osoasă sau din sângele periferic ale pacientului. Apoi, ADN-ul cromozomial al acestor celule stem

mezenchimale poate să fie editat folosind materialele și metodele descrise în prezenta dezvoltare. În continuare, celulele stem mezenchimale editate genomic pot să fie diferențiate în celule progenitoare hematopoietice. În cele din urmă, aceste celule progenitoare hematopoietice pot să fie implantate în pacient.

Un alt aspect al unei astfel de metode este o terapie pe bază de celule *ex vivo*. De exemplu, o celulă progenitoare hematopoietică poate să fie izolată de la pacient. Apoi, ADN-ul cromozomial al acestor celule poate să fie editat folosind materialele și metodele descrise în prezenta dezvoltare. În cele din urmă, celulele progenitoare hematopoietice editate enomic pot să fie implantate în pacient.

Un avantaj al unei abordări de terapie celulară *ex vivo* este capacitatea de efectuare a unei analize complete a terapiei înainte de administrare. Terapiile pe bază de nuclează pot avea un anumit nivel de efecte în afara-țintei. Efectuarea corectării genelor *ex vivo* permite caracterizarea populației de celule corectate înainte de implantare. Prezenta dezvoltare include secvențierea întregului genom al celulelor corectate pentru a se asigura că efectele în afara-țintei, dacă există, pot să fie în locații genomice asociate cu risc minim pentru pacient. Mai mult, populațiile de celule specifice, care includ populațiile clonale, pot să fie izolate înainte de implantare.

Un alt avantaj al terapiei celulare *ex vivo* se referă la corectarea genetică în iPSC-uri în comparație cu alte surse de celule primare. iPSC-urile sunt prolifiche, ceea ce facilitează obținerea unui număr mare de celule, care va fi necesar pentru o terapie pe bază de celule. În plus, iPSC-urile sunt un tip de celulă ideal pentru efectuarea izolărilor clonale. Acest lucru permite screening-ul pentru corectarea genomică corectă, fără a risca o diminuare a viabilității. În schimb, alte celule primare sunt viabile numai pentru câteva treceri și sunt dificil de extins clonal. Astfel, manipularea iPSC-urilor pentru tratamentul unei hemoglobinopatii poate să fie mult mai ușoară și poate să scurteze timpul necesar pentru a face corectarea genetică dorită.

Pentru terapia *ex vivo*, transplantul necesită clearance-ul nișelor măduvei osoase sau al HSC-urilor donoare pentru grefare. Metodele actuale se bazează pe radiații și/sau chimioterapie. Datorită limitărilor pe care acestea le impun, au fost și sunt dezvoltate regimuri de condiționare mai sigure, cum ar fi imunodepleția celulelor măduvei osoase prin anticorpi sau conjugați de anticorpi-toxine direcționați împotriva markerilor de suprafață ai celulelor hematopoietice, de exemplu CD117, c-kit și altele. Succesul transplantului de HSC depinde de eficacitatea localizării în măduva osoasă, grefarea ulterioară și repopularea măduvei osoase. Nivelul celulelor modificate de genele grefate este important, la fel ca și capacitatea de grefare multilinară a celulelor.

Celulele stem hematopoietice (HSC) sunt o țintă importantă pentru terapia genică *ex vivo*, deoarece furnizează o sursă prelungită de celule corectate. Celulele CD34+ tratate vor fi returnate în organismul pacientului.

Metodele, de asemenea, pot să includă o terapie *in vivo*. ADN-ul cromozomial al celulelor pacientului este editat folosind materialele și metodele descrise, conform cu prezenta dezvoltare. Celulele pot să fie celule de măduvă osoasă, celule progenitoare hematopoietice sau celule CD34+.

Deși, celulele sanguine prezintă o țintă atractivă pentru tratamentul și terapia *ex vivo*, eficacitatea crescută în livrare poate să permită livrarea directă *in vivo* către celulele stem hematopoietice (HSC) și/sau alți progenitori de celule B și T, cum ar fi celulele CD34+. În mod ideal, țintirea și editarea ar fi direcționate către celulele relevante. Clivarea în alte celule poate să fie, de asemenea, prevenită prin utilizarea de promotori activi numai în anumite celule și/sau în anumite stadii de dezvoltare. Promotorii suplimentari sunt inductibili și, prin urmare, pot să fie controlați temporal dacă nucleaza este livrată ca o plasmidă. Perioada de timp în care ARN-ul și proteina livrate rămân în celulă poate să fie, de asemenea, ajustată folosind tratamente sau domenii adăugate pentru a modifica timpul de înjumătățire. Tratamentul *in vivo* ar elimina o serie de etape de tratament, dar o rată mai mică de livrare poate să necesite rate mai mari de editare. Tratamentul *in vivo* poate să elimine problemele și pierderile din tratamentul și grefarea *ex vivo*.

Un avantaj al terapiei genice *in vivo* poate să se refere la ușurința producerii și administrării terapeutice. Aceeași abordare și terapie terapeutică vor fi potențial utilizate pentru tratamentul mai multor pacienți, de exemplu, pentru tratamentul unui număr de pacienți care au același genotip sau alele similare. În contrast, terapia celulară *ex vivo* necesită, în mod obișnuit, utilizarea celulelor proprii ale pacientului, care sunt izolate, manipulate și returnate în organismul aceluiași pacient.

De asemenea, descrisă în prezenta dezvoltare este o metodă celulară pentru editarea genei BCL11A într-o celulă prin editarea genomului. De exemplu, o celulă poate să fie izolată de la un pacient uman sau animal. Apoi, ADN-ul cromozomial al celulei poate să fie editat folosind materialele și metodele descrise, descrise în prezenta dezvoltare.

Metodele furnizate în prezenta dezvoltare, indiferent dacă este o metodă celulară sau o metodă *ex vivo* sau *in vivo*, pot să implice una sau o combinație dintre următoarele: 1) modularea sau inactivarea

secvenței de control transcripțional a genei BCL11A, prin deleții care apar datorită căii NHEJ, 2) modularea sau inactivarea secvenței de control transcripțional a genei BCL11A, prin HDR, sau 3) modularea sau inactivarea secvența de control transcripțional a genei BCL11A, prin deleția cel puțin a unei porțiuni din secvența de control transcripțional și/sau inserarea (knocking-in) genei BCL11A de tip sălbatic sau a ADNc-ului care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată în locusul genei sau la o locație heterologă în genom (cum ar fi un situs de siguranță, cum ar fi AAVS1). Atât strategia HDR, cât și acelea de inserare (knock-in) utilizează o matriță ADN donor în Repararea Direcționată pe Omologie (HDR). HDR conform cu oricare dintre strategii poate să fie realizată prin una sau mai multe ruperi monocatenare (SSB-uri) sau dublu-catenare (DSB-uri) la situsurile specifice din genom prin utilizarea uneia sau a mai multor endonucleaze.

De exemplu, strategia NHEJ poate să implice deleția cel puțin a unei porțiuni din secvența de control transcripțional a genei BCL11A prin inducerea unei ruperi monocatenare sau dublu-catenare în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A cu una sau mai multe endonucleaze CRISPR și un ARNg (de exemplu, ARNcr + ARNtracr sau ARNsg), sau două sau mai multe ruperi monocatenare sau dublu catenare în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A cu două sau mai multe endonucleaze CRISPR și două sau mai multe ARNsg-uri. Această abordare poate să necesite dezvoltarea și optimizarea ARNsg-urilor pentru secvența de control transcripțional a genei BCL11A.

De exemplu, strategia HDR poate să implice modularea sau inactivarea secvenței de control transcripțional a genei BCL11A prin inducerea unei ruperi monocatenare sau dublu catenare în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A cu una sau mai multe endonucleaze CRISPR și un ARNg (de exemplu, ARNcr + ARNtracr sau ARNsg), sau două sau mai multe ruperi monocatenare sau dublu catenare în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A cu una sau mai multe endonucleaze CRISPR și două sau mai multe ARNg-uri, în prezența unei matrițe ADN donor introdusă, în mod exogen, pentru a direcționa răspunsul celular DSB către Repararea Direcționată pe Omologie (matrița ADN-ului donor poate să fie o oligonucleotidă monocatenară scurtă, o oligonucleotidă dublu-catenară scurtă, o moleculă de ADN monocatenară sau dublu-catenară lungă). Această abordare poate să necesite dezvoltarea și optimizarea moleculelor de ARNg donor și ADN donor care cuprind o genă BCL11A de tip sălbatic, care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată.

De exemplu, strategia de knock-in implică inserarea (knocking-in) unei gene BCL11A de tip sălbatic sau a unui ADNc care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată în locusul genei BCL11A utilizând un ARNg (de exemplu, ARNcr + ARNtracr sau ARNsg) sau o pereche de ARNg care țintește în amonte sau în secvența de control transcripțional a genei BCL11A sau într-un situs refugiu de siguranță (cum ar fi AAVS1). ADN-ul donor poate să fie ADN monocatenar sau dublu-catenar și cuprinde o genă BCL11A de tip sălbatic care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată.

Avantajele pentru strategiile menționate mai sus (deleție/modulare/inactivare și knock-in) sunt similare, incluzând, în principiu, efecte clinice și de laborator benefice atât pe termen scurt, cât și pe termen lung.

În plus față de opțiunile de editare enumerate mai sus, proteinele Cas9 sau similare pot să fie utilizate pentru a ținti domenii efectoare către aceleași situsuri țintă, care pot să fie identificate pentru editare, sau situsuri țintă suplimentare din raza domeniului efector. O serie de enzime de modificare a cromatinei, a metilazei sau a demetilazei pot să fie utilizate pentru a modifica exprimarea genei țintă. Aceste tipuri de reglare epigenetică au unele avantaje, în special faptul că sunt limitate în privința posibilelor efecte în afara țintei.

Reglarea transcripției și traducerii implică o serie de clase diferite de situsuri care interacționează cu proteinele celulare sau cu nucleotidele. Adesea, situsurile de legare la ADN ale factorilor de transcripție sau ale altor proteine pot să fie țintite pentru mutație sau deleție pentru a studia rolul situsului, deși ele pot să fie, de asemenea, țintite pentru a modifica exprimarea genei. Situsurile pot să fie adăugate prin îmbinarea la extremitate non-omologă (NHEJ) sau editarea directă a genomului prin reparare direcționată pe omologie (HDR). Utilizarea crescută a secvențierii genomului, exprimarea ARN-ului precum și studiile la nivelul genomului asupra legării factorului de transcripție au mărit capacitatea noastră de a identifica modul în care situsurile conduc la reglarea genelor de dezvoltare sau temporale. Aceste sisteme de control pot să fie directe sau pot să implice o reglare cooperantă extinsă, care poate să necesite integrarea activităților de la mai mulți potențiatori. Factorii de transcripție leagă, în mod obișnuit, secvențe de ADN degenerate de 6-12 pb. Nivelul scăzut de specificitate furnizat de situsurile individuale sugerează faptul că interacțiuni și reguli complexe sunt implicate în legare și în rezultatul funcțional.

Situsurile de legare cu mai puțină degenerare pot să furnizeze mijloace mai simple de reglare. Factorii de transcripție artificiali pot să fie concepuți pentru a specifica secvențele mai lungi care au secvențe mai puțin similare în genom și care au un potențial mai redus pentru clivare în afara-țintei. Oricare dintre aceste tipuri de situsuri de legare poate să fie transformat, șters sau chiar creat pentru a permite modificări în reglarea sau exprimarea genelor (Canver, M.C. *și colaboratorii*, Nature (2015)). Factorii de transcripție GATA sunt o familie de factori de transcripție caracterizați prin capacitatea lor de a se lega la secvența de legare din ADN-ul GATA. O secvență de legare GATA este localizată în situsul hipersensibil al ADN 58+ (DHS) al genei BCL11A.

O altă clasă de regiuni de reglare a genelor, care prezintă aceste caracteristici sunt situsurile de legare- microARN (ARNmi). ARNmi-urile sunt ARN-uri necodificatoare, care joacă roluri cheie în reglarea genelor post-transcripționale. ARNmi-ul poate regla exprimarea a 30% din toate genele care codifică pentru proteine de mamifere. S-a constatat silențierea specifică și puternică a genei prin ARN-ul dublu-catenar (ARNi), la care s-a adăugat un ARN suplimentar mic necodificator (Canver, M.C. *și colaboratorii*, Nature (2015)). Cea mai mare clasă de ARN-uri necodificatoare importante pentru silențiere genetică sunt miARN-urile. În cazul mamiferelor, ARNmi-urile sunt mai întâi transcrise sub formă de transcrieri lungi de ARN, care pot să fie unități transcripționale separate, parte din intronii proteinelor sau alte transcrieri. Transcrierile lungi sunt denumite ARNmi-uri primare (pri-ARNmi), care includ structuri imperfecte de perechi de baze de ac de păr (hairpin). Aceste pri-ARNmi-uri pot să fie clivate în unul sau în mai multe ARNmi-uri precursore mai scurte (pre-ARNmi) de către Microprocesor, un complex proteic din nucleu, care implică Drosha.

Pre-ARNmi-urile sunt bucle scurte stem de aproximativ 70 de nucleotide lungime, cu o supra-înălțare de 2 nucleotide 3', care sunt exportate în duplexuri mature ARNmi:ARNmi* care conțin nucleotidele de la 19 până la 25. Catena de ARNmi cu stabilitate de împerechere a bazelor inferioară (catena ghid) poate să fie încărcată pe complexul de silențiere indus de ARN (RISC). Catena ghid pasageră (marcată cu *), poate să fie funcțională, dar în mod obișnuit este degradată. ARNmi-ul matur leagă RISC de motive de secvență parțial complementare în ARNm-ul țintă care se găsesc în mod predominant în regiunile 3' netranslate (UTR) și induce silențiere posttranscripțională a genei (Bartel, D. P. Cell 136, 215-233 (2009); Saj, A. & Lai, E.C. Curr Opin Genet Dev 21, 504-510 (2011)).

ARNmi-urile pot să fie importante în dezvoltarea, diferențierea, ciclul celular și controlul creșterii și, practic, în toate căile biologice atât la mamifere cât și la alte organisme pluricelulare. ARNmi-urile pot să fie, de asemenea, implicate în controlul ciclului celular, în apoptoză și în diferențierea celulelor stem, în hematopoieza, în hipoxie, în dezvoltarea mușchilor, în neurogeneză, în secreția de insulină, în metabolismul colesterolului, în procesul de îmbătrânire, în replicarea virală și în răspunsurile imunitare.

Un singur ARNmi poate să țintească sute de transcripte ARNm diferite, în timp ce o transcriere individuală poate să fie țintită de mai multe ARNmi diferite. Mai mult de 28645 de microARN-uri au fost adnotate în cea mai recentă versiune a miRBase (v.21). Unele ARNmi-uri pot să fie codificate de loci multipli, dintre care unele pot să fie exprimate din clustere co-transcrise în tandem. Caracteristicile permit rețele de reglare complexe cu căi multiple și controale de feedback. ARNmi-urile pot să fie părți integrante ale acestor circuite de feedback și de reglare și pot să contribuie la reglare în ceea ce privește exprimarea genelor prin menținerea producției de proteine în limite (Herranz, H. & Cohen, S.M. Genes Dev 24, 1339-1344 (2010); Posadas, D.M. & Carthew, R.W. Curr Opin Genet Dev 27, 1 -6 (2014)).

De asemenea, ARNmi-ul poate să fie important într-un număr mare de boli umane care sunt asociate cu exprimarea anormală a ARNmi-ului. Această asociere subliniază importanța căii de reglare a ARNmi-ului. Studiile recente de deleție a miARN-ului au legat miARN-ul de reglarea răspunsurilor imune (Stern-Ginossar, N. *și colaboratorii*, Science 317, 376-381 (2007)).

De asemenea, ARNmi-ul are o legătură puternică cu cancerul și poate juca un rol în diferite tipuri de cancer. S-a constatat faptul că ARNmi-urile sunt reglate descendent într-un număr de tumori. ARNmi-ul poate să fie important în reglarea căilor cheie legate de cancer, cum ar fi controlul ciclului celular și răspunsul față de deteriorarea ADN-ului și, prin urmare, poate să fie utilizat în diagnostic și poate să fie țintit clinic. MicroARN-urile pot să regleze, în mod delicat, echilibrul angiogenezei, astfel încât experimentele care epuizează toate microARN-urile suprimă angiogeneza tumorală (Chen, S. *și colaboratorii*, Genes Dev 28, 1054-1067 (2014)).

După cum s-a arătat pentru genele care codifică pentru proteine, genele ARNmi pot să fie, de asemenea, supuse modificărilor epigenetice care apar la cancer. Mulți loci ARNmi pot să fie asociați cu insulele CpG crescându-și astfel oportunitatea de reglare prin metilare ADN (Weber, B., Stresmann, C, Brueckner, B. & Lyko, F. Cell Cycle Q, 1001 - 1005 (2007)). Majoritatea studiilor au folosit tratamentul cu medicamente de remodelare a cromatinei pentru a dezvălui ARNmi-uri epigenetice reduse la silențiere.

Pe lângă rolul lor în silențiere ARN-ul, ARNmi-ul poate să activeze și translația (Posadas, D.M. & Carthew, R.W. Curr Opin Genet Dev 27, 1 -6 (2014)). Eliminarea (knocking out) acestor situsuri poate să conducă la o exprimare diminuată a genei țintite, în timp ce introducerea acestor situsuri poate să crească exprimarea.

ARNmi-ul individual poate să fie eliminat (knocked out), cel mai eficient, prin mutarea secvenței de însămănțare (bazele de la 2 până la 8 ale microARN-ului), care poate să fie importantă pentru specificitatea de legare. Clivarea în această regiune, urmată de repararea incorectă de către NHEJ poate să suprimă, în mod eficient, funcția miARN-ului, prin blocarea legării la situsurile țintă. ARNmi-ul ar putea să fie, de asemenea, inhibat prin țintirea specifică a regiunii buclei speciale adiacente secvenței palindromice. Cas9 inactiv din punct de vedere catalitic poate să fie, de asemenea, utilizat pentru inhibare în ceea ce privește exprimarea ARNsh-ului (Zhao, Y. și colaboratorii, Sci Rep 4, 3943 (2014)). Pe lângă țintirea ARNmi-ului, situsurile de legare pot să fie, de asemenea, țintite și transformate pentru a împiedica silențierea de către ARNmi.

Celulele umane

Pentru ameliorarea hemoglobinopatiilor, așa cum este descris și ilustrat în prezenta dezvoltare, principalele ținte pentru editarea genelor sunt celulele umane. De exemplu, în metodele *ex vivo*, celulele umane pot să fie celule somatice, care, după ce au fost modificate folosind tehnicile descrise, pot să dea naștere la celule progenitoare. De exemplu, conform cu metodele *in vivo*, celulele umane pot să fie o celulă de măduvă osoasă, o celulă progenitoare hematopoietică sau o celulă CD34+.

Efectuând editarea genelor în celule autologe ale pacientului și, prin urmare, deja perfect compatibile cu pacientul în dificultate, este posibil să se genereze celule care pot să fie reintroduse în siguranță în pacient și să dea naștere efectiv la o populație de celule care poate să fie eficace în ameliorarea uneia sau a mai multor stări clinice asociate cu boala pacientului.

Celulele progenitoare (denumite și celule stem în prezenta dezvoltare) sunt capabile atât de proliferare, cât și de a da naștere la mai multe celule progenitoare, acestea având, la rândul lor, capacitatea de a genera un număr mare de celule mamă care, la rândul lor, pot să dea naștere la celule fiice diferențiate sau diferențiabile. Celulele fiice în sine pot să fie induse să prolifereze și să producă descendenți care ulterior se diferențiază în unul sau mai multe tipuri de celule mature, păstrând în același timp una sau mai multe celule cu potențial de dezvoltare parentală. Termenul "celulă stem" se referă apoi la o celulă având capacitatea sau potențialul, în circumstanțe speciale, de a se diferenția la un fenotip mai specializat sau diferențiat și care își păstrează capacitatea, în anumite circumstanțe, de a prolifera fără a se diferenția în mod substanțial. Într-un aspect, termenul progenitor sau celulă stem se referă la o celulă mamă generalizată ai cărei descendenți (progenitori) se specializează, adesea în direcții diferite, prin diferențiere, de exemplu, prin dobândirea de caractere complet individuale, așa cum se întâmplă în diversificarea progresivă a celulelor și țesuturilor embrionare. Diferențierea celulară este un proces complex care are loc, în mod obișnuit, prin multe diviziuni celulare. O celulă diferențiată poate deriva dintr-o celulă multipotentă, care ea însăși este derivată dintr-o celulă multipotentă și așa mai departe. În timp ce fiecare dintre aceste celule multipotente poate să fie considerată celulă stem, gama tipurilor de celule care pot da naștere la alte celule poate varia considerabil. Unele celule diferențiate au și capacitatea de a da naștere la celule având un potențial de dezvoltare mai mare. O astfel de capacitate poate să fie naturală sau poate să fie indusă artificial prin tratament cu diverși factori. În multe cazuri biologice, celulele stem pot să fie, de asemenea, „multipotente”, deoarece acestea pot să producă o descendență de mai multe tipuri de celule distincte, dar acest lucru nu este necesar pentru „stem-ness”.

Auto-reînnoirea poate să fie un alt aspect important al celulei stem. În teorie, auto-reînnoirea poate avea loc prin oricare dintre acele două mecanisme majore. Celulele stem se pot diviza asimetric, o fiică păstrând condiția stem și cealaltă fiică exprimând o altă funcție și fenotip specific distinct. În mod alternativ, unele dintre celulele stem dintr-o populație se pot diviza simetric în două tulpini, menținând astfel unele celule stem în ansamblul populației, în timp ce alte celule din populație dau naștere numai unei descendențe diferențiate. În general, „celulele progenitoare” au un fenotip celular care este mai primitiv (adică se află într-un fază mai timpurie de-a lungul unei căi de dezvoltare sau de progresie decât este o celulă complet diferențiată). Adesea, celulele progenitoare au de asemenea un potențial proliferativ semnificativ sau foarte ridicat. Celulele progenitoare pot să dea naștere la mai multe tipuri de celule diferențiate distincte sau la un singur tip de celule diferențiate, în funcție de calea de dezvoltare și de mediul în care celulele se dezvoltă și se diferențiază.

În contextul ontogenezei celulare, adjectivul „diferențiat” sau „diferențierea” este un termen relativ. O „celulă diferențiată” este o celulă care a progresat mai departe pe calea de dezvoltare decât celula cu care este comparată. Astfel, celulele stem se pot diferenția în celule precursor restricționate la linie (cum ar fi o celulă progenitoare hematopoietică), care, la rândul lor, se pot diferenția în alte tipuri de celule precursor mai departe pe cale (cum ar fi un precursor hematopoietic), și apoi într-o celulă

diferențiată în stadiu terminal, cum ar fi eritrocitele, care joacă un rol caracteristic într-un anumit tip de țesut și pot să conserve sau nu pot să conserve capacitatea de a prolifera în continuare.

Termenul „celulă progenitoare hematopoietică” se referă la celule dintr-o linie de celule stem, care dau naștere la toate tipurile de celule sanguine, care includ eritroide (eritrocite sau globule roșii (RBC)), mieloide (monocite și macrofage, neutrofile, bazofile, eozinofile, megacariocite/trombocite și celule dendritice) și limfoide (celule T, celule B, celule NK).

O „celulă a liniei eritroide” indică faptul că celula contactată este o celulă care trece prin procesul de eritropoieză, astfel încât la diferențierea finală formează o eritrocită sau o globulă roșie. Astfel de celule provin din celulele progenitoare hematopoietice ale măduvei osoase. După expunerea la factori de creștere specifici precum și la alte componente ale micromediului hematopoietic, celulele progenitoare hematopoietice se pot maturiza printr-o serie de tipuri celulare de diferențiere intermediară, toți intermediarii liniei eritroide, în RBCs. Astfel, celulele „liniei eritroide” cuprind celule progenitoare hematopoietice, rubriblaste, prorubricite, eritroblaste, metarubricite, reticulocite și eritrocite.

Celula progenitoare hematopoietică poate să exprime cel puțin unul dintre următorii markeri de suprafață celulară caracteristici celulelor progenitoare hematopoietice: CD34+, CD59+, Thyl/CD90+, CD381o/- și C-kit/CDI 17+. În unele exemple furnizate în prezenta dezvoltare, progenitorii hematopoietici pot să fie CD34+.

Celula progenitoare hematopoietică poate să fie o celulă stem din sângele periferic, prelevată de la pacient, după ce pacientul a fost tratat cu unul sau mai mulți factori, cum ar fi factorul de stimulare a coloniilor de granulocite (opțional în combinație cu Plerixaflor). Celulele CD34+ pot să fie îmbogățite utilizând CliniMACS® Cell Selection System (Miltenyi Biotec). Celulele CD34+ pot să fie stimulate în mediu fără ser (de exemplu, mediu CellGrow SCGM, CellGenix) cu citokine (de exemplu, SCF, rhTPO, rhFLT3) înainte de editarea genomului. Adăugarea de SR1 și de dmPGE2 și/sau de alți factori este avută în vedere pentru a îmbunătăți grefarea pe termen lung.

Celulele progenitoare hematopoietice ale liniei eritroide pot să aibă un marker de suprafață celulară caracteristic liniei eritroide: cum ar fi CD71 și Ter119.

Celulele stem hematopoietice (HSC-uri) pot să fie o țintă importantă pentru terapia genică, deoarece furnizează o sursă prelungită de celule corectate. Celulele stem hematopoietice (HSC) dau naștere atât liniei mieloide, cât și liniei limfoide ale celulelor sanguine. Celulele sanguine mature au o durată de viață limitată și trebuie să fie înlocuite, în mod continuu, pe tot parcursul vieții. Celulele sanguine sunt produse în mod continuu prin proliferarea și diferențierea unei populații de HSC-uri pluripotente care pot să fie reînnoite prin auto-reînnoire. Măduva osoasă (BM) este situsul principal al hematopoiezei la om și o sursă bună de celule stem și de celule progenitoare hematopoietice (HSPC-uri). HSPC-urile pot să fie găsite într-un număr mic în sângele periferic (PB). În unele indicații sau tratamente numărul acestora crește. Descendența HSC-urilor se maturizează prin etape, generând celule progenitoare cu potențial multiplu și angajate în linie, care includ celulele progenitoare limfoide, care dau naștere celulelor care exprimă BCL11A. Progenitorii celulelor B și T sunt cele două populații de celule care necesită activitatea BCL11A, astfel încât acestea să poată să fie editate în etapele anterioare rearanjării, deși corectarea progenitorilor are avantajul să continue să fie o sursă de celule corectate. Celulele tratate, cum ar fi celulele CD34+, vor fi returnate în pacientului. Nivelul de grefare poate să fie important, la fel ca și capacitatea de grefare multilinie a celulelor editate genic după perfuzia CD34+ *in vivo*.

Celule Stem Pluripotente Induse

Celulele umane modificate genetic descrise în prezenta dezvoltare, pot să fie celule stem pluripotente induse (iPSC). Un avantaj al utilizării iPSC-urilor este acela că celulele pot să fie derivate de la același subiect, căruia urmează să-i fie administrate celulele progenitoare. Adică, o celulă somatică poate să fie obținută de la un subiect, reprogramată la o celulă stem pluripotentă indusă și apoi rediferențiată într-o celulă progenitoare pentru a fi administrată subiectului (de exemplu, celule autologe). Deoarece progenitorii sunt derivați, în mod esențial, dintr-o sursă autologă, riscul de respingere a grefei sau de răspuns alergic poate să fie redus în comparație cu utilizarea celulelor provenite de la un alt subiect sau de la un grup de subiecți. În plus, utilizarea iPSC-urilor anulează nevoia de celule care să fie obținute dintr-o sursă embrionară. Astfel, conform cu un aspect, celulele stem utilizate în metodele dezvoltate nu sunt celule stem embrionare.

Deși, diferențierea este în general ireversibilă în contexte fiziologice, recent s-au dezvoltat câteva metode pentru a reprograma celulele somatice ca iPSC-uri. Metode, cu titlu de exemplu, sunt cunoscute specialiștilor în domeniu și sunt descrise pe scurt, în prezenta dezvoltare, în cele ce urmează.

Termenul „reprogramare” se referă la un proces care modifică sau inversează starea de diferențiere a unei celule diferențiate (de exemplu, o celulă somatică). Altfel spus, reprogramarea se referă la un proces de diferențiere a unei celule înapoi la un tip de celulă mai nediferențiat sau mai primitiv. Trebuie remarcat faptul că plasarea multor celule primare în cultură poate să conducă la o anumită

pierdere a caracteristicilor complet diferențiate. Astfel, simpla cultivare a unor astfel de celule, care sunt incluse în termenul de celule diferențiate, nu face ca aceste celule să fie celule nediferențiate (de exemplu, celule fără diferențiere) sau celule pluripotente. Tranziția unei celule diferențiate la pluripotență necesită un stimul de reprogramare dincolo de stimulii care conduc la pierderea parțială a caracterului diferențiat în cultură. Celulele reprogramate au, de asemenea, caracteristica capacității de trecere extinsă fără pierderea potențialului de creștere, în raport cu părinții celulelor primare, care, în general, au capacitate numai pentru un număr limitat de diviziuni în cultură.

Celula care urmează să fie reprogramată poate să fie parțial sau diferențiată în stadiul terminal înainte de reprogramare. Reprogramarea poate să cuprindă revenirea completă a stării de diferențiere a unei celule diferențiate (de exemplu, o celulă somatică) la o stare pluripotentă sau la o stare multipotentă. Reprogramarea poate să cuprindă revenirea completă sau parțială a stării de diferențiere a unei celule diferențiate (de exemplu, o celulă somatică) la o celulă nediferențiată (de exemplu, o celulă de tipul embrionului). Reprogramarea poate să conducă la exprimarea anumitor gene de către celule, a căror exprimare contribuie, în continuare, la reprogramare. În anumite exemple descrise, conform cu prezenta dezvăluire, reprogramarea unei celule diferențiate (de exemplu, o celulă somatică) poate să determine ca celula diferențiată să adopte o stare nediferențiată (de exemplu, este o celulă nediferențiată). Celulele rezultate sunt denumite „celule reprogramate” sau „celule stem pluripotente induse (iPSC-uri sau celule iPS) ”.

Reprogramarea poate să implice modificarea, de exemplu, inversarea, a cel puțin unora dintre matrițele ereditare pentru modificarea acidului nucleic (de exemplu, metilarea), condensarea cromatinei, modificări epigenetice, amprentare genomică etc., care apar în timpul diferențierii celulare. Reprogramarea este diferită de simpla menținere a stării nediferențiate existente a unei celule, care este deja pluripotentă sau de menținerea stării existente mai puțin decât complet diferențiate a unei celule care este deja o celulă multipotentă (de exemplu, o celulă stem hematopoietică). Reprogramarea este, de asemenea, diferită de promovarea auto-înnoirii sau proliferării celulelor, care sunt deja pluripotente sau multipotente, deși compozițiile și metodele descrise, conform cu prezenta dezvăluire, pot să fie, de asemenea, utile în astfel de scopuri, conform cu unele exemple.

Sunt cunoscute multe metode în stadiul tehnicii care pot să fie utilizate pentru a genera celule stem pluripotente din celule somatice. Orice astfel de metodă care reprogreamază o celulă somatică la fenotipul pluripotent ar fi adecvată pentru utilizare în metodele descrise în prezenta dezvăluire.

S-au descris metodologii de reprogramare pentru generarea de celule pluripotente folosind combinații definite de factori de transcripție. Celulele somatice de șoarece pot să fie convertite în celule de tipul celulelor ES cu potențial de dezvoltare extins prin transducția directă a Oct4, Sox2, Klf4 și c-Myc; *a se vedea, de exemplu*, Takahashi și Yamanaka, Cell 126(4): 663-76 (2006). iPSC-urile seamănă cu celulele ES, deoarece refac circuitele transcripționale asociate pluripotenței și o mare parte din peisajul epigenetic. În plus, celule stem pluripotente induse (iPSC) de șoarece satisfac toate testele standard pentru pluripotență: în special, diferențierea in vitro în tipuri de celule ale celor trei straturi germinale, formarea teratomului, contribuția la himere, transmiterea liniei germinale [*a se vedea, de exemplu*, Maherali și Hochedlinger, Cell Stem Cell. 3(6):595-605 (2008)], și complementare tetraploidă.

iPSC-urile umane pot să fie obținute folosind metode de transducție similare, iar trio-ul factorului de transcripție, OCT4, SOX2 și NANOG, a fost stabilit ca fiind setul de bază de factori de transcripție care guvernează pluripotența; *a se vedea, de exemplu*, Budnitsky și Gepstein, Stem Cells Transl Med. 3(4):448-57 (2014); Barrett și colaboratorii, Stem Cells Trans Med 3: 1-6 sctm.2014-0121 (2014); Focosi și colaboratorii, Blood Cancer Journal 4: e21 1 (2014); și referințele care s-au citat în document. Producția iPSCuri poate să fie realizată prin introducerea de secvențe de acid nucleic, care codifică pentru genele asociate celulelor stem într-o celulă somatică adultă, folosind în mod istoric vectori virali.

iPSC-urile pot să fie generate sau derivate din celule somatice diferențiate terminal, precum și din celule stem adulte sau celule stem somatice. Adică, o celulă progenitoare non-pluripotentă poate să fie făcută pluripotentă sau multipotentă prin reprogramare. În astfel de cazuri, poate să nu fie necesar să se includă atât de mulți factori de reprogramare cât este necesar pentru a reprograma o celulă diferențiată în stadiul terminal. În plus, reprogramarea poate să fie indusă prin introducerea non-virală a factorilor de reprogramare, de exemplu, prin introducerea proteinelor în sine, sau prin introducerea de acizi nucleici care codifică pentru factorii de reprogramare sau prin introducerea de ARN mesageri care, la translație produc factori de reprogramare (*a se vedea, de exemplu*, Warren și colaboratorii, Cell Stem Cell, 7(5):618-30 (2010). Reprogramarea poate să fie realizată prin introducerea unei combinații de acizi nucleici, care codifică pentru gene asociate celulelor stem, care includ, de exemplu: Oct-4 (cunoscut și ca Oct-3/4 sau Pou5f1), Sox1, Sox2, Sox3, Sox 15, Sox 18, NANOG, Klf1, Klf2, Klf4, Klf5, NR5A2, c-Myc, 1-Myc, n-Myc, Rem2, Tert și LIN28. Reprogramarea utilizând metodele și compozițiile descrise,

conform cu prezenta dezvoltare poate să cuprindă, în plus, introducerea unuia sau a mai multor dintre Oct-3/4, un membru al familiei Sox, un membru al familiei Klf și un membru al familiei Myc într-o celulă somatică. Metodele și compozițiile descrise, conform cu prezenta dezvoltare, pot să cuprindă, în plus, introducerea unuia sau a mai multor dintre Oct-4, Sox2, Nanog, c-MYC și Klf4 pentru reprogramare. După cum s-a menționat mai sus, metoda exact utilizată pentru reprogramare nu este neapărat critică pentru metodele și compozițiile descrise, conform cu prezenta dezvoltare. Cu toate acestea, în cazul în care celulele diferențiate de celulele reprogramate urmează să fie utilizate, de exemplu, în terapia umană, conform cu un aspect, reprogramarea nu este efectuată printr-o metodă care alterează genomul. Ca urmare, în astfel de exemple, reprogramarea poate să fie realizată, de exemplu, fără utilizarea vectorilor virali sau plasmidici.

Eficiența reprogramării (adică numărul de celule reprogramate) derivate dintr-o populație de celule inițiale poate să fie îmbunătățită prin adăugarea diferiților agenți, de exemplu, molecule mici, așa cum prezintă Shi și colaboratorii, *Cell-Stem Cell* 2:525-528 (2008); Huangfu și colaboratorii, *Nature Biotechnology* 26(7):795-797 (2008) și Marson și colaboratorii, *Cell-Stem Cell* 3: 132-135 (2008). Astfel, un agent sau o combinație de agenți, care îmbunătățesc eficiența sau rata producției de celule stem pluripotente induse, pot să fie utilizate în producerea de celule stem pluripotente induse (iPSC) specifice pacientului sau specifice bolii. Unele exemple nelimitative de agenți care îmbunătățesc eficiența reprogramării includ Wnt solubil, mediu condiționat cu Wnt, BIX-01294 (o histonă metiltransferază G9a), PD0325901 (un inhibitor MEK), inhibitori de ADN metiltransferază, inhibitori de histon-deacetilază (HDAC), acid valproic, 5'-azacitidină, dexametazonă, suberoilanolidă, acid hidroxic (SAHA), vitamina C și trichostatină (TSA), printre altele.

Alte exemple, cu caracter nelimitativ, de agenți de îmbunătățire a reprogramării includ: Suberoilanolidă acidului hidroxic (SAHA (de exemplu, MK0683, vorinostat) și alți acizi hidroxicici), BML-210, Depudecin (de exemplu, (-)-Depudecin), HC Toxin, Nullscript (4-(1,3-Dioxo-1H,3H-benzo[de]izochinolin-2-il)-N-hidroxiutanamidă), fenil butirat (de exemplu, fenilbutirat de sodiu) și acid valproic ((VP A) și alți acizi grași cu lanț scurt), Scriptaid, suramină de sodiu, trichostatină A (TSA), compusul 8 APHA, apicidină, butirat de sodiu, butirat de pivaloiloximetil (Pivanex, AN-9), trapoxină B, Chlamydocin, Dipsipeptidă (cunoscută și sub denumirea de FR901228 sau FK228), benzamide (de exemplu, CI-994 (de exemplu, N-acetil dinalină) și MS-27-275), MGCD0103, NVP-LAQ-824, acid m-carboxihidrocinaminic acid bishidroxic, JNJ16241 199, Tubacin, A-161906, proxamidă, oxamflatin, 3-CI-UCHA (de exemplu, acid hidroxic 6-(3-clorfenilureido)caproic), AOE (acid 2-amino-8-oxo-9, 10- epoxidecanoic), CHAP31 și CHAP 50. Alți agenți de îmbunătățire a reprogramării includ, de exemplu, forme negative dominante ale HDAC-urilor (de exemplu, forme inactive din punct de vedere catalitic), inhibitori de ARNs ai HDAC-urilor și anticorpi care se leagă în mod specific la HDAC. Astfel de inhibitori sunt disponibili, de exemplu, de la BIOMOL International, Fukasawa, Merck Biosciences, Novartis, Gloucester Produse farmaceutice, Titan Pharmaceuticals, MethylGene și Sigma Aldrich.

Pentru a confirma inducerea celulelor stem pluripotente pentru utilizare în metodele descrise, conform cu prezenta dezvoltare, clonele izolate pot să fie testate din punct de vedere al exprimării unui marker de celule stem. O astfel de exprimare într-o celulă derivată, dintr-o celulă somatică, identifică celulele ca fiind celule stem pluripotente induse. Markerii de celule stem pot să fie selectați din grupul, cu caracter nelimitativ, care include: SSEA3, SSEA4, CD9, Nanog, Fbx15, Ecatl, Esgl, Eras, Gdf3, Fgf4, Cripto, Daxl, Zpf296, Slc2a3, Rexl, Utl și Natl. Conform cu un caz, de exemplu, o celulă care exprimă Oct4 sau Nanog este identificată ca fiind pluripotentă. Metodele pentru detectare în ceea ce privește exprimarea unor astfel de markeri pot să includă, de exemplu, RT-PCR și metodele imunologice care detectează prezența polipeptidelor codificate, cum ar fi Western blot sau analiza citometrie în flux. Detectarea poate să implice nu numai RT-PCR, ci poate să includă și detectarea markerilor proteici. Markerii intracelulari pot să fie identificați cel mai bine prin RT-PCR sau prin metode de detectare a proteinelor, cum ar fi imunocitochimie, în timp ce markerii de suprafață celulară sunt identificați ușor, de exemplu, prin imunocitochimie.

Caracterul celulelor stem pluripotente al celulelor izolate poate să fie confirmat prin teste care evaluează capacitatea iPSC-urilor de a se diferenția în celulele fiecăruia dintre cele trei straturi germinale. Cu titlu de exemplu, formarea teratomului în cazul șoarecilor nuzi poate să fie utilizată pentru evaluarea caracterului pluripotent al clonelor izolate. Celulele pot să fie introduse în organismul șoarecilor nuzi și se poate efectua histologie și/sau imunohistochimie pe o tumoră care s-a dezvoltat din celule. Creșterea unei tumori care cuprinde celule din toate cele trei straturi germinale, de exemplu, indică în continuare că celulele sunt celule stem pluripotente.

Crearea de iPSC-uri specifice pacientului

O etapă a metodelor *ex vivo* din prezenta dezvoltare poate să implice crearea unei celule iPSC specifice pacientului, celule iPSC specifice pacientului sau a unei linii celulare iPSC specifice pacientului.

Există multe metode stabilite în stadiul tehnicii pentru generarea celulelor iPS specifice pacientului, așa cum este descris în documentele Takahashi și Yamanaka 2006; Takahashi, Tanabe și colaboratorii, 2007. De exemplu, etapa de creare poate să cuprindă: a) izolarea unei celule somatice, cum ar fi o celulă de piele sau un fibroblast, de la pacient; și b) introducerea unui set de gene asociate-pluripotentei în celula somatică pentru a induce celula să devină o celulă stem pluripotentă. Setul de gene asociate-pluripotentei poate să fie una sau mai multe dintre genele selectate din grupul constând din: OCT4, SOX2, KLF4, Lin28, NANOG și cMYC.

Efectuarea unei biopsii sau a unui aspirat al măduvei osoase a pacientului

O biopsie sau aspirat este un eșantion de țesut sau de lichid prelevat din corp. Există multe tipuri diferite de biopsii sau aspirate. Aproape toate implică utilizarea unui instrument ascuțit pentru a îndepărta o cantitate mică de țesut. Dacă biopsia va fi pe piele sau pe altă zonă sensibilă, se poate aplica mai întâi un anestezic. O biopsie sau aspirat pot să fie efectuate în conformitate cu oricare dintre metodele cunoscute în stadiul tehnicii. De exemplu, într-un aspirat de măduvă osoasă, se folosește un ac mare pentru penetrarea în osul pelvisului pentru a colecta măduva osoasă.

Izolarea unei celule stem mezenchimale

Celulele stem mezenchimale pot să fie izolate conform oricărei metode cunoscute în stadiul tehnicii, cum ar fi din măduva osoasă a unui pacient sau din sângele periferic. De exemplu, aspiratul de măduvă poate să fie colectat într-o seringă cu heparină. Celulele pot să fie spălate și centrifugate pe un gradient de densitate Percoll™. Celulele, cum ar fi celulele sanguine, celulele hepatice, celulele interstițiale, macrofagele, mastocitele și timocitele, pot să fie separate folosind Percoll™. Celulele pot să fie cultivate în mediu Eagle modificat Dulbecco (DMEM) (glucoză scăzută) care conține 10% ser fetal bovin (FBS) (Pitinger MF, Mackay AM, Beck SC și colaboratorii, Science 1999; 284: 143-147).

Tratamentul unui pacient cu GCSF

Un pacient poate să fie tratat opțional cu factor de stimulare a coloniilor de granulocite (GCSF) în conformitate cu orice metodă cunoscută în stadiul tehnicii. GCSF poate să fie administrat în asociere cu Plerixaflor.

Izolarea unei celule progenitoare hematopoietice de la un pacient

O celulă progenitoare hematopoietică poate să fie izolată de la un pacient folosind orice metodă cunoscută în stadiul tehnicii. Celulele CD34+ pot să fie îmbogățite utilizând CliniMACS® Cell Selection System (Miltenyi Biotec). Celulele CD34+ pot să fie stimulate slab în mediu fără ser (de exemplu, mediu CellGrow SCGM, CellGenix) cu citokine (de exemplu, SCF, rhTPO, rhFLT3) înainte de editarea genomului.

Editarea genomului

Editarea genomului se referă, în general, la procesul de modificare a secvenței nucleotidice a unui genom, de preferință, într-o manieră precisă sau predeterminată. Exemple de metode de editare a genomului care sunt descrise, conform cu prezenta dezvăluire, includ metode de utilizare a nucleazelor direcționate pe situs pentru a tăia acidul dezoxiribonucleic (ADN) în locații țintă precise din genom, creând astfel ruperi de ADN monocatenar sau dublu-catenar în anumite locații din genom. Astfel de ruperi pot să fie și sunt reparate, cu regularitate, prin procese celulare naturale, endogene, cum ar fi repararea direcționată pe omologie (HDR) și Îmbinarea non-omologă la extremități (NHEJ), așa cum s-a revizuit recent de către Cox și colaboratorii, Nature Medicine 21 (2), 121 -31 (2015). Aceste două procese principale de reparare ADN-ului constau dintr-o familie de căi alternative. Îmbinarea non-omologă la extremități (NHEJ) unește direct extremitățile ADN-ului care rezultă dintr-o rupere dublu-catenar, uneori cu pierderea sau adăugarea secvenței nucleotidice, care poate să perturbe sau să îmbunătățească exprimarea genei. Repararea direcționată pe omologie (HDR) utilizează o secvență omologă, sau o secvență donor, drept matriță pentru inserția unei secvențe ADN definite la punctul de rupere. Secvența omologă poate să fie în genomul endogen, cum ar fi o cromatidă soră. În mod alternativ, donorul poate să fie un acid nucleic exogen, cum ar fi o plasmidă, o oligonucleotidă monocatenară, o oligonucleotidă dublu-catenară, o oligonucleotidă duplex sau un virus, care prezintă regiuni cu omologie înaltă cu locusul clivat-de nuclează, dar care poate să conțină, de asemenea, secvențe suplimentare sau modificări de secvență, care includ deleții care pot să fie încorporate în locusul țintă clivat. Un al treilea mecanism de reparare poate să fie îmbinarea la extremitate mediată-pe microomologie (MMEJ), denumită și „NHEJ alternativă”, în care rezultatul genetic este similar cu Îmbinarea non-omologă la extremități (NHEJ) prin faptul că delețiile sau la inserțiile având dimensiuni mici pot avea loc la situsul de clivare. Îmbinarea la extremitate mediată-pe microomologie (MMEJ) poate face uz de secvențe omologe, ale câtorva perechi de baze care flanchează situs-ul de rupere al ADN-ului, pentru a conduce la un rezultat mai favorizat al reparării îmbinării extremităților ADN-ului, iar rapoartele recente au elucidat în continuare mecanismul molecular al acestui proces; a se vedea, de exemplu, Cho și Greenberg, Nature 518, 174-76 (2015); Kent și colaboratorii, Nature Structural and Molecular Biology, Adv. Online doi:

10.1038/nsmb.2961 (2015); Mateos-Gomez *și colaboratorii*, Nature 518, 254-57 (2015); Ceccaldi *și colaboratorii*, Nature 528, 258-62 (2015). În unele cazuri, poate să fie posibil să se preconizeze rezultate potențiale privind repararea pe baza analizei microomologiilor potențiale pe situsul ruperii ADN-ului.

Fiecare dintre aceste mecanisme de editare a genomului poate să fie utilizat pentru generarea modificărilor genomice dorite. O etapă în procesul de editare a genomului poate să fie generarea uneia sau două ruperi ale ADN-ului, acestea din urmă sub formă de ruperi dublu-catenare sau ca două ruperi monocatenare, în locusul țintă cât mai în vecinătatea situsului mutației intenționate. Acest lucru poate să fie realizat prin utilizarea polipeptidelor direcționate pe situs, așa cum este descris și ilustrat, conform cu prezenta dezvoltare.

Polipeptidele direcționate pe situs, cum ar fi o endonuclează ADN, pot să introducă ruperi dublu-catenare una sau mai multe ruperi monocatenare în acizi nucleici, de exemplu, în ADN-ul genomic. Ruperea dublu-catenară poate stimula căile endogene pentru repararea ADN-ului unei celule (de exemplu, repararea dependentă pe omologie sau îmbinarea de extremități non-omologă sau îmbinarea alternativă de extremitate non-omologă (A-NHEJ) sau îmbinarea de extremitate mediată-de microomologie). NHEJ poate să repare acidul nucleic țintă rupt fără să fie nevoie de o matriță omologă. Aceasta poate să conducă uneori la deleții sau la inserții având dimensiuni mici (indel-uri) în acidul nucleic țintă la situsul clivării și poate să conducă la perturbarea sau alterarea în ceea ce privește exprimarea genelor. HDR poate să apară atunci când este disponibilă o matriță de reparare omologă sau un donor. Matrița donor omologă poate să cuprindă secvențe care pot să fie omologe cu secvențele care flanchează situsul țintă de clivare la acidului nucleic. Cromatida soră poate să fie folosită de celulă drept matriță de reparare. Cu toate acestea, în scopul editării genomului, matrița de reparare poate să fie furnizată ca acid nucleic exogen, cum ar fi o plasmidă, un duplex, o oligonucleotidă, o oligonucleotidă monocatenară, o oligonucleotidă dublu-catenară sau un acid nucleic viral. Cu matrițele donor exogene, o secvență suplimentară de acid nucleic (cum ar fi o transgenă) sau o modificare (cum ar fi o modificare de bază simplă sau multiplă sau o deleție) poate să fie introdusă între regiunile de flancate de omologie, astfel încât și secvența suplimentară sau modificată de acid nucleic să devină incorporată în locusul țintă. Îmbinarea la extremitate mediată-pe microomologie (MMEJ) poate să conducă la un rezultat genetic care este similară cu Îmbinarea non-omologă la extremități (NHEJ) prin faptul că delețiile și inserțiile având dimensiuni mici pot să apară la situsul de clivare. MMEJ poate folosi secvențele omologe ale câtorva perechi de baze care flanchează situsul de clivare pentru a conduce la un rezultat favorizat în ceea ce privește repararea ADN-ului prin îmbinare de extremitate. În unele cazuri, poate să fie posibil să se prognozeze rezultate posibile ale reparării pe baza analizei microomologiilor potențiale în regiunile țintă ale nucleazei.

Astfel, în unele cazuri, recombinația omologă poate să fie utilizată pentru a introduce o secvență polinucleotidică exogenă în situsul țintă de clivare al acizilor nucleici. O secvență polinucleotidică exogenă este denumită o polinucleotidă donor (sau un donor sau o secvență donor sau o matriță donor polinucleotidică). Polinucleotida donor, o porțiune a polinucleotidei donor, o copie a polinucleotidei donor sau o porțiune a unei copii a polinucleotidei donor pot să fie insertate în situsul de clivare al acizilor nucleici țintă. Polinucleotida donor poate să fie o secvență polinucleotidică exogenă, adică o secvență care nu apare în mod natural la situsul țintă de clivare al acizilor nucleici.

Modificările ADN-ului țintă datorate NHEJ și/sau HDR pot să conducă, de exemplu, la mutații, deleții, modificări, integrări, corecție genică, înlocuire genică, marcare genică, inserție transgenică, deleția de nucleotide, perturbare genică, translocații și/sau mutație genetică. Procesele de deleția ADN-ului genomic și de integrarea acidului nucleic non-nativ în ADN-ul genomic sunt exemple de editare a genomului.

Sistemul de endonuclează CRISPR

Un locus genomic CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) poate să fie găsit în genomul multor procariote (de exemplu, bacterii și arhee). În cazul procariotelor, locusul CRISPR codifică produse care funcționează ca un tip de sistem imunitar pentru a contribui la apărarea procariotelor împotriva invadatorilor străini, cum ar fi virusul și bacteriofagul. Există trei stagii ale funcției locusului CRISPR: integrarea de noi secvențe în locusul CRISPR, exprimarea ARN-ului CRISPR (ARN_{cr}) și silențierea acidului nucleic invadator străin. S-au identificat cinci tipuri de sisteme CRISPR (de exemplu, Tip I, Tip II, Tip III, Tip U și Tip V).

Un locus CRISPR include un număr de secvențe scurte care se repetă, denumite "repetiții". Atunci când sunt exprimate, repetițiile pot forma structuri secundare (de exemplu, ace de păr) și/sau pot să cuprindă secvențe nestructurate monocatenare. Repetițiile apar, în mod obișnuit, în clustere și diferă frecvent de la o specie la alta. Repetițiile sunt intercalate, cu regularitate, cu secvențe intermediare unice denumite "distanțieri", rezultând o arhitectură de locus repetiție-distanțier-repetiție. Distanțierii sunt identici sau prezintă o omologie înaltă cu secvențe ale invadatorilor străini cunoscute. O unitate distanțier-repetiție codifică un ARN crispr (ARN_{cr}), care este transformat într-o formă matură a unității distanțier-

repetiție. Un ARNcr cuprinde o secvență "sămânță" sau o secvență distanțier care este implicată în direcționarea unui acid nucleic țintă (în forma naturală la procariote, secvența de spațiere direcționează acidul nucleic invadator străin). O secvență distanțier este situată la extremitățile 5' sau 3' ale ARNcr-ului.

Un locus CRISPR cuprinde, de asemenea, secvențe polinucleotidice care codifică genele asociate CRISPR (Cas). Genele Cas codifică endonucleazele implicate în biogeneza și etapele de interferență ale funcției ARNcr la procariote. Unele gene Cas cuprind structuri secundare și/sau terțiare omologe.

Sisteme CRISPR de Tip II

Biogeneza ARNcr într-un sistem CRISPR de tip II natural necesită un ARN CRISPR transactivator (ARNtracr). ARNtracr poate să fie modificat de RnaseIII endogenă și apoi hibridizează la o repetiție ARNcr în matricea pre-ARNcr. RnaseIII endogen poate să fie recrutată pentru a cliveze pre-ARNcr-ul. ARNcr-urile clivate pot să fie supuse tăierii exoribonucleazei pentru a produce forma ARNcr matură (de exemplu, tăierea 5'). ARNtracr poate rămâne hibridizat cu ARNcr, iar ARNtracr și ARNcr se asociază cu o polipeptidă direcționată-pe situs (de exemplu, cu Cas9). ARNcr al complexului ARNcr-ARNtracr-Cas9 poate să ghideze complexul către un acid nucleic țintă la care ARNcr se poate hibridiza. Hibridizarea ARNcr-ului la acidul nucleic țintă poate activa Cas9 pentru clivarea acidului nucleic țintă. Acidul nucleic țintă într-un sistem CRISPR de tip II este denumit un motiv adiacent protodistanțier (PAM). În natură, PAM-ul este esențial pentru a facilita legarea unei polipeptide direcționate pe situs (de exemplu, Cas9) la acidul nucleic țintă. Sistemele de tip II (numite și Nmeni sau CASS4) sunt subdivizate, în continuare, în Tipul II-A (CASS4) și II-B (CASS4a). Jinek și colaboratorii, *Science*, 337(6096):816-821 (2012) au arătat faptul că sistemul CRISPR/Cas9 este util pentru editarea genomului programabil cu ARN, iar publicația cererii de brevet de invenție internațională WO2013/176772 furnizează numeroase exemple și aplicații ale sistemului de endonuclează CRISPR/Cas pentru editarea genelor specifice-situsului.

Sisteme CRISPR de Tip V

Sistemele CRISPR de tip V prezintă câteva diferențe importante față de sistemele de tip II. De exemplu, Cpf1 este o endonuclează ghidată de un singur ARN care, spre deosebire de sistemele de tip II, nu are ARNtracr. De fapt, matricile CRISPR asociate-cu Cpf1 pot să fie procesate în ARNcr-uri mature fără a necesita un ARNtracr trans-activator suplimentar. Matricea CRISPR de tip V poate să fie procesată în ARNcr-uri mature scurte având de la 42 până la 44 de nucleotide în lungime, fiecare ARNcr matur începând cu nucleotida 19 repetitivă directă urmată de nucleotidele de la 23 până la 25 ale secvenței distanțier. În contrast, ARNcr-urile mature în sistemele de tip II pot să începe cu nucleotidele de la 20 până la 24 ale secvenței distanțier urmate de aproximativ 22 de nucleotide repetitive directe. De asemenea, Cpf1 poate să utilizeze un motiv adiacent protodistanțier bogat în T, astfel încât complexe Cpf1-ARNcr să cliveze eficient ADN-ul țintă precedat de un PAM scurt bogat în T, care este în contrast cu PAM-ul bogat în G care urmează ADN-ul țintă pentru sistemele de tip II. Astfel, sistemele de tip V clivează într-un punct care este îndepărtat de PAM, în timp ce sistemele de tip II clivează într-un punct care este adiacent PAM-ului. În plus, spre deosebire de sistemele de tip II, Cpf1 clivează ADN-ul printr-o clivare dublu-catenară al ADN-ului eşalonat cu o supraîncărcare 5' de 4 sau 5 nucleotide. Sistemele de tip II clivează printr-o clivare dublu-catenară. Similar cu sistemele de tip II, Cpf1 conține un domeniu de endonuclează de tip RuvC predicționat, dar nu are cel de-al doilea domeniu de endonuclează HNH, care este în contrast cu sistemele de tip II.

Gene Cas/Polipeptide și Motive Adiacente Protodistanțier

Exemplele de polipeptide CRISPR/Cas includ polipeptidele Cas9 din Fig.1 din documentul Fonfara și colaboratorii, *Nucleic Acids Research*, 42: 2577-2590 (2014). Sistemul de denumire a genelor CRISPR/Cas a suferit o rescriere extinsă de când au fost dezvăluite genele Cas. Astfel, Fig.5 din documentul Fonfara, *supra*, furnizează secvențe PAM pentru polipeptide Cas9 din diferite specii.

Polipeptide Direcționate - pe Situs

O polipeptidă direcționată-pe situs este o nuclează utilizată în editarea genomului pentru ca să cliveze ADN-ul. Nucleaza sau polipeptida direcționată-pe situs poate să fie administrată unei celule sau unui pacient fie ca una sau mai multe polipeptide, fie ca unul sau mai multe ARNm-uri care codifică pentru polipeptida.

În contextul unui sistem CRISPR/Cas sau CRISPR/Cpf1, polipeptida direcționată-pe situs se poate lega la un ARN ghid care, la rândul său, specifică situsul din ADN-ul țintă către care este direcționată polipeptida. În sistemele CRISPR/Cas sau CRISPR/Cpf1 care sunt dezvăluite, conform cu prezenta dezvăluire, polipeptida direcționată-pe situs poate să fie o endonuclează, cum ar fi o endonuclează ADN.

O polipeptidă direcționată-pe situs poate să cuprindă o multitudine de domenii -de clivare ale acidului nucleic (adică, nuclează). Două sau mai multe domenii de clivare ale acidului nucleic pot să fie

legate împreună printr-un linker. De exemplu, linkerul poate să cuprindă un linker flexibil. Linkerii pot să cuprindă: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 sau mai mulți aminoacizi în lungime.

Enzimele Cas9 de tip sălbatic, care apar în mod natural, cuprind două domenii nuclează, un domeniu nuclează HNH și un domeniu RuvC. Conform cu prezenta dezvăluire, enzimele „Cas9” se referă atât la enzimele Cas9 care apare în mod natural, cât și la enzimele Cas9- recombinate. Enzimele Cas9 luate în considerare, conform cu prezenta dezvăluire, pot să cuprindă un domeniu nuclează HNH sau asemănător HNH și/sau un domeniu nuclează asemănător-RuvC sau un domeniu nuclează RuvC.

Domeniile HNH sau de tipul HNH cuprind un pliu (fold) asemănător McrA. Domeniile HNH sau domeniile-de tipul HNH cuprind două catene- β antiparalele și un helix- α . Domeniile HNH sau de tipul HNH cuprind un situs de legare a metalului (de exemplu, un situs de legare a cationului divalent). HNH sau domenii de tipul HNH pot să cliveze o catenă a unui acid nucleic țintă (de exemplu, catena complementară a catenei țintite de ARNcr).

Domeniile RuvC sau de tipul-RuvC cuprind un pliu (fold) asemănător RnaseH sau RnaseH. Domeniile RuvC/RnaseH sunt implicate într-un set divers de funcții bazate pe acid nucleic, care includ acționarea atât asupra ARN-ului, cât și asupra ADN-ului. Domeniul RnaseH cuprinde 5 catene β înconjurate de o multitudine de elice- α . Domeniile de tipul RuvC/RnaseH sau RuvC/RnaseH cuprind un situs de legare a metalului (de exemplu, un situs de legare a cationului divalent). Domeniile RuvC/RnaseH sau RuvC/RnaseH pot să cliveze o catenă a unui acid nucleic țintă (de exemplu, catena non-complementară a unui ADN țintă dublu catenar).

Polipeptidele direcționate-pe situs pot să introducă ruperi dublu-catenare sau mai multe ruperi monocatenare în acizi nucleici, de exemplu, ADN-ul genomic. Ruperea dublu-catenară poate să stimuleze căile endogene de reparare a ADN-ului unei celule (de exemplu, repararea dependentă pe omologie (HDR) sau NHEJ sau îmbinarea finală non-omologă alternativă (A-NHEJ) sau îmbinarea finală mediată de microomologie (MMEJ)). NHEJ poate să repare acidul nucleic țintă clivat fără să mai fie nevoie de o matriță omologă. Aceasta poate să conducă uneori la deleții sau inserții având dimensiuni mici (indels) în acidul nucleic țintă la situsul de clivare și poate să conducă la perturbarea sau la alterarea în ceea ce privește exprimarea genelor. HDR poate să apară atunci când este disponibilă o matriță de reparare omologă sau o matriță donor omologă. Matrița donor omologă poate să cuprindă secvențe care sunt omologe cu secvențele care flanchează situsul țintă de clivare al acizilor nucleici. Cromatida soră poate să fie folosită de celulă drept matriță de reparare. Cu toate acestea, în scopul editării genomului, matrița de reparare poate să fie furnizată drept un acid nucleic exogen, cum ar fi o plasmidă, o oligonucleotidă duplex, o oligonucleotidă monocatenară sau un acid nucleic viral. Cu matrițele donor exogene, poate să fie introdusă o secvență suplimentară de acid nucleic (cum ar fi o transgenă) sau o modificare (cum ar fi o modificare de bază simplă sau multiplă sau o deleție) între regiunile de flancare de omologie, astfel încât și secvența suplimentară sau modificată de acid nucleic devine încorporată în locusul țintă. MMEJ-ul poate să conducă la un rezultat genetic care este similar cu NHEJ prin faptul că delețiile și inserțiile având dimensiuni mai mici pot să apară la situsul de clivare. MMEJ-ul poate să folosească secvențele omologe ale câtorva perechi de baze care flanchează situsul de clivare pentru a conduce la un rezultat favorizat de repararea ADN-ului prin îmbinare a extremităților. În unele cazuri, poate să fie posibil să se prognozeze rezultate potențiale ale reparării pe baza analizei microomologiilor potențiale în regiunile țintă de nuclează.

Astfel, în unele cazuri, recombinația omologă poate să fie utilizată pentru a introduce o secvență polinucleotidică exogenă în situsul țintă de clivare al acizilor nucleici. O secvență polinucleotidică exogenă este denumită, conform cu prezenta dezvăluire, o polinucleotidă donor (sau secvență donor sau donor). Polinucleotida donor, o porțiune a polinucleotidei donor, o copie a polinucleotidei donor sau o porțiune a unei copii a polinucleotidei donor poate să fie inserționată în situsul țintă de clivare al acizilor nucleici. Polinucleotida donor poate să fie o secvență polinucleotidică exogenă, adică o secvență care nu apare în mod natural la situsul țintă de clivare al acizilor nucleici.

Modificările ADN-ului țintă datorate îmbinării extremităților non-omologă (NHEJ) și/sau repararea direcționată pe omologie (HDR) pot să conducă, de exemplu, la mutații, deleții, modificări, integrări, corecție genică, înlocuire genică, marcare genică, inserție transgenă, deleție de nucleotide, perturbare genică, translocatii și/sau mutație genetică. Procesele referitoare la deleția ADN-ului genomic și la integrarea acidului nucleic non-nativ în ADN-ul genomic sunt exemple privind editarea genomului.

Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă o secvență de aminoacizi având cel puțin 10%, cel puțin 15%, cel puțin 20%, cel puțin 30%, cel puțin 40%, cel puțin 50%, cel puțin 60%, cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 99% sau 100% identitatea secvenței de aminoacizi cu o polipeptidă orientată pe situs, cu titlu de exemplu, de tip sălbatic [de exemplu, Cas9 din specia *S. pyogenes*, a se vedea cererea de brevet de invenție U.S.

2014/0068797 Sequence ID Nr. 8 sau documentul Sapranaukas *și colaboratorii*, Nucleic Acids Res, 39(21): 9275-9282 (2011)], și cu diverse alte polipeptide direcționate. Polipeptida direcționată-pe situs poate să prezinte identitate de cel puțin 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 sau 100% cu o polipeptidă direcționată-pe situs de tip sălbatic (de exemplu, Cas9 din specia *S. pyogenes*, *supra*) peste 10 aminoacizi contigui. Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă cel mult: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 sau 100% identitate cu o polipeptidă direcționată-pe situs de tip sălbatic (de exemplu, Cas9 din specia *S. pyogenes*, *supra*) peste 10 aminoacizi contigui. Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă cel puțin: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 sau 100% identitate cu o polipeptidă direcționată-pe situs de tip sălbatic (de exemplu, Cas9 din specia *S. pyogenes*, *supra*) peste 10 aminoacizi contigui într-un domeniu de nuclează HNH al polipeptidei direcționată pe situs. Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă cel mult: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 sau 100% identitate cu o polipeptidă direcționată-pe situs de tip sălbatic (de exemplu, Cas9 din specia *S. pyogenes*, *supra*) peste 10 aminoacizi contigui într-un domeniu nuclează HNH al polipeptidei direcționată pe situs. Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă cel puțin: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 sau 100% identitate cu o polipeptidă direcționată-pe situs de tip sălbatic (de exemplu, Cas9 din specia *S. pyogenes*, *supra*) peste 10 aminoacizi contigui într-un domeniu de nuclează RuvC al polipeptidei direcționată. Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă cel mult: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 sau 100% identitate cu o polipeptidă direcționată-pe situs de tip sălbatic (de exemplu, Cas9 din specia *S. pyogenes*, *supra*) peste 10 aminoacizi contigui într-un domeniu de nuclează RuvC al polipeptidei direcționată pe situs.

Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă o formă modificată a unei polipeptide direcționată pe situs de tip sălbatic cu titlu de exemplu. Forma modificată a polipeptidei direcționată pe situs de tip sălbatic, cu titlul de exemplu, poate să cuprindă o mutație care reduce activitatea-de clivare a acidului nucleic al polipeptidei direcționată pe situs. Forma modificată a polipeptidei direcționată pe situs de tip sălbatic, cu titlul de exemplu, poate avea mai puțin de 90%, mai puțin de 80%, mai puțin de 70%, mai puțin de 60%, mai puțin de 50%, mai puțin de 40%, mai puțin de 30%, mai puțin de 20%, mai puțin de 10%, mai puțin de 5% sau mai puțin de 1% din activitatea de clivare a acizilor nucleici ai polipeptidei direcționată pe situs de tip sălbatic, cu titlul de exemplu, (de exemplu, Cas9 din specia *S. pyogenes*, *supra*). Forma modificată a polipeptidei direcționată pe situs nu poate să aibă nicio activitate substanțială de clivare-a acizilor nucleici. Atunci când o polipeptidă direcționată-pe situs este o formă modificată care nu poate să aibă nicio activitate substanțială de clivare-a acizilor nucleici, aceasta este denumită, conform cu prezenta dezvăluire, „inactivă din punct de vedere enzimatic”.

Forma modificată a polipeptidei direcționată-pe situs poate să cuprindă o mutație astfel încât să poată să inducă o rupere monocatenară (SSB) pe un acid nucleic țintă (de exemplu, prin tăierea numai a unui schelet zahar-fosfat al unui acid nucleic țintit dublu-catenar). Mutația poate avea drept rezultat mai puțin de 90%, mai puțin de 80%, mai puțin de 70%, mai puțin de 60%, mai puțin de 50%, mai puțin de 40%, mai puțin de 30%, mai puțin de 20%, mai puțin de 10%, mai puțin de 5%, sau mai puțin de 1% din activitatea acizilor nucleici-de clivare în unul sau mai multe din multitudinea de domenii de clivare ale acizilor nucleici ai polipeptidei direcționată-pe situs de tip sălbatic (de exemplu, Cas9 din specia *S. pyogenes*, *supra*). Mutația poate avea drept rezultat unul sau mai multe din multitudinea de domenii de clivare ale acizilor nucleici, care păstrează capacitatea de clivare a catenei complementară acidului nucleic țintă, dar care reduce capacitatea acestuia de clivare a catenei non-complementară a acidului nucleic țintă. Mutația poate să conducă la unul sau mai multe din multitudinea de domenii ale acizilor nucleici de clivare, care păstrează capacitatea de clivare a catenei non-complementară acidului nucleic țintă, dar care reduce capacitatea acestuia de clivare a catenei complementară acidului nucleic țintă. De exemplu, resturile din polipeptida Cas9 din special *S. pyogenes* de tip sălbatic, cu titlu de exemplu, cum ar fi Asp10, His840, Asn854 și Asn856, sunt transformate pentru a inactiva unul sau mai multe dintre multitudinea de domenii de clivare a acizilor nucleici (de exemplu, domeniile de nuclează). Resturile care urmează să fie transformate pot să corespundă resturilor Asp10, His840, Asn854 și Asn856 din polipeptida Cas9 din specia *S. pyogenes* de tip sălbatic, cu titlu de exemplu, (de exemplu, așa cum este determinat prin alinierea secvențelor și/sau alinierea structurală). Exemple, cu caracter nelimitativ, de mutații includ D10A, H840A, N854A sau N856A. O persoană de specialitate în domeniu va recunoaște că pot să fie adecvate și alte mutații decât substituțiile de alanină.

O mutație D10A poate să fie combinată cu una sau cu mai multe dintre mutațiile H840A, N854A sau N856A pentru a produce o polipeptidă direcționată pe situs, lipsită în mod substanțial de activitate de clivare-a ADN-ului. O mutație H840A poate să fie combinată cu una sau mai multe dintre mutațiile D10A, N854A sau N856A pentru a produce o polipeptidă direcționată-pe situs lipsită, în mod substanțial, de activitate de clivare-a ADN-ului. O mutație N854A poate să fie combinată cu una sau mai multe dintre mutațiile H840A, D10A sau N856A pentru a produce o polipeptidă direcționată- pe situs, lipsită, în mod substanțial, de activitate de clivare-a ADN-ului. O mutație N856A poate să fie combinată cu una sau mai

multe dintre mutațiile H840A, N854A sau D10A pentru a produce o polipeptidă direcționată-pe situs, lipsită, în mod substanțial, de activitate de clivare-a ADN-ului. Polipeptide direcționate-pe situs care cuprind unul din domeniile nucleazei în inactive, mod substanțial, sunt denumite "nickaze".

Variante de "nickaze" ale endonucleazelor ghidate-ARN, de exemplu Cas9, pot să fie utilizate pentru a crește specificitatea editării genomului mediată de CRISPR. Polipeptida Cas9 de tip sălbatic este ghidată, în mod obișnuit, de un ARN ghid cu o singură moleculă conceput să hibridizeze cu o secvență de aproximativ 20 de nucleotide, specificată în secvența țintă (cum ar fi un locus genomic endogen). Cu toate acestea, mai multe incompatibilități pot să fie tolerate între ARN-ul ghid și locusul țintă, reducând, în mod eficient, lungimea omologiei necesare în situsul țintă, de exemplu, până la un nivel omologic de 13 nt și, prin urmare, rezultă un potențial crescut de legare și de clivarea acidului nucleic dublu-catenar de către complexul CRISPR/Cas9 în altă parte în genomul țintă – de asemenea cunoscut și sub denumirea de clivare în afara-țintei. Deoarece variantele de nickaze ale polipeptidei Cas9 taie fiecare numai o catenă, pentru a genera o clivare dublu-catenară, este necesar ca o pereche de nickaze să se lege în imediata vecinătate și pe catenele opuse ale acidului nucleic țintă, creând astfel o pereche de nick-uri, care sunt echivalente unei ruperi dublu-catenare. Acest lucru necesită ca două ARN-uri ghid separate - unul pentru fiecare nickază - trebuie să se lege în imediata vecinătate și pe catenele opuse ale acidului nucleic țintă. Această cerință dublează, în esență, lungimea minimă de omologie necesară pentru ca clivarea dublu-catenară să apară, reducând astfel probabilitatea ca un eveniment de clivare dublu-catenară să aibă loc în altă parte a genomului, unde cele două situsuri ARN-ghid - dacă acestea există - este puțin probabil ca acestea să fie suficient de apropiate unul de celălalt pentru a permite formarea ruperii dublu-catenară. Așa cum este descris în stadiul tehnicii, nickazele pot să fie, de asemenea, utilizate pentru a promova HDR-uri față de NHEJ-uri. HDR poate să fie utilizată pentru a introduce modificări selectate în situsurile țintă din genom prin utilizarea unor secvențe donor specifice care mediază în mod eficient modificările dorite.

Mutațiile, care sunt luate în considerare, pot să includă substituții, adăugiri și deleții, sau orice combinație a acestora. Mutația transformă aminoacidul mutant în alanină. Mutația transformă aminoacidul transformat într-un alt aminoacid (de exemplu, glicină, serină, treonină, cisteină, valină, leucină, izoleucină, metionină, prolină, fenilalanină, tirozină, triptofan, acid aspartic, acid glutamic, asparagine, glutamina, histidină, lizină sau arginină). Mutația transformă aminoacidul transformat într-un aminoacid non-natural (de exemplu, selenometionina). Mutația transformă aminoacidul transformat în imitații de aminoacizi (de exemplu, fosfomimici). Mutația poate să fie o mutație conservatoare. De exemplu, mutația transformă aminoacidul transformat în aminoacizi, care se seamănă, având dimensiunea, forma, sarcina, polaritatea, conformația și/sau rotamerii aminoacizilor transformați (de exemplu, mutația cisteină/serină, mutația lizină/asparagină, mutația histidină/fenilalanină). Mutația poate să provoace o modificare a cadrului de citire și/sau generarea unui codon de oprire prematur. Mutațiile pot să provoace modificări ale regiunilor reglatoare ale genelor sau ale locilor care afectează exprimarea uneia sau a mai multor gene.

Polipeptida direcționată-pe situs (de exemplu, variantă, transformată, polipeptida direcționată-pe situs inactivă din punct de vedere enzimatic și/sau inactivă enzimatic în mod condiționat) poate să țintească acidul nucleic. Polipeptida direcționată-pe situs (de exemplu, variantă, mutantă, endorfinonucleaza inactivă din punct de vedere enzimatic și/sau inactivă din punct de vedere enzimatic în mod condiționat) poate să țintească ADN-ul. Polipeptida direcționată-pe situs (de exemplu, variantă, transformată, endorfinonucleaza inactivă din punct de vedere enzimatic și/sau inactivă din punct de vedere enzimatic în mod condiționat) poate să țintească ARN-ul.

Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă una sau mai multe secvențe non-native (de exemplu, polipeptida direcționată-pe situs este o proteină de fuziune).

Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă o secvență de aminoacizi care cuprinde cel puțin 15% identitate aminoacizi cu o Cas9 provenită de la o bacterie (de exemplu, *S. pyogenes*), cu un domeniu de legare al acidului nucleic și cu două domenii de clivare ale acizilor nucleici (adică un domeniu HNH și un domeniu RuvC).

Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă o secvență de aminoacizi care cuprinde cel puțin 15% identitate aminoacizi cu o Cas9 provenită de la o bacterie (de exemplu, de la specia *S. pyogenes*) și două domenii de clivare a acizilor nucleici (adică un domeniu HNH și un domeniu RuvC).

Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă o secvență de aminoacizi care cuprinde cel puțin 15% identitate aminoacizi cu o Cas9 provenită de la o bacterie (de exemplu, de la specia *S. pyogenes*) și două domenii de clivare ale acizilor nucleici, în care unul sau ambele domenii de clivare ale acizilor nucleici cuprind cel puțin 50% identitate aminoacizi cu un domeniu nuclează de la Cas9 provenit de la o bacterie (de exemplu, din specia *S. pyogenes*).

Polipeptida direcționată-pe situs poate să cuprindă o secvență de aminoacizi care cuprinde cel puțin 15% identitate aminoacizi cu o Cas9 provenită de la o bacterie (de exemplu, din specia *S.*

pyogenes), cu două domenii de clivare ale acizilor nucleici (adică, un domeniu HNH și un domeniu RuvC) și cu o secvență non-nativă (de exemplu, un semnal de localizare nucleară) sau un linker, de legare polipeptida direcționată-pe situs de o secvență non-nativă.

Polipectida direcționată-pe situs poate să cuprindă o secvență de aminoacizi care cuprinde cel puțin 15% identitate aminoacizi cu o Cas9 provenită de la o bacterie (de exemplu, din specia *S. pyogenes*), cu două domenii de clivare ale acizilor nucleici (adică, un domeniu HNH și un domeniu RuvC), în care polipeptida direcționată-pe situs cuprinde o mutație în unul sau în ambele domenii de clivare ale acizilor nucleici, care reduce activitatea de clivare a domeniilor nucleazei cu cel puțin 50%.

Polipectida direcționată-pe situs poate să cuprindă o secvență de aminoacizi care cuprinde cel puțin 15% identitate aminoacizi cu o Cas9 provenită de la o bacterie (de exemplu, din specia *S. pyogenes*) și două domenii de clivare a acizilor nucleici (adică, un domeniu HNH și un domeniu RuvC), în care unul dintre domeniile nucleazei cuprinde mutația acidului aspartic 10 și/sau în care unul dintre domeniile nucleazei poate să cuprindă o mutație a histidinei 840, și în care mutația reduce activitatea de clivare a domeniului/ domeniilor nucleazei cu cel puțin 50%.

Una sau mai multe polipeptide direcționată-pe situs, de exemplu, endonucleazele ADN-ului pot să cuprindă două “nickaze” care realizează împreună o rupere dublu-catenară la un locus specific din genom, sau poate să cuprindă patru “nickaze” care împreună realizează sau provoacă două ruperi dublu-catenare la loci specifici din genom. În mod alternativ, o polipeptidă direcționată-pe situs, de exemplu, endonucleaza ADN-ului, poate să realizeze sau să provoace o rupere dublu-catenară la un locus specific din genom.

Polipectida direcționată-pe situs poate să fie flancată la N-terminal, la C-terminal sau atât la N-terminal cât și la C-terminal de unul sau de mai multe semnale de localizare nucleară (NLS). De exemplu o endonuclează Cas9 poate să fie flancată de două NLS-uri, un NLS situat la N-terminal și cel de-al doilea NLS situat la C-terminal. NLS-urile pot să fie orice NLS cunoscut în stadiul tehnicii, cum ar fi NLS SV40.

Acidul Nucleic care Țintește - Genomul

Prezenta dezvoltare furnizează un acid nucleic-care țintește genomul care poate să direcționeze activitățile unei polipeptide asociate (de exemplu, o polipeptidă direcționată-pe situs) către o secvență țintă specifică dintr-un acid nucleic țintă. Acidul nucleic-care țintește genomul poate să fie un ARN. Un ARN-care țintește genomul este denumit, conform cu prezenta dezvoltare „ARN ghid” sau „ARNg”. Un ARN ghid poate să cuprindă cel puțin o secvență distanțier, care hibridizează la o secvență țintă de acid nucleic de interes și o secvență repetitivă CRISPR. În sistemele de tip II, ARNg-ul cuprinde, de asemenea, un al doilea ARN denumit secvența ARNtracr. În ARN-ul ghid de tip II (ARNg), secvența repetitivă CRISPR și secvența ARNtracr hibridizează una cu cealaltă pentru a forma un duplex. În ARN-ul ghid de tip V (ARNg), ARNcr formează un duplex. În ambele sisteme, duplexul poate lega o polipeptidă direcționată-pe situs, astfel încât ARN-ul ghid și polipeptida direcționată-pe situs formează un complex. Acidul nucleic-care țintește genomul poate furniza complexului specificitate de țintă în virtutea asocierii sale cu polipeptida direcționată-pe situs. Acidul nucleic-care țintește genomul poate să direcționeze astfel activitatea polipeptidei direcționată-pe situs.

ARN-urile ghid exemplare includ secvențele distanțier din SECV ID NR: de la 1 până la 71.947 și secvențele ARNsg din SECV ID NR: 71.950-71.959 din Lista de secvențe. După cum este evident pentru o persoană de specialitate în domeniu, fiecare ARN ghid poate să fie conceput să includă o secvență distanțier complementară secvenței sale genomice țintă. De exemplu, fiecare dintre secvențele distanțier din SECV ID NR: de la 1 până la 71.947 din Lista de secvențe poate să fie introdusă într-o himeră ARN unică sau într-un ARNcr (împreună cu un ARNtracr corespunzător). *A se vedea Jinek și colaboratorii, Science, 337, 816-821 (2012) și Deltcheva și colaboratorii, Nature, 471, 602-607 (2011) sau Tabelul 1.*

Acidul nucleic-care țintește genomul poate să fie un ARN ghid cu o moleculă dublă. Acidul nucleic-care țintește genomul poate să fie un ARN ghid cu o singură moleculă.

Un ARN ghid cu moleculă-dublă poate să cuprindă două catene de ARN. Prima catenă cuprinde pe direcția 5' - 3', extinderea secvenței de spațiere opțională, o secvență distanțier și o secvență repetitivă minimă CRISPR. Cea de-a doua catenă poate să cuprindă o secvență ARNtracr minimă (complementară cu secvența repetitivă minimă CRISPR), o secvență de ARNtracr 3' și o secvență de extensie ARNtracr opțională.

Un ARN ghid cu o singură moleculă (ARNsg) într-un sistem de tip II poate să cuprindă, în direcția 5' - 3', extinderea secvenței de spațiere opțională, o secvență distanțier, o secvență repetitivă minimă CRISPR, un linker de ghidare cu o singură moleculă, o secvență minimă de ARNtracr, o secvență de ARNtracr 3' și o secvență de extensie de ARNtracr opțională. Extensia opțională de ARNtracr poate să cuprindă elemente care furnizează funcționalitate suplimentară (de exemplu, stabilitate) ARN-ului ghid.

Un ARN ghid cu o singură moleculă (ARNsg) într-un sistem de tip V poate să cuprindă, în 5 direcția 5' - 3', o secvență repetitivă CRISPR minimă și o secvență distantier.

ARNsg nu poate cuprinde uracil la extremitatea 3' a secvenței ARNsg, cum ar fi în SECV ID NR: 71.961 din Tabelul 1. ARNsg poate să cuprindă unul sau mai mulți uracili la extremitatea 3' a secvenței de ARNsg, cum ar fi în SECV ID NR: 71.962 din Tabelul 1. De exemplu, ARN-ul ghid cu o singură moleculă (ARNsg) poate să cuprindă 1 uracil (U) la extremitatea 3' a secvenței ARNsg. ARNsg-ul poate să cuprindă 2 uracil (UU) la extremitatea 3' a secvenței ARNsg. ARNsg-ul poate să cuprindă 3 uracil (UUU) la extremitatea 3' a secvenței ARNsg. ARNsg-ul poate să cuprindă 4 uracil (UUUU) la extremitatea 3' a secvenței ARNsg. ARNsg-ul poate să cuprindă 5 uracil (UUUUU) la extremitatea 3' a secvenței ARNsg. ARNsg-ul poate să cuprindă 6 uracil (UUUUUU) la extremitatea 3' a secvenței ARNsg. ARNsg-ul poate să cuprindă 7 uracil (UUUUUUU) la extremitatea 3' a secvenței ARNsg. ARNsg-ul poate să cuprindă 8 uracil (UUUUUUUU) la extremitatea 3' a secvenței ARNsg.

25 **Tabelul 1**

Cu titlu de ilustrare, ARN-urile ghid utilizate în sistemul CRISPR /Cas/Cpf1 sau alte ARN-uri având dimensiuni mai mici pot să fie sintetizate cu ușurință prin mijloace chimice, așa cum este ilustrat în cele ce urmează și cum este descris în stadiul tehnicii. În timp ce procedurile chimice de sinteză se extind continuu, purificările unor astfel de ARN-uri prin proceduri precum cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC, care evită utilizarea gelurilor precum PAGE) tinde să devină mai dificile, pe măsură ce lungimile polinucleotidelor cresc într-o manieră semnificativă dincolo de o sută sau mai multe nucleotide. O abordare utilizată pentru generarea de ARN-uri cu lungime mai mare se referă la producerea a două sau mai multe molecule care sunt legate împreună. ARN-urile mult mai lungi, cum ar fi acelea care codifică pentru o endonuclează Cas9 sau Cpf1, sunt mai ușor generate în mod enzimatic. Diferite tipuri de modificări ale ARN-ului pot să fie introduse în timpul sau după sinteza chimică și/sau generarea enzimatică de ARN-uri, de exemplu, modificările care îmbunătățesc stabilitatea, reduc probabilitatea sau gradul de răspuns imun înăscut și/sau îmbunătățesc alte atribute, așa cum este descris în stadiul tehnicii.

Conform cu unele exemple de acizi nucleici care țințește genom, extinderea secvenței de spațiere poate să modifice activitatea, poate să furnizeze stabilitate și/sau să furnizeze o locație pentru modificări a unui acid nucleic-care țințește genomul. Extinderea secvenței de spațiere poate să modifice activitatea sau specificitatea-pe țintă sau specificitatea-în afara țintei. Conform cu unele exemple, poate să fie furnizată o extindere a secvenței de spațiere. Extinderea secvenței de spațiere poate avea o lungime mai mare de 1, 5,

10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 sau mai mult de 70000 de nucleee. Extinderea secvenței de spațiere poate avea o lungime mai mică de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 sau mai mult de 7000 de nucleotide. Extinderea secvenței de spațiere poate avea o lungime cuprinsă de la 10 până la 30 de nucleotide. Extinderea secvenței de spațiere poate avea o lungime cuprinsă de la 30 până la 70 de nucleotide.

Secvența de spațiere de extensie poate să cuprindă un alt fragment (de exemplu, o secvență de control a stabilității, o secvență de legare-o endoribonuclează, o ribozimă). Fragmentul poate să reducă sau să mărească stabilitatea unui acid nucleic care țintește acidul nucleic. Fragmentul poate să fie un segment terminator al transcripției (adică, o secvență de terminare a transcripției). Fragmentul poate să funcționeze într-o celulă eucariotă. Fragmentul poate să funcționeze într-o celulă procariotă. Fragmentul poate să funcționeze atât în celulele eucariote, cât și în acele procariote. Exemplele, cu caracter nelimitativ, de fragmente adecvate includ: o extremitate 5' (de exemplu, o extremitate de 7-metilguanilat (m7 G)), o secvență riboswitch (de exemplu, care să permită stabilitatea reglată și/sau accesibilitatea reglată de proteine și complexe proteice), o secvență care formează un duplex de ARNs (adică, un ac de păr), o secvență care țintește ARN-ul către o locație subcelulară (de exemplu, nucleu, mitocondrii, cloroplaste și altele asemenea), o modificare sau secvență care să permită urmărirea (de exemplu, conjugarea direct cu o moleculă fluorescentă, conjugarea cu un fragment care facilitează detectarea fluorescentă, o secvență care permite detectarea fluorescentă etc.) și/sau o modificare sau o secvență care furnizează un situs de legare pentru proteine (de exemplu, proteine care acționează asupra ADN-ului, care includ activatori transcripționali, controale transcripționale, ADN metiltransferaze, ADN demetilaze, histon acetiltransferaze, histon deacetilaze și altele asemenea).

Secvența de Spațiere

Secvența de spațiere hibridizează la o secvență într-un acid nucleic țintă de interes. Distanțierul unui acid nucleic care țintește - genomul poate să interacționeze cu un acid nucleic țintă într-o manieră specifică - secvenței prin hibridizare (adică prin împerecherea bazelor). Secvența nucleotidică a distanțierului poate să varieze în funcție de secvența acidului nucleic de interes țintă.

Într-un sistem CRISPR/Cas, definit conform conform cu prezenta dezvoltare, secvența de spațiere poate să fie concepută pentru a hibridiza la un acid nucleic țintă, care este situat la extremitatea 5' a unui PAM al enzimei Cas9 utilizată în sistem. Distanțiatorul poate să fie perfect compatibil cu secvența țintă sau poate prezenta incompatibilități. Fiecare enzimă Cas9 posedă o anumită secvență a motivului adiacent protodistanțier (PAM) pe care acesta o recunoaște într-o moleculă de ADN țintă. De exemplu, *S. pyogenes* recunoaște într-un acid nucleic țintă un PAM care cuprinde secvența 5'-NRG-3', în care R cuprinde fie A sau G, în care N este orice nucleotidă și N este extremitatea 3' imediată a secvenței acidului nucleic țintită de secvența de spațiere.

Secvența de acid nucleic țintă poate să cuprindă 20 de nucleotide. Acidul nucleic țintă poate să cuprindă mai puțin de 20 de nucleotide. Acidul nucleic țintă poate să cuprindă mai mult de 20 de nucleotide. Acidul nucleic țintă poate să cuprindă cel puțin: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 sau mai multe nucleotide. Acidul nucleic țintă poate să cuprindă cel mult: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 sau mai multe nucleotide. Secvența de acid nucleic țintă poate să cuprindă 20 de baze la extremitatea 5' imediată a primei nucleotide a motivului adiacent protodistanțier (PAM). De exemplu, într-o secvență care cuprinde 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNRG-3' (SECV ID NR: 71.948), acidul nucleic țintă poate să cuprindă secvența care corespunde la mai mulți N, în care N este orice nucleotidă, iar secvența NRG subliniată este motiv adiacent protodistanțier (PAM) din specia *S. pyogenes*.

Secvența de spațiere care hibridizează la acidul nucleic țintă poate avea o lungime de cel puțin aproximativ 6 nucleotide (nt). Secvența de spațiere poate să fie de cel puțin aproximativ 6 nt, cel puțin aproximativ 10 nt, cel puțin aproximativ 15 nt, cel puțin aproximativ 18 nt, cel puțin aproximativ 19 nt, cel puțin aproximativ 20 nt, cel puțin aproximativ 25 nt, cel puțin aproximativ 25 nt, cel puțin aproximativ 30 nt, cel puțin aproximativ 35 nt sau cel puțin aproximativ 40 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 80 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 50 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 45 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 35 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 25 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 20 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 19 nt, de la aproximativ 10 nt până la aproximativ 50 nt, de la aproximativ 10 nt până la aproximativ 45 nt, de la aproximativ 10 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 10 nt până la aproximativ 35 nt, de la aproximativ 10 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 10 nt până la

aproximativ 25 nt, de la aproximativ 10 nt până la aproximativ 20 nt, de la aproximativ 10 nt până la aproximativ 19 nt, de la aproximativ 19 nt până la aproximativ 25 nt, de la aproximativ 19 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 19 nt până la aproximativ 35 nt, de la aproximativ 19 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 19 nt până la aproximativ 45 nt, de la aproximativ 19 nt până la aproximativ 50 nt, de la aproximativ 19 nt până la aproximativ 60 nt, de la aproximativ 20 nt până la aproximativ 25 nt, de la aproximativ 20 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 20 nt până la aproximativ 35 nt, de la aproximativ 20 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 20 nt până la aproximativ 45 nt, de la aproximativ 20 nt până la aproximativ 50 nt, sau de la aproximativ 20 nt până la aproximativ 60 nt. Conform cu unele exemple, secvența de spațiere poate să cuprindă 20 de nucleotide. Conform cu unele exemple, distanțierul poate să cuprindă 19 nucleotide.

Conform cu unele exemple, procentul de complementaritate între secvența de spațiere și acidul nucleic țintă este cel puțin aproximativ 30%, cel puțin aproximativ 40%, cel puțin aproximativ 50%, cel puțin aproximativ 60%, cel puțin aproximativ 65%, cel puțin aproximativ 70%, cel puțin aproximativ 75%, cel puțin aproximativ 80%, cel puțin aproximativ 85%, cel puțin aproximativ 90%, cel puțin aproximativ 95%, cel puțin aproximativ 97%, cel puțin aproximativ 98%, cel puțin aproximativ 99%, sau 100%. Conform cu unele exemple, procentul de complementaritate între secvența de spațiere și acidul nucleic țintă este cel mult aproximativ 30%, cel mult aproximativ 40%, cel mult aproximativ 50%, cel mult aproximativ 60%, cel mult aproximativ 65%, cel mult aproximativ 70%, cel mult aproximativ 75%, cel mult aproximativ 80%, cel mult aproximativ 85%, cel mult aproximativ 90%, cel mult aproximativ 95%, cel mult aproximativ 97%, cel mult aproximativ 98%, cel mult aproximativ 99%, sau 100%. Conform cu unele exemple, procentul de complementaritate între secvența de spațiere și acidul nucleic țintă este de 100% pe cele șase nucleotide cele mai contigue 5' ale secvenței țintă a catenei complementară a acidului nucleic țintă. Complementaritatea procentuală între secvența de spațiere și acidul nucleic țintă poate să fie cel puțin 60% pe aproximativ 20 de nucleotide contigue. Lungimea secvenței de spațiere precum și aceea corespunzătoare acidului nucleic țintă poate să difere cu 1 (una) până la 6 nucleotide, care pot să fie considerate ca o buclă sau bucle.

Secvența de spațiere poate să fie concepută sau selectată folosind un program de calculator. Programul de calculator poate să folosească variabile, cum ar fi temperatura de topire preconizată, formarea structurii secundare, temperatura de împerechere preconizată, identitatea secvenței, contextul genomic, accesibilitatea cromatinei, % GC, frecvența apariției genomice (de exemplu, a secvențelor care sunt identice sau sunt similare, dar variază într-un spot sau în mai multe spoturi ca urmare a incompatibilității, inserției sau deleției), starea de metilare, prezența SNP-urilor și altele asemenea.

Secvența Repetitivă CRISPR Minimă

O secvență repetitivă CRISPR minimă poate să fie o secvență cu cel puțin identitate de secvență: de aproximativ 30%, de aproximativ 40%, de aproximativ 50%, de aproximativ 60%, de aproximativ 65%, de aproximativ 70%, de aproximativ 75%, de aproximativ 80%, de aproximativ 85%, de aproximativ 90%, de aproximativ 95% sau de 100% cu o secvență repetitivă CRISPR de referință (de exemplu, ARNcr din specia *S. pyogenes*).

O secvență repetitivă CRISPR minimă poate să cuprindă nucleotide care se pot hibridiza la o secvență ARNtracr minimă într-o celulă. Secvența repetitivă CRISPR minimă și o secvență ARNtracr minimă pot să formeze un duplex, adică o structură dublu-catenară cu pereche de baze. Împreună, secvența repetitivă CRISPR minimă și secvența ARNtracr minimă se pot lega la polipeptida direcționată-pe situs. Cel puțin o parte din secvența repetitivă CRISPR minimă poate hibridiza la secvența ARNtracr minimă. Cel puțin o parte din secvența repetitivă CRISPR minimă poate să fie cel puțin aproximativ 30%, aproximativ 40%, aproximativ 50%, aproximativ 60%, aproximativ 65%, aproximativ 70%, aproximativ 75%, aproximativ 80%, aproximativ 85%, aproximativ 90%, aproximativ 95% sau 100% complementară cu secvența ARNtracr minimă. Cel puțin o parte din secvența repetitivă CRISPR minimă poate să fie cel mult aproximativ 30%, aproximativ 40%, aproximativ 50%, aproximativ 60%, aproximativ 65%, aproximativ 70%, aproximativ 75%, aproximativ 80%, aproximativ 85%, aproximativ 90%, aproximativ 95% sau 100% complementară cu secvența ARNtracr minimă.

Secvența repetitivă CRISPR minimă poate avea o lungime de la aproximativ 7 nucleotide până la aproximativ 100 de nucleotide. De exemplu, lungimea secvenței repetitive CRISPR minimă poate să fie cuprinsă în intervalul de la aproximativ 7 nucleotide (nt) până la aproximativ 50 nt, de la aproximativ 7 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 7 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 7 nt până la aproximativ 25 nt, de la aproximativ 7 nt până la aproximativ 20 nt, de la aproximativ 7 nt până la aproximativ 15 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 25 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 20 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 15 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 100 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 80 nt, de la aproximativ 15 nt până la

aproximativ 50 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 30 nt, sau de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 25 nt. Conform cu unele exemple, secvența repetitivă CRISPR minimă poate să cuprindă aproximativ 9 nucleotide în lungime. Secvența repetitivă CRISPR minimă poate să cuprindă aproximativ 12 nucleotide în lungime.

5 Secvența repetitivă CRISPR minimă poate să fie identică cel puțin aproximativ 60% cu o secvență repetitivă CRISPR minimă de referință (de exemplu, ARNcr de tip sălbatic din specia *S. pyogenes*) pe o lungime de cel puțin 6, 7 sau 8 nucleotide contigue. De exemplu, secvența repetitivă CRISPR minimă poate să fie identică cel puțin aproximativ 65%, cel puțin aproximativ 70%, cel puțin aproximativ 75%, cel puțin aproximativ 80%, cel puțin aproximativ 85%, cel puțin aproximativ 90%, cel puțin aproximativ 95%, cel puțin aproximativ 98%, cel puțin aproximativ 99% sau 100% identică cu o secvență repetitivă CRISPR minimă de referință pe o lungime de cel puțin 6, 7 sau 8 nucleotide contigue.

Secvență ARNtracr Minimă

15 O secvență ARNtracr minimă poate să fie o secvență care prezintă identitate de secvență de cel puțin: aproximativ 30%, aproximativ 40%, aproximativ 50%, aproximativ 60%, aproximativ 65%, aproximativ 70%, aproximativ 75%, aproximativ 80%, aproximativ 85%, aproximativ 90%, aproximativ 95%, sau 100% cu o secvență ARNtracr de referință (de exemplu, ARNtracr de tip sălbatic din specia *S. pyogenes*).

20 O secvență ARNtracr minimă poate să cuprindă nucleotide care hibridizează la o secvență repetitivă CRISPR minimă într-o celulă. O secvență ARNtracr minimă și o secvență repetitivă CRISPR minimă formează un duplex, adică o structură dublu-catenară cu pereche de baze. Împreună, secvența ARNtracr minimă și secvența repetitivă CRISPR minimă se pot lega la o polipeptidă direcționată-pe situs. Cel puțin o parte din secvența ARNtracr minimă poate hibridiza la secvența repetitivă CRISPR minimă. Secvența ARNtracr minimă poate să fie cel puțin: aproximativ 30%, aproximativ 40%, aproximativ 50%, aproximativ 60%, aproximativ 65%, aproximativ 70%, aproximativ 75%, aproximativ 80%, aproximativ 85%, aproximativ 90%, aproximativ 95 % sau 100% complementară cu secvența repetitivă CRISPR minimă.

30 Secvența ARNtracr minimă poate avea o lungime care variază de la aproximativ 7 nucleotide până la aproximativ 100 de nucleotide. De exemplu, secvența ARNtracr minimă poate să varieze în intervalul de la aproximativ 7 nucleotide (nt) până la aproximativ 50 nt, de la aproximativ 7 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 7 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 7 nt până la aproximativ 25 nt, de la aproximativ 7 nt până la aproximativ 20 nt, de la aproximativ 7 nt până la aproximativ 15 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 25 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 20 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 15 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 100 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 80 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 50 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 30 nt sau de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 25 nt lungime. Secvența ARNtracr minimă poate avea o lungime de aproximativ 9 nucleotide. Secvența ARNtracr minimă poate să cuprindă aproximativ 12 nucleotide. ARNtracr minimă poate să conștie din ARNtracr de la 23 până la 48 nt, așa cum este descris în documentul Jinek și colaboratorii, *supra*.

45 Secvența ARNtracr minimă poate să prezinte identitate de secvență cel puțin de aproximativ 60% cu o secvență de ARNtracr minimă de referință (de exemplu, de tip sălbatic, ARNtracr din specia *S. pyogenes*) pe o lungime de cel puțin 6, 7 sau 8 nucleotide contigue. De exemplu, secvența ARNtracr minimă poate să prezinte identitate de secvență cel puțin de: aproximativ 65%, aproximativ 70%, aproximativ 75%, aproximativ 80%, aproximativ 85%, aproximativ 90%, aproximativ 95%, aproximativ 98%, aproximativ 99% sau 100% cu o secvență ARNtracr minimă de referință pe o lungime de cel puțin 6, 7 sau 8 nucleotide contigue.

50 Duplexul dintre CRISPR ARN-ul minim și ARNtracr-ul minim poate să cuprindă un dublu helix. Duplexul dintre ARN-ul CRISPR minim și ARNtracr-ul minim poate să cuprindă cel puțin aproximativ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 sau mai multe nucleotide. Duplexul dintre ARN-ul CRISPR minim și ARNtracr-ul minim poate să cuprindă cel mult aproximativ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 sau mai multe nucleotide.

55 Duplexul poate să cuprindă o incompatibilitate (adică cele două catene ale duplexului nu sunt 100% complementare). Duplexul poate să cuprindă cel puțin aproximativ 1, 2, 3, 4 sau 5 sau incompatibilități. Duplexul poate să cuprindă cel mult aproximativ 1, 2, 3, 4 sau 5 incompatibilități. Duplexul poate să cuprindă nu mai mult de 2 incompatibilități.

Bucle (bulges)

În unele cazuri, poate să existe o „bucă (bulge)” în duplex între ARN-ul CRISPR minim și ARNtracr-ul minim. O buclă este o regiune nepereche de nucleotide din duplex. O buclă poate să contribuie la legarea duplexului de polipeptida direcționată-pe situs. Bucla poate să cuprindă, pe o parte a duplexului, un 5'-XXXY-3' nepereche în care X este orice purină și Y cuprinde o nucleotidă care poate să formeze o pereche de baze wobble cu o nucleotidă de pe catena opusă și o regiune de nucleotide nepereche pe cealaltă parte a duplexului. Numărul de nucleotide nepereche de pe cele două părți ale duplexului poate să fie diferit.

Conform cu un exemplu, bucla poate să cuprindă o purină nepereche (de exemplu, adenină) pe catena repetitivă CRISPR minimă a buclei. Conform cu unele exemple, bucla poate să cuprindă un 5'-AAGY-3' nepereche al catenei secvenței ARNtracr minimă a buclei, în care Y cuprinde o nucleotidă care poate să formeze o împerechere wobble cu o nucleotidă pe catena repetitivă CRISPR minimă.

O buclă pe partea repetitivă CRISPR minimă a duplexului poate să cuprindă cel puțin 1, 2, 3, 4 sau 5 sau mai multe nucleotide nepereche. O buclă pe partea repetitivă CRISPR minimă a duplexului poate să cuprindă cel mult 1, 2, 3, 4 sau 5 sau mai multe nucleotide nepereche. O buclă pe partea repetitivă CRISPR minimă a duplexului poate să cuprindă 1 nucleotidă nepereche.

O buclă pe partea secvenței ARNtracr minimă a duplexului poate să cuprindă cel puțin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 sau mai multe nucleotide nepereche. O buclă pe partea secvenței de ARNtracr minimă a duplexului poate să cuprindă cel mult 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 sau mai multe nucleotide nepereche. O buclă pe cea de-a doua parte a duplexului (de exemplu, partea secvenței ARNtracr minimă a duplexului) poate să cuprindă 4 nucleotide nepereche.

O buclă poate să cuprindă cel puțin o pereche wobble. Conform cu unele exemple, o buclă poate să cuprindă cel mult o pereche wobble. O buclă poate să cuprindă cel puțin o nucleotidă purinică. O buclă poate să cuprindă cel puțin 3 nucleotide purinice. O secvență a buclei poate să cuprindă cel puțin 5 nucleotide purinice. O secvență a buclei poate să cuprindă cel puțin o nucleotidă cu guanină. Conform cu unele exemple, o secvență a buclei poate să cuprindă cel puțin o nucleotidă cu adenină.

Structuri Ac de Păr

Conform cu diverse exemple, una sau mai multe structuri ac de păr pot să fie localizate în poziția 3' față de ARNtracr-ul minim în secvența ARNtracr 3'.

Structura ac de păr poate să înceapă cu cel puțin aproximativ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 sau 20 sau mai multe nucleotide 3' de la ultima nucleotidă pereche în duplexul secvenței repetitivă CRISPR minimă și al secvenței ARNtracr minimă. Structura ac de păr poate să înceapă cu cel mult aproximativ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 sau mai multe nucleotide 3' ale ultimei nucleotide pereche în duplexul secvenței repetitivă CRISPR minimă și și al secvenței ARNtracr minimă.

Structura ac de păr poate să cuprindă cel puțin aproximativ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 sau 20 sau mai multe nucleotide consecutive. Structura ac de păr poate să cuprindă cel mult aproximativ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 sau mai multe nucleotide consecutive.

Structura ac de păr poate să cuprindă o dinucleotidă CC (adică două nucleotide de citozină consecutive).

Structura ac de păr poate să cuprindă nucleotide duplexate (de exemplu, nucleotide cu structură ac de păr, hibridizate împreună). De exemplu, o structură ac de păr poate să cuprindă o dinucleotidă CC care este hibridizată la o dinucleotidă GG în duplexul în formă de ac de păr al secvenței ARNtracr 3'.

Una sau mai multe dintre structurile ac de păr pot să interacționeze cu regiunile care interacționează - cu ARN-ul ghid ale unei polipeptide direcționată-pe situs.

Conform cu unele exemple, există două sau mai multe ace de păr, iar conform cu alte exemple există trei sau mai multe ace de păr.

Secvența ARNtracr 3'

O secvență ARNtracr 3' poate să cuprindă o secvență cu identitate de secvență de cel puțin: aproximativ 30%, aproximativ 40%, aproximativ 50%, aproximativ 60%, aproximativ 65%, aproximativ 70%, aproximativ 75%, aproximativ 80%, aproximativ 85%, aproximativ 90 %, aproximativ 95% sau 100% cu o secvență ARNtracr de referință (de exemplu, cu ARNtracr din specia *S. pyogenes*).

Secvența ARNtracr 3' poate avea o lungime de la aproximativ 6 nucleotide până la aproximativ 100 de nucleotide. De exemplu, secvența ARNtracr 3' poate avea o lungime de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 50 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 25 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 20 nt, de la aproximativ 6 nt până la aproximativ 15 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 25 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 20 nt, de la aproximativ 8 nt până la aproximativ 15 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 100 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 80 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 50 nt, de la aproximativ 15 nt până la

aproximativ 40 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 30 nt, sau de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 25 nt. Secvența ARNtracr 3' poate avea o lungime de aproximativ 14 nucleotide.

Secvența ARNtracr 3' poate să prezinte identitate de secvență de cel puțin aproximativ 60% cu o secvență ARNtracr 3' de referință (de exemplu, secvența ARNtracr 3' de tip sălbatic din specia *S. pyogenes*) pe o lungime de cel puțin 6, 7 sau 8 nucleotide contigue. De exemplu, secvența ARNtracr 3' poate să prezinte identitate de secvență de cel puțin: aproximativ 60%, aproximativ 65%, aproximativ 70%, aproximativ 75%, aproximativ 80%, aproximativ 85%, aproximativ 90%, aproximativ 95%, aproximativ 98%, aproximativ 99% sau 100% cu o secvență ARNtracr 3' de referință (de exemplu, secvența ARNtracr 3' de tip sălbatic din specia *S. pyogenes*) pe o lungime de cel puțin 6, 7 sau 8 nucleotide contigue.

Secvența ARNtracr 3' poate să cuprindă mai mult de o regiune duplexată (de exemplu, ac de păr, regiune hibridizată). Secvența ARNtracr 3' poate să cuprindă două regiuni duplexate.

Secvența ARNtracr 3' poate să cuprindă o structură de buclă stem. Structura buclei stem din ARNtracr 3' poate să cuprindă cel puțin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 sau 20 sau mai multe nucleotide. Structura buclei stem din ARNtracr 3' poate să cuprindă cel mult 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 sau mai multe nucleotide. Structura buclei stem poate să cuprindă un fragment funcțional. De exemplu, structura buclei stem poate să cuprindă un aptamer, o ribozimă, un ac de păr care interacționează cu proteinele, cu o matrice CRISPR, cu un intron sau cu un exon. Structura buclei stem poate să cuprindă cel puțin aproximativ 1, 2, 3, 4 sau 5 sau mai multe fragmente funcționale. Structura buclei stem poate să cuprindă cel mult aproximativ 1, 2, 3, 4 sau 5 sau mai multe fragmente funcționale.

Structura ac de păr din secvența ARNtracr 3' poate să cuprindă un domeniu-P. Conform cu unele exemple, domeniul-P poate să cuprindă o regiune dublu- catenară în acul de păr.

Secvența ARNtracr de Extensie

O secvență ARNtracr de extensie poate să fie furnizată indiferent dacă ARNtracr-ul este în contextul ghidurilor cu o singură moleculă sau al ghidurilor cu moleculă-dublă. Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă de la o lungime care variază de la aproximativ 1 nucleotidă până la aproximativ 400 nucleotide. Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă de la o lungime mai mare de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380 sau 400 de nucleotide. Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă de la o lungime de la aproximativ 20 până la aproximativ 5000 sau mai multe nucleotide. Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă de la o lungime mai mare de 1000 de nucleotide. Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă de la o lungime mai mică de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400 sau mai multe nucleotide. Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă de la o lungime mai mică de 1000 de nucleotide. Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă mai puțin de 10 nucleotide în lungime. Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă de la 10-30 de nucleotide în lungime. Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă de la 30 până la 70 de nucleotide în lungime.

Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă un fragment funcțional (de exemplu, o secvență de control a stabilității, ribozimă, secvență de legare endoribonuclează). Fragmentul funcțional poate să cuprindă un segment terminator al transcripției (adică, o secvență de terminare a transcripției). Fragmentul funcțional poate avea o lungime totală de la aproximativ 10 nucleotide (nt) până la aproximativ 100 nucleotide, de la aproximativ 10 nt până la aproximativ 20 nt, de la aproximativ 20 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 30 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 40 nt până la aproximativ 50 nt, de la aproximativ 50 nt până la aproximativ 60 nt, de la aproximativ 60 nt până la aproximativ 70 nt, de la aproximativ 70 nt până la aproximativ 80 nt, de la aproximativ 80 nt până la aproximativ 90 nt, sau de la aproximativ 90 nt până la aproximativ 100 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 80 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 50 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 30 nt, sau de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 25 nt. Fragmentul funcțional poate să funcționeze într-o celulă eucariotă. Fragmentul funcțional poate să funcționeze într-o celulă procariotă. Fragmentul funcțional poate să funcționeze atât în celulele eucariote, cât și în acelea procariote.

Exemplele, cu caracter nelimitativ, de fragmente funcționale de extensie a ARNtracr adecvate includ: o coadă poli-adenilată 3', o secvență riboswitch (de exemplu, pentru a permite stabilitatea reglată și/sau accesibilitatea reglată de proteine și complexe proteice), o secvență care formează un duplex de ARNdc (adică un ac de păr), o secvență care țintește ARN-ul către o locație subcelulară (de exemplu, nucleu, mitocondrii, cloroplaste și altele asemenea), o modificare sau o secvență care permite urmărirea (de exemplu, conjugarea directă la o moleculă fluorescentă, conjugarea la o parte care facilitează detectarea fluorescentă, o secvență care permite detectarea fluorescentă etc.) și/sau o modificare sau secvență care furnizează un situs de legare pentru proteine (de exemplu, proteine care acționează asupra

ADN-ului, care includ activatori transcripționali, controale transcripționale, ADN metiltransferaze, ADN demetilaze, histon acetiltransferaze, histon deacetilaze și altele asemenea). Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă un situs de legare- primerul sau un index molecular (de exemplu, secvență de cod de bare). Secvența ARNtracr de extensie poate să cuprindă una sau mai multe tag-uri de afinitate.

5 **Secvență de Linker Ghid cu o Singură Moleculă**

Secvența linker a unui acid nucleic ghid cu o singură moleculă poate avea o lungime de la aproximativ 3 nucleotide până la aproximativ 100 de nucleotide. Conform cu documentul Jinek și colaboratorii, *supra*, de exemplu, a fost utilizată o „tetrabuclă” simplă cu 4 nucleotide (-GAAA-), a se vedea documentul Science, 337(6096):816-821 (2012). Un linker, cu titlu ilustrativ, are o lungime cuprinsă în intervalul: de la aproximativ 3 nt până la aproximativ 90 nt, de la aproximativ 3 nt până la aproximativ 80 nt, de la aproximativ 3 nt până la aproximativ 70 nt, de la aproximativ 3 nt până la aproximativ 60 nt, de la aproximativ 3 nt până la aproximativ 60 nt. aproximativ 50 nt, de la aproximativ 3 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 3 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 3 nt până la aproximativ 20 nt, de la aproximativ 3 nt până la aproximativ 10 nt. De exemplu, linkerul poate avea o lungime cuprinsă în intervalul: de la aproximativ 3 nt până la aproximativ 5 nt, de la aproximativ 5 nt până la aproximativ 10 nt, de la aproximativ 10 nt până la aproximativ 15 nt, de la aproximativ 15 nt până la aproximativ 20 nt, de la aproximativ 20 nt până la aproximativ 25 nt, de la aproximativ 25 nt până la aproximativ 30 nt, de la aproximativ 30 nt până la aproximativ 35 nt, de la aproximativ 35 nt până la aproximativ 40 nt, de la aproximativ 40 nt până la aproximativ 50 nt, de la aproximativ 50 nt până la aproximativ 60 nt, de la aproximativ 60 nt până la aproximativ 70 nt, de la aproximativ 70 nt până la aproximativ 80 nt, de la aproximativ 80 nt până la aproximativ 90 nt, sau de la aproximativ 90 nt până la aproximativ 100 nt. Linkerul unui acid nucleic ghid cu o singură moleculă poate să aibă o lungime cuprinsă între 4 și 40 de nucleotide. Linkerul poate să cuprindă cel puțin aproximativ 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500 sau 7000 sau mai multe nucleotide. Linkerul poate să cuprindă cel mult aproximativ 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500 sau 7000 sau mai multe nucleotide.

Linkerii pot să cuprindă oricare dintr-o varietate de secvențe, deși conform cu unele exemple, linkerul nu va cuprinde secvențe care au regiuni extinse de omologie cu alte porțiuni ale ARN-ului ghid, care ar putea să provoace legarea intramoleculară, care ar putea interfera cu alte regiuni funcționale ale ghidului. Conform cu documentul Jinek și colaboratorii, *supra*, a fost utilizată o secvență simplă de 4 nucleotide -GAAA, a se vedea documentul Science, 337(6096):816-821 (2012), dar numeroase alte secvențe, care includ secvențe mai lungi pot să fie, de asemenea, utilizate.

Secvența linker poate să cuprindă un fragment funcțional. De exemplu, secvența linker poate să prezinte una sau mai multe caracteristici, care includ: un aptamer, o ribozimă, un ac de păr care interacționează cu proteina, un situs de legare- o proteină, o matrice CRISPR, un intron sau un exon. Secvența linker poate să cuprindă cel puțin aproximativ 1, 2, 3, 4 sau 5 sau mai multe fragmente funcționale. Conform cu unele exemple, secvența linker poate să cuprindă cel mult aproximativ 1, 2, 3, 4 sau 5 sau mai multe fragmente funcționale.

O etapă a metodelor *ex vivo*, definite conform cu prezenta dezvăluire, poate să cuprindă editarea celulelor iPSC specifice pacientului utilizând ingineria genetică a genomului. În mod alternativ, o etapă a metodelor *ex vivo*, definite conform cu prezenta dezvăluire, poate să cuprindă editarea celulelor stem mezenchimale sau a celei progenitoare hematopoietice. De asemenea, o etapă a metodelor *in vivo*, definite conform cu prezenta dezvăluire, poate să cuprindă editarea celulelor în cazul unui pacient, care suferă de hemoglobinopatie, utilizând ingineria genetică a genomului. În mod similar, o etapă în metodele celulare, definite conform cu prezenta dezvăluire, poate să cuprindă editarea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN, care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A într-o celulă umană, prin inginerie genomică.

Pacienții diferiți care suferă de hemoglobinopatie vor necesita, în general, strategii diferite de deleție, de modulare sau de inactivare. Orice endonuclează CRISPR poate să fie utilizată în metodele definite conform cu prezenta dezvăluire, fiecare endonuclează CRISPR având propriul PAM asociat, care poate să fie sau nu poate să fie specific unei boli. De exemplu, secvențe distanțiere ARNg pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe ADN, care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A cu endonucleaza CRISPR/Cas9 din specia *S. pyogenes*, s-au identificat în SECV ID NR: de la 1 până la 29.482 din Lista de secvențe. Secvențele distanțier ARNg pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN, care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A cu o endonuclează CRISPR/Cas9 din specia *S. pyogenes*, s-au identificat în SECV ID NR: de la 29.483 până la 32.387 din Lista de secvențe. Secvențele distanțier ARNg pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe ADN, care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A cu o endonuclează CRISPR/Cas9 din specia *S.*

thermophilus, s-au identificat în SECV ID NR. de la 32.388 până la 33.420 din Lista de secvențe. Secvențele distanțier ARNg pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A cu o endonuclează CRISPR/Cas9 din specia *T. denticola*, s-au identificat în SECV ID NR. de la 33.421 până la 33.851 din

5 Lista de secvențe. Secvențele distanțier ARNg pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A cu o endonuclează CRISPR/Cas9 din specia *N. meningitidis* s-au identificat în SECV ID NR. de la 33.852 până la 36.731. Secvențele distanțier ARNg pentru țintirea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe ADN, care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A cu o

10 endonuclează CRISPR/Cpf1 din specia *Acidominococcus*, specia *Lachnospiraceae* și specia *Franciscella Novicida*, s-au identificat în SECV ID NR. de la 36.732 până la 71.947.

De exemplu, secvența de control transcripțional a genei BCL11A poate să fie modulată sau inactivată prin deleții, care apar datorită căii de îmbinare a extremităților non-omologă (NHEJ). Îmbinarea non-omologă la extremități (NHEJ) poate să fie utilizată pentru a șterge segmente ale secvenței de control

15 transcripțional a genei BCL11A, fie direct, fie prin modificarea situsurilor donor sau acceptor de îmbinare prin clivare de către un ARNg care țintește mai multe locații sau mai multe ARNg-uri.

Secvența de control transcripțional a genei BCL11A poate să fie, de asemenea, modulată sau inactivată prin inserția unei gene BCL11A de tip sălbatic sau prin inserția unui ADNc, care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată. De exemplu, donorul pentru modularea sau activarea prin

20 reparare direcționată pe omologie (HDR) conține secvența de control transcripțional modificată a genei BCL11A cu brațe de omologie de flancare având dimensiuni mici sau având dimensiuni mari pentru a permite împerecherea. HDR-ul este în esență un mecanism fără erori, care utilizează o secvență de ADN omologă furnizată ca matriță în timpul reparării ruperilor dublu-catenare (DSB). Rata de reparare direcționată pe omologie (HDR) este o funcție a distanței dintre secvența de control transcripțional și

25 situsul de tăiere, astfel încât alegerea situsurilor țintă suprapuse sau cele mai învecinate este importantă. Matrițele pot să includă secvențe suplimentare flancate de regiunile omologe sau pot să conțină o secvență care diferă de secvența genomică, permițând astfel editarea secvenței.

În plus, pe lângă modularea sau inactivarea secvenței de control transcripțional a genei BCL11A prin Îmbinarea non-omologă la extremități (NHEJ) sau prin reparare direcționată pe omologie (HDR),

30 sunt posibile o serie de alte opțiuni. Dacă există deleții având dimensiuni mici sau având dimensiuni mari, poate să fie introdus un ADNc, care conține o secvență de control transcripțional modificată. Un ADNc având lungime completă poate să fie introdus în orice „refugiu de siguranță”, dar trebuie să folosească un promotor fiziologic sau un alt promotor. Dacă acest construct este dirijat în locația corectă, va avea control fiziologic, similar cu gena normală. Perechile de nucleaze pot să fie utilizate pentru a șterge

35 regiunile genelor, totuși, în mod obișnuit, ar trebui furnizat un donor pentru a modula sau pentru a inactiva funcția. În acest caz, ar fi furnizate două ARNg-uri și o secvență donor.

Unele strategii de inginerie genetică a genomului implică modularea sau inactivarea unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A prin deleția cel puțin a unei părți din secvența de control transcripțional a genei BCL11A și/sau prin introducerea unei gene BCL11A de tip sălbatic sau a

40 unui ADNc, care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată în locusul genei corespunzătoare sau în locusul „refugiu de siguranță” prin reparare direcționată pe omologie (HDR), care este cunoscută și drept recombinare omologă (HR). Această strategie poate să moduleze sau să inactiveze secvența de control transcripțional a genei BCL11A și poate să inverseze, să trateze și/sau atenueze starea de boală. Nucleotidele donor pentru secvențele de control transcripțional de modulare/inactivare sunt

45 adesea mici (< 300 bp). Acest aspect este avantajos, deoarece eficiența reparării direcționată pe omologie (HDR) poate să fie invers legată de dimensiunea moleculei donor. De asemenea, este de așteptat ca matrițele donor să fie compatibile cu molecula virusului adeno-asociat constrâns de mărime (AAV), fapt care s-a dovedit că este un mijloc eficient de livrare a matriței donor.

Repararea direcționată pe omologie este un mecanism celular pentru repararea ruperilor dublu-catenare (DSB-uri). Cea mai obișnuită formă este recombinarea omologă. Există căi suplimentare pentru

50 HDR, care includ împerecherea monocatenei și HDR alternativ. Instrumentele de inginerie genetică a genomului permit cercetătorilor să manipuleze căile de recombinare omologă celulară pentru a genera modificări specifice ale genomului. S-a constatat faptul că celulele pot să repare o rupere dublu-catenară folosind o moleculă donor sintetică furnizată în formă *trans*. Prin urmare, prin introducerea unei ruperi dublu-catenare în vecinătatea unei mutații specifice și furnizarea unui donor adecvat, pot să fie realizate

55 modificări țintite în genom. Clivarea specifică crește rata HDR de mai mult de 1.000 de ori peste rata de 1 în 10⁶ celule, care primesc numai un donor omolog. Rata de reparare direcționată pe omologie (HDR) pentru o anumită nucleotidă este o funcție a distanței până la situsul de tăiere, astfel încât alegerea

situsurilor țintă suprapuse sau a celor mai învecinate este importantă. Editarea genelor furnizează un avantaj față de adăugarea genelor, deoarece corectarea *in situ* lasă restul genomului non-perturbat.

Donorii furnizați pentru editare prin HDR, variază, în mod semnificativ, dar pot să conțină secvența preconizată având brațe de omologie de flancare, cu dimensiuni mici sau cu dimensiuni mari pentru a permite recoacerea pentru ADN-ul genomic. Regiunile de omologie care flanchează modificările genetice introduse pot să fie de 30 pb sau mai mici sau la fel de mari precum o casetă multi-kilobază, care poate să conțină promotori, ADNc etc. S-au utilizat atât donori de oligonucleotide monocatenare cât și de oligonucleotide dublu-catenare. Aceste oligonucleotide variază în ceea ce privește dimensiunea de la mai puțin de 100 nt la peste mai mulți kb, deși poate să fie, de asemenea, generat și utilizat ADNss-ul mai lung. Pot să fie utilizați donori dublu-catenari, care includ ampliconi PCR, plasmide și mini-cercuri. În general, s-a constatat faptul că un vector AAV poate să fie un mijloc foarte eficient de livrare a unei matrițe donor, deși limitele de împachetare pentru donorii individuali sunt < 5kb. Transcripția activă a donorului a amplificat repararea direcționată pe omologie (HDR) de trei ori, ceea ce indică faptul că includerea promotorului poate să crească conversia. În schimb, metilarea CpG a donorului a redus exprimarea genelor și repararea direcționată pe omologie (HDR).

În plus, pe lângă endonucleazele de tip sălbatic, cum ar fi Cas9, există variante de nickază, care au un domeniu sau un alt domeniu nuclează inactivat, ceea ce conduce la tăierea numai a unei catene de ADN. HDR poate să fie direcționată din nickazele Cas individuale sau folosind perechile de nickaze care flanchează zona țintă. Donorii pot să fie monocatenari, tăiați(niked) sau ADNds-uri.

ADN-ul donor poate să fie furnizat cu nuclează sau în mod independent folosind o varietate de metode diferite, de exemplu: prin transfecție, prin formare de nanoparticule, prin micro-injecție sau prin transducție virală. Au fost propuse o serie de opțiuni de atașare (tethering) pentru a crește disponibilitatea donoriilor pentru repararea direcționată pe omologie (HDR). Exemplele se referă la atașarea donorului la nuclează, atașarea la proteinele de legare a ADN-ului, care se leagă în proximitate sau atașarea la proteinele care sunt implicate în legarea sau în repararea extremităților ADN-ului.

Alegerea căii de reparare poate să fie ghidată de o serie de condiții de cultură, cum ar fi acelea care influențează ciclul celular, sau prin țintirea reparării ADN-ului și a proteinelor asociate. De exemplu, pentru a crește HDR-ul, moleculele cheie NHEJ pot să fie suprimate, cum ar fi KU70, KU80 sau ADN ligaza IV.

Fără prezența unui donor, extremitățile de la clivarea ADN-ului sau extremitățile de la diferite ruperi pot să fie unite utilizând mai multe căi de reparare non-omologă în care extremitățile ADN-ului sunt unite printr-o împerechere de baze mică sau fără împerechere de baze la joncțiune. Pe lângă NHEJ canonică, există mecanisme de reparare similare, cum ar fi calea alt-NHEJ. Dacă există două ruperi, segmentul intermediar poate să fie șters sau inversat. Căile de reparare NHEJ pot să conducă la inserții, la deleții sau la mutații la nivelul îmbinărilor.

NHEJ a fost utilizată pentru inserția unei casete de exprimare genică inductibilă de 15 kb într-un locus definit în liniile celulare umane după clivarea nucleazei. Maresca, M., Lin, V.G., Guo, N. & Yang, Y., *Genome Res* 23, 539-546 (2013).

În plus, față de editarea genomului prin NHEJ sau prin HDR, s-au efectuat inserții de gene specifice situs-ului, folosind NHEJ, cât și HR. O abordare combinată poate să fie aplicabilă în anumite setări, care includ eventual granițele intron/exon. NHEJ se poate dovedi eficientă pentru ligatura în intron, în timp ce HDR fără erori poate să fie mai adecvată în regiunea de codificare.

Ca o alternativă suplimentară, gena BCL11A de tip sălbatic sau ADNc-ul care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată pot să fie introduse în locusul genei corespunzătoare sau pot să fie introduse într-un situs de refugiu de siguranță, cum ar fi AAVS1-ul. Conform cu unele exemple, metodele pot să furnizeze un ARNg sau o pereche de ARNg, care pot să fie utilizate pentru a facilita incorporarea unei noi secvențe dintr-o matriță donor de polinucleotidă, în scopul de a înlocui o parte sau întreaga genă BCL11A de tip sălbatic sau o parte sau întreaga moleculă de ADNc, care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată.

Metodele pot să furnizeze perechi de ARNg, care efectuează o deleție prin tăierea genei de două ori, un ARNg tăiat la extremitatea 5' a uneia sau a mai multor mutații și celălalt ARNg tăiat la extremitatea 3' a uneia sau al mai multor mutații, ceea ce facilitează inserția unei noi secvențe dintr-o matriță donor de polinucleotide, în scopul de a înlocui secvența de control transcripțional a genei BCL11A. Tăierea poate să fie realizată printr-o pereche de endonucleaze ADN, fiecare producând o rupere dublu-catenară (DBS) în genom sau prin multiple "nickaze" care împreună produc o rupere dublu-catenară (DSB) în genom.

În mod alternativ, metodele pot să furnizeze un ARNg, pentru efectuarea unei tăieri dublu-catenară în jurul unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A, care facilitează inserția unei noi secvențe dintr-o matriță donor de polinucleotide, în scopul de a înlocui secvența de control

transcripțional a genei BCL11A cu o genă BCL11A de tip sălbatic sau cu un ADNc, care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată. Tăierea dublu-catenară poate să fie realizată pe o endonuclează ADN monocatenară sau pe mai multe "nickaze" care împreună formează o rupere dublu-catenară (DSB) în genom.

Modificările, cu titlu ilustrativ, în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau ale unei alte secvențe ADN, care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A, includ înlocuiri în interiorul sau în vecinătatea secvenței de control transcripțional a genei BCL11A, care s-a menționat mai sus, cum ar fi în cadrul unei regiuni având mai puțin de 3 kb, mai puțin de 2 kb, mai puțin de 1 kb, mai puțin de 0,5 kb, care este situată în amonte sau în aval de secvența de control transcripțional.

Astfel de variante pot să includă înlocuiri, care sunt mai mari pe direcția extremității 5' și/sau pe direcția extremității 3' decât înlocuirea în discuție specifică sau care sunt mai mici în oricare dintre direcții. În consecință, prin termenii „în vecinătatea” sau „în apropierea”, în ceea ce privește înlocuirile specifice, se preconizează că locusul SSB sau locusul DSB asociat cu limita de înlocuire dorită (denumită în prezenta dezvăluire și punct final) poate să fie într-o regiune care este mai mică decât aproximativ 3 kb față de locusul de referință indicat. Locusul SSB sau locusul DSB poate să fie mai apropiat și situat la mai puțin de 2 kb, la mai puțin de 1 kb, la mai puțin de 0,5 kb sau la mai puțin de 0,1 kb. În cazul unei înlocuiri având dimensiuni mai mici, punctul final dorit poate să fie la sau „adiacent față de” locusul de referință, prin care se preconizează ca punctul final să fie situat la 100 bp, la 50 bp, la 25 bp sau la mai puțin de aproximativ de la 10 bp până la 5 pb față de locusul de referință.

Exemplele, care cuprind înlocuiri cu dimensiuni mai mari sau înlocuiri cu dimensiuni mai mici, pot să fie preconizate să furnizeze același beneficiu, atâta timp cât activitatea privind controlul transcripțional este modulată sau inactivată. Astfel, este de așteptat ca multe variații, care se referă la înlocuirile descrise și ilustrate, conform cu prezenta dezvăluire, să poată să fie eficiente pentru ameliorarea hemoglobinopatiilor.

O altă strategie de inginerie a genomului implică deleția unui exon sau deleția unui intron. Deleția țintită, în ceea ce privește exonii sau intronii, poate să fie considerată o strategie atractivă pentru tratamentul unui subset mare de pacienți folosind un singur cocktail terapeutic. Delețiile pot să fie: fie deleția unui exon unic sau a unui intron unic, fie deleții multi-exon sau deleții multi-intron. În timp ce delețiile multi-exon pot să ajungă la un număr mai mare de pacienți, în cazul delețiilor mai mari, eficiența delețiilor scade foarte mult odată cu creșterea dimensiunii. Prin urmare, domeniul delețiilor poate să fie cuprins în intervalul de la 40 până la 10.000 de perechi de baze (bp) ca dimensiune. De exemplu, delețiile pot să varieze: de la 40 până la 100; de la 100 până la 300; de la 300 până la 500; de la 500 până la 1.000; de la 1.000 până la 2.000; de la 2.000 până la 3.000; de la 3.000 până la 5.000; sau de la 5.000 până la 10.000 de perechi de baze în dimensiune. Poate să fie de dorit să se șteargă un intron, dacă intronul respectiv conține un element de reglare, cum ar fi un element de control transcripțional (de exemplu, un situs de legare al factorului de transcripție).

Pentru a se asigura că pre-ARNm s-a procesat în mod corespunzător după deleție, semnalele de îmbinare din jur pot să fie șterse. Donorii și acceptorii de îmbinare sunt, în general, în număr de 100 de perechi de baze ale intronului din vecinătate. Prin urmare, conform cu unele exemple, metodele pot să furnizeze toate ARNg-urile care taie aproximativ +/- 100-3100 bp în raport cu fiecare joncțiune exon/intron de interes.

Pentru oricare dintre strategiile de editare a genomului, editarea genelor poate să fie confirmată prin secvențiere sau prin analiză PCR.

Selectarea Secvenței Țintă

Deplasările în locația graniței 5' și/sau a graniței 3', în raport cu anumiți loci de referință, pot să fie utilizate pentru a facilita sau pentru a îmbunătăți aplicațiile speciale de editare a genelor, care depind parțial de sistemul de endonuclează care s-a selectat pentru editare, așa cum este descris în continuare și ilustrat conform cu prezenta dezvăluire.

Într-un prim exemplu nelimitativ referitor la o astfel de selecție a secvenței țintă, multe sisteme de endonuclează se bazează pe reguli sau pe criterii, care pot să ghideze selecția inițială a situsurilor țintă potențiale de clivare, cum ar fi necesitatea unui motiv de secvență PAM într-o poziție specială adiacentă situsurilor de clivare ale ADN-ului, în cazul endonucleazei CRISPR de tip II sau de tip V.

Într-un alt exemplu nelimitativ, selecția sau optimizarea secvenței țintă, frecvența activității în afara țintei, în cazul unei combinații speciale dintre secvența țintă și endonucleaza de editare a genei (de exemplu, frecvența DSB-urilor, care apar în alte situsuri decât secvența țintă selectată) pot să fie evaluate în raport cu frecvența activității - pe țintă. În unele cazuri, celulele, care au fost corect editate la situsul dorit, pot avea un avantaj selectiv față de alte celule. Exemple cu titlu ilustrativ, dar cu caracter nelimitativ, referitoare la un avantaj selectiv includ: dobândirea de atribute, cum ar fi ratele îmbunătățite de replicare, de persistență, de rezistență în anumite condiții, ratele îmbunătățite de grefare sau de

persistență de succes *in vivo* după introducerea în organismul unui pacient precum și alte atribute asociate cu menținerea sau cu creșterea numărului sau a viabilității unor astfel de celule. În alte cazuri, celulele care au fost editate corect la locusul dorit pot să fie selectate pozitiv folosind una sau mai multe metode de screening utilizate pentru a identifica, pentru a sorta sau pentru a selecta în alt mod celulele care au fost editate corect. Atât avantajul selectiv, cât și metodele de selecție direcționată pot să beneficieze de fenotipul asociat corectării. În unele cazuri, celulele pot să fie editate de două sau de mai multe ori pentru efectuarea celei de-a doua modificări, care generează un nou fenotip, care este utilizat pentru a selecta sau pentru a purifica populația de celule care este dorită. O astfel de cea de-a doua modificare ar putea să fie efectuată prin adăugarea unui al doilea ARNg pentru un marker selectabil sau ecranabil. În unele cazuri, celulele pot să fie editate corect la locusul dorit folosind un fragment de ADN care conține ADNc și, de asemenea, un marker selectabil.

Indiferent dacă vreun avantaj selectiv este aplicabil sau orice selecție direcționată urmează să fie aplicată conform cu un caz special, selecția secvenței țintă poate să fie, de asemenea, ghidată prin luarea în considerare a frecvențelor în afara țintei, pentru a îmbunătăți eficacitatea aplicației și/sau pentru a reduce potențialul de apariție a modificărilor nedorite în alte situsuri decât în ținta dorită. Așa cum este descris în continuare și ilustrat, conform cu prezenta dezvoltare precum și în stadiul tehnicii, apariția activității în afara țintei poate să fie influențată de un număr de factori care include: asemănări și diferențe între situsul țintă și diferite situsuri în afara-țintei, precum și endonucleaza specială utilizată. Sunt disponibile instrumente de bioinformatică, care permit predicția activității în afara țintei și, în mod frecvent, astfel de instrumente pot să fie utilizate și pentru identificarea celor mai probabile situsuri de activitate în afara-țintei, care pot să fie, apoi, evaluate prin setări experimentale, pentru evaluarea frecvențele relative ale activității în afara țintei față de activitatea pe-țintă, permițând astfel selecția secvențelor, care prezintă activități-pe țintă relativ mai mari. Exemplele, cu titlu ilustrativ, de astfel de tehnici sunt furnizate în prezenta dezvoltare, iar altele sunt cunoscute în stadiul tehnicii.

Un alt aspect privind selecția secvenței țintă se referă la evenimentele de recombinare omologă. Secvențele care partajează regiuni de omologie pot să servească drept puncte focale pentru evenimentele de recombinare omologă, care au drept rezultat deleția secvențelor care intervin. Astfel de evenimente de recombinare apar în cursul normal al replicării cromozomilor și a altor secvențe ADN, precum și în alte momente atunci când secvențele ADN-ului sunt sintetizate, cum ar fi în cazul reparărilor ruperilor dublu-catenare (DSB-uri), care cu regularitate, apar în timpul ciclului normal de replicare celulară, dar pot să fie, de asemenea, îmbunătățite prin apariția diferitelor evenimente (cum ar fi lumina UV și alți inductori ai ruperilor ADN-ului) sau prezența anumitor agenți (cum ar fi diverși inductori chimici). Mulți dintre astfel de inductori determină apariția la întâmplare a DSB-urilor în genom, iar DSB-urile pot să fie induse și reparate, cu regularitate, în celulele normale. În timpul reparării, secvența originală poate să fie reconstruită cu fidelitate completă, cu toate acestea, în unele cazuri, inserțiile sau delețiile având dimensiuni mici (denumite indels) sunt introduse la situsul DSB.

DSB-urile pot să fie, de asemenea, induse, în mod specific, în locații speciale, cum ar fi în cazul sistemelor de endonucleaze care s-au descris, conform cu prezenta dezvoltare, care pot să fie utilizate pentru a provoca evenimente de modificare a genelor direcționate sau preferențiale la locațiile cromozomiale selectate. Tendința, ca secvențele omologe să fie supuse recombinării în contextul reparării ADN-ului (precum și al replicării), poate să fie benefică într-o serie de circumstanțe și reprezintă baza unei aplicații a sistemelor de editare a genelor, cum ar fi CRISPR, în care repararea direcționată pe omologie este utilizată pentru a introduce o secvență de interes, furnizată prin utilizarea unei polinucleotide „donoare”, într-o locație cromozomială dorită.

[229] Regiunile omologiei între secvențele speciale, care pot să fie regiuni având dimensiuni mici de „microomologie”, care pot să cuprindă câteva zeci de perechi de baze sau mai puțin, pot să fie, de asemenea, utilizate pentru a produce delețiile dorite. De exemplu, o singură DSB poate să fie introdusă într-un situs care prezintă microomologie cu o secvență învecinată. În cursul normal al reparării unei astfel de DSB un rezultat care apare cu frecvență înaltă este deleția secvenței de intervenție, ca urmare a recombinării care este facilitată de DSB și de procesul concomitent de reparare celulară.

În unele circumstanțe, totuși, selecția secvențelor țintă în regiunile de omologie poate, de asemenea, să dea naștere la deleții cu dimensiuni mult mai mari, care includ fuziuni de gene (atunci când delețiile au loc în regiunile de codificare), care pot să fie dorite sau care nu pot să fie dorite, având în vedere circumstanțele speciale.

Exemplele furnizate conform cu prezenta dezvoltare ilustrează, în continuare, selecția diferitelor regiuni țintă, pentru generarea ruperii dublu-catenară (DSB), concepută pentru a induce înlocuiri care să aibă drept rezultat modularea sau inactivarea activității proteinei de control transcripțional, precum și selecția secvențelor țintă specifice în astfel de regiuni, care sunt concepute pentru a minimiza evenimentele în afara țintei în raport cu evenimentele-pe țintă.

Modificări ale acidului nucleic

În unele cazuri, polinucleotidele introduse în celule pot să cuprindă una sau mai multe modificări care pot să fie utilizate individual sau în combinație, de exemplu, pentru a îmbunătăți activitatea, stabilitatea sau specificitatea, pentru a modifica livrarea, pentru a reduce răspunsurile imune innăscute în celulele gazdă sau pentru alte îmbunătățiri, așa cum este descris în continuare în prezenta dezvoltare și cunoscut în stadiul tehnicii.

În anumite exemple, polinucleotidele modificate pot să fie utilizate în sistemul CRISPR/Cas9/Cpf1, caz în care ARN-urile ghid (fie ghiduri cu o singură moleculă sau ghiduri cu dublă-moleculă) și/sau ADN-ul sau ARN-ul, care codifică pentru o endonuclează Cas sau Cpf1 introduse într-o celulă, pot să fie modificate, așa cum este descris și ilustrate în cele ce urmează. Astfel de polinucleotide modificate pot să fie utilizate în sistemul CRISPR/Cas9/Cpf1 pentru editarea oricărui loci sau editarea mai multor loci genomici.

Folosind sistemul CRISPR/Cas9/Cpf1 ca o ilustrare, cu caracter nelimitativ, a unor astfel de utilizări, modificările ARN-urilor ghid pot să fie utilizate pentru a îmbunătăți formarea sau stabilitatea complexului de editare a genomului CRISPR/Cas9/Cpf1, care cuprinde ARN-uri ghid, care pot să fie ghid cu o singură-moleculă sau ghid cu dublă-moleculă, precum și o endonuclează Cas sau Cpf1. Modificările ARN-urilor ghid pot, de asemenea, sau în mod alternativ să fie utilizate, pentru a îmbunătăți inițierea, stabilitatea sau cinetica interacțiunilor dintre complexul de editare a genomului cu secvența țintă din genom, care pot să fie utilizate, de exemplu, pentru a îmbunătăți activitatea pe-țintă. Modificările ARN-urilor ghid pot să fie, de asemenea, sau alternativ utilizate pentru a îmbunătăți specificitatea, de exemplu, ratele relative de editare a genomului la situsul țintă în comparație cu efectele la alte situsuri (în afara-țintei).

Modificările, de asemenea sau în mod alternativ, pot să fie utilizate pentru creșterea stabilității unui ARN ghid, de exemplu, prin creșterea rezistenței acestuia față de degradarea provocată de ribonucleaze (Rnase), care sunt prezente într-o celulă, determinând astfel creșterea timpului său de înjumătățire în celulă. Modificările care îmbunătățesc timpul de înjumătățire al ARN-ului ghid pot să fie deosebit de utile în cazurile în care o endonuclează Cas sau Cpf1 este introdusă într-o celulă care urmează să fie editată prin intermediul unui ARN, care trebuie translatat pentru a genera endonucleaza, deoarece creșterea timpului de înjumătățire al ARN-urilor ghid introduse în același timp cu ARN-ul care codifică pentru endonuclează poate să fie utilizată pentru a crește timpul în care ARN-urile ghid și endonucleazele Cas sau Cpf1 codificate co-există în celulă.

Modificările, de asemenea, sau alternativ, pot să fie utilizate pentru a diminua probabilitatea sau gradul în care ARN-urile introduse în celule declanșează răspunsuri imune innăscute. Astfel de răspunsuri, care au fost bine caracterizate în contextul interferenței ARN-ului (ARNi), care includ ARN-uri (ARNsi-uri) cu interferență-slabă, așa cum este descris în cele ce urmează și în stadiul tehnicii, tind să fie asociate cu timpul de înjumătățire redus al ARN-ului și/sau cu declanșarea de citokine sau de alți factori care sunt asociați cu răspunsurile imune.

Unul sau mai multe tipuri de modificări, de asemenea, pot să fie aplicate ARN-urilor, care codifică pentru o endonuclează, care sunt introduse într-o celulă, care includ, dar fără limitare, modificări care îmbunătățesc stabilitatea ARN-ului (cum ar fi prin creșterea degradării acestuia de către ARN-azele prezente în celulă), modificări care îmbunătățesc translația produsului rezultat (de exemplu, a endonucleazei) și/sau modificări care scad probabilitatea sau gradul în care ARN-urile introduse în celule declanșează răspunsuri imune innăscute.

Combinațiile de modificări, cum ar fi acelea care s-au menționat mai sus precum și altele, de asemenea, pot să fie utilizate. În cazul sistemului CRISPR/Cas9/Cpf1, de exemplu, unul sau mai multe tipuri de modificări pot să fie aplicate pe ARN-urile ghid (care includ pe acelea care s-au exemplificat *supra*) și/sau unul sau mai multe tipuri de modificări pot să fie aplicate pe ARN-urile care codifică pentru endonucleaza Cas (care le includ pe acelea care s-au exemplificat *supra*).

Cu titlu de ilustrare, ARN-urile ghid, care sunt utilizate în sistemul CRISPR/Cas9/Cpf1 sau în cazul altor ARN-uri, având dimensiuni mai mici, pot să fie sintetizate cu ușurință utilizând mijloace chimice, care permit incorporarea cu ușurință a unui număr de modificări, așa după cum este ilustrat în cele ce urmează și așa după cum este descris în stadiul tehnicii. În timp ce procedurile de sinteză chimică sunt în continuă expansiune, purificarea unor astfel de ARN-uri folosind proceduri cum ar fi cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC-ul, care evită utilizarea gelurilor precum PAGE), tinde să devină mai dificilă pe măsură ce lungimile polinucleotidelor cresc, în mod semnificativ, ajungând la peste o sută și ceva de nucleotide. O abordare, care poate să fie utilizată pentru generarea de ARN-uri modificate chimic cu lungime mai mare, se referă la producerea a două sau mai multe molecule, care sunt legate împreună. ARN-urile cu dimensiuni mult mai lungi, cum ar fi acelea care codifică pentru o endonuclează Cas9, sunt mai ușor generate pe cale enzimatică. Deși, sunt disponibile mai puține tipuri de

modificări pentru a fi utilizate în generarea ARN-urilor pe cale enzimatică, există încă modificări care pot să fie utilizate, de exemplu, pentru îmbunătățirea stabilității, pentru reducerea probabilității sau a gradului de răspuns imun înăscut și/sau pentru îmbunătățirea altor atribute, așa cum este descris în cele ce urmează și în stadiul tehnicii; iar noi tipuri de modificări sunt dezvoltate cu regularitate.

Cu titlu ilustrativ, diferite tipuri de modificări, în special, acelea care sunt utilizate, în mod frecvent, pentru sinteza ARN-urilor cu lungime mai mică pe cale chimică, modificările pot să cuprindă una sau mai multe nucleotide modificate la poziția 2' a zaharului, în unele cazuri la o nucleotidă modificată-2'-O-alchil, la o nucleotidă modificată-2'-O-alchil-O-alchil sau la o nucleotidă modificată-2'-fluor. Conform cu unele exemple, modificările ARN-ului pot să cuprindă modificări: 2'-fluor, 2'-amino sau 2' O-metil pe riboza pirimidinelor, a resturilor abazice sau a unei baze inversată la extremitatea 3' a ARN-ului. Astfel de modificări pot să fie încorporate, în mod obișnuit, în oligonucleotide și aceste oligonucleotidele s-au demonstrat că au o valoare T_m mai mare (adică afinitate mai mare de legare la țintă) decât 2'-deoxiloligonucleotidele în raport cu o țintă dată.

S-a demonstrat faptul că o serie de modificări ale nucleotidelor și ale nucleozidelor conferă oligonucleotidei în care sunt încorporate mai multă rezistentă la digestia de către nuclează decât oligonucleotida nativă; aceste oligonucleotide modificate supraviețuiesc intacte mai mult timp decât oligonucleotidele care nu au fost modificate. Exemplele specifice de oligonucleotide modificate se referă la acele oligonucleotide modificate care cuprind schelete principale modificate, de exemplu, fosforotioați, fosfortriesteri, metil fosfonați, legături inter-zaharuri alchil cu lanț scurt sau cicloalchil sau legături inter-zaharuri heteroatomice cu lanț scurt sau heterociclice. Unele oligonucleotide sunt oligonucleotide cu schelete de fosforotioat și acelea cu schelete heteroatomice, în special, scheletele $\text{CH}_2\text{NH-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{N(CH}_3\text{)O-CH}_2$ (cunoscut sub denumirea de schelet de metilen(metilimino) sau schelet MMI), $\text{CH}_2\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, în care scheletul fosfodiester nativ este reprezentat ca O-P-O-CH₂); schelet amidic [a se vedea De Mesmaeker și colaboratorii, *Ace.Chim.Res.*, 28:366-374 (1995)]; structuri de schelet morfolino (a se vedea Summerton și Weller, brevetul de invenție U.S. nr. 5.034.506); scheletul peptidic al acidului nucleic (PNA) (în care scheletul fosfodiester al oligonucleotidei este înlocuit cu un schelet poliamidic, nucleotidele fiind legate direct sau indirect de atomii de azot-aza ai scheletului poliamidic, a se vedea Nielsen și colaboratorii, *Science* 1991, 254, 1497). Legăturile care conțin fosfor includ, dar nu se limitează la, fosforotioați, fosforotioați chirali, fosforoditioați, fosfortriesteri, aminoalchilfosfortriesteri, metil și alți alchil fosfonați care cuprind 3'alchilen fosfonați și fosfonați chirali, fosfinați, fosforamidați care cuprind 3'-aminofosforamidați, și aminoalchilfosforamidați, tiofosforamidați, tioalchilfosfonați, tioalchilfosfoteri, și borano fosfați care au legături normale 3'-5', analogii legați 2'-5' ai acestora și cei care prezintă polaritate inversă în care perechile adiacente unităților nucleozidice sunt legate 3'-5' la 5'-3' sau 2'-5' la 5'-2'; a se vedea brevetele: U.S. Nr. 3.687.808; U.S. Nr. 4.469.863; U.S. Nr. 4.476.301; U.S. Nr. 5.023.243; U.S. Nr. 5. 177. 196; U.S. Nr. 5. 188.897; U.S. Nr. 5.264.423; U.S. Nr. 5.276.019; U.S. Nr. 5.278.302; U.S. Nr. 5.286.717; U.S. Nr. 5.321.131; U.S. Nr. 5.399.676; U.S. Nr. 5.405.939; U.S. Nr. 5.453.496; U.S. Nr. 5.455.233; U.S. Nr. 5.466.677; U.S. Nr. 5.476.925; U.S. Nr. 5.519.126; U.S. Nr. 5.536.821; U.S. Nr. 5.541.306; U.S. Nr. 5.550.111; U.S. Nr. 5.563.253; U.S. Nr. 5.571.799; U.S. Nr. 5.587.361; și U.S. Nr. 5.625.050.

Compușii oligomerici pe bază de morfolino sunt descriși în Braasch și David Corey, *Biochemistry*, 41 (14): 4503-4510 (2002); Genesis, vol. 30, issue 3, (2001); Heasman, *Dev.Biol.*, 243: 209-214 (2002); Nasevicius și colaboratorii, *Nat.Genet.*, 26:216-220 (2000); Lacerra și colaboratorii, *Proc.Natl. Acad. Sci.*, 97: 9591 - 9596 (2000); și brevetul de invenție U.S. Nr. 5.034.506, emis la data de 23 iulie 1991.

Mimeticele oligonucleotidice ale acidului nucleic ciclohexenil sunt descrise în Wang și colaboratorii, *J. Am. Chim. Soc.*, 122: 8595-8602 (2000).

Scheletele oligonucleotidelor modificate, care nu includ un atom de fosfor, sunt schelete formate prin legături internucleozidice alchilice sau cicloalchilice cu lanț scurt, legături mixte de heteroatom și internucleozidice alchil sau cicloalchil, sau una sau mai multe legături internucleozidice heteroatomice sau heterociclice cu lanț scurt. Acestea le cuprind pe acelea care au legături morfolino (formate în parte din porțiunea de zahăr a unei nucleozide); schelete siloxanice; legături sulfură, sulfoxid și sulfone; schelete formacetil și tioformacetil; schelete metilen formacetil și tioformacetil; schelete care conțin alchene; schelete sulfamat; schelete metilenimino și metilenhidrazino; schelete sulfonat și sulfonamide; schelete amidice; și altele care posedă componente amestecate N, O, S și CH₂; a se vedea brevetele de invenție: U.S. Nr. 5.034.506; U.S. Nr. 5.166.315; U.S. Nr. 5.185.444; U.S. Nr. 5.214.134; U.S. Nr. 5.216.141; U.S. Nr. 5.235.033; U.S. Nr. 5.264.562; U.S. Nr. 5.264.564; U.S. Nr. 5.405.938; U.S. Nr. 5.434.257; U.S. Nr. 5.466.677; U.S. Nr. 5.470.967; U.S. Nr. 5.489.677; U.S. Nr. 5.541.307; U.S. Nr. 5.561.225; U.S. Nr. 5.596.086; U.S. Nr. 5.602.240; U.S. Nr. 5.610.289; U.S. Nr. 5.602.240; U.S. Nr.

5.608.046; U.S. Nr. 5.610.289; U.S. Nr. 5.618.704; U.S. Nr. 5.623.070; U.S. Nr. 5.663.312; U.S. Nr. 5.633.360; U.S. Nr. 5.677.437; și U.S. Nr. 5.677.439.

Unul sau mai multe fragmente de zahar substituite, de asemenea, pot să fie incluse, de exemplu, în poziția 2' una dintre următoarele: OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nNH₂, sau O(CH₂)_nCH₃, în care n ia valori de la 1 până la aproximativ 10; alchil inferior C₁ - C₁₀, alcoxialcoxi, alchil inferior substituit, alcaril sau aralchil; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S- sau N-alchil; O-, S- sau N-alchenil; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalchil; heterocicloalcaril; aminoalchilamino; polialchilamino; silil substituit; o grupare de clivare a ARN-ului; o grupare reporter; un intercalator; o grupare pentru îmbunătățirea proprietăților farmacocinetice ale unei oligonucleotide; sau o grupare pentru îmbunătățirea proprietăților farmacodinamice ale unei oligonucleotide și ale altor substituenți având proprietăți similare. În unele aspecte, o modificare include: 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, de asemenea, cunoscut și sub denumirea de 2'-O-(2-metoxietil)) (Martin și colaboratorii, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486). Alte modificări includ 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂CH₂CH₃) și 2'-fluor (2'-F). Modificări similare pot să fie efectuate, de asemenea, în alte poziții ale oligonucleotidei, în special, în poziția 3' a zaharului pe nucleotida 3' terminală și în poziția 5' a nucleotidei 5' terminală. Oligonucleotidele pot avea, de asemenea, mimetice de zahar, cum ar fi ciclobutili în loc de gruparea pentofuranozil.

Conform cu unele exemple, atât o legătură de zahar, cât și o legătură internucleozidică, adică scheletul, unor unități nucleotidice pot să fie înlocuite cu grupări noi. Unitățile de bază pot să fie menținute pentru hibridizare cu un compus țintă de acid nucleic adecvat. Un astfel de compus oligomeric, un mimetic oligonucleotidic care s-a dovedit că posedă proprietăți excelente de hibridizare, este denumit acid nucleic peptidic (PNA). În compuşii acidului nucleic peptidic (PNA), scheletul de zahar al unei oligonucleotide poate să fie înlocuit cu un schelet care conține amidă, de exemplu, un schelet principal de aminoetilglicină. Nucleobazele pot să fie reținute și legate direct sau indirect de atomul de azot al azacompusului din porțiunea amidică a scheletului. Brevetele de invenție reprezentative din Statele Unite, care descriu prepararea compușilor PNA se referă, dar nu se limitează la, brevetele de invenție: U.S. Nr. 5.539.082; U.S. Nr. 5.714,331; și U.S. Nr. 5.719.262. O prezentare suplimentară a compușilor PNA poate să fie găsită în Nielsen și colaboratorii, Science, 254: 1497-1500 (1991).

ARN-urile ghid pot să includă, de asemenea, suplimentar sau alternativ, modificări sau substituții ale nucleobazei (deseori denumită în domeniu pur și simplu „bază”). Așa cum se utilizează, în prezenta dezvăluire, nucleobazele "nemodificate" sau "naturale" includ adenină (A), guanină (G), timină (T), citozină (C) și uracil (U). Nucleobazele modificate includ nucleobazele găsite numai rareori sau tranzitoriu în acizii nucleici naturali, de exemplu, hipoxantină, 6-metiladenină, 5-Me pirimidine, în special, 5-metilcitozină (denumită și 5-metil-2' deoxicitozină și adesea denumită în stadiul tehnicii 5-Me-C), 5-hidroxi-metilcitozină (HMC), glicozil HMC și gentobiosil HMC, precum și nucleobaze sintetice, de exemplu, 2-aminoadenină, 2-(metilamino) adenină, 2-(imidazolil alchil) adenină, 2-(aminoalchiamino) adenină sau alte alchiladenine heterosubstituite, 2-tiouracil, 2-tiotimină, 5-bromoracil, 5-etil-azaguanil, 8-metil-azaguanil 7-deazaguanină, N6 (6-aminohexil) adenină și 2,6-diaminopurină. Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp75-77 (1980); Gebeyehu și colaboratorii, Nucl.Acizi Res. 15:4513 (1997). O bază "universală" cunoscută în stadiul tehnicii, de exemplu, inozină, poate să fie, de asemenea, inclusă. S-a demonstrat faptul că substituțiile 5-Me-C cresc stabilitatea duplexului acidului nucleic cu 0,6-1,2°C. (Sanghvi, Y. S., în Crooke, S. T. și Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) și prezintă aspecte ale substituțiilor de baze.

Nucleobazele modificate pot să cuprindă alte nucleobaze sintetice și naturale, cum ar fi 5-metilcitozină (5-me-C), 5-hidroxi-metil citozină, xantină, hipoxantină, 2-aminoadenină, 6-metil și alți derivați alchil ai adeninei și guaninei, 2-propil și alți derivați alchil ai adeninei și guaninei, 2-tiouracil, 2-tiotimină și 2-tiocitozină, 5-halouracil și citozină, 5-propinil uracil și citozină, 6-azo uracil, citozină și timină, 5-pseudouracil (uracil), 4-tiouracil, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalchii, 8-hidroxi și alte adenine și guanine 8-substituite, 5-halo, în special, 5-brom, 5-trifluormetil și altele uracili și citozine 5-substituite, 7-metilquanină și 7-metiladenină, 8-azaguanină și 8-azaadenină, 7-deazaguanină și 7-deazaadenină și 3-deazaguanină și 3-deaza adenină.

Mai mult, nucleobazele le pot să cuprindă pe acelea care sunt descrise în brevetul U.S. Nr.3.687.808, acelea dezvăluite în „The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering”, paginile 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, acelea dezvăluite de Englisch și colaboratorii, Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, pag. 613, și acelea dezvăluite de Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications', paginile 289-302, Crooke, S. T. și Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Anumite dintre aceste nucleobaze sunt deosebit de utile pentru creșterea afinității de legare a compușilor oligomerici conform prezentei invenții. Acestea includ pirimidine 5-

substituie, 6-azapirimidine și purine N-2, N-6 și 0-6 substituie, care cuprind 2-aminopropiladenină, 5-propiniluracil și 5-propinilcitozină. S-a demonstrat faptul că substituțiile 5-metilcitozinei cresc stabilitatea duplexului acidului nucleic cu 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, ST. și Lebleu, B., eds, „Antisense Research and Applications”, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) și constituie aspecte ale substituțiilor de baze, chiar în mod particular, atunci când sunt combinate cu modificări de zahar 2'-O-metoxietil. Nucleobazele modificate sunt descrise în brevetele de invenție U.S. Nr. 3.687.808, precum și în U.S. Nr. 4.845.205; U.S. Nr. 5.130.302; U.S. Nr. 5.134.066; U.S. Nr. 5.175.273; U.S. Nr. 5.367.066; U.S. Nr. 5.432.272; U.S. Nr. 5.457.187; U.S. Nr. 5.459.255; U.S. Nr. 5.484.908; U.S. Nr. 5.502.177; U.S. Nr. 5.525.711; U.S. Nr. 5.552.540; U.S. Nr. 5.587.469; U.S. Nr. 5.596.091; U.S. Nr. 5.614.617; U.S. Nr. 5.681.941; U.S. Nr. 5.750.692; U.S. Nr. 5.763.588; U.S. Nr. 5.830.653; U.S. Nr. 6.005.096; și publicația cererii de brevet de invenție U.S. 2003/0158403.

Astfel, termenul "modificat" se referă la un zahar, la un fosfat sau la o bază non-naturale care sunt încorporată într-un ARN ghid, într-o endonuclează sau într-o secvență de control transcripțional a BCL11A sau la ambele un ARN ghid și o endonuclează. Nu este necesar ca toate pozițiile dintr-o oligonucleotidă dată să fie modificate uniform și, de fapt, mai mult de una dintre modificările menționate mai sus poate să fie încorporată într-o oligonucleotidă unică, sau chiar într-o nucleozidă unică în interiorul unei oligonucleotide.

ARN-urile ghid și/sau ARNm-ul (sau ADN-ul) care codifică pentru o endonuclează pot să fie legate chimic la unul sau la mai multe fragmente sau la conjugați, care îmbunătățesc activitatea, distribuția celulară sau absorbția celulară ale oligonucleotidei. Astfel de fragmente cuprind, dar nu sunt limitate la: fragmente lipidice cum ar fi un fragment de colesterol [Letsinger și colaboratorii, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6553-6556 (1989)]; acid colic [Manoharan și colaboratorii, Bioorg. Med. Chim. Let., 4: 1053-1060 (1994)]; un tioeter, de exemplu, hexil-S-tritilol [Manoharan și colaboratorii, Ann. N. Y. Acad. Sci., 660: 306-309 (1992) și Manoharan și colaboratorii, Bioorg. Med. Chim. Let., 3: 2765-2770 (1993)]; un tiocolsterol [Oberhauser și colaboratorii, Nucl. Acids Res., 20: 533-538 (1992)]; un lanț alifatic, de exemplu, dodecandiol sau resturi undecil [Kabanov și colaboratorii, FEBS Lett., 259: 327-330 (1990) și Svinarchuk și colaboratorii, Biochimie, 75: 49-54 (1993)]; o fosfolipidă, de exemplu, di-hexadecil-rac-glicerol sau 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonat de trietilamoniu [Manoharan și colaboratorii, Tetrahedron Lett., 36: 3651 - 3654 (1995) și Shea și colaboratorii, Nucl. Acids Res., 18: 3777-3783 (1990)]; o poliamină sau un lanț de polietilen glicol [Mancharan și colaboratorii, Nucleosides & Nucleotides, 14: 969-973 (1995)]; acid adamantan acetic [Manoharan și colaboratorii, Tetrahedron Lett., 36: 3651 -3654 (1995)]; un fragment palmitil [(Mishra și colaboratorii, Biochim. Biophys. Acta, 1264: 229-237 (1995)]; sau un fragment octadecilamină sau hexilamino-carbonil-t-oxicolessterol [Crooke și colaboratorii, J. Pharmacol. Exp. Ther., 277: 923-937 (1996)]. A se vedea, de asemenea, brevetele de invenție: U.S. Nr. 4.828.979; U.S. Nr. 4.948.882; U.S. Nr. 5.218.105; U.S. Nr. 5.525.465; U.S. Nr. 5.541.313; U.S. Nr. 5.545.730; U.S. Nr. 5.552.538; U.S. Nr. 5.578.717; U.S. Nr. 5.580.731; U.S. Nr. 5.580.731; U.S. Nr. 5.591.584; U.S. Nr. 5.109.124; U.S. Nr. 5.118.802; U.S. Nr. 5.138.045; U.S. Nr. 5.414.077; U.S. Nr. 5.486.603; U.S. Nr. 5.512.439; U.S. Nr. 5.578.718; U.S. Nr. 5.608.046; U.S. Nr. 4.587.044; U.S. Nr. 4.605.735; U.S. Nr. 4.667.025; U.S. Nr. 4.762.779; U.S. Nr. 4.789.737; U.S. Nr. 4.824.941; U.S. Nr. 4.835.263; U.S. Nr. 4.876.335; U.S. Nr. 4.904.582; U.S. Nr. 4.958.013; U.S. Nr. 5.082.830; U.S. Nr. 5.112.963; U.S. Nr. 5.214.136; U.S. Nr. 5.082.830; U.S. Nr. 5.112.963; U.S. Nr. 5.214.136; U.S. Nr. 5.245.022; U.S. Nr. 5.254.469; U.S. Nr. 5.258.506; U.S. Nr. 5.262.536; U.S. Nr. 5.272.250; U.S. Nr. 5.292.873; U.S. Nr. 5.317.098; U.S. Nr. 5.371.241; U.S. Nr. 5.391.723; U.S. Nr. 5.416.203; U.S. Nr. 5.451.463; U.S. Nr. 5.510.475; U.S. Nr. 5.512.667; U.S. Nr. 5.514.785; U.S. Nr. 5.565.552; U.S. Nr. 5.567.810; U.S. Nr. 5.574.142; U.S. Nr. 5.585.481; U.S. Nr. 5.587.371; U.S. Nr. 5.595.726; U.S. Nr. 5.597.696; U.S. Nr. 5.599.923; U.S. Nr. 5.599.928 și U.S. Nr. 5.688.941.

Zaharurile și alte fragmente pot să fie utilizate pentru a ținti proteinele și complexe care cuprind nucleotide, cum ar fi polizomi și lipozomi cationici, către anumite situsuri. De exemplu, transferul direcționat de celule hepatice poate să fie mediat de către receptorii asialoglicoproteinei (ASGPR); a se vedea, de exemplu, Hu, și colaboratorii, Protein Pept Lett. 21 (10): 1025-30 (2014). Alte sisteme cunoscute în stadiul tehnicii și dezvoltate, cu regularitate, pot să fie utilizate pentru a ținti biomoleculele pentru utilizare în cazul de față și/sau complexe acestora către anumite celule țintă de interes.

Aceste fragmente de țintire sau conjugate pot să includă grupări conjugate legate covalent la grupări funcționale, cum ar fi grupări hidroxil primare sau secundare. Grupările conjugate ale invenției includ intercalatoare, molecule reporter, poliamine, poliamide, polietilen glicoli, polieteri, grupări care îmbunătățesc proprietățile farmacodinamice ale oligomerilor și grupări care îmbunătățesc proprietățile farmacocinetice ale oligomerilor. Grupările conjugate tipice include colesterol, lipide, fosfolipide, biotină, fenazină, folat, fenantridină, antrachinonă, acridină, fluoresceine, rodamine, cumarine și coloranți.

Grupările care îmbunătățesc proprietățile farmacodinamice, în contextul acestei dezvoltări, includ grupări care îmbunătățesc absorbția, îmbunătățesc rezistența la degradare și/sau întăresc hibridizarea specifică secvenței cu acidul nucleic țintă. Grupările care îmbunătățesc proprietățile farmacocinetice, în contextul acestei invenții, includ grupări care îmbunătățesc absorbția, distribuția, metabolismul sau excreția compuşilor prezentei invenții. Grupările conjugate reprezentative sunt dezvoltate în brevetul de invenție U.S. Nr. 6.287.860. Fragmentele conjugate includ, dar nu sunt limitate la, fragmentele lipidice, cum ar fi un fragment de colesterol, acid colic, un tioeter, de exemplu, hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, o catenă alifatică, de exemplu, dodecandiol sau resturi de undecil, o fosfolipidă, de exemplu, di-hexadecil-rac-glicerol sau 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonat de trietilamoniu, o poliamină sau un lanț polietilen glicolic sau acid adamantan acetic, un fragment palmitil sau un fragment octadecilamină sau hexilamino-carbonil-oxi colesterol. A se vedea, de exemplu, brevetul U.S. nr. 4.828.979; 4.948.882; U.S. Nr. 5.218.105; U.S. Nr. 5.525.465; U.S. Nr. 5.541.313; U.S. Nr. 5.545.730; U.S. Nr. 5.552.538; U.S. Nr. 5.578.717; U.S. Nr. 5.580.731; U.S. Nr. 5.580.731; U.S. Nr. 5.591.584; U.S. Nr. 5.109.124; U.S. Nr. 5.118.802; U.S. Nr. 5.138.045; U.S. Nr. 5.414.077; U.S. Nr. 5.486.603; U.S. Nr. 5.512.439; U.S. Nr. 5.578.718; U.S. Nr. 5.608.046; U.S. Nr. 4.587.044; U.S. Nr. 4.605.735; U.S. Nr. 4.667.025; U.S. Nr. 4.762.779; U.S. Nr. 4.789.737; U.S. Nr. 4.824.941; U.S. Nr. 4.835.263; U.S. Nr. 4.876.335; U.S. Nr. 4.904.582; U.S. Nr. 4.958.013; U.S. Nr. 5.082.830; U.S. Nr. 5.112.963; U.S. Nr. 5.214.136; U.S. Nr. 5.082.830; U.S. Nr. 5.112.963; U.S. Nr. 5.214.136; U.S. Nr. 5.245.022; U.S. Nr. 5.254.469; U.S. Nr. 5.258.506; U.S. Nr. 5.262.536; U.S. Nr. 5.272.250; U.S. Nr. 5.292.873; U.S. Nr. 5.317.098; U.S. Nr. 5.371.241; U.S. Nr. 5.391.723; U.S. Nr. 5.416.203; 5.451.463; U.S. Nr. 5.510.475; U.S. Nr. 5.512.667; U.S. Nr. 5.514.785; U.S. Nr. 5.565.552; U.S. Nr. 5.567.810; U.S. Nr. 5.574.142; U.S. Nr. 5.585.481; U.S. Nr. 5.587.371; U.S. Nr. 5.595.726; U.S. Nr. 5.597.696; U.S. Nr. 5.599.923; U.S. Nr. 5.599.928 și U.S. Nr. 5.688.941.

Polinucleotidele mai lungi care sunt mai puțin maleabile la sinteza chimică și sunt produse, în mod obișnuit, prin sinteză enzimatică pot să fie, de asemenea, modificate folosind diferite mijloace. Astfel de modificări pot să includă, de exemplu, introducerea anumitor analogi de nucleotide, încorporarea unor secvențe speciale sau încorporarea altor fragmente la extremitățile 5' sau 3' ale moleculelor precum și alte modificări. Cu titlu de ilustrare, ARNm-ul care codifică pentru Cas9 are o lungime de aproximativ 4 kb și poate să fie sintetizat prin transcripție *in vitro*. Modificările ARNm-ului pot să fie aplicate, de exemplu, pentru a crește translația sau stabilitatea acestuia (cum ar fi prin creșterea rezistenței sale la degradare cu o celulă) sau pentru a reduce tendința ARN-ului de a provoca un răspuns imun înăscut, care adesea este observat în celule, după introducerea ARN-urilor exogene, în special, a ARN-urilor mai lungi, cum ar fi acela care codifică pentru Cas9.

Numeroase astfel de modificări au fost descrise în stadiul tehnicii, cum ar fi cozile poliA, analogii extremitate 5' (de exemplu, Analog Cap Anti Revers (ARCA) sau m7G(5')ppp(5')G(mCAP)), regiuni modificate 5' sau 3' netranslate (UTR), utilizarea de baze modificate (cum ar fi Pseudo-UTP, 2-Tio-UTP, 5-metilcitidin-5'-trifosfat (5-metil-CTP) sau N6-Metil-ATP), sau tratamentul cu fosfatază pentru a îndepărta fosfații 5' terminali. Aceste modificări și alte modificări sunt cunoscute în stadiul tehnicii și noi modificări ale ARN-urilor sunt dezvoltate cu regularitate.

Există numeroși furnizori comerciali de ARN modificați, care includ, de exemplu, TriLink Biotech, AxoLabs, Bio-Synthesis Inc., Dharmacon și mulți alții. Așa cum este descris de către TriLink, de exemplu, 5-Metil-CTP poate să fie utilizat pentru a furniza caracteristicile dorite, cum ar fi stabilitatea crescută a nucleazei, translația crescută sau interacția redusă a receptorilor imuni înăscuți cu ARN-ul transcris *in vitro*. 5-Metilcitidina-5'-Mrfosfat (5-Metil-CTP), N6-Metil-ATP, precum și Pseudo-UTP și 2-Tio-UTP, au demonstrat, de asemenea, că reduc stimularea imună înăscută în cultură și *in vivo* în timp ce îmbunătățirea translației este obținută așa cum este ilustrat în publicațiile lui Kormann și colaboratorii și Warren și colaboratorii, la care se face referire în cele ce urmează.

S-a demonstrat faptul că ARNm-ul modificat chimic livrat *in vivo* poate să fie utilizat pentru obținerea efectelor terapeutice îmbunătățite; a se vedea, de exemplu, Kormann și colaboratorii, Nature Biotechnology 29, 154-157 (2011). Astfel de modificări pot să fie utilizate, de exemplu, pentru a crește stabilitatea moleculei de ARN și/sau pentru a reduce imunogenitatea acesteia. Folosind modificări chimice, cum ar fi Pseudo-U, N6-Metil-A, 2-Tio-U și 5-Metil-C, s-a constatat că înlocuind numai un sfert din resturile de uridină și citidină cu 2-Tio-U și respectiv cu 5-Metil-C, a condus la o scădere semnificativă a recunoașterii mediată de receptorul toll-like (TLR) a ARNm-ului în cazul șoarecilor. Prin reducerea activării sistemului imunitar înăscut, aceste modificări pot să fie utilizate pentru a crește, în mod eficient, stabilitatea și longevitatea ARNm *in vivo*; a se vedea, de exemplu, Kormann și colaboratorii, *supra*.

S-a demonstrat, de asemenea, faptul că administrarea repetată de ARN mesager sintetic, care încorporează modificări concepute pentru a ocoli răspunsurile anti-virale înăscute, poate reprograma

celulele umane diferențiate la pluripotență. *A se vedea*, de exemplu, Warren, *și colaboratorii*, Cell Stem Cell, 7(5):618-30 (2010). Un astfel de ARNm modificat, care acționează ca proteine primare de reprogramare, poate să fie un mijloc eficient de reprogramare a mai multor tipuri de celule umane. Astfel de celule sunt denumite celule stem cu pluripotență indusă (iPSCs) și s-a constatat faptul că ARN-ul sintetizat pe cale enzimatică, care încorporează 5-Metil-CTP, Pseudo-UTP și Analogul Cap Anti Reverse (ARCA) ar putea să fie utilizat pentru evitarea, în mod eficient, răspunsul antiviral al celulei.; *a se vedea*, de exemplu, Warren *și colaboratorii*, *supra*.

Alte modificări ale polinucleotidelor descrise în stadiul tehnicii includ, de exemplu, utilizarea cozilor poliA, adăugarea de analogi cap 5' (cum ar fi m7G (5')ppp(5')G(mCAP)), modificări ale regiunilor 5' sau 3' netranslate (UTR-uri) sau trata- mentul cu fosfatază pentru a elimina fosfații terminali 5' - și noi abordări sunt dezvoltate cu regularitate.

Un număr de compoziții și tehnici aplicabile pentru generarea de ARN-uri modificate, destinate pentru utilizare conform cu prezenta dezvoltare, au fost dezvoltate în conexiune cu modificarea interferenței ARN (ARNi), care include ARN-uri cu interferențe mici (ARNsi). ARN-urile cu interferențe mici (ARNsi) prezintă provocări speciale *in vivo*, deoarece efectele lor asupra reducerii genelor prin interferența ARNm-ului sunt, în general, tranzitorii, ceea ce poate să necesite administrarea repetată. În plus, ARNsi-urile sunt ARN-urile dublu-catenare (ARNds) și celulele de mamifere au răspunsuri imune care au evoluat pentru a detecta și neutraliza ARNds-ul, care este adesea un produs secundar al infecției virale. Astfel, există enzime de mamifere precum PKR (kinaza sensibilă la ARNds) și gena I care poate să fie indusă de acidul retinoic (RIG-I), care poate să medieze răspunsurile celulare la ARNdc, precum și de receptorii de tip Toll (cum ar fi TLR3, TLR7 și TLR8) care pot să declanșeze inducerea de citokine ca răspuns la astfel de molecule; *a se vedea*, de exemplu, recenziiile lui Angart *și colaboratorii*, Pharmaceuticals (Basel) 6(4): 440-468 (2013); Kanasty *și colaboratorii*, Molecular Therapy 20(3): 513-524 (2012); Burnett *și colaboratorii*, Biotechnol J. 6(9):1 130-46 (2011); Judge și MacLachlan, Hum Gene Ther 19(2): 1 1 1 - 24 (2008); precum și referințele citate în prezenta dezvoltare.

O mare varietate de modificări au fost dezvoltate și aplicate pentru a îmbunătăți stabilitatea ARN-ului, pentru a reduce răspunsurile imune innăscute și/sau pentru obținerea altor beneficii care pot să fie utile în conexiune cu introducerea de polinucleotide în celulele umane, așa cum este descris în prezenta dezvoltare; *a se vedea*, de exemplu, recenziiile lui Whitehead KA *și colaboratorii*, Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2: 77-96 (2011); Gaglione și Messere, Mini Rev Med Chem, 10(7):578-95 (2010); Chernolovskaya *și colaboratorii*, Curr Opin Mol Ther., 12(2): 158-67 (2010); Deleavey *și colaboratorii*, Curr Protoc Nucleic Acid Chem Chapter 16: Unit 16.3 (2009); Behlke, Oligonucleotides 18(4):305-19 (2008); Fucini *și colaboratorii*, Nucleic Acid Ther 22(3): 205-210 (2012); Bremsen *și colaboratorii*, Front Genet 3: 154 (2012).

După cum s-a menționat mai sus, există un număr de furnizori comerciali de ARN-uri modificate, mulți dintre aceștia specializându-se în modificări menite să îmbunătățească eficacitatea ARNsi-ului. S-au furnizat o varietate de abordări pe baza diferitelor constatări raportate în literatura de specialitate. De exemplu, Dharmacon observă că înlocuirea oxigenului fără punte de sulf (fosforotioat, PS) a fost utilizată pe scară largă pentru a îmbunătăți rezistența la nuclează a ARNsi, așa cum a raportat Kole, Nature Reviews Drug Discovery 1 1: 125-140 (2012). S-a raportat faptul că modificările poziției 2' a ribozei îmbunătățesc rezistența la nuclează a legăturii internucleotidice fosfat în timp ce cresc stabilitatea duplexului (Tm), care s-a dovedit, de asemenea, că furnizează protecție împotriva activării imune. O combinație de modificări moderate ale scheletului PS cu substituții 2' mici, bine tolerate (2'-O-metil, 2'-Fluoro, 2'-Hidro) au fost asociate cu ARNsi-uri foarte stabile pentru aplicații *in vivo*, așa cum este raportat de Soutschek *și colaboratorii*, Nature 432: 173-178 (2004); și modificările 2'-O-metil au fost raportate că sunt eficiente în îmbunătățirea stabilității așa cum este raportat de Volkov, Oligonucleotides 19: 191-202 (2009). În ceea ce privește scăderea inducerii răspunsurilor imune innăscute, modificarea secvențelor specifice cu 2'-O-metil, 2'-fluor, 2'-hidro s-a raportat că reduce interacțiunea TLR7/TLR8, conservând, în general, activitatea de silențiere; *a se vedea*, de exemplu, Judge *și colaboratorii*, Mol.Acolo. 13:494-505 (2006); și Cekaite *și colaboratorii*, J. Mol. Biol. 365:90-108 (2007). Modificările suplimentare, cum ar fi 2-tiouracil, pseudouracil, 5-metilcitozină, 5-metiluracil și N6-metiladenozină s-au dovedit, de asemenea, că reduc la minimum efectele imune mediate de TLR3, TLR7 și TLR8; *a se vedea*, de exemplu, Kariko, K. *și colaboratorii*, Immunity 23: 165-175 (2005).

De asemenea, după cum este cunoscut din stadiul tehnicii și disponibile comercial un număr de conjugate pot să fie aplicate polinucleotidelor, cum ar fi ARN-ul, pentru a fi utilizate în prezenta dezvoltare, conjugate care pot îmbunătăți livrarea și/sau absorbția lor de către celule, care includ, de exemplu, colesterolul, tocoferolul și acidul folic, lipidele, peptidele, polimerii, linkerii și aptamerii; *a se vedea*, de exemplu, recenzia lui Winkler, Ther. Livrare 4:791 -809 (2013), și referințele citate în prezenta dezvoltare.

Optimizarea-Codonului

O polinucleotidă care codifică pentru o polipeptidă direcționată-pe situs poate să fie codon-optimizată conform cu metodele standard din stadiul tehnicii pentru exprimare în celula care conține ADN-ul țintă de interes. De exemplu, dacă acidul nucleic țintă intenționat este într-o celulă umană, o polinucleotidă codon-optimizată umană, care codifică pentru Cas9 s-a avut în vedere pentru utilizare în producerea polipeptidei Cas9.

Complexe ale unui Acid Nucleic-care țintește Genomul și o Polipeptidă Direcționată-pe Situs

Un acid nucleic care țintește genomul interacționează cu o polipeptidă direcționată-pe situs (de exemplu, o nuclează ghidată de acid nucleic, cum ar fi Cas9), formând astfel un complex. Acidul nucleic care țintește genomul ghidează polipeptida direcționată-pe situs către acidul nucleic țintă.

RNP-uri

Polipeptida direcționată-pe situs și acidul nucleic-care țintește genomul pot să fie fiecare administrate separat unei celule sau unui pacient.

Pe de altă parte, polipeptida direcționată-pe situs poate să fie pre-complexată cu unul sau cu mai mulți acizi nucleici care țintesc genomul (ARN ghid, ARNsg sau ARNcr împreună cu un ARNtracr). Materialul pre-complexat poate să fie apoi administrat unei celule sau unui pacient. Un astfel de material pre-complexat este cunoscut ca fiind o particulă de ribonucleoproteină (RNP). Polipeptida direcționată-pe situs din RNP poate să fie, de exemplu, o endonuclează Cas9 sau o endonuclează Cpf1. Polipeptida direcționată-pe situs poate să fie flancată la N-terminal, la C-terminal sau atât la N-terminal cât și la C-terminal de unul sau de mai multe semnale de localizare nucleară (NLS-uri). De exemplu, o endonuclează Cas9 poate să fie flancată de două NLS-uri, un NLS situat la N-terminal și cel de-al doilea NLS situat la C-terminal. NLS-urile pot să fie orice NLS cunoscut în stadiul tehnicii, cum ar fi un NLS SV40. Raportul în greutate dintre acidul nucleic-care țintește genomul și polipeptida direcționată-pe situs din RNP poate să fie 1:1. De exemplu, raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza Cas9 din RNP poate să fie 1:1. De exemplu, ARNsg poate să cuprindă secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959, endonucleaza Cas9 poate să fie o Cas9 din specia *S. pyogenes*, care cuprinde un NLS N-terminalNLS SV40 și un NLS C-terminalSV40NLS și raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza Cas9 poate să fie 1:1.

Componentele Sistemului de Codificare Acizi Nucleici

Prezenta dezvoltare dezvoltă un acid nucleic, care cuprinde o secvență nucleotidică care codifică pentru un acid nucleic-care țintește genomul din prezenta dezvoltare, o polipeptidă direcționată-pe situs din prezenta dezvoltare și/sau orice acid nucleic sau moleculă proteică necesară pentru realizarea aspectelor metodelor definite în prezenta dezvoltare.

Acidul nucleic care codifică pentru un acid nucleic-care țintește genomul din dezvoltare, o polipeptidă direcționată-pe situs din prezenta dezvoltare și/sau orice acid nucleic sau moleculă proteică necesară pentru realizarea aspectelor metodelor definite în prezenta dezvoltare poate să cuprindă un vector (de exemplu, un vector de exprimare recombinant).

Termenul "vector" se referă la o moleculă de acid nucleic, care este capabilă să transporte un alt acid nucleic de care acesta a fost legat. Un tip de vector este o „plasmidă”, care se referă la o buclă circulară de ADN dublu-catenar în care pot să fie ligate segmente suplimentare de acid nucleic. Un alt tip de vector este un vector viral, în care segmente suplimentare de acid nucleic pot să fie legate în genomul viral. Anumiți vectori sunt capabili de replicare autonomă în celula gazdă în care sunt introduși (de exemplu, vectori bacterieni având origine bacteriană de replicare și vectori de mamifere epizomali). Alți vectori (de exemplu, vectori de mamifere non-epizomali) sunt integrați în genomul unei celule gazdă, în momentul introducerii în celula gazdă și, prin urmare, sunt replicați împreună cu genomul gazdă.

În unele exemple, vectorii pot să fie capabili să direcționeze exprimarea acizilor nucleici, de care aceștia sunt legați în mod operațional. Astfel de vectori sunt denumiți, în prezenta dezvoltare "vectori de exprimare recombinanți", sau mai simplu "vectori de exprimare", care îndeplinesc funcții echivalente.

Termenul "legat operațional" înseamnă că secvența nucleotidică de interes este legată de secvența/secvențele de reglare într-o manieră care permite exprimarea secvenței nucleotidice. Termenul „secvență de reglare” este destinat să includă, de exemplu, promotori, amplificatori și alte elemente de control ale exprimării (de exemplu, semnale de poliadenilare). Astfel de secvențe de reglare sunt bine cunoscute în stadiul tehnicii și sunt descrise, de exemplu, de către Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Secvențele de reglare includ acele secvențe care direcționează exprimarea constitutivă a unei secvențe nucleotidice în multe tipuri de celule gazdă precum și acele secvențe care direcționează exprimarea secvenței nucleotidice numai în anumite celule gazdă (de exemplu, secvențe de reglare specifice țesutului). Este evident pentru specialiștii în domeniu că conceperea vectorului de exprimare poate să depindă de factori cum ar fi: alegerea celulei țintă, nivelul de exprimare dorit și altele asemenea.

Vectorii de exprimare luați în considerare includ, dar nu sunt limitați la, vectori virali bazați pe virusul vacciniei, poliovirusul, adenovirusul, virusul adeno-asociat, SV40, virusul herpes simplex, virusul imunodeficienței umane, retrovirusul (de exemplu, virusul leucemiei murine, virusul necrozei splenice și vectori derivați din retrovirusuri, cum ar fi virusul sarcomului Rous, virusul sarcomului Harvey, virusul leucozei aviare, un lentivirus, virusul imunodeficienței umane, virusul sarcomului mieloproliferativ și virusul tumorii mamare) și alți vectori recombinanți. Alți vectori luați în considerare pentru celulele țintă eucariote includ, dar nu sunt limitați la, vectorii pXT1, pSG5, pSVK3, pBPV, pMSG și pSVLSV40 (Pharmacia). Vectorii suplimentari luați în considerare pentru celulele țintă eucariote includ, dar nu sunt limitați la, vectorii pCTx-1, pCTx-2 și pCTx-3, care sunt descriși în Figurile de la 1A până la 1C. Alți vectori pot să fie utilizați atâta timp cât sunt compatibil cu celula gazdă.

În unele exemple, un vector poate să cuprindă unul sau mai multe elemente de control ale transcripției și/sau ale translației. În funcție de sistemul gazdă/vector utilizat, oricare dintr-un număr de elemente adecvate de control ale transcripției și ale translației, care includ promotori constitutivi și inductibili, elemente de amplificare a transcripției, terminatori de transcripție, etc. pot să fie utilizate în vectorul de exprimare. Vectorul poate să fie un vector cu auto-inactivare, care fie inactivează secvențele virale, fie componentele mecanismului CRISPR sau alte elemente.

Exemplele, cu caracter nelimitativ, de promotori eucariotici adecvați (adică, promotori funcționali într-o celulă eucariotă) se referă la aceia care provin de la: citomegalovirus (CMV) imediat timpuriu, virusul herpes simplex (HSV) timidin kinaza, SV40 precoce și târzie, repetiții terminale lungi (LTR) de la retrovirus, promotorul factorului de elongație uman 1 (EF1), un construct hibrid care cuprinde amplificatorul citomegalovirusului (CMV) fuzionat cu promotorul beta-actinei de pui (CAG), promotorul virusului celulelor stem de origine murină (MSCV), promotorul locusului fosfoglicerat kinazei-1 (PGK), și metalotioneina-1 de soarece.

Pentru exprimarea ARN-urilor cu dimensiuni mici, care includ ARN-urile ghid utilizate în conexiune cu endonucleaza Cas, diverși promotori, cum ar fi promotorii ARN polimerazei III, care includ, de exemplu, U6 și H1, pot să fie avantajoși. Descrierile și parametrii pentru îmbunătățirea utilizării unor astfel de promotori sunt cunoscute în stadiul tehnicii, iar informațiile și abordările suplimentare sunt descrise, cu regularitate; *a se vedea*, de exemplu, Ma, H. și colaboratorii, Molecular Therapy - Nucleic Acids 3, e161 (2014) doi: 10.1038/mtna.2014.12.

Vectorul de exprimare poate să conțină, de asemenea, un situs de legare la ribozom, pentru inițierea translației și un terminator de transcripție. Vectorul de exprimare poate să cuprindă, de asemenea, secvențe adecvate pentru amplificare în ceea ce privește exprimarea. Vectorul de exprimare poate să includă, de asemenea, secvențe nucleotidice care codifică tag-uri non-native (de exemplu, tag-ul histidină, tag-ul hemaglutinină, proteină verde fluorescentă, etc.) care sunt fuzionate cu polipeptida direcționată-pe situs, rezultând astfel o proteină de fuziune.

Un promotor poate să fie un promotor inductibil (de exemplu, un promotor de șoc termic, un promotor reglat cu tetraciclină, un promotor reglat cu steroizi, un promotor reglat cu metal, un promotor reglat cu receptorul de estrogen etc.). Promotorul poate să fie un promotor constitutiv (de exemplu, promotorul CMV, promotorul UBC). În unele cazuri, promotorul poate să fie un promotor restrâns spațial și/sau temporal (de exemplu, un promotor specific pentru țesut, un promotor specific de tip celular etc.).

Acidul nucleic, care codifică pentru un acid nucleic-care țintește genomul, din prezenta dezvăluire și/sau o polipeptidă direcționată-pe situs pot să fie împachetate în sau pe suprafața vehiculelor de livrare, pentru livrare la celule. Vehiculele de livrare avute în vedere includ, dar nu sunt limitate la, nanosfere, lipozomi, puncte cuantice, nanoparticule, particule de polietilen glicol, hidrogeluri și micelii. Așa cum este descris în stadiul tehnicii, o varietate de fragmente de țintire pot să fie utilizate pentru a îmbunătăți interacțiunea preferențială a unor astfel de vehicule cu tipurile sau cu locațiile de celule dorite.

Introducerea complexelor, a polipeptidelor și a acizilor nucleici din prezenta dezvăluire în celule poate avea loc prin infecție virală sau bacteriofagică, transfecție, conjugare, fuziune de protoplaste, lipofecție, electroporare, nucleofecție, precipitare cu fosfat de calciu, transfecție mediată de polietilenimină (PEI), DEAE- transfecția mediată de dextran, transfecția mediată de lipozomi, folosind tehnologia pistolului cu particule, precipitarea cu fosfat de calciu, microinjecția directă, livrarea de acid nucleic mediată de nanoparticule și altele asemenea.

Livrare

Polinucleotidele ARN ghid (ARN sau ADN) și/sau endonucleaza poli nucleotidei/polinucleotidelor (ARN-ului sau ADN-ului) pot să fie livrate prin vehicule de livrare virale sau non-virale cunoscute în stadiul tehnicii, cum ar fi electroporarea, forța mecanică, deformarea celulară (SQZ Biotech) și peptidele care penetrează în celulă. În mod alternativ, polipeptida/polipeptidele de endonuclează poate/pot să fie livrate prin vehicule de livrare virale sau non-virale cunoscute în stadiul

tehnicii, cum ar fi electroporare sau nanoparticule lipidice. În alte aspecte alternative, endonucleaza ADN-ului poate să fie livrată ca una sau mai multe polipeptide, fie singure, fie pre-complexate cu unul sau cu mai multe ARN-uri ghid, sau cu unul sau cu mai multe ARNcr-uri împreună cu un ARNtracr.

Electroporația este o tehnică de livrare în care este aplicat un câmp electric uneia sau mai multor celule pentru a crește permeabilitatea membranei celulare, ceea ce permite substanțelor cum ar fi medicamentele, acizii nucleici (acizii nucleici care ținesc genomul), proteinele (polipeptidele direcționate-pe situs) sau RNP-urile, să fie introduse în celulă. În general, electroporarea acționează prin trecerea a mii de volți pe o distanță de la unu până la doi milimetri de celule suspendate într-o cuvă de electroporare (1,0 - 1,5 kV, 250 - 750 V/cm).

Polinucleotidele pot să fie livrate prin vehicule de livrare non-virală care includ, dar fără a se limita la, nanoparticule, lipozomi, ribonucleoproteine, peptide încărcate pozitiv, conjugate de ARN cu molecule mici, himere aptamer-ARN și complexe de proteine de fuziune ARN. Câteva vehicule de livrare non-virale, cu titlu de exemplu, sunt descrise de către Peer și Lieberman, *Gene Therapy*, 18: 1 127-1 133 (2011) (care se concentrează pe vehicule de livrare non-virale pentru ARNs care sunt, de asemenea, utile pentru livrarea altor polinucleotide).

Polinucleotidele, cum ar fi ARN-ul ghid, ARNsg-ul și ARNm-ul care codifică pentru o endonuclează, pot să fie livrate unei celule sau unui pacient prin intermediul unei nanoparticule lipidică (LNP).

O nanoparticulă lipidică (LNP) se referă la orice particulă având un diametru mai mic de 1000 nm, 500 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm sau 25 nm. În mod alternativ, o nanoparticulă poate să varieze ca dimensiune de la 1-1000 nm, 1-500 nm, 1-250 nm, 25-200 nm, 25-100 nm, 35-75 nm sau 25-60 nm.

LNP-urile pot să fie realizate din lipide cationice, anionice sau neutre. Lipidele neutre, cum ar fi fosfolipidul fusogen DOPE sau colesterolul component al membranei, pot să fie incluse în LNP ca „lipide auxiliare” pentru a îmbunătăți activitatea de transfecție și stabilitatea nanoparticulelor. Limitările lipidelor cationice se referă la eficacitatea scăzută datorită stabilității slabe precum și a clearance-ului rapid, și generarea de răspunsuri inflamatorii sau antiinflamatorii.

LNP-urile pot să fie, de asemenea, formate din lipide hidrofobe, lipide hidrofile sau din ambele tipuri de lipide hidrofobe și hidrofile.

Orice lipidă sau combinație de lipide, care sunt cunoscute în stadiul tehnicii, poate să fie utilizată pentru a produce un LNP. Exemple de lipide utilizate pentru a produce LNP se referă la: DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-colesterol, DOTAP-colesterol, GAP-DMORIE-DPyPE și GL67A-DOPE-DMPE-poliethilen glicol (PEG). Exemple de lipide cationice se referă la: 98N12-5, C12-200, Dlin-KC2-DMA (KC2), Dlin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1 și 7C1. Exemple de lipide neutre se referă la: DPSC, DPPC, POPC, DOPE și SM. Exemple de lipide modificate cu PEG se referă la: PEG-DMG, PEG-CerC14 și PEG-CerC20.

Lipidele pot să fie combinate, sub orice număr de rapoarte molare, pentru a produce un LNP. În plus, polinucleotidele pot să fie combinate cu lipidele într-o gamă largă de rapoarte molare pentru a produce un LNP.

După cum s-a afirmat anterior, polipeptida direcționată-pe situs și acidul nucleic-care țineste genomul pot să fie fiecare administrate separat unei celule sau unui pacient. Pe de altă parte, polipeptida direcționată-pe situs poate să fie pre-complexată cu unul sau cu mai multe ARN-uri de ghidare, sau cu unul sau cu mai multe ARNcr-uri împreună cu un ARNtracr. Materialul pre-complexat poate să fie apoi administrat unei celule sau unui pacient. Un astfel de material pre-complexat este cunoscut ca fiind o particulă de ribonucleoproteină (RNP).

ARN-ul este capabil să formeze interacțiuni specifice cu ARN-ul sau ADN-ul. Deși această proprietate este folosită în multe procese biologice, ea prezintă și riscul de interacțiuni promiscue într-un mediu celular bogat în acid nucleic. O soluție față de această problemă este formarea particulelor de ribonucleoproteină (RNP), în care ARN-ul este pre-complexat cu o endonuclează. Un alt beneficiu al RNP-ului este protecția ARN-ului împotriva degradării.

Endonucleaza din RNP poate să fie modificată sau nemodificată. De asemenea, ARNg, ARNcr, ARNtracr sau ARNsg pot să fie modificate sau nemodificate. Numeroase modificări sunt cunoscute în stadiul tehnicii și pot să fie utilizate.

Endonucleaza și ARNsg-ul pot să fie combinate, în general, într-un raport molar de 1:1. Alternativ, endonucleaza, ARNcr-ul și ARNtracr-ul pot să fie, în general, combinate într-un raport molar de 1:1:1. Cu toate acestea, o gamă largă de rapoarte molare poate să fie utilizată pentru a produce un RNP.

Un vector recombinant de virus adeno-asociat (AAV) poate să fie utilizat pentru livrare. Tehnicile de producere a particulelor de AAVr, în care genomul AAV care urmează să fie împachetat,

care include polinucleotida care urmează să fie livrată, genele rep și cap și funcțiile virusului helper care sunt furnizate unei celule, sunt standard în stadiul tehnicii. Producerea de AAVr, în mod obișnuit, necesită ca următoarele componente să fie prezente într-o celulă unică (notată în prezenta dezvăluire ca celula de împachetare): genomul AAVr, genele rep și cap AAV separate de (adică, nu în) genomul AAVr și funcțiile virusului helper. Genele AAV rep și cap pot să fie provenite de la orice serotip AAV, pentru care poate să fie derivat virusul recombinant și pot să fie dintr-un serotip AAV diferit de ITR-urile genomului AAVr, care includ, dar fără a se limita la, serotipurile AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 și AAV rh.74. Producerea de AAVr pseudotipizat este dezvăluită, de exemplu, în publicația cererii internaționale de brevet WO 01/83692. A se vedea Tabelul 2.

Tabelul 2

Serotip AAV	Nr. Acces Genbank
AAV - 1	NC_002077.1
AAV - 2	NC_001401.2
AAV - 3	NC_001729.1
AAV - 3B	AF028705.1
AAV - 4	NC_001829.1
AAV - 5	NC_006152.1
AAV - 6	AF028704.1
AAV - 7	NC_006260.1
AAV - 8	NC_006261.1
AAV - 9	AX753250.1
AAV - 10	AY631965.1
AAV - 11	AY631966.1
AAV - 12	DQ813647.1
AAV - 13	EU285562.1

O metodă de generare a unei celule de împachetare implică generarea unei linii celulare care exprimă stabil toate componentele necesare pentru producerea particulei AAV. De exemplu, o plasmidă (sau mai multe plasmide) care cuprinde un genom AAVr lipsit de gene AAV rep și cap, gene AAV rep și cap separate de genomul AAVr și un marker selectabil, cum ar fi o genă cu rezistență la neomicină, sunt integrate în genomul celulei. Genomurile AAV s-au introdus în plasmidele bacteriene prin proceduri cum ar fi GC tailing (Samulski și colaboratorii, 1982, Proc.Natl.Acad.S6.USA, 79:2077-2081), adăugarea de linker sintetici care conțin situsuri de clivare a endonucleazei de restricție (a se vedea Laughlin și colaboratorii, 1983, Gene, 23:65-73) sau prin ligatură directă, la extremitatea-boantă (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chim., 259:4661-4666). Linia celulară de împachetare poate să fie apoi infectată cu un virus helper, cum ar fi adenovirusul. Avantajele acestei metode sunt acelea că celulele sunt selectabile și sunt adecvate pentru producția pe scară largă de AAVr. Alte exemple de metode adecvate folosesc adenovirusul sau baculovirusul, mai degrabă decât plasmidele, pentru a introduce genomi AAVr și/sau gene rep și cap în celulele de împachetare.

Principiile generale ale producției de AAVr sunt revizuite, de exemplu, de către Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; și Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial, and Immunol., 158:97-129). Diverse abordări sunt descrise de către Ratschin și colaboratorii, Mol. Celulă. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat și colaboratorii, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin și colaboratorii, Mol. Celulă. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin și colaboratorii, J. Virol., 62: 1963 (1988); și Lebkowski și colaboratorii, 1988 Mol. Celulă. Biol., 7:349 (1988). Samulski și colaboratorii, (1989, J. Virol., 63:3822-3828); Brevetul de invenție U.S. Nr. 5.173.414; publicația cererii de brevet de invenție internațională WO95/13365 și brevetul de invenție corespunzător U.S. nr. 5.658.776; publicațiile cererilor de brevet de invenție internaționale WO 95/13392; WO 96/17947; cererea de brevet de invenție internațională PCT/US98/18600; publicațiile cererilor de brevet de invenție internaționale: WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/1 1764; Perrin și colaboratorii, (1995) Vaccin 13: 1244-1250; Paul și colaboratorii, (1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clark și colaboratorii, (1996) Terapie genetică 3:1 124-1 132; Brevetul de invenție U.S. Nr. 5.786.211; Brevetul de invenție U.S. Nr. 5.871.982; și Brevetul de invenție U.S. Nr. 6.258.595.

Serotipurile vectorului AAV pot să fie corelate cu tipurile de celule țintă. De exemplu, următoarele tipuri de celule cu titlu de exemplu, pot să fie translate prin serotipurile AAV indicate, printre altele. A se vedea Tabelul 3.

Tabelul 3

Tip de Țesut/Celulă	SEROTIP
Ficat	AAV8, AA3, AA5, AAV9
Mușchi scheletici	AAV1, AAV7, AAV6, AAV8, AAV9
Sistem nervos Central	AAV5, AAV1, AAV4
RPE	AAV5, AAV4
Celule fotoreceptoare	AAV5
Plămân	AAV9
Inimă	AAV8
Pancreas	AAV8
Rinichi	AAV2, AA8

În plus, față de vectorii virali adeno-asociați, pot să fie utilizați și alți vectori virali. Astfel de vectori virali includ, dar nu sunt limitați la, lentivirus, alfavirus, enterovirus, pestivirus, baculovirus, herpesvirus, virus Epstein Barr, papovavirus, poxvirus, virus vaccinia și virus herpes simplex.

În unele cazuri, ARNm Cas9, ARNsg-ul care țintește unul sau doi loci în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN, care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A și ADN-ul donor pot să fie fiecare formulat separat în nanoparticule lipidice sau sunt toate co-formulate într-o singură nanoparticulă lipidică.

În unele cazuri, ARNm Cas9 poate să fie formulat într-o nanoparticulă lipidică, în timp ce ARNsg-ul și ADN-ul donor pot să fie livrate într-un vector AAV.

Sunt disponibile opțiuni pentru a furniza nucleaza Cas9 sub formă de plasmidă ADN, de ARNm sau de proteină. ARN-ul ghid poate să fie exprimat din același ADN sau poate să fie, de asemenea, livrat ca ARN. ARN-ul poate să fie modificat chimic pentru a-și modifica sau îmbunătăți timpul de înjumătățire sau pentru a reduce probabilitatea sau gradul de răspuns imun. Proteina endonuclează poate să fie complexată cu ARNg înainte de livrare. Vectorii virali permit livrarea eficientă; versiunile divizate ale Cas9 și ortologii cu dimensiuni mai mici ai Cas9 pot să fie împachetate în AAV, la fel ca și donorii pentru HDR. Există, de asemenea, o gamă largă de metode de livrare non-virale care pot să furnizeze fiecare dintre aceste componente, sau pot să fie folosite metode non-virale și virale în tandem. De exemplu, nanoparticulele pot să fie folosite pentru a furniza proteina și ARN-ul ghid, în timp ce AAV poate să fie folosit pentru a furniza ADN-ul donor.

Celule Modificate Genetic

Termenul „celulă modificată genetic” se referă la o celulă care cuprinde cel puțin o modificare genetică introdusă prin editarea genomului (de exemplu, folosind sistemul CRISPR/Cas9/Cpf1). În unele exemple *ex vivo* din prezenta dezvoltare, celula modificată genetic poate să fie celulă progenitoare modificată genetic. În unele exemple *in vivo* din prezenta dezvoltare, celula modificată genetic poate să fie o celulă progenitoare hematopoietică modificată genetic. S-a luat în considerare o celulă modificată genetic, care cuprinde un acid nucleic exogen, care țintește genomul și/sau un acid nucleic exogen, care codifică pentru un acid nucleic-care țintește genomul.

Termenul „populație tratată de control” descrie o populație de celule care a fost tratată cu medii identice, inducție virală, secvențe de acid nucleic, temperatură, confluență, dimensiunea balonului, pH etc., cu excepția adăugării componentelor de editare a genomului. Orice metodă cunoscută în stadiul tehnicii poate să fie utilizată pentru a măsura modularea sau inactivarea secvenței de control transcripțional a genei BCL11A sau în ceea ce privește exprimarea sau activitatea proteinei, de exemplu, analiza Western Blot a secvenței de control transcripțional a proteinei genei BCL11A sau cuantificarea secvenței de control transcripțional a ARNm-ului genei BCL11A.

Termenul „celulă izolată” se referă la o celulă care a fost îndepărtată dintr-un organism în care a fost găsită inițial sau la un descendent al unei astfel de celule. Opțional, celula poate să fie cultivată *in vitro*, de exemplu, în condiții definite sau în prezența altor celule. Opțional, celula poate să fie introdusă ulterior în cel de-al doilea organism sau reintrodusă în organismul din care a fost izolată (sau celula din care descinde).

Termenul "populație izolată" cu privire la o populație izolată de celule se referă la o populație de celule, care a fost îndepărtată și separată dintr-o populație de celule mixtă sau eterogenă. În unele cazuri, populația izolată poate să fie o populație de celule substanțial pură, în comparație cu populația eterogenă din care celulele au fost izolate sau îmbogățite. În unele cazuri, populația izolată poate să fie o populație izolată de celule progenitoare umane, de exemplu, o populație substanțial pură de celule progenitoare

umane, în comparație cu o populație eterogenă de celule care cuprinde celule progenitoare umane și celule din care au fost derivate celulele progenitoare umane.

Termenul „substanțial îmbunătățit”, în ceea ce privește o anumită populație de celule, se referă la o populație de celule în care apariția unui anumit tip de celulă este crescută în raport cu nivelurile preexistente sau de referință, de cel puțin 2 ori, la cel puțin 3-, cel puțin 4-, cel puțin 5-, cel puțin 6-, cel puțin 7-, cel puțin 8-, cel puțin 9, cel puțin 10-, cel puțin 20-, cel puțin 50-, cel puțin 100-, cel puțin 400-, cel puțin 1000-, cel puțin 5000-, cel puțin 20000-, cel puțin 100000- sau mai multe ori în funcție, de exemplu, de nivelurile dorite de astfel de celule pentru ameliorarea hemoglobinopatiei.

Termenul „îmbogățit substanțial” cu privire la o anumită populație de celule, se referă la o populație de celule care reprezintă cel puțin aproximativ 10%, aproximativ 20%, aproximativ 30%, aproximativ 40%, aproximativ 50%, aproximativ 60%, aproximativ 70% sau mai mult în raport cu celulele care formează o populație totală de celule.

Termenul „substanțial pur” în ceea ce privește o populație de celule specială, se referă la o populație de celule reprezintă cel puțin aproximativ 75%, de cel puțin aproximativ 85%, de cel puțin aproximativ 90% sau cel puțin aproximativ 95% pură, din celulele care alcătuiesc o populație totală de celule. Adică, termenii „substanțial pur” sau „esențial purificat”, cu privire la o populație de celule progenitoare, se referă la o populație de celule care conține mai puțin de aproximativ 20%, aproximativ 15%, aproximativ 10%, aproximativ 9%, aproximativ 8%, aproximativ 7%, aproximativ 6%, aproximativ 5%, aproximativ 4%, aproximativ 3%, aproximativ 2%, aproximativ 1% sau mai puțin de 1% din celulele care nu sunt celule progenitoare, așa cum sunt definite în terminologia prezentei dezvoltări.

Diferențierea iPSC-urilor editate genomic în celule progenitoare hematopoietice

O altă etapă a metodelor *ex vivo* din prezenta dezvoltare poate să cuprindă diferențierea iPSC-urilor editate genomic în celulele progenitoare hematopoietice. Etapa de diferențiere poate să fie efectuată conform oricărei metode cunoscute în stadiul tehnicii.

Diferențierea celulelor stem mezenchimale cu genom-editat în celule progenitoare hematopoietice

O altă etapă a metodelor *ex vivo* din prezenta dezvoltare poate să cuprindă diferențierea celulelor stem mezenchimale cu genom-editat în celule progenitoare hematopoietice. Etapa de diferențiere poate să fie efectuată conform oricărei metode cunoscute în stadiul tehnicii.

Implantarea celulelor la pacienți

O altă etapă a metodelor *ex vivo* din prezenta dezvoltare poate să cuprindă implantarea celulelor la pacienți. Această etapă de implantare poate să fie realizată folosind orice metodă de implantare cunoscută în stadiul tehnicii. De exemplu, celulele modificate genetic pot să fie injectate direct în sângele pacientului sau administrate în alt mod pacientului. Celulele modificate genetic pot să fie purificate *ex vivo* folosind un marker selectat.

Purtători acceptabili farmaceutic

Metodele *ex vivo* de administrare a celulelor progenitoare la un subiect luate în considerare în prezenta dezvoltare pot să implice utilizarea compozițiilor terapeutice care cuprind celule progenitoare.

Compozițiile terapeutice pot să conțină un purtător tolerabil fiziologic împreună cu compoziția celulară și, în mod opțional, cel puțin un agent bioactiv suplimentar așa cum este descris în prezenta dezvoltare, dizolvat sau dispersat în aceasta ca ingredient activ. În unele cazuri, compoziția terapeutică nu este substanțial imunogenă, atunci când este administrată în scopuri terapeutice, unui pacient mamifer sau uman, dacă nu se dorește.

În general, celulele progenitoare descrise în prezenta dezvoltare, pot să fie administrate sub formă de suspensie cu un purtător acceptabil farmaceutic. Pentru o persoană de specialitate în domeniu este evident faptul că purtătorul acceptabil farmaceutic, destinat pentru a fi utilizat într-o compoziție celulară, nu va include soluții tampon, compuși, agenți de crioconservare, conservanți sau alți agenți în cantități care interferează, în mod substanțial, cu viabilitatea celulelor care urmează să fie livrate subiectului. O formulare care cuprinde celule poate să includă, de exemplu, soluții tampon osmotice care permit menținerea integrității membranei celulare și, în mod opțional, nutrienți pentru a menține viabilitatea celulară sau pentru a îmbunătăți grefarea după administrare. Astfel de formule și suspensii sunt cunoscute specialiștilor în domeniu și/sau pot să fie adaptate pentru utilizare cu celulele progenitoare, așa cum este descris în prezenta dezvoltare, folosind experimente de rutină.

O compoziție celulară poate să fie, de asemenea, emulsionată sau prezentată sub formă de compoziție de lipozomi, cu condiția ca procedura de emulsionare să nu afecteze în mod negativ viabilitatea celulei. Celulele și orice alt ingredient activ pot să fie amestecate cu excipienți care sunt acceptabili farmaceutic și compatibili cu ingredientul activ și în cantități adecvate pentru utilizare în metodele terapeutice descrise în prezenta dezvoltare.

Agenții suplimentari incluși într-o compoziție celulară pot să includă săruri acceptabile farmaceutic ale componentelor din aceasta. Sărurile acceptabile farmaceutic includ sărurile de aditie acidă

(formate cu grupările amino libere ale polipeptidei) care sunt formate cu acizi anorganici, cum ar fi, de exemplu, acid clorhidric sau acid fosforic, sau acizi organici precum acid acetic, acid tartric, acid mandelic și alții asemenea. Sărurile formate cu grupările carboxil libere pot să fie, de asemenea, derivate din baze anorganice, cum ar fi, de exemplu, hidroxid de sodiu, hidroxid de potasiu, hidroxid de amoniu, hidroxid de calciu sau hidroxizi ferici, și baze organice precum izopropilamină, trimetilamină, 2-etilaminoetanol, histidină, procaină și asemenea.

Purtătorii tolerabili fiziologic sunt bine cunoscuți în stadiul tehnicii. Exemple de purtători lichizi se referă la soluții apoase sterile, care nu conțin materiale în plus față de ingredientele active și de apă, sau care conțin un tampon cum ar fi fosfat de sodiu la valoarea fiziologică a pH-ului, soluție salină fiziologică sau ambele, cum ar fi soluție salină tamponată cu fosfat. În plus, purtătorii apoși pot să conțină mai mult de o sare tampon, precum și săruri cum ar fi clorurile: de sodiu și de potasiu, dextroza, polietilen glicolul și alți soluți. Compozițiile lichide pot să conțină, de asemenea, faze lichide, în plus, față de și cu excluderea apei. Exemple de astfel de faze lichide suplimentare se referă la: glicerină, uleiurile vegetale cum ar fi uleiul din semințe de bumbac și la emulsiile apă-ulei. Cantitatea de compus activ utilizată în compozițiile celulare, care este eficientă în tratamentul unei anumite tulburări sau afecțiuni, poate să depindă de natura tulburării sau afecțiunii și poate să fie determinată prin tehnici clinice standard.

Administrare și eficacitate

Termenii „administrare”, „introducere” și „transplant” sunt utilizați interschimbabili în contextul plasării celulelor, de exemplu, celule progenitoare, în organismul unui subiect, printr-o metodă sau cale, care au drept rezultat localizarea cel puțin parțială a celulelor introduse, în situsul dorit, cum ar fi un situs de rănire sau de reparare, astfel încât să se producă efectul/efectele dorite. Celulele, de exemplu, celulele progenitoare, sau descendenții lor diferențiați pot să fie administrate folosind orice cale adecvată, care are drept rezultat livrarea într-o locație dorită a unui subiect, în care cel puțin o parte din celulele implantate sau componente ale celulelor rămân viabile. Perioada de viabilitate a celulelor după administrarea la un subiect poate să fie cât mai scurtă de câteva ore, de exemplu, douăzeci și patru de ore, până la câteva zile, până la câțiva ani, sau chiar pe durata de viață a pacientului, de exemplu, grefa pe termen lung. De exemplu, în unele aspecte descrise, conform cu prezenta dezvăluire, o cantitate eficientă de celule progenitoare miogenice este administrată folosind o cale sistemică de administrare, cum ar fi o cale intraperitoneală sau intravenoasă.

Termenii „individ”, „subiect”, „gazdă” și „pacient” sunt interschimbabili în prezenta dezvăluire, și aceștia se referă la orice subiect pentru care se dorește diagnostic, tratament sau terapie. În unele aspecte, subiectul este un mamifer. În unele aspecte, subiectul este o ființă umană.

Atunci când sunt furnizate profilactic, celulele progenitoare descrise în prezenta dezvăluire, pot să fie administrate unui subiect înaintea oricărui simptom de hemoglobinopatie, de exemplu, înainte de apariția oboselii, dificultății de respirație, icter, creștere lentă pubertate târzie, dureri articulare, dureri osoase și toracice, splina și ficatul marite. În consecință, administrarea profilactică a unei populații de celule progenitoare hematopoietice servește la prevenirea unei hemoglobinopatii, cum ar fi β -talasemia sau siclemia.

Atunci când sunt furnizate terapeutic, celulele progenitoare hematopoietice sunt furnizate la (sau după) debutul unui simptom sau a unei stări de hemoglobinopatie, de exemplu, la debutul bolii.

Populația de celule progenitoare hematopoietice, care este administrată conform metodelor descrise în prezenta dezvăluire poate să cuprindă celule progenitoare hematopoietice alogene, recoltate de la unul sau de la mai mulți donori. Termenul "alogenic" se referă la o celulă progenitoare hematopoietică sau eșantioane biologice, care cuprinde celule progenitoare hematopoietice obținute de la unul sau de mai mulți donori diferiți ai aceleiași specii, în care genele la unul sau la mai mulți loci nu sunt identice. De exemplu, o populație de celule progenitoare hematopoietice fiind administrată unui subiect poate să fie derivată de la un alt subiect donor neînrudit sau de la unul sau de la mai mulți frați care nu sunt identici. În unele cazuri, pot să fie utilizate populații de celule progenitoare hematopoietice singeneice, cum ar fi acelea obținute de la animale identice genetic sau de la gemeni identici. Celulele progenitoare hematopoietice pot să fie celule autologe; adică celulele progenitoare hematopoietice sunt obținute sau izolate de la un subiect și administrate aceluiași subiect, adică donatorul și primitorul sunt aceiași.

Termenul „cantitate eficientă” se referă la cantitatea dintr-o populație de celule progenitoare sau de la descendenții acestora necesară pentru a împiedica sau pentru a atenua cel puțin unul sau mai multe semne sau simptome de hemoglobinopatie și, se referă la o cantitate suficientă dintr-o compoziție pentru a furniza efectul dorit, de exemplu, pentru tratamentul unui subiect care suferă de hemoglobinopatie. Prin urmare, termenul "cantitate eficientă terapeutic" se referă la o cantitate de celule progenitoare sau o compoziție, care cuprinde celule progenitoare, care este suficientă pentru a promova un efect special atunci când este administrată unui subiect tipic, cum ar fi unul care are sau este expus riscului de hemoglobinopatie. O cantitate eficientă ar include, de asemenea, o cantitate suficientă pentru a împiedica

sau pentru a întârzia dezvoltarea unui simptom al bolii, pentru a modifica cursul unui simptom al bolii (de exemplu, dar fără a se limita la, încetinirea progresiei unui simptom al bolii), sau pentru a inversa un simptom al bolii. Este evident faptul că pentru orice caz dat, o „cantitate eficientă” adecvată poate să fie determinată de către un specialist în domeniu pe baza unei experiențe de rutină.

Pentru utilizare în diferitele aspecte descrise în prezenta dezvoltare, o cantitate eficientă de celule progenitoare cuprinde cel puțin 10^2 celule progenitoare, cel puțin 5×10^2 celule progenitoare, cel puțin 10^3 celule progenitoare, cel puțin 5×10^3 celule progenitoare, cel puțin 10^4 celule progenitoare, cel puțin 5×10^4 celule progenitoare, cel puțin 10^5 celule progenitoare, cel puțin 2×10^5 celule progenitoare, cel puțin 3×10^5 celule progenitoare, cel puțin 4×10^5 celule progenitoare, cel puțin 5×10^5 celule progenitoare, cel puțin 6×10^5 celule progenitoare, cel puțin 7×10^5 celule progenitoare, cel puțin 8×10^5 celule progenitoare, cel puțin 9×10^5 celule progenitoare, cel puțin 1×10^6 celule progenitoare, cel puțin 2×10^6 celule progenitoare, cel puțin 3×10^6 celule progenitoare, cel puțin 4×10^6 celule progenitoare, cel puțin 5×10^6 celule progenitoare, cel puțin 6×10^6 celule progenitoare, cel puțin 7×10^6 celule progenitoare, cel puțin 8×10^6 celule progenitoare, cel puțin 9×10^6 celule progenitoare sau multipli ai acestora. Celulele progenitoare pot să fie derivate de la unul sau de la mai mulți donori sau pot să fie obținute dintr-o sursă autologă. În unele exemple descrise în prezenta dezvoltare, celulele progenitoare pot să fie expandate în cultură înainte de administrare la un subiect care necesită o astfel de administrare.

Termenul „administrat” se referă la livrarea unei compoziții de celule progenitoare la un subiect folosind o metodă sau o cale care are drept rezultat localizarea cel puțin parțială a compoziției celulare la un situs dorit. O compoziție celulară poate să fie administrată pe folosind orice cale adecvată care are drept rezultat un tratament eficient pentru subiect, adică administrarea are drept rezultat livrarea într-o locație dorită a subiectului, în care cel puțin o porțiune din compoziție este livrată, adică cel puțin 1×10^4 celule sunt livrate la situsul dorit pentru o perioadă de timp. Modurile de administrare includ: injecția, perfuzia, instilarea sau ingestia. Termenul „injecție” include, fără limitare, injecție și perfuzie: intravenoasă, intramusculară, intraarterială, intratecală, intraventriculară, intracapsulară, intraorbitală, intracardiacă, intradermică, intraperitoneală, transtraheală, subcutanată, subcuticulară, intraarticulară, subcapsulară, subarahnoidiană, intraspinală, intracerebro-spinală și intrasternală. În unele exemple, calea este intravenoasă. Pentru livrarea celulelor se poate face administrare prin injecție sau prin perfuzie.

Celulele pot să fie administrate sistemic. Expresiile „administrare sistemică”, „administrare în mod sistemic”, „administrare periferică” și „administrat în mod periferic” se referă la administrarea unei populații de celule progenitoare, altfel decât direct într-un situs țintă, țesut țintă sau organ țintă, astfel încât aceasta să pătrundă, în schimb, în sistemul circulator al subiectului și, astfel, să fie supusă metabolismului și altor procese similare.

Eficacitatea unui tratament care cuprinde o compoziție, pentru tratamentul hemoglobinopatiilor, poate să fie determinată de un clinician calificat. Cu toate acestea, un tratament este considerat „tratament eficient”, dacă unul sau toate semnele sau simptomele, cu titlu de numai un exemplu, nivelurile funcționale ale BCL11A și ale HbF sunt modificate într-o manieră benefică (de exemplu, reducerea cu cel puțin 10 % în cazul BCL11A și/sau creșterea cu cel puțin 10% în cazul HbF), sau dacă alte simptome acceptate clinic sau markeri de boală acceptați clinic sunt îmbunătățiți sau ameliorați. Eficacitatea poate să fie măsurată și prin absența agravării situației unui pacient așa după cum s-a evaluat prin necesitatea de spitalizare sau prin necesitatea intervențiilor medicale (de exemplu, progresia bolii este oprită sau cel puțin încetinită). Metodele de măsurare a acestor indicatori sunt cunoscute specialiștilor în domeniu și/sau sunt descrise în cu prezenta dezvoltare. Tratamentul se referă la orice tratament al unei boli în cazul unui individ sau a unui animal (unele exemple cu caracter nelimitativ se referă la un pacient uman sau la un mamifer) și include: (1) inhibarea bolii, de exemplu, oprirea sau încetinirea progresiei simptomelor; sau (2) ameliorarea bolii, de exemplu, regresia simptomelor; și (3) prevenirea sau reducerea probabilității dezvoltării simptomelor.

Tratamentul conform prezentei dezvoltări poate să amelioreze unul sau mai multe simptome asociate cu hemoglobinopatiile prin scăderea cantității de BCL11A funcțională și/sau creșterea cantității de HbF funcțională la un individ. Primele semnale asociate, în mod obișnuit, cu hemoglobinopatiile includ, de exemplu, oboseală, dificultăți de respirație, icter, creștere lentă pubertate târzie, dureri articulare, dureri osoase și toracice, splină mărită și ficat mărit.

Kit-uri

Prezenta dezvoltare dezvoltă kit-uri pentru realizarea metodelor descrise, în prezenta dezvoltare. Un kit poate să includă unul sau mai multe dintre un acid nucleic-care țintește genomul, o polinucleotidă care codifică pentru un acid nucleic-care țintește genomul, o polipeptidă direcționată-pe situs, o polinucleotidă care codifică pentru o polipeptidă direcționată-pe situs și/sau orice acid nucleic sau moleculă proteică necesară pentru realizarea aspectelor metodelor descrise în prezenta dezvoltare, sau orice combinație a acestora.

Un kit poate să cuprindă: (1) un vector care cuprinde o secvență nucleotidică, care codifică pentru un acid nucleic-care țintește genomul, (2) polipeptida direcționată-pe situs sau un vector care cuprinde o secvență nucleotidică, care codifică pentru polipeptida direcționată-pe situs și (3) un reactiv pentru reconstituirea și/sau pentru diluarea vectorului/vectorilor și/sau a polipeptidei.

Un kit poate să cuprindă: (1) un vector care cuprinde (i) o secvență nucleotidică, care codifică pentru un acid nucleic-care țintește genomul și (ii) o secvență nucleotidică care codifică pentru polipeptida direcționată-pe situs; și (2) un reactiv pentru reconstituirea și/sau diluarea vectorului.

În oricare dintre kit-urile menționate mai sus, kit-ul poate să cuprindă un acid nucleic ghid cu o singură moleculă care țintește genomul. În oricare dintre kit-urile de mai sus, kit-ul poate să cuprindă un acid nucleic cu moleculă dublă care țintește genomul. În oricare dintre kit-urile menționate mai sus, kit-ul poate să cuprindă două sau mai multe ghiduri cu moleculă dublă sau ghiduri cu o singură moleculă. Kit-urile pot să cuprindă un vector care codifică acidul nucleic care țintește acidul nucleic.

În oricare dintre kit-urile menționate mai sus, kit-ul poate să cuprindă, în plus, o polinucleotidă care urmează să fie inserată pentru a efectua modificarea genetică dorită.

Componentele unui kit pot să fie dispuse în containere separate sau pot să fie dispuse combinat într-un singur container.

Orice kit descris mai sus poate să cuprindă în plus unul sau mai mulți reactivi suplimentari, în care astfel de reactivi suplimentari sunt selectați dintre o soluție tampon, o soluție tampon pentru introducerea unei polipeptide sau polinucleotide într-o celulă, o soluție tampon de spălare, un reactiv de control, un vector de control, un ARN de control, o polinucleotidă, un reactiv pentru producerea *in vitro* a polipeptidei ADN-ului, adaptoare pentru secvențiere și altele asemenea. O soluție tampon poate să fie o soluție tampon de stabilizare, o soluție tampon de reconstituire, o soluție tampon de diluare sau altele asemenea. Un kit poate să cuprindă, de asemenea, una sau mai multe componente care pot să fie utilizate pentru a facilita sau pentru a îmbunătăți legarea la țintă sau clivarea ADN-ului de către endonuclează sau pentru a îmbunătăți specificitatea țintirii.

În plus, față de componentele menționate mai sus, un kit poate să cuprindă, în plus, instrucțiuni pentru utilizarea componentelor kit-ului pentru aplicarea metodelor. Instrucțiunile pentru aplicarea metodelor pot să fie înregistrate pe un mediu de înregistrare adecvat. De exemplu, instrucțiunile pot să fie tipărite pe un suport, cum ar fi pe hârtie sau pe material plastic etc. Instrucțiunile pot să fie prezente în kit-uri sub formă de prospect, sub formă de etichetă a recipientului kit-ului sau a componentelor acestuia (adică, asociate cu ambalajul sau cu ambalajul interior) etc. Instrucțiunile pot să fie prezente sub formă de fișier de date de stocare electronic, care este prezent pe un mediu de stocare adecvat, care poate să fie citit de calculator, de exemplu: CD-ROM, dischetă, unitate flash etc. În unele cazuri, instrucțiunile reale nu sunt prezente în kit, dar pot să fie furnizate mijloace pentru obținerea instrucțiunilor de la o sursă de la distanță (de exemplu, prin Internet). Un exemplu, al acestui caz, se referă la un kit care cuprinde o adresă web de unde pot să fie vizualizate instrucțiunile și/sau de pe care instrucțiunile pot să fie descărcate. Ca și în cazul instrucțiunilor, acest mijloc de obținere de instrucțiuni poate să fie înregistrat pe un suport adecvat.

Formularea ARN-ului ghid

ARN-urile ghid din prezenta dezvoltare pot să fie formulate cu excipienți acceptabili farmaceutic cum ar fi cu: purtători, solvenți, stabilizatori, adjuvanți, diluanți etc., în funcție de modul special de administrare și de forma de dozare. Compozițiile ARN ghid pot să fie formulate pentru atingerea unui pH compatibil fiziologic, și variază de la un pH de aproximativ 3 până la un pH de aproximativ 11, de la aproximativ pH 3 până la aproximativ pH 7, în funcție de formulare și de calea de administrare. În unele cazuri, pH-ul poate să fie ajustat la un interval de la aproximativ pH 5,0 până la aproximativ pH 8. În unele cazuri, compozițiile pot să cuprindă o cantitate eficientă terapeutic din cel puțin un compus așa cum este descris în prezenta dezvoltare, împreună cu unul sau cu mai mulți excipienți acceptabili farmaceutic. În mod opțional, compozițiile pot să cuprindă o combinație între compușii descriși în prezenta dezvoltare sau compozițiile pot să includă un al doilea ingredient activ util în tratamentul sau prevenirea creșterii bacteriene (de exemplu și fără limitare, agenți anti-bacterieni sau anti-microbieni) sau compozițiile pot să includă o combinație de reactivi conform prezentei dezvoltări.

Excipienții adecvați includ, de exemplu, molecule purtător care includ macromolecule mari, metabolizate lent, cum ar fi proteine, polizaharide, acizi polilactici, acizi poliglicolici, aminoacizi polimerici, copolimeri de aminoacizi și particule virale inactivate. Alți excipienți exemplificativi pot să includă antioxidanți (de exemplu și fără limitare, acid ascorbic), agenți de chelare (de exemplu și fără limitare, EDTA), carbohidrați (de exemplu și fără limitare, dextrină, hidroxialchilceluloză și hidroxialchilmetilceluloză), acid stearic, lichide (de exemplu, dar fără limitare, uleiuri, apă, soluție salină, glicerol și etanol), agenți de umectare sau de emulsionare, substanțe de tamponare a pH-ului și altele asemenea.

Alte Abordări Terapeutice Posibile

Editarea genelor poate să fie efectuată folosind nucleaze concepute pentru a ținti secvențele specifice. Până în prezent, există patru tipuri majore de nucleaze: meganucleazele și derivații lor, nucleaze degete de zinc (ZFN-uri), nucleaze efectoare de tipul activatorilor de transcripție (TALEN) și sisteme de nucleaze CRISPR-Cas9. Platformele de nuclează variază în ceea ce privește dificultatea de concepție, densitatea de țintire și modul de acțiune, în special, deoarece specificitatea ZFN-urilor și TALEN-urilor se face prin interacțiuni proteină-ADN, în timp ce interacțiunile ARN-ADN ghidează în primul rând Cas9. Clivarea Cas9 necesită, de asemenea, un motiv adiacent, PAM-ul, care diferă între diferitele sisteme CRISPR. Cas9 de la specia *Streptococcus pyogenes* clivează folosind un NGG PAM, CRISPR-ul de la specia *Neisseria meningitidis* poate să cliveze la situsuri cu PAM-uri care includ NNNNGATT, NNNNGTTT și NNNNGCTT. O serie de alte ortologi Cas9 țintește protodistanțier adiacent față de PAM-urile alternative.

Endonucleazele CRISPR, cum ar fi Cas9, pot să fie utilizate în metodele, definite conform cu prezenta dezvăluire. Cu toate acestea, cunoștințele descrise în prezenta dezvăluire, cum ar fi situsurile țintă terapeutice, ar putea să fie aplicate altor forme de endonucleaze, cum ar fi ZFN, TALEN, HE sau MegaTAL, sau folosind combinații de nucleaze. Totuși, pentru aplicarea cunoștințelor prezentei dezvăluiri la astfel de endonucleaze, ar fi nevoie, printre altele, să se genereze proteine direcționate-pe situsurile țintă specifice.

Domeniile de legare suplimentare pot să fie fuzionate cu proteina Cas9 pentru a crește specificitatea. Situsurile țintă ale acestor construcții s-ar mapa la situsul specificat de ARNg-ului identificat, dar ar necesita motive de legare suplimentare, cum ar fi pentru un domeniu deget de zinc. În cazul Mega-TAL, o meganuclează poate să fie fuzionată cu un domeniu de legare-ADN TALE. Domeniul meganuclează poate crește specificitatea și poate asigura clivarea. În mod similar, Cas9 inactivat sau mort (dCas9) poate să fie fuzionat la un domeniu de clivare și necesită situsul țintă ARNg/Cas9 și situsul de legare adiacent pentru domeniul de legare la ADN-ul fuzionat. Acest lucru ar necesita probabil o anumită inginerie proteică a dCas9, în plus, față de inactivarea catalitică, pentru a reduce legarea fără situs-ul de legare suplimentar.

Nucleazele Degete de Zinc

Nucleazele degete de zinc (ZFN-uri) sunt proteine modulare compuse dintr-un domeniu de legare ADN degete de zinc conceput prin inginerie genetică legat de domeniul catalitic al endonucleazei de tip II FokI. Deoarece FokI funcționează numai ca un dimer, o pereche de ZFN trebuie concepută pentru a se lega la secvențele „semi-situsurilor” țintă înrudite pe catenele de ADN opuse și cu o distanță precisă între ele pentru a permite formarea dimerului FokI activ catalitic. La dimerizarea domeniului FokI, care, în sine, nu prezintă specificitate de secvență propriu-zis, este generată o rupere a ADN-ului dublu-catenar între jumătățile ZFN ca etapă de inițiere în editarea genomului.

Domeniul de legare la ADN al fiecărui ZFN este, în mod obișnuit, format din 3-6 degete de zinc ale arhitecturii abundente Cys2-His2, fiecare deget recunoscând în primul rând un triplet de nucleotide pe o catenă a secvenței de ADN țintă, deși interacțiunea încrucișată cu o a patra nucleotide pot să fie de asemenea importante. Alterarea aminoacizilor unui deget în poziții care fac contacte cheie cu ADN-ul modifică specificitatea secvenței unui deget dat. Astfel, o proteină degete de zinc, având patru degete va recunoaște, în mod selectiv, o secvență țintă de 12 pb, în care secvența țintă este un compozit al preferințelor pentru triplete la care contribuie fiecare deget, deși preferința pentru triplete poate să fie influențată în diferite grade de către degetele vecine. Un aspect important al ZFN-urilor este acela că pot să fie redirecționate cu ușurință către vecinătatea oricărei adrese genomice prin simpla modificare a degetelor individuale, deși este necesară o expertiză considerabilă pentru a face acest lucru bine. În majoritatea aplicațiilor ZFN-urilor, sunt utilizate proteine cu 4-6 degete, recunoscând 12-18 bp, respectiv. Prin urmare, o pereche de ZFN-uri va recunoaște, în mod obișnuit, o secvență țintă combinată de 24-36 bp, fără a include distanțierul tipic de 5-7 bp între semi-situsuri. Situsurile de legare pot să fie separate în continuare cu distanțieri mai mari, care includ 15-17 pb. O secvență țintă având această lungime este probabil să fie unică în genomul uman, presupunând că secvențele repetitive sau omologii genei sunt excluse în timpul procesului de concepție. Cu toate acestea, interacțiunile proteină ZFN-ADN nu sunt absolute în specificitatea lor, așa că apar evenimente de legare în afara-țintei și de clivare în afara-țintei, fie sub formă de heterodimer între cele două ZFN-uri fie sub formă de homodimer al unuia sau al altuia dintre ZFN. Această din urmă posibilitate a fost eliminată, în mod eficient, prin proiecția interfeței de dimerizare a domeniului FokI pentru a crea variante „plus” și „minus”, cunoscute și sub denumirea de variante heterodimer obligatorii, care pot să dimerizeze numai una cu cealaltă, și nu cu ele însele. Fortărea heterodimerului obligatoriu împiedică formarea homodimerului. Acest lucru a îmbunătățit mult specificitatea ZFN-urilor, precum și orice altă nuclează care adoptă aceste variante FokI.

O varietate de sisteme bazate pe ZFN-uri au fost descrise în stadiul tehnicii, modificările acestora sunt raportate cu regularitate și numeroase referințe descriu reguli și parametri care sunt utilizați pentru a ghida concepția ZFN-urilor; a se vedea, de exemplu, Segal și colaboratorii, Proc Natl Acad Sci USA 96(6):2758-63 (1999); Dreier B și colaboratorii, J Mol Biol.303(4):489-502 (2000); Liu Q și colaboratorii, J Biol Chem. 277(6):3850-6 (2002); Dreier și colaboratorii, J Biol Chem 280(42):35588-97 (2005); și Dreier și colaboratorii, J Biol Chem. 276(31):29466-78 (2001).

Nucleazele Efectoare de tipul-Activatorului de Transcripție (TALEN-uri)

TALEN-urile reprezintă un alt format de nucleaze modulare prin care, ca și în cazul ZFN-urilor, un domeniu de legare la ADN-ul conceput este legat de domeniul nucleazei FokI și o pereche de TALEN-uri funcționează în tandem pentru a realiza clivarea ADN-ului țintit. Diferența majoră față de ZFN-uri este natura domeniului de legare la ADN și proprietățile asociate de recunoaștere a secvenței de ADN țintă. Domeniul de legare la ADN al TALEN derivă din proteinele TALE, care au fost descrise inițial în patogenul bacterian al plantei *Xanthomonas sp.* TALE-urile sunt compuse din rețele tandem de 33-35 de repetiții de aminoacizi, fiecare repetiție recunoscând o singură pereche de baze în secvența de ADN țintă, care are în mod obișnuit o lungime de până la 20 bp, dând o lungime totală a secvenței țintă de până la 40 bp. Specificitatea nucleotidică a fiecărei repetiții este determinată de perechea de aminoacizi (diresidue) variabilă care se repetă (RVD), care include numai doi aminoacizi în pozițiile 12 și 13. Bazele guanina, adenina, citozina și timina sunt recunoscute predominant de cele patru RVD-uri: Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp și respectiv Asn-Gly. Acesta constituie un cod de recunoaștere mult mai simplu decât pentru degetele de zinc și, prin urmare, reprezintă un avantaj față de acesta din urmă pentru concepția nucleazei. Cu toate acestea, ca și în cazul ZFN-urilor, interacțiunile proteină-ADN ale TALEN-urilor nu sunt absolute în specificitatea lor, iar TALEN-urile au beneficiat, de asemenea, de utilizarea variantelor heterodimer obligatoriu ale domeniului FokI pentru a reduce activitatea în afara-țintei.

S-au generat variante suplimentare ale domeniului FokI care sunt dezactivate în ceea ce privește funcția lor catalitică. Dacă o jumătate fie dintr-un TALEN, fie dintr-o pereche ZFN conține un domeniu FokI inactiv, atunci numai clivarea ADN-ului monocatenar (nicking) va avea loc la situsul țintă, mai degrabă decât o rupere dublu-catenară (DSB). Rezultatul este comparabil cu utilizarea mutanților „nickaze” CRISPR/Cas9/CpfI în care unul dintre domeniile de clivare Cas9 a fost dezactivat. Nick-urile ADN-ului pot să fie folosite pentru a conduce editarea genomului prin HDR, dar cu o eficiență mai mică decât cu DSB. Principalul beneficiu este că nickurile în afara țintei sunt reparate rapid și precis, spre deosebire de DSB, care este predispusă la reparații greșite mediate-NHEJ.

O varietate de sisteme bazate pe TALEN au fost descrise în stadiul tehnicii, iar modificările acestora sunt raportate cu regularitate; a se vedea, de exemplu, Boch, Science 326(5959): 1509-12 (2009); Mak și colaboratorii, Science 335(6069): 716-9 (2012); și Moscou și colaboratorii, Science 326(5959): 1501 (2009). Utilizarea TALEN bazate pe platforma „Golden Gate” sau pe schema de clonare a fost descrisă de mai multe grupuri; a se vedea, de exemplu, Cermak și colaboratorii, Nucleic Acids Res. 39(12): e82 (2011); Li și colaboratorii, Nucleic Acids Res. 39(14):6315-25(2011); Weber și colaboratorii, PLoS One. 6(2): e16765 (2011); Wang și colaboratorii, J Genet Genomics 4? (6):339-47, Epub 2014 17 mai (2014); și Cermak T și colaboratorii, Methods Mol Biol.1239: 133-59 (2015).

Endonucleaze Tip Homing

Endonucleazele tip homing (HE-uri) sunt endonucleaze specifice- secvenței care au secvențe lungi de recunoaștere (14-44 perechi de baze) și clivează ADN-ul cu specificitate ridicată - adesea în situsuri unice în genom. Există cel puțin șase familii cunoscute de HE-uri, așa cum sunt clasificate după structura lor, care includ LAGLIDADG (SECV ID NR. 71 949), GIY-YIG, His-Cis box, H-N-H, PD-(D/E)xK și Vsr- de tipul care sunt derivate dintr-o gamă largă de gazde, care includ eucarya, protisti, bacterii, arhee, cianobacterii și fagi. Ca și în cazul ZFN-urilor și TALEN-urilor, HE-urile pot să fie utilizate pentru a genera o DSB la un locus țintă ca etapă inițială în editarea genomului. În plus, unele HE-uri naturale și concepute taie numai o singură catenă de ADN, funcționând astfel ca nickaze specifice-situsului. Secvența țintă mare a HE-urilor și specificitatea pe care acestea o furnizează le-au făcut candidați atractivi pentru a crea DSB-uri specifice-situsului.

O varietate de sisteme bazate-pe HE-uri au fost descrise în stadiul tehnicii, iar modificările acestora sunt raportate cu regularitate; a se vedea, de exemplu, recenzii făcute de Steentoft și colaboratorii, Glycobiology 24(8):663-80 (2014); Belfort și Bonocora, Methods Mol Biol. 1123: 1 -26 (2014); Hafez și Hausner, Genome 55(8):553-69 (2012); și referințele citate acolo.

MegaTAL / Tev-mTALEN / MegaTev

Ca exemple suplimentare de nucleaze hibride, platforma MegaTAL și platforma Tev-mTALEN utilizează o fuziune a domeniilor de legare- ADN TALE și HE-urile active catalitic, având avantajul atât al legării reglabile ADN cât și al specificității TALE, precum și al specificității secvenței de clivare a HE-ului; a se vedea, de exemplu, Boissel și colaboratorii, NAR 42: 2591 -2601 (2014); Kleinstiver și

colaboratorii, G3 4: 1 155-65 (2014); și Boissel and Scharenberg, *Methods Mol.Biol.*1239: 171 -96 (2015).

Conform cu o variantă suplimentară, arhitectura MegaTev reprezintă fuziunea unui meganucleaze (Mega) cu domeniul nuclează derivat din endonucleaza homing GIY-YIG I-Tevl (Tev). Cele două situsuri active sunt poziționate la aproximativ 30 bp unul de celălalt pe un substrat ADN și generează două DSB-uri cu extremități coezive necompatibile; *a se vedea*, de exemplu, documentul *Wolfs și colaboratorii*, NAR 42, 8816-29 (2014). Se anticipează faptul că alte combinații de abordări existente pe bază de nuclează vor evolua și vor fi utile în realizarea modificărilor țintite ale genomului care sunt descrise în prezenta dezvoltare.

10 **dCas9-FokI sau dCpf1-FokI și Alte Nucleaze**

Combinarea proprietăților structurale și funcționale ale platformelor de nucleaze care s-au descris mai sus furnizează o abordare suplimentară a editării genomului care poate să depășească unele dintre deficiențele inerente. De exemplu, sistemul de editare a genomului CRISPR utilizează, în mod obișnuit, o endonuclează Cas9 unică pentru a crea o DSB. Specificitatea țintirii este determinată de o secvență de 20 sau 24 de nucleotide în ARN-ul ghid care suferă împerecherea bazelor Watson-Crick cu ADN-ul țintă (plus alte 2 baze în secvența NAG sau NGG PAM adiacentă în cazul Cas9 din specia *S. pyogenes*). O astfel de secvență este suficient de lungă pentru a fi unică în genomul uman, cu toate acestea, specificitatea interacțiunii ARN-ADN nu este absolută, fiind un amestec heterogen semnificativ uneori tolerat, în special, la jumătatea 5' a secvenței țintă, reducând efectiv numărul de baze care determină specificitatea. O soluție pentru aceasta a fost dezactivarea completă a funcției catalitice a Cas9-ului sau a Cpf1-ului reținând numai funcția de legare la ADN ARN - ghid și în schimb fuzionarea unui domeniu FokI cu Cas9 dezactivat; *a se vedea*, de exemplu, *Tsai și colaboratorii*, *Nature Biotech* 32: 569-76 (2014); și *Guilinger și colaboratorii*, *Nature Biotech.* 32: 577-82 (2014). Deoarece FokI trebuie să dimerizeze pentru a deveni activ catalitic, sunt necesare două ARN-uri ghid pentru a atașa două fuziuni FokI în imediata vecinătate pentru a forma dimerul și pentru a cliva ADN-ul. Acest lucru dublează, în esență, numărul de baze din situsurile țintă combinate, crescând astfel stringența țintirii de către sistemele bazate pe CRISPR.

Drept un exemplu suplimentar, fuziunea domeniului de legare a ADN-ului TALE la un HE activ catalitic, cum ar fi I-Tevl, are avantajul atât de legarea reglabilă ADN, cât și de specificitatea TALE, precum și de specificitatea secvenței de clivare a I-Tevl, cu preconizarea faptului că clivarea în afara-țintei poate să fie redusă și mai mult.

30 **Detectarea mutației pe și în afara-țintei prin secvențiere**

Pentru a secvenționa situsurile țintă și situsurile ipotetice off-țintă, primerii de amplificare corespunzători s-au identificat și reacțiile s-au stabilit cu acești primeri folosind ADN-ul genomic recoltat, folosind soluția de extracție ADN QuickExtract (Epicentre) din celulele tratate, la trei zile după transfecție. Primerii de amplificare conțin porțiunea specifică genei flancate de adaptorii. Extremitatea 5' a primerului direct (forward) include un situs de legare-primer direct (forward) (read 1) modificat. Extremitatea 5' a primerului invers (revers) conține un situs de legare primer invers (revers) (read 2) modificat și situsul de legare-primer cod de bare, în orientare opusă. Reacțiile PCR individuale au fost validate prin separare pe geluri de agaroză, apoi purificate și re-amplificate. Primerii direcți (forward) din runda a doua conțin secvența Illumina P5, urmată de către o porțiune din situsul de legare-primer (read 1) modificat. Primerii inverși (reversi) din runda a doua conțin secvența Illumina P7 (la extremitatea 5'), urmată de codul de bare cu 6 baze și de situsul de legare primer invers (reverse) modificat (read 2) și de codul de bare combinat. Amplificările din cea de-a doua rundă au fost, de asemenea, verificate pe geluri de agaroză, apoi purificate și cuantificate folosind un spectrofotometru NanoDrop. Producții de amplificare au fost regrupați pentru a corespunde concentrației și apoi s-au transmis la Emory Integrated Genomic Core pentru pregătirea bibliotecii și secvențiere pe un aparat Illumina Miseq.

Citirile de secvențiere s-au sortat după codul de bare și apoi s-au aliniat în raport cu secvențele de referință furnizate prin bioinformatică pentru fiecare produs. Ratele de inserție și de deleție în citirile de secvențiere alinate s-au detectat în regiunea situsurilor presupuse de tăiere folosind software-ul descris anterior; *a se vedea*, de exemplu, *Lin și colaboratorii*, *Nucleic Acids Res.*, 42: 7473-7485 (2014). Nivelurile inserțiilor și ale delețiilor detectate în această fereastră au fost apoi comparate cu nivelul observat în aceeași locație în ADN-ul genomic izolat din celulele transfectate false pentru a minimiza efectele artefactelor de secvențiere.

55 **Teste de detectare a mutațiilor**

Activitățile de clivare pe și în afara-țintei ale combinațiile de Cas9 și ARN-ul ghid s-au măsurate utilizând ratele de mutație, care rezultă din repararea imperfectă a ruperilor dublu-catenare prin NHEJ.

Locii pe-țintă s-au amplificat utilizând AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies, Carlsbad, CA) urmând instrucțiunile producătorului pentru 40 de cicluri (94°C, 30 s; U.S.

Nr.52-60°C, 30 s; 68°C, 60 s;) în reacții de 50 μl care conțin 1 μl de lizat celular și 1 μl din fiecare primer de amplificare 10 μM. S-au efectuat teste de detectare a mutației T7EI, conform protocolului producătorului [Reyon și colaboratorii, Nat.Biotechnol., 30: 460-465 (2012)], la digestii separate pe geluri de agaroză 2% și s-au cuantificat folosind ImageJ [Guschin și colaboratorii, Methods Mol.Biol., 649: 247-256 (2010)]. Testele determină procentul de inserții/deleții ("indels") în populația de celule în vrac (bulk).

Metode și Compoziții

În consecință, prezenta dezvăluire, se referă, în special, la următoarele invenții cu caracter nelimitativ: Conform cu prima metodă, Metoda 1, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă pentru editarea unei gene BCL11A într-o celulă umană prin editarea genomului, metodă care cuprinde etapa de introducere în celula umană a uneia sau a mai multor endonucleaze ale acidului dezoxiribonucleic (ADN) pentru a determina una sau mai multe ruperi monocatenare (SSB-uri) sau dublu-catenare (DSB-uri) în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică pentru un element reglator a genei BCL11A, care au drept rezultat o deleție permanentă, o modulare permanentă sau o inactivare permanentă a unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 2, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă pentru editarea unei gene BCL11A într-o celulă umană prin editarea genomului, așa cum este dezvăluit în Metoda 1, în care secvența de control transcripțional este localizată în cel de-al doilea intron al genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 3, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă pentru editarea unei gene BCL11A într-o celulă umană prin editarea genomului, așa cum este dezvăluit în Metodele 1 sau 2, în care secvența de control transcripțional este localizată în situsul hipersensibil ADN 58+(DHS) al genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 4, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, metodă care cuprinde etapele de: crearea unei celule stem pluripotente induse specifice pacientului (iPSC); editare în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A a iPSC; diferențiere iPSC editat-genomic într-o celulă progenitoare hematopoietică; și implantarea celulei progenitoare hematopoietice în pacient.

Conform cu o altă metodă, Metoda 5, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în Metoda 4, în care etapa de creare cuprinde: izolarea unei celule somatice de la pacient; și introducerea unui set de gene asociat-pluripotenței în celula somatică pentru a induce celula somatică să devină o celulă stem pluripotentă.

Conform cu o altă metodă, Metoda 6, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie așa cum este dezvăluit în Metoda 5, în care celula somatică este un fibroblast.

Conform cu o altă metodă, Metoda 7, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în Metodele 5 sau 6, în care setul de gene asociat-pluripotenței este reprezentă sau mai multe dintre genele selectate din grupul care constă din: OCT4, SOX2, KLF4, Lin28, NANOG și cMYC.

Conform cu o altă metodă, Metoda 8, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în oricare dintre Metodele de la 4 până la 7, în care etapa de editare cuprinde introducerea în iPSC a unuia sau a mai multor endonucleaze de acid dezoxiribonucleic (ADN) pentru a determina una sau mai multe ruperi monocatenare (SSB-uri) sau ruperi dublu-catenare (DSB-uri) în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A, care au drept rezultat o deleție permanentă, o modulare permanentă sau o inactivare permanentă a unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 9, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în oricare dintre Metodele de la 4 până la 8, în care etapa de diferențiere cuprinde una sau mai multe dintre următoarele pentru a diferenția iPSC-ul editat-genomic într-o celulă progenitoare hematopoietică: tratamentul cu o combinație de molecule mici, livrarea de factori de transcripție master, livrarea de ARNm care codifică pentru factorii de transcripție master sau livrarea de ARNm care codifică pentru factori de transcripție.

Conform cu o altă metodă, Metoda 10, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în oricare dintre Metodele de la 4 până la 9, în care etapa de implantare cuprinde implantarea celulei

progenitoare hematopoietice în pacient prin transplant, prin injecție locală, prin perfuzie sistemică sau prin combinații ale acestora.

Conform cu o altă metodă, Metoda 11, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, metoda care cuprinde etapele de: izolarea unei celule stem mezenchimale de la pacient; editarea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A a celulei stem mezenchimale; diferențierea celulei stem mezenchimale editată-genomic într-o celulă progenitoare hematopoietică; și implantarea celulei progenitoare hematopoietice în pacient.

Conform cu o altă metodă, Metoda 12, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie așa cum este dezvăluit în Metoda 11, în care celula stem mezenchimală este izolată din măduva osoasă sau din sângele periferic al pacientului.

Conform cu o altă metodă, Metoda 13, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în Metodele 11 sau 12, în care etapa de izolare cuprinde: aspirarea măduvei osoase și izolarea celulelor mezenchimale utilizând medii de centrifugare cu gradient de densitate.

Conform cu o altă metodă, Metoda 14, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în oricare dintre Metodele 11-13, în care etapa de editare cuprinde introducerea în celula stem mezenchimală a uneia sau a mai multor endonuclease ale acidului dezoxiribonucleic (ADN) pentru a determina una sau mai multe ruperi monocatenare (SSB-uri) sau ruperi dublu-catenare (DSB-uri) în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A, care au drept rezultat o deleție permanentă, o modulare permanentă sau o inactivare permanentă a unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 15, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în oricare dintre Metodele de la 11 până la 14, în care etapa de diferențiere cuprinde una sau mai multe dintre următoarele pentru a diferenția celula stem mezenchimală editată-genomic într-o celulă progenitoare hematopoietică: tratamentul cu o combinație de molecule mici, livrarea factorilor de transcripție master, livrarea de ARNm care codifică factorii de transcripție master sau livrarea de ARNm care codifică factori de transcripție.

Conform cu o altă metodă, Metoda 16, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în oricare dintre Metodele de la 11 până la 15, în care etapa de implantare cuprinde implantarea celulei progenitoare hematopoietice în pacient prin transplant, prin injecție locală, prin perfuzie sistemică sau prin combinații ale acestora.

Conform cu o altă metodă, Metoda 17, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, metoda care cuprinde etapele de: izolarea unei celule progenitoare hematopoietice de la pacient; editarea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A a celulei progenitoare hematopoietice; și implantarea celulei progenitoare hematopoietice editată-genomic în pacient.

Conform cu o altă metodă, Metoda 18, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în Metoda 17, în care metoda cuprinde, în plus, tratamentul pacientului cu factor de stimulare a coloniilor de granulocite (GCSF) înainte de etapa de izolare.

Conform cu o altă metodă, Metoda 19, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie așa cum este dezvăluit în Metoda 18, în care etapa de tratament este efectuată în combinație cu Plerixaflor.

Conform cu o altă metodă, Metoda 20, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie așa cum este dezvăluit în oricare dintre Metodele de la 17 până la 19, în care etapa de izolare cuprinde izolarea celulelor CD34+.

Conform cu o altă metodă, Metoda 21, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în oricare dintre Metodele de la 17 până la 20, în care etapa de editare cuprinde introducerea în celula progenitoare hematopoietică a uneia sau a mai multor endonuclease ale acidului dezoxiribonucleic (ADN) pentru a efectua una sau mai multe ruperi monocatenare (SSB-uri) sau ruperi dublu-catenare (DSB-uri) în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică

pentru un element reglator al genei BCL11A, care au drept rezultat o deleție permanentă, o modulare permanentă sau o inactivare permanentă a unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 22, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *ex vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în oricare dintre Metodele de la 17 până la 21, în care etapa de implantare cuprinde implantarea celulei progenitoare hematopoietice editată-genomic în pacient prin transplant, prin injecție locală, prin perfuzie sistemică sau prin combinații ale acestora.

Conform cu o altă metodă, Metoda 23, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *in vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, metodă care cuprinde etapa de editare a unei gene BCL11A într-o celulă a pacientului.

Conform cu o altă metodă, Metoda 24, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *in vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie, așa cum este dezvăluit în Metoda 23, în care etapa de editare cuprinde introducerea în celulă a uneia sau a mai multor endonucleaze ale acidului dezoxiribonucleic (ADN) pentru efectuarea uneia sau a mai multor ruperi monocatenare (SSB-uri) sau ruperi dublu-catenare (DSB-uri) în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A, care au drept rezultat o deleție permanentă, o modulare permanentă sau o inactivare permanentă a unui control transcripțional al genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 25, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă *in vivo* pentru tratamentul unui pacient, care suferă de un tip de hemoglobinopatie așa cum este dezvăluit în Metodele 23 sau 24, în care celula este o celulă de măduvă osoasă, o celulă progenitoare hematopoietică sau o celulă CD34+.

Conform cu o altă metodă, Metoda 26, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă conform oricăreia dintre Metodele 1, 8, 14, 21 și 24, în care una sau mai multe endonucleaze ADN sunt: Cas1, Cas11B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (cunoscut și ca Csn1 și Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, sau Cpf1; un omolog al acestora, o recombinare a moleculei naturale a acesteia, un codon-optimizat al acesteia, sau versiuni modificate ale acestora și combinații ale acestora.

Conform cu o altă metodă, Metoda 27, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă așa cum este dezvăluită în Metoda 26, în care metoda cuprinde introducerea în celulă a uneia sau a mai multor polinucleotide care codifică pentru una sau mai multe endonucleaze ADN.

Conform cu o altă metodă, Metoda 28, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă așa cum este dezvăluită în Metodele 26 sau 27, în care metoda cuprinde introducerea în celulă a unuia sau a mai multor acizi ribonucleici (ARN) care codifică pentru una sau mai multe endonucleaze ADN.

Conform cu o altă metodă, Metoda 29, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă așa cum este dezvăluită în Metodele 27 sau 28, în care una sau mai multe polinucleotide sau unul sau mai mulți ARN-uri sunt una sau mai multe polinucleotide modificate sau unul sau mai mulți ARN modificați.

Conform cu o altă metodă, Metoda 30, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă așa cum este dezvăluită în Metoda 26, în care una sau mai multe endonucleaze ADN sunt una sau mai multe proteine sau polipeptide.

Conform cu o altă metodă, Metoda 31, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă așa cum este dezvăluită în Metoda 30, în care una sau mai multe proteine sau polipeptide sunt flancate la N-terminal, la C-terminal sau atât la N-terminal, cât și la C-terminal prin unul sau de mai multe semnale de localizare nucleară (NLS-uri).

Conform cu o altă metodă, Metoda 32, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă așa cum este dezvăluită în Metoda 31, în care una sau mai multe proteine sau polipeptide sunt flancate de două NLS-uri, un NLS situat la N-terminal și cel de-al doilea NLS situat la C-terminal.

Conform cu o altă metodă, Metoda 33, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă așa cum este dezvăluită în oricare dintre Metodele 31-32, în care unul sau mai multe NLS-uri este NLS SV40.

Conform cu o altă metodă, Metoda 34, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă așa cum este dezvăluită în oricare dintre Metodele de la 1 până la 33, în care metoda cuprinde, în plus, introducerea în celulă a unuia sau a mai multor acizi ribonucleici ghid (ARNg).

Conform cu o altă metodă, Metoda 35, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă așa cum este dezvăluită în Metoda 34, în care unul sau mai mulți ARNg-uri sunt ARN ghid cu o singură moleculă (ARNsg).

Conform cu o altă metodă, Metoda 36, din prezenta dezvăluire, furnizează o metodă așa cum este dezvăluită în Metodele 34 sau 35, în care unul sau mai mulți ARNg-uri sau unul sau mai mulți ARNsg-uri este unul sau mai mulți ARNg-uri modificați sau unul sau mai mulți ARNsg-uri modificați.

Conform cu o altă metodă, Metoda 37, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 36, în care unul sau mai mulți ARNsg-uri modificate cuprind trei resturi 2'-O-metil-fosforotioat la sau în vecinătatea fiecăreia dintre extremitățile sale 5' și 3'.

Conform cu o altă metodă, Metoda 38, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 37, în care ARNsg-ul modificat este secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959.

Conform cu o altă metodă, Metoda 39, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metodele de la 34 până la 38, în care una sau mai multe endonucleaze ADN sunt pre-complexate cu unul sau mai mulți ARNg-uri sau unul sau mai mulți ARNsg-uri -uri pentru a forma una sau mai multe ribonucleoproteine (RNP-uri).

Conform cu o altă metodă, Metoda 40, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 39, în care raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza ADN din RNP este 1:1.

Conform cu o altă metodă, Metoda 41, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 40, în care ARNsg-ul cuprinde secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959, endonucleaza ADN este Cas9 din specia *S. pyogenes*, care cuprinde o extremitate N-terminal NLS SV40 și o extremitate C-terminal NLS SV40, în care raportul de greutate dintre ARNsg și endonucleaza ADN este 1:1.

Conform cu o altă metodă, Metoda 42, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele de la 1 până la 41, în care metoda cuprinde, în plus, introducerea în celulă a unei matrițe donor de polinucleotide care cuprinde o genă BCL11A de tip sălbatic sau un ADNc care cuprinde un secvență modificată de control transcripțional.

Conform cu o altă metodă, Metoda 43, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele 1, 8, 14, 21 sau 24, în care metoda cuprinde, în plus, introducerea în celulă a unui acid ribonucleic ghid (ARNg) și a unei matrițe donor de polinucleotide care cuprinde o genă BCL11A de tip sălbatic sau un ADNc care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată și în care una sau mai multe endonucleaze ADN sunt una sau mai multe endonucleaze Cas9 sau Cpf1, care determină o rupere monocatenară (SSB) sau dublu-catenară (DSB) la un locus din interiorul sau din vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A, care facilitează inserția unei noi secvențe din matrița donor de polinucleotidă în ADN-ul cromozomial la locus, ceea ce are drept rezultat o inserție permanentă, o modulare permanentă sau o inactivare permanentă a secvenței de control transcripțional a ADN-ului cromozomial din vecinătatea locusului și în care ARNg cuprinde o secvență distanțier care este complementară unui segment al locusului.

Conform cu o altă metodă, Metoda 44, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 43, în care învecinat înseamnă nucleotidele situate atât în amonte, cât și în aval față de locus.

Conform cu o altă metodă, Metoda 45, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă conform oricăreia dintre Metodele 1, 8, 14, 21 sau 24, în care metoda cuprinde, în plus, introducerea în celulă a unui sau a mai multor acizi ribonucleici ghid (ARNg) și o matriță donor de polinucleotidă care cuprinde o genă BCL11A de tip sălbatic sau un ADNc care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată și în care una sau mai multe endonucleaze ADN sunt una sau mai multe endonucleaze Cas9 sau Cpf1, care determină sau crează o pereche de ruperi monocatenare (SSB-uri) sau ruperi dublu-catenare (DSB-uri), prima rupere la un locus 5' și cea de-a doua rupere la un locus 3', în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A, care facilitează inserția unei noi secvențe din matrița donor polinucleotidică în ADN-ul cromozomial între locusul 5' și locusul 3', care au drept rezultat o inserție permanentă, o modulare permanentă sau o inactivare permanentă a secvenței de control transcripțional a ADN-ului cromozomial între locusul 5' și locusul 3'.

Conform cu o altă metodă, Metoda 46, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 45, în care un ARNg-ul generează o pereche de SSB-uri sau de DSB-uri.

Conform cu o altă metodă, Metoda 47, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 45, în care un ARNg-ul cuprinde o secvență distanțier care este complementară fie locusului 5', fie locusului 3'.

Conform cu o altă metodă, Metoda 48, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 45, în care metoda cuprinde un prim ARN ghid și un al doilea ARN ghid, în care primul ARN ghid cuprinde o secvență distanțier care este complementară unui segment al situsului 5' și cel de-al doilea ARN ghid cuprind o secvență distanțier care este complementară unui segment al locusului 3'.

Conform cu o altă metodă, Metoda 49, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele de la 43 până la 48, în care unul sau doi ARNg-uri sunt unul sau doi ARN-uri ghid cu o singură moleculă (ARNsg).

Conform cu o altă metodă, Metoda 50, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă conform oricăreia dintre Metodele de la 43 până la 49, în care unul sau doi ARNg-uri sau unul sau doi ARNsg-uri sunt unul sau doi ARNg-uri modificați sau unul sau doi ARNsg-uri modificați.

Conform cu o altă metodă, Metoda 51, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 50, în care ARNsg-ul monocatenar modificat cuprinde trei resturi de 2'-O-metil-fosforotioat la sau în vecinătatea fiecăreia dintre extremitățile sale 5' și 3'.

Conform cu o altă metodă, Metoda 52, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 51, în care ARNsg-ul monocatenar modificat este secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959.

Conform cu o altă metodă, Metoda 53, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele de la 43 până la 52, în care una sau mai multe endonucleaze Cas9 sunt pre-complexate cu unul sau doi ARNg-uri sau unul sau doi ARNsg-uri pentru a forma una sau mai multe ribonucleoproteine (RNP-uri).

Conform cu o altă metodă, Metoda 54, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 53, în care una sau mai multe endonucleaze Cas9 sunt flancate la N-terminal, la C-terminal sau la ambele extremități N-terminal și C-terminal prin unul sau de mai multe semnale de localizare nucleară (NLS-uri).

Conform cu o altă metodă, Metoda 55, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 54, în care una sau mai multe endonucleaze Cas9 sunt flancate de două NLS-uri, un NLS situat la N-terminal și cel de-al doilea NLS situat la C-terminal.

Conform cu o altă metodă, Metoda 56, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele 54 și 55, în care unul sau mai multe NLS-uri este NLS SV40.

Conform cu o altă metodă, Metoda 57, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 53, în care raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza Cas9 din RNP este 1:1.

Conform cu o altă metodă, Metoda 58, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 53, în care un ARNsg cuprinde secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959, endonucleaza Cas9 este o Cas9 din specia *S. pyogenes* care cuprinde N-terminal NLS SV40 și C-terminal NLS SV40, în care raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza Cas9 este 1:1.

Conform cu o altă metodă, Metoda 59, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă conform oricăreia dintre Metodele de la 43 până la 58, în care matrița donor este fie monocatenară, fie dublu-catenară.

Conform cu o altă metodă, Metoda 60, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele de la 42 până la 59, în care secvența de control transcripțional modificată este localizată în cel de-al doilea intron al genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 61, așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele de la 42 până la 59, în care secvența de control transcripțional modificată este localizată într-un situs hipersensibil la ADN 58+ (DHS) al genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 62, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele de la 42 până la 61, în care inserția este o reparare direcționată pe omologie (HDR).

Conform cu o altă metodă, Metoda 63, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele 8, 14, 21, 24, 43 și 45, în care SSB, DSB sau locusul 5' și locusul 3' sunt situate în cel de-al doilea intron al genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 64, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele 8, 14, 21, 24, 43 și 45, în care SSB, DSB sau DSB 5' și DSB 3' sunt situate într-un situs de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) al genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 65, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă conform oricăreia dintre Metodele 1, 8, 14, 21 sau 24, în care metoda cuprinde, în plus, introducerea în celulă a unui sau a mai multor acizi ribonucleici ghid (ARNg), și în care una sau mai multe endonucleaze ADN sunt una sau mai multe endonucleaze Cas9 sau Cpf1 care determină sau creează o pereche de ruperi monocatenare (SSB-uri) sau ruperi dublu-catenare (DSB-uri), o primă SSB sau o primă DSB la un locus 5' și cea de-a doua SSB sau cea de-a doua DSB la un locus 3', în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A, care provoacă o deleția ADN-ului cromozomial între locusul 5' și locusul 3' care are drept rezultat o

deleție permanentă, o modulare permanentă sau o inactivare permanentă a secvenței de control transcripțional al ADN-ului cromozomial între locusul 5' și locusul 3'.

Conform cu o altă metodă, Metoda 66, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 65, în care un ARNg-ul creează o pereche de SSB-uri sau de DSB-uri.

5 Conform cu o altă metodă, Metoda 67, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 65, în care un ARNg-ul cuprinde o secvență distanțier care este complementară fie locusului 5', fie locusului 3'.

10 Conform cu o altă metodă, Metoda 68, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 65, în care metoda cuprinde un prim ARN ghid și un al doilea ARN ghid, în care primul ARN ghid cuprinde o secvență distanțier care este complementară unui segment al locusului 5' și cel de-al doilea ARN ghid cuprinde o secvență distanțier care este complementară unui segment al locusului 3'.

15 Conform cu o altă metodă, Metoda 69, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metodele de la 65 până la 68, în care unul sau mai mulți ARNg-uri sunt unul sau mai mulți ARN-uri ghid cu o singură moleculă (ARNsg).

Conform cu o altă metodă, Metoda 70, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metodele de la 65 până la 69 în care unul sau mai mulți ARNg-uri sau unul sau mai mulți ARNsg-uri -uri sunt unul sau mai mulți ARNg-uri modificați sau unul sau mai mulți ARNsg-uri -uri modificați.

20 Conform cu o altă metodă, Metoda 71, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 70, în care ARNsg-ul monocatenar modificat cuprinde trei resturi de 2'-O-metil-fosforotioat la sau în vecinătatea fiecăreia dintre extremitățile sale 5' și 3'.

25 Conform cu o altă metodă, Metoda 72, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 71, în care ARNsg-ul monocatenar modificat este secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959.

Conform cu o altă metodă, Metoda 73, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele de la 65 până la 72, în care una sau mai multe endonucleaze Cas9 sunt pre-complexate cu unul sau mai multe ARNg-uri sau cu unul sau mai mulți ARNsg-uri pentru a forma una sau mai multe ribonucleoproteine (RNP-uri).

30 Conform cu o altă metodă, Metoda 74, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 73, în care una sau mai multe endonucleaze Cas9 sunt flancate la N-terminal, la C-terminal sau la ambele extremități N-terminal și C-terminal prin unul sau de mai multe semnale de localizare nucleară (NLS-uri).

35 Conform cu o altă metodă, Metoda 75, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 74, în care una sau mai multe endonucleaze Cas9 sunt flancate de două NLS-uri, un NLS situat la N-terminal și cel de-al doilea NLS situat la C-terminal.

Conform cu o altă metodă, Metoda 76, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele 74 și 75, în care unul sau mai multe NLS-uri este un NLS SV40.

40 Conform cu o altă metodă, Metoda 77, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 73, în care raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza Cas9 din RNP este 1:1.

45 Conform cu o altă metodă, Metoda 78, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în Metoda 73, în care ARNsg-ul cuprinde secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959, endonucleaza Cas9 este o Cas9 din specia *S. pyogenes*, care cuprinde o extremitate N-terminal NLS SV40 și o extremitate C-terminal NLS SV40, în care raportul în greutate dintre ARNsg și endonucleaza Cas9 este 1:1.

50 Conform cu o altă metodă, Metoda 79, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele de la 65 până la 78, în care atât locusul 5' cât și locusul 3' sunt localizate în cel de-al doilea intron al genei BCL11A.

Conform cu o altă metodă, Metoda 80, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele de la 65 până la 78, în care atât locusul 5', cât și locusul 3' sunt localizate într-un situs hipersensibil al ADN 58+ (DHS) al genei BCL11A.

55 Conform cu o altă metodă, Metoda 81, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele 1, 8, 14, 21 sau de la 24 până la 80 în care ARNm, ARNg și matrița donor Cas9 sau Cpf1 sunt fie fiecare formulate separat sub formă de nanoparticule lipidice sau toate sunt co-formulate într-o nanoparticulă lipidică.

Conform cu o altă metodă, Metoda 82, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele 1, 8, 14, 21 sau de la 24 până la 80, în care ARNm Cas9 sau

ARNm Cpfl sunt formulate într-o nanoparticulă lipidică și atât ARNg-ul cât și matrița donor sunt livrate în celulă de către un vector de virus adeno-asociat (AAV).

Conform cu o altă metodă, Metoda 83, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă conform oricăreia dintre Metodele 1, 8, 14, 21 sau de la 24 până la 80, în care ARNm Cas9 sau ARNm Cpfl sunt formulate într-o nanoparticulă lipidică, iar ARNg-ul este livrat în celulă prin electroporare și matrița donor este livrată în celulă de către un vector de virus adeno-asociat (AAV).

Conform cu o altă metodă, Metoda 84, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele 1, 8, 14, 21 sau de la 24 până la 80, în care una sau mai multe RNP-uri sunt livrate celulei prin electroporare.

Conform cu o altă metodă, Metoda 85, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă conform oricăreia dintre Metodele de la 1 până la 84, în care gena BCL11A este localizată pe Cromozomul 2: 60.451.167 - 60.553.567 (Genome Reference Consortium - GRCh38).

Conform cu o altă metodă, Metoda 86, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă așa cum este dezvoltată în oricare dintre Metodele de la 1 până la 85, în care hemoglobinopatia este selectată dintr-un grup care constă din: anemia falciformă și talasemia (α , β , δ , γ și combinații ale acestora).

Conform cu o altă metodă, Metoda 87, din prezenta dezvoltare, furnizează o metodă conform oricăreia dintre Metodele de la 1 până la 86, în care editarea în interiorul sau în vecinătatea unei gene BCL11A sau a unei alte secvențe de ADN, care codifică pentru un element reglator al genei BCL11A, poate să reducă exprimarea genei BCL11A.

Conform cu o primă compoziție, Compoziția 1, din prezenta dezvoltare, furnizează unul sau mai mulți acizi ribonucleici de ghidare (ARNg-uri) pentru editarea unei gene BCL11A într-o celulă a unui pacient, care suferă de hemoglobinopatie, unul sau mai mulți ARNg-uri care cuprinde o secvență distanțier selectată dintr-un grup care constă din: secvențe de acid nucleic din SECV ID NR: de la 1 până la 71. 947 din Lista de Secvențe.

Conform cu o altă compoziție, Compoziția 2, din prezenta dezvoltare, furnizează unul sau mai mulți ARNg-uri din Compoziția 1, în care unul sau mai mulți ARNg-uri este unul sau mai mulți ARN-uri ghid cu o singură moleculă (ARNsg).

Conform cu o altă compoziție, Compoziția 3, din prezenta dezvoltare, furnizează unul sau mai mulți ARNg-uri sau unul sau mai mulți ARNsg-uri din Compozițiile 1 sau 2, în care unul sau mai mulți ARNg-uri sau unul sau mai mulți ARNsg-uri este unul sau mai mulți ARNg-uri modificați sau unul sau mai mulți ARNsg-uri modificați.

Conform cu o altă compoziție, Compoziția 4, din prezenta dezvoltare, furnizează unul sau mai mulți ARNsg-uri din Compoziția 3, în care unul sau mai mulți ARNsg-uri modificați cuprind trei resturi de 2'-O-metil-fosforotioat la sau în vecinătatea fiecăruia dintre extremitățile sale 5' și 3'.

Conform cu o altă compoziție, Compoziția 5, din prezenta dezvoltare, furnizează unul sau mai mulți ARNsg-uri din Compoziția 3, în care unul sau mai mulți ARNsg-uri modificați cuprind secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959.

Conform cu o altă compoziție, Compoziția 6, din prezenta dezvoltare, furnizează un ARN ghid cu o singură moleculă (ARNsg), care cuprinde secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959.

Definiții

Termenul "cuprinzând" sau "cuprinde" este utilizat cu referire la compoziții, la metode și la componentele respective ale acestora, care sunt esențiale pentru invenție, însă deschise includerii de elemente nespecificate, dacă sunt esențiale sau nu sunt.

Termenul „care constă în esență din” se referă la acele elemente necesare pentru un aspect dat. Termenul permite prezența unor elemente suplimentare care nu afectează, în mod material, caracteristicile de bază și cele noi sau funcționale ale aceluia aspect al invenției.

Termenul "care constă din" se referă la compozițiile, metodele și respectiv componentele acestora așa cum sunt descrise, conform cu prezenta dezvoltare, care exclude orice element care nu este menționat în acea descriere privind aspectul.

Formele de singular „un”, „o” și „forma articulată” includ și formele de plural, cu excepția cazului în care contextul precizează în mod clar altfel.

Orice interval numeric menționat în această specificație descrie toate sub-intervalele având aceeași precizie numerică (adică, având același număr de cifre specificate) subsumate în intervalul menționat. De exemplu, un interval citat de la „1,0 până la 10,0” descrie toate sub-intervalele între (și inclusiv) valoarea minimă recitată de 1,0 și valoarea maximă recitată de 10,0, cum ar fi, de exemplu, „de la 2,4 până la 7,6” chiar dacă intervalul „de la 2,4 până la 7,6” nu este menționat, în mod expres, în textul specificației. În consecință, solicitantul își rezervă dreptul de a modifica această specificație, inclusiv revendicările, pentru a cita, în mod expres, orice sub-domeniu având aceeași precizie numerică cuprinsă în intervalele menționate, în mod expres, în această specificație. Toate aceste intervale sunt descrise

inerent în această specificație, astfel încât modificarea pentru a menționa, în mod expres, orice astfel de sub-intervaluri va respecta descrierea scrisă, caracterul suficient al descrierii și cerințele conținutului adăugat, care includ cerințele conform 35 U.S.C. § 112 litera (a) și articolul 123 alineatul (2) CBE. De asemenea, cu excepția cazului în care se specifică, în mod expres, sau nu se solicită altfel în context, toți parametrii numerici descriși în această specificație (cum ar fi aceia care exprimă valori, intervale, cantități, procente și altele asemenea) pot să fie citați ca și cum ar fi prefațați de cuvântul „aproximativ”, chiar dacă cuvântul „aproximativ” nu apare în mod expres înaintea unui număr. În plus, parametrii numerici descriși în această specificație ar trebui să fie interpretați în lumina numărului de cifre semnificative raportate, preciziei numerice și prin aplicarea tehnicilor obișnuite de rotunjire. De asemenea, este evident faptul că parametrii numerici descriși în această specificație vor poseda în mod necesar caracteristica de variabilitate inerentă a tehnicilor de măsurare de bază utilizate pentru a determina valoarea numerică a parametrului.

Exemple

Prezenta invenție va fi înțeleasă mai pe deplin cu referire la următoarele exemple, care furnizează aspecte cu titlu ilustrativ, cu caracter nelimitativ, ale prezentei invenții.

Exemplele descriu utilizarea sistemului CRISPR, ca tehnică, cu titlu ilustrativ, de editare a genomului pentru generarea de deleții, inserții sau înlocuiri genomice definite, denumite conform cu prezenta dezvoltare „modificări genomice”, în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică pentru un element de reglare a Genei BCL11A care conduce la deleția permanentă, modularea permanentă sau inactivarea permanentă a unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A. Introducerea modificărilor terapeutice definite reprezintă o nouă strategie terapeutică pentru ameliorarea potențială a unei hemoglobinopatii, așa cum este descrisă și ilustrată în prezenta dezvoltare.

Exemplul 1 - Situri țintă CRISPR/SpCas9 pentru secvența de control transcripțional a genei BCL11A

Regiunile din secvența de control transcripțional de 12,4 kb a genei BCL11A s-au scanat în ceea ce privește situsurile țintă. Fiecare zonă s-a scanat pentru un motiv adiacent protodistanțier (PAM) având secvența NRG. S-au identificat secvențe distanțiere ARNg 20bp corespunzătoare PAM, așa cum se prezintă în SECV ID NR: de la 1 până la 29.482 din Lista de Secvențe.

Exemplul 2 - Situri țintă CRISPR/SaCas9 pentru secvența de control transcripțional a genei BCL11A

Regiunile din secvența de control transcripțional de 12,4 kb a genei BCL11A s-au scanat pentru situsurile țintă. Fiecare zonă s-a scanat pentru un motiv adiacent protodistanțier (PAM) având secvența NNGRRT. S-au identificat secvențe distanțiere ARNg 20 bp corespunzătoare PAM, așa cum se prezintă în SECV ID NR: 29.483 - 32.387 din Lista de Secvențe.

Exemplul 3 - Situri țintă CRISPR/StCas9 pentru secvența de control transcripțional a genei BCL11A

Regiunile din secvența de control transcripțional de 12,4 kb a genei BCL11A s-au scanat pentru situsurile țintă. Fiecare zonă s-a scanat pentru un motiv adiacent protodistanțier (PAM) având secvența NNAGAAW. S-au identificat secvențe distanțiere ARNg 20bp corespunzătoare PAM, așa cum se prezintă în SECV ID NR: 32.388 - 33.420 din Lista de Secvențe.

Exemplul 4 - Situri țintă CRISPR/TdCas9 pentru secvența de control transcripțional a genei BCL11A

Regiunile din secvența de control transcripțional de 12,4 kb a genei BCL11A s-au scanat pentru situsurile țintă. Fiecare zonă s-a scanat pentru un motiv adiacent protodistanțier (PAM) având secvența NAAAAC. S-au identificat secvențe distanțiere ARNg 20 bp corespunzătoare PAM, așa cum se prezintă în SECV ID NR: 33.421 - 33.851 din Lista de secvențe.

Exemplul 5 - Situri țintă CRISPR/NmCas9 pentru secvența de control transcripțional a genei BCL11A

Regiunile din secvența de control transcripțional de 12,4 kb a genei BCL11A s-au scanat pentru situsurile țintă. Fiecare zonă s-a scanat pentru un motiv adiacent protodistanțier (PAM) având secvența NNNNGHTT. S-au identificat secvențe distanțiere ARNg 20 bp corespunzătoare PAM, așa cum se prezintă în SECV ID NR: 33.852 - 36.731 din Lista de Secvențe.

Exemplul 6 - Situri țintă CRISPR/Cpf1 pentru secvența de control transcripțional a genei BCL11A

Regiunile din secvența de control transcripțional de 12,4 kb a genei BCL11A s-au scanat pentru situsurile țintă. Fiecare zonă s-a scanat pentru un motiv adiacent protodistanțier (PAM) având secvența YTN. S-au identificat secvențe distanțiere ARNg 22 bp corespunzătoare PAM, așa cum se prezintă în SECV ID NR: 36.732 - 71.947 din Lista de Secvențe.

Exemplul 7 - Analiza bioinformatică a catenelor ghid

Ghidurile candidate vor fi selectate și ecranate conform cu un proces în mai multe etape care implică atât legare teoretică, cât și activitate evaluată experimental. Cu titlu de ilustrare, ghidurile candidate care au secvențe care se potrivesc cu un anumit situs-țintă, cum ar fi un situs din secvența de control transcripțional a genei BCL11A, cu PAM adiacent, pot să fie evaluate din punct de vedere al potențialului lor de clivare a situsurilor în afara țintei, care au secvențe similare, folosind unul sau mai multe dintre o varietate de instrumente bioinformatic disponibile pentru evaluarea legării în afara țintei, așa cum este descris și ilustrat mai detaliat în cele ce urmează, în scopul evaluării probabilității efectelor la pozițiile cromozomiale, altele decât acelea preconizate. Candidații despre care s-a preconizat faptul că posedă un potențial relativ mai scăzut de activitate în afara-țintei pot să fie apoi evaluați experimental pentru măsurarea activității lor pe-țintă și apoi a activității lor în afara țintei pe diferite situsuri. Ghidurile preferate au activitate pe-țintă suficient de mare pentru atingerea nivelurilor dorite de editare-genică pe locusul selectat și o activitate în afara-țintei relativ mai redusă pentru reducerea probabilității modificărilor la alți loci cromozomiali. Raportul dintre activitățile pe-țintă și activitățile în afara-țintei este adesea denumit „specificitatea” unui ghid.

În cazul screening-ului inițial al activităților în afara-țintei preconizate, există o serie de instrumente bioinformatic cunoscute și disponibile public, care pot să fie utilizate pentru a preconiza situsurile în-afara țintei cele mai probabile; și deoarece legarea la situsurile țintă din sistemul nucleazei CRISPR/Cas9/Cpf1 este determinată de împerecherea bazelor Watson-Crick între secvențele complementare, gradul disimilarității (și, prin urmare, potențialul redus de legare în afara-țintei) este dependent, în esență, de diferențele secvenței primare: incompatibilități și bucle (bulges), adică baze care sunt modificate într-o bază non-complementară și inserții sau deleții de baze în situsul în-afara țintei potențial în raport cu situsul țintit. Un instrument bioinformatic, cu titlu de exemplu, denumit COSMID (CRISPR Off-target Sites with Mismatches, Insertions and Deletions (disponibil pe web la adresa: crispr.bme.gatech.edu) compilează astfel de similarități. Alte instrumente bioinformatic includ, dar nu sunt limitate la, GUIDO, autoCOSMID și CCTop.

Bioinformatica a fost folosită pentru a minimiza clivarea în afara-țintei pentru a reduce efectele dăunătoare ale mutațiilor și rearanjamentelor cromozomiale. Studiile asupra sistemelor CRISPR/Cas9 au sugerat posibilitatea unei activități în afara-țintei ridicate din cauza hibridizării nespecifice a catenei ghid la secvențele de ADN cu incompatibilități și/sau bucle de perechi de baze, în special, în pozițiile distale în raport cu regiunea PAM. Prin urmare, este important să existe un instrument de bioinformatică care să poată identifica potențialele situsuri în afara-țintei, care posedă inserții și/sau deleții între catena ghid a ARN-ului și secvențele genomice, în plus, față de incompatibilitățile perechilor de baze. Instrumentul bazat pe bioinformatică, COSMID (CRISPR Off-target Sites with Mismatches, Insertions and Deletions) a fost, prin urmare, utilizat pentru a căuta genomii pentru situsurile potențiale CRISPR în afara-țintei (disponibil pe web la adresa crispr.bme.gatech.edu). Rezultatul (output-ul) COSMID a clasificat listele potențialelor situsuri în afara-țintei pe baza numărului și a locației incompatibilităților, permițând alegerea mai informată a situsurilor țintă și evitând utilizarea situsurilor cu clivare în afara-țintei mai probabilă.

S-au utilizat pipeline-uri bioinformatic suplimentare pentru ponderarea activității estimată pe și/sau în afara țintei a situsurilor de țintire a ARNg-ului dintr-o regiune. Alte caracteristici care pot să fie utilizate pentru a preconiza activitatea includ informații despre tipul de celulă în discuție, accesibilitatea ADN-ului, starea cromatinei, situsurile de legare a factorilor de transcripție, datele privind legarea factorului de transcripție precum și alte date CHIP-seq. S-au evaluat factori suplimentari pentru preconizarea eficienței editării, cum ar fi pozițiile relative și direcțiile perechilor de ARNg, caracteristicile secvenței locale și microomologiile.

Exemplul 8 - Testarea ghidurilor preferate în celule din punct de vedere al activității-țintă

ARNg -urile preconizate că posedă cea mai scăzută activitate în afara-țintei vor fi apoi testate din punct de vedere al activității pe-țintă în celulele K562 și vor fi evaluate din punct de vedere al frecvenței inserției/deleției (indel) folosind TIDE.

TIDE este un instrument web destinat pentru evaluarea rapidă a editării genomului de către CRISPR-Cas9 a unui locus țintă determinat de un ARN ghid (ARNg sau ARNsg). Pe baza datelor cantitative a urmelor secvenței provenite din două reacții de secvențiere capilară standard, software-ul TIDE cuantifică eficacitatea editării și identifică tipurile predominante de inserții și deleții (indels) în ADN-ul unui pool de celule țintite. A se vedea Brinkman și colaboratorii, Nucl.Acids Res. (2014) pentru o explicație detaliată precum și pentru exemple. O metodă alternativă este Secvențierea de generație următoare (NGS), cunoscută și sub denumirea de secvențiere cu randament înalt, care este termenul general folosit pentru a descrie o serie de tehnologii de secvențiere moderne diferite, care includ: secvențierea Illumina (Solexa), secvențierea Roche 454, secvențierea Ion torrent: secvențierea Proton/PGM și secvențierea SOLiD. Aceste tehnologii recente permit secvențierea ADN-ului și ARN-

ului mult mai rapid și mai ieftin decât secvențierea Sanger folosită anterior și, ca atare, au revoluționat studiul genomicii și al biologiei moleculare.

Transfecția celulelor culturii de țesut, permite screening-ul diferitelor constructe și un mijloc robust de testare în ceea ce privește activitatea și specificitatea. Liniile celulare de cultură de țesut, cum ar fi K562 sau HEK293T sunt ușor transfectate și au drept rezultat o activitate înaltă. Acestea sau alte linii celulare vor fi evaluate pentru determinarea liniilor celulare care se potrivesc cu CD34+ și care furnizează cel mai bun surrogat. Aceste celule vor fi, apoi, utilizate pentru efectuarea mai multor teste în stadiu incipient. De exemplu, ARNg-urile individuale pentru Cas9 din specia *S. pyogenes* pot să fie transfectate în celule folosind plasmide, cum ar fi, de exemplu, CTx-1, CTx-2 sau CTx-3 descrise în Figura 1A - 1C, care sunt adecvate pentru exprimare în celulele umane. În mod alternativ, de asemenea, vectorii disponibili comercial pot să fie utilizați. Pentru evaluarea Frecvenței Inserție/Deleție a ARNg-urilor BCL11A descrise, conform cu prezenta dezvăluire, s-a folosit o plasmidă de exprimare Cas9 disponibilă comercial (GeneArt, Thermo Fisher). Câteva zile mai târziu (48 de ore în cazul acestui experiment), ADN-ul genomic s-a recoltat și situsul țintă s-a amplificat prin PCR. Activitatea de tăiere s-a măsurat prin rata de inserții, de deleții și de mutații introduse prin repararea NHEJ a extremităților libere ale ADN-ului. Deși această metodă nu poate să diferențieze în mod corect secvențele reparate de ADN-ului neclivat, nivelul de tăiere poate să fie măsurat în funcție de cantitatea de reparații greșite. Activitatea în afara-țintei poate să fie observată prin amplificarea situsurilor în-afara țintei putative identificate și folosind metode similare pentru a detecta clivarea. Translocarea poate să fie, de asemenea, testată folosind primeri care flanchează situsurile de tăiere, pentru a determina dacă au avut loc tăieturi și translocații specifice. Au fost dezvoltate teste non-ghid care permit testarea complementară a clivării în-afara țintei, care includ ghid-seq. ARNg-ul sau perechile de ARNg cu activitate semnificativă pot să fie, apoi, urmărite în celulele cultivate pentru a măsura modularea sau inactivarea situsului de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) în cadrul secvenței de control transcripțional a genei BCL11A. Evenimentele în-afara țintei pot să fie urmărite din nou. În mod similar, celulele CD34+ pot să fie transfectate și nivelul de modulare sau de inactivare al situsului de hipersensibilitate la ADN 58+ (DHS) în cadrul secvenței de control transcripțional a genei BCL11A și al posibilelor evenimente în-afara țintei măsurate. Aceste experimente permit optimizarea nucleazei și a donorului și a livrării.

Exemplul 9 - Testarea ghidurilor preferate în celule din punct de vedere al activității în afara-țintei

ARNg-urile care posedă cea mai bună activitate pe-țintă din studiile de secvențiere de generație următoare și ale TIDE din exemplul menționat mai sus vor fi, apoi, testate din punct de vedere al activității în-afara țintei folosind secvențierea întregului genom. ARNg-urile candidate vor fi evaluate mai complet în celulele CD34+ sau în iPSC-uri.

Exemplul 10 - Testarea combinațiilor preferate de ARNg în celule

ARNg-urile care au cea mai bună activitate pe-țintă din studiile de secvențiere de generație următoare și ale TIDE și cea mai scăzută activitate în afara-țintei vor fi testate în combinații pentru evaluarea dimensiunii deleției, care rezultă din utilizarea fiecărei combinații de ARNg. Potențialele combinații de ARNg vor fi evaluate în celule CD34+ umane primare.

De exemplu, combinațiile de ARNg vor fi testate din punct de vedere al eficienței deleției întregii sau a unei părți din secvența de control transcripțional a genei BCL11A. Combinațiile de ARNg vor fi, de asemenea, testate din punct de vedere al eficienței deleției întregului sau a unei părți din situsul de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) al genei BCL11A.

Exemplul 11 - Testarea diferitelor abordări pentru editarea genelor HDR

După testarea ARNg-urilor atât în ceea ce privește activitatea pe-țintă, cât și activitatea în afara-țintei, strategiile de modulare/inactivare și inserare (knock-in) vor fi testate în ceea ce privește editarea genelor prin HDR.

Pentru abordarea modularii/inactivării, va fi furnizată matrița ADN-ului donor ca oligonucleotidă monocatenară scurtă, ca oligonucleotidă dublu-catenară scurtă (secvență PAM intactă/secvență PAM transformată), ca ADN monocatenar cu moleculă lungă (secvență PAM intactă/secvență PAM transformată) sau ca ADN dublu-catenar cu moleculă lungă (secvență PAM intactă/secvență PAM transformată). Matrița ADN-ului donor va cuprinde fie o genă BCL11A de tip sălbatic, fie un ADNc care cuprinde o secvență de control transcripțional modificată, fie o genă BCL11A de tip sălbatic sau un ADNc care cuprinde un situs hipersensibil ADN 58+ modificat (de exemplu, transformat) (DHS). În plus, matrița ADN-ului donor va fi furnizată de AAV.

Pentru abordarea knock-in a ADNc-ului, ADN-ul monocatenar sau dublu-catenar poate să includă mai mult de 40 nt din secvența de control transcripțional modificată a genei BCL11A. ADN-ul monocatenar sau dublu-catenar poate să includă mai mult de 80 nt din secvența de control transcripțional modificată a genei BCL11A. ADN-ul monocatenar sau dublu-catenar poate să includă mai mult de 100 nt din secvența de control transcripțional modificată a genei BCL11A. ADN-ul monocatenar sau dublu-

catenar poate să includă mai mult de 150 nt din secvența de control transcripțional modificată a genei BCL11A. ADN-ul monocatenar sau dublu-catenar poate să includă mai mult de 300 nt din secvența de control transcripțional modificată a genei BCL11A. ADN-ul monocatenar sau dublu-catenar poate să includă mai mult de 400 nt din secvența de control transcripțional modificată a genei BCL11A. În mod alternativ, matrița ADN-ului va fi furnizată de AAV.

Pentru abordarea knock-in a ADNc-ului, ADN-ul monocatenar sau dublu-catenar poate să includă mai mult de 40 nt din situsul de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) modificat al genei BCL11A. ADN-ul monocatenar sau dublu-catenar poate să includă mai mult de 80 nt din situsul de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) modificat al genei BCL11A. ADN-ul monocatenar sau dublu-catenar poate să includă mai mult de 100 nt din situsul de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) modificat al genei BCL11A. ADN-ul monocatenar sau dublu-catenar poate să includă mai mult de 150 nt din situsul de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) modificat al genei BCL11A. ADN-ul monocatenar sau dublu-catenar poate să includă mai mult de 300 nt din situsul de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) modificat al genei BCL11A. ADN-ul monocatenar sau dublu-catenar poate să includă mai mult de 400 nt din situsul de hipersensibilitate ADN 58+ (DHS) modificat al genei BCL11A. În mod alternativ, matrița ADN-ului va fi furnizată de AAV.

Exemplul 12 - Reevaluarea principalelor combinații CRISPR-Cas9/ADN donor

După testarea diferitelor strategii pentru editarea genelor prin HDR, principalele combinații CRISPR-Cas9/ADN donor vor fi reevaluate în celulele umane primare din punct de vedere al eficienței deleției în afara-țintei, a recombinării în afara-țintei și a specificității în afara-țintei. ARNm Cas9 sau RNP vor fi formulate sub formă de nanoparticule lipidice pentru livrare, ARNsg-urile vor fi formulate sub formă de nanoparticule sau livrate ca AAV, iar ADN-ul donor va fi formulat sub formă de nanoparticule sau livrat ca AAV.

Exemplul 13 - Testare *in vivo* pe un model animal relevant

După ce combinațiile CRISPR-Cas9/ADN donor au fost reevaluate, formulările lead vor fi testate *in vivo* pe un model animal.

Cultura în celule umane permite testarea directă pe ținta umană și pe genomul uman de bază, așa cum s-a descris mai sus.

Evaluările preclinice ale eficacității și siguranței pot să fie observate prin greșarea de celule CD34+ de șoarece sau umane modificate la șoareci NSG sau similari. Celulele modificate pot fi observate în lunile de după greșare.

Exemplul 14 - Editarea celulelor cu ARNg-uri diferite

Celulele CD34+ din sângele periferic uman mobilizate provenite de la 1-3 donori umani s-au cultivat în mediu StemSpan fără ser cu supliment de expandare CD34+, timp de două zile. Un număr de 100.000 de celule s-au spălat și s-au electroporat folosind ARNm Cas9 cu ARNg Corfu Large (CLO), ARNg Corfu Small (CSO), ARNg HPFH5, ARNg Kenya, ARNsg SD2 sau ARNsg SPY101. Celulele au fost lăsate să-și revină timp de două zile înainte de a fi trecute pe un mediu de diferențiere eritroid (IMDM+Glutamax suplimentat cu 5% ser uman, 10 ug/ml insulină, 20ng/ml SCF, 5ng/ml IL-3, 3U/ml EPO, 1 uM dexametazonă, 1 uM β -estradiol, 330 uM/ml holo-transferină și 2U/ml heraprină). Procentul de inserții/deleții („indels”) s-a determinat pentru fiecare dintre: celulele electroporate cu ARNg Corfu Large (CLO), celulele electroporate cu ARNg Corfu Small (CSO), celulele electroporate cu ARNg HPFH5, celulele electroporate cu ARNg Kenya, celulele electroporate cu ARNsg SD2 și celulele electroporate cu ARNsg SPY101 (Figura 3), așa cum este descris în secțiunile "Detectia mutației pe și în afara-țintei prin secvență" și "Teste de detectare a mutațiilor" descrise în prezenta dezvăluire. După diferențierea acestor celule timp de 12 zile în mediu de diferențiere eritroid, s-a colectat ARN-ul pentru evaluarea nivelurilor de hemoglobină prin PCR cantitativă în timp real (Figurile 4A-4C).

Progenitorii eritroizi simpli s-au generat folosind citometria în flux o zi mai târziu și s-au cultivat în mediul de diferențiere eritroid pentru a se expanda și pentru a crește sub formă de colonii. Fiecare colonie s-a divizat și s-a colectat la interval de 12 zile după sortare pentru analiza ADN-ului și ARN-ului. Coloniile surori s-au colectat la interval de 15 zile după sortare pentru analiza proteinelor de hemoglobină. Expimarea globinei (raportul $\gamma/18$ ARNs sau raportul γ/α) s-a determinat prin PCR cantitativă în timp real și s-a comparat pentru fiecare dintre coloniile eritroide editate (Figurile 5A-5B).

Exemplul 15 - Testarea ARNsg SPY101

Trei rezultate posibile de editare-genică pot să apară în intronul 2 al genei BCL11A, atunci când se utilizează ARNsg SPY101. Primul rezultat al editării genelor, care poate să apară atunci când se utilizează ARNsg SPY101 are drept rezultat numai în indel-uri în ambele alele (Indel/Indel, Figura 6). Cel de-al doilea rezultat al editării genei, care poate să apară atunci când se utilizează ARNsg SPY101 are drept rezultat o clonă atât cu secvențe indel cât și secvențe de tip sălbatic în cele două alele (Indel/WT,

Figura 6). Cel de-al treilea rezultat al editării genei care poate să apară atunci când se utilizează ARNsg SPY101 are drept rezultat o colonie cu secvențe de tip sălbatic în ambele alele (WT/WT, a Figura 6).

Atunci când se utilizează ARNsg SPY101, 92% dintre coloniile eritroide au fost editate. De exemplu, 92% dintre coloniile eritroide aveau alele cu indel-uri (Figura 6).

Exprimarea γ globinei (raportul ARNm γ/α globină sau raportul ARNm al globinei $\gamma/(\gamma+\beta)$) s-a măsurat în colonii eritroide individuale editate cu SPY101 (Figurile 7A-B). Coloniile eritroide simple au inclus colonii cu indel bialelic sau cu indel homozigot (indel/indel), colonii cu indel monoalelic sau cu indel heterozigot (indel/WT) și colonii cu secvențe de tip sălbatic în ambele alele (WT/WT). Coloniile eritroide care au indel-uri au avut capacitatea să exprime niveluri mai mari de γ -globină în comparație cu clonele cu secvențe de tip sălbatic în ambele alele (Figurile 7A-B).

Exemplul 16 - Strategie Terapeutică pentru Boala cu Celule Falciforme (SCD) și β -talasemie

Tabelul care urmează (Tabelul 4) furnizează informații legate de ARNg-urile utilizate în Exemplele 16-17.

Tabelul 4

ARNg	Denumire	Secvență	SECV ID NR.
ARNg A	CL01		71950
		UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCususus U3'	
ARNg B	CL08		71951
ARNg C	CS02		71952
ARNg D	CS06		71953
ARNg E	HPFH5-15	5'csusgsUCUUAUUACCCUGUCAUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCusususU 3'	71954
ARNg F	HPFH5-4	5'ascsusGAGUUCUAAAAUCAUCGGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCusususU 3'	71955
ARNg G	Kenya 02		71956
ARNg H	Kenya 17		71957
ARNg I	SD2		71958

ARNg	Denumire	Secvență	SECV ID NR.
		5'csususGUCAAGGCUAUUGGUCAGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCusus U3'	
ARNg J	SPY	5'csusasACAGUUGCUUUUAUCACGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCususU 3'	71959
a, g, u: resturi 2'-O-metil s: fosforotioat A, C, G, U: resturi de ARN			

Tabelul care urmează (Tabelul 5) furnizează informații referitoare la țintele la care se face referire în Exemplele 16-17.

Tabelul 5

Ținta 1	Corfu Large
Ținta 2	Corfu Small
Ținta 3	HPFH5
Ținta 4	KENYA
Ținta 5	SD2
Ținta 6	SPY101

O strategie terapeutică pentru SCD și β -talasemie a folosit CRISPR/Cas9 pentru a regenera aceleași mutații genetice care apar, în mod natural, la pacienții cu HPFH. Celulele stem hematopoietice ale pacienților au fost izolate, aceste celule au fost tratate *ex vivo* cu CRISPR/Cas9 pentru a crea editări genetice HPFH, iar apoi celulele editate s-au reintrodus în organismul pacienților. Celulele stem modificate genetic au dat naștere la eritrocite care conțin niveluri suficiente de HBF pentru a reduce semnificativ severitatea simptomelor de boală. O serie de editări genetice au fost prioritizate pe baza gradului de reglare a HBF-ului observat în natură, a capacității de regenera editările acestora cu o eficiență înaltă folosind CRISPR/Cas9 și absența editării în afara-țintei.

Secvențele ARN-ului ghid candidat (ARNg) au fost selecționate computațional și apoi verificate din punct de vedere al eficacității editării pe-țintă în celulele CD34+. În Figura 8 sunt prezentate rezultatele unui astfel de ecran. ARNg-urile s-au identificat având o editare pe-țintă consecventă, înaltă (>70%) în cazul mai multor mostre de donori. Fiecare donator de celule CD34+ este reprezentat de un simbol unic (▲, ★, ●) și eficiența editării pe-țintă pentru fiecare donator s-a măsurat de două ori.

ARNg-urile candidate s-au testat în celulele CD34+ din punct de vedere la activității în afara-țintei prin examinarea a sute de situsuri identificate computațional ca fiind cele mai similare în secvență cu situs-ul pe-țintă preconizat și, astfel, au cel mai înalt potențial de activitate în afara-țintei. Figurile 9A-B prezintă: abordarea experimentală (Figura 9A) și rezultatele (Figura 9B) pentru fiecare dintre ARNg-urile testate în Figura 8. Majoritatea ARNg-urilor nu au afișat nicio activitate în afara-țintei detectabilă, chiar și la situs-urile preconizate. Numai ARNg C și ARNg G prezintă activitate în afara-țintei. Au fost utilizate mai multe sonde pentru fiecare situs preconizat pentru a crește sensibilitatea testului.

ARNg-urile candidate au fost utilizate pentru a recrea HPFH-ul specific sau alte modificări ale celulelor eritroide obținute de la pacienți care suferă de SCD și β -talasemie, precum și de la donori

sănătoși. După diferențierea eritroidei, nivelurile transcriptului globinei s-au măsurat pentru evaluarea creșterii γ -globinei în raport cu α - sau β -globină. În Figurile 10A-B, s-au observat niveluri mai mari de 30% de ARNm de γ -globină în celulele pacientului editate cu ARNg pentru a recrea ținta HPFH 5 și 6. Eșantioanele pacienților care suferă de SCD și β -talasemie au prezentat o creștere absolută mai mare a γ -globinei decât eșantioanele provenite de la donori sănătoși, în concordanță cu observarea HbF-ului mai mare la pacienți decât la purtătorii de heterozigot cu HPFH. Nivelul de bază al celulelor tratate fals de la fiecare donor a fost scăzut din valorile prezentate. Datele reprezintă un singur experiment, cu excepția datelor pacientului cu SCD care reprezintă media a 3 eșantioane diferite de donori. Eficiența editării a fost similară pentru toate experimentele.

Pentru a se asigura faptul că eficiența editării în cazul populației CD34+ în vrac (bulk) a fost reprezentativă pentru acelea din HSC-uri cu repopulare pe termen lung (LT-HSC), celulele CD34+ în vrac s-au sortat în sub-populații specifice și s-au testat din punct de vedere al eficienței editării pe-țintă, așa cum se prezintă în Figurile 11A-C. S-a observat o eficiență de editare înaltă în cazul populației LT-HSC. Experimentele s-au efectuat folosind proteinele SPY101 și Cas9 provenite de la 4 donori. Barele reprezintă media $\pm$ SEM. LT-HSC, Long-term Hematopoietic Stem Cell; MPP, multipotent progenitor; MLP, multilimbic progenitor; CMP, common myeloid progenitor; MEP, Megakaryocyte Erythrocyte Progenitor; GMP, granulocyte macrophage progenitor.

Studiile de grefare *in vivo* s-au efectuat pe șoareci imunocompromiși pentru a confirma că HSPC-urile editate genetic păstrează potențialul de repopulare pe termen lung a sistemului hematopoietic. Celulele CD34+ umane provenite de la donori sănătoși nu au fost tratate, nu s-au editat sau nu s-au editat genic folosind ARNg SPY101 și s-au introdus în organismul șoarecilor NSG. După cum se prezintă în Figura 12, prezența unor niveluri similare de celule hCD45RA+ (la interval de 8 săptămâni după grefare) în cazul șoarecilor injectați cu HSPC-uri netratate/needitate și al șoarecilor injectați cu HSPC-uri editate cu gena SPY101, au confirmat faptul că celulele editate SPY101 au păstrat potențialul de grefare. Punctele datelor reprezintă animale individuale și prezintă procentul de celule vii care au fost CD45RA+ umane. Media (mean) $\pm$ SD. Termenul „netratat” reprezintă HSPC-uri care nu s-au electroporat și s-au injectat la șoareci imunocompromiși. Termenul „needitat” reprezintă HSPC-uri care au fost electroporate, dar nu s-au modificat genetic și s-au injectat la șoareci imunocompromiși. „SPY101” reprezintă HSPC-uri care au fost electroporate cu ARNg Cas9 și SPY101 și injectate la șoareci imunocompromiși.

Dezvoltarea procesului s-a inițiat pe o instalație capabilă - GMP, în pregătirea pentru studii clinice. După cum este ilustrat în Figura 13, nu a fost observată nicio pierdere semnificativă de eficacitate a editării genelor la scară clinică într-un proces compatibil GMP. Datele reprezintă media a 4 sau mai multe experimente, $\pm$ SD.

Studiile GLP/toxicologice s-au inițiat pentru candidații lead, așa cum se prezintă în Figura 14. Două studii separate pe șoareci NSG vor permite o caracterizare cuprinzătoare a biodistribuției și toxicologiei celulelor CD34+ editate.

Exemplul 17 - Strategie Terapeutică pentru Boala cu Celule Falciforme (SCD) și β -talasemie

Rezultatele de la regenerarea a șase variante diferite de HPFH sau de la editarea „țintelor” în celulele CD34+mPB+ umane sunt prezentate în Figurile 16A-B și Figura 17. Celulele CD34+ s-au tratat cu CRISPR/Cas9, s-au diferențiat în eritrocite și apoi s-au testat privind exprimarea ARNm-ului și a proteinei HbF în vrac (Figurile 16A-B) și în colonii (Figura 17), folosind un proces experimental demonstrat în Figura 15.

Rezultatele prezentate în Figurile 16A-B au provenit de la 3 donori diferiți pentru țintele 1 - 3 și de la 7 donori diferiți pentru țintele 4 - 6. Nivelul de bază pentru celulele tratate în fals a fost scăzut. Datele reprezintă valoarea medie (mean) $\pm$ SEM. Analiza în vrac (bulk) a confirmat reglarea ascendentă a HbF-ului și a permis prioritizarea țintelor care au demonstrat cele mai înalte niveluri ale HbF-ului.

Analiza clonală prezentată în Figura 17 a permis confirmarea faptului că editările genetice provocate de CRISPR/Cas9 au fost într-adevăr cauza creșterii HbF-ului la nivel de celulă individuală. Rezultatele au provenit de la un singur donor și de la 50-80 de colonii per țintă. Nivelurile transcriptului ARNm s-au măsurat prin qRT-PCR. Datele reprezintă valoarea medie (mean) $\pm$ SEM.

Țintele 5 și 6 au afișat cele mai ridicate niveluri de HbF și s-au analizat în continuare în Figurile 18A-B. Datele reprezintă valoarea medie $\pm$ SEM. WT desemnează colonii care nu prezintă evidența de editare a genelor, Heterozigot sau Het desemnează colonii cu o alelă editată, iar Homozygous sau Homo desemnează colonii cu ambele alele editate. Evidența din Figurile 16A-B, Figura 17 și Figurile 18A-B susține relația cauzală dintre modificările genetice produse și reglarea ascendentă dorită a HbF-ului, furnizând o validare suplimentară pentru strategia terapeutică propusă.

Exemplul 18 - Testarea ARN-urilor ghid preferate în celule pentru activitatea pe-țintă

Celulele CD34+ din sângele periferic uman (mPB) mobilizate de la patru donori independenți s-au cultivat în medii CellGro® fără ser, care includ 100 ng/ml factor de celule stem umane recombinante (SCF), 100 ng/ml Fit 3-Ligand uman recombinant (FLT3L) și 100 ng /ml Trombopoietină (TPO). Un număr de 200.000 de celule per donor s-au spălat și s-au electroporat folosind un electroporator Lonza fără niciun component de editare CRISPR/Cas9 (probă de electroporare falsă), cu proteină ARNg GFP și proteină Cas9 drept control negativ (GFP), cu proteină ARNg SPY101 și proteină Cas9 (SPY), cu proteină ARNg SD2 și proteină Cas9 (SD2) sau dual proteină BCL11A Exon 2 ARNg și proteină Cas9 (Ex2). Proteina Cas9 recombinantă codifică pentru Cas9 din specia *S. pyogenes* flancat de două secvențe de localizare nucleară SV40 (NLS-uri). Aceste experimente s-au efectuate folosind o ribonucleoproteină (RNP) raport în greutate între ARNg și Cas9 de 1:1. ARNg SPY101 generează o perturbare InDel a situsului de legare DHS 58+ Gata 1 în intronul 2 al locusului BCL11a. ARNg SD2 generează InDels și o deleție de 4,9 Kb în locusul beta al globinei umane. Deleția de 4,9 Kb este situată în amonte de HBG1 și include întreaga secvență HBG2. Deleția de 4,9 Kb începe 168 bp 5' la secvența de codificare HBG2 și se termină 168 bp 5' la secvența de codificare HBG1. ARNg-urile Exonului 2 generează o deleție de 196pb pe Exonul 2 al locusului BCL11A și au servit drept control pozitiv. Celulele CD34+mPB+ umane care nu au fost electroporate au servit drept control negativ (fără EP).

După electroporare, Celulele CD34+mPB+ editate-genic au fost lăsate să se recupereze timp de două zile înainte de a fi trecute la un mediu de diferențiere eritroid (IMDM+L-glutamină suplimentată cu 5% ser uman, 10 ug/mL insulină, 20 ug/mL SCF, 5 ng/mL IL-3, 3 U/mL EPO, 1 uM dexametazonă, 330 ug/ml holo-transferină și 2 U/mL heparină). Celulele CD34+mPB+ editate-genic s-au diferențiat în eritrocite și s-au testat în continuare prin analiză TIDE, analiză ddPCR, analiză PCR cantitativă în timp real, FACS și LC-MS (Figurile 20A-B, 21A-D, 22A-B și 23A -D). Procesul experimental general este demonstrat în Figura 19.

Analiza TIDE / analiza ddPCR

ADN-ul genomic s-a izolat și s-a testat pentru fiecare dintre probele celulare CD34+ mPB umane editate-genic dezvoltate în mediu de diferențiere. ADN-ul genomic s-a izolat din celule în zilele 1, a 11-a, a 13-a și a 15-a post-diferențiere. ADN-ul genomic s-a analizat prin analiza TIDE, care este un instrument web pentru evaluarea rapidă a editării genomice de către CRISPR-Cas9 a unui locus țintă determinat de un ARN ghid (ARNg sau ARNsg). Rezultatele prezentate în Figurile 20A-B au provenit de la 4 donori diferiți și au demonstrat faptul că procentul de editare-genică s-a menținut pe tot parcursul diferențierii eritroide *ex-vivo* a celulelor CD34+ mPB editate cu SD2 ARNg (Figura 20B) și a celulelor CD34+ mPB editate cu SPY101 ARNg (Figura 20A). Datele reprezintă valoarea medie (mean) +SD.

ADN-ul genomic a fost, de asemenea, analizat prin analiza ddPCR pentru a detecta frecvența deleției de 4,9 kb folosind tratamentul SD2. Rezultatele prezentate în Figura 20B au provenit de la 4 donori diferiți și au demonstrat faptul că procentul de editare-genică s-a menținut pe parcursul diferențierii eritroide *ex-vivo* a celulelor CD34+ mPB editate cu SD2 ARNg (Figura 20B). Datele reprezintă valoarea medie (mean) +SD.

Analiza PCR Cantitativă în Timp Real

ARNm-ul s-a izolat și s-a testat pentru fiecare dintre eșantioanele de celule CD34+ mPB umane editate-genic crescute în mediu de diferențiere. Izolarea ARNm-ului s-a efectuat în zilele a 11-a și a 15-a post-diferențiere. Exprimarea globinei (raportul γ/α și raportul $\gamma/(\gamma+\beta)$) s-a determinat prin analiza PCR cantitativă în timp real și s-a comparat pentru fiecare dintre celulele CD34+ mPB umane editate cu SD2 ARNg și celulele CD34+ mPB umane editate cu SPY101 ARNg (Figurile 21A-D). Rezultatele prezentate în Figurile 21A-D au provenit de la 4 donori diferiți și au demonstrat o creștere a transcriptului γ -globină în celulele CD34+ mPB umane editate cu SD2 ARNg și în celulele CD34+ mPB umane editate cu SPY101 ARNg în comparație cu controlul negativ. Datele reprezintă valoarea medie (mean) +SD.

FACS / LC-MS

Celulele CD34+ mPB umane editate cu ARNg SD2 și celulele CD34+ mPB umane editate cu ARNg SPY101 s-au cultivat în mediu de diferențiere timp de 15 zile. Celulele CD34+ mPB umane, de asemenea, s-au editat cu ARNg dual BCL11A Exon 2 (Ex2) sau ARNg GFP și s-au cultivat în mediu de diferențiere timp de 15 zile. Unele celule CD34+ mPB umane nu s-au editat cu nicio componentă de editare CRISPR/Cas9 (eșantion de electroporare fals) și unele celule CD34+ mPB umane nu s-au electroporat (fără EP). Celulele vii s-au colorat cu glicoforină A, un marker de maturare eritroidă. Apoi, celulele s-au fixat și s-au permeabilizat. Celulele fixate s-au colorat cu anticorp conjugat cu fluorofor pentru fiecare subunitate de globină. Apoi, celulele colorate s-au analizat prin FACS, un exemplu de γ -globină este reprezentat în Figura 22A. Intensitatea fluorescenței medie pentru γ -globină provenită de la 4 donori diferiți este descrisă în Figura 22B (media $\pm$ SEM) și a demonstrat o reglare ascendentă a γ -globinei în celulele CD34+ mPB umane editate cu SD2 ARNg și în celulele CD34+ mPB umane editate cu SPY101 ARNg.

Celulele CD34+ mPB umane editate cu SD2 ARNg și celulele CD34+ mPB editate cu SPY101 ARNg s-au cultivat în mediu de diferențiere timp de 15 zile. Celulele CD34+ mPB umane au fost, de asemenea, editate cu ARNg dual BCL11A Exon 2 (Ex2) sau ARNg GFP și s-au cultivat în mediu de diferențiere timp de 15 zile. Unele celule CD34+ mPB -umane nu au fost editate cu nicio componentă de editare CRISPR/Cas9 (probă de electroporare falsă) și unele celule CD34+ mPB umane nu au fost electroporate (fără EP). Analiza cromatografia lichidă - spectrometria de masă (LC-MS) s-a utilizat pentru a detecta monomerii globinei denaturați (Figurile 23A-D). Rezultatele prezentate în Figurile 23A-D au provenit de la 4 donori diferiți și au demonstrat, de asemenea, o reglare ascendentă a γ -globinei în celulele CD34+ mPB editate cu SD2 ARNg și în celulele CD34+ mPB editate cu SPY101 ARNg. Datele reprezintă valoarea medie +SD.

Exemplul 19 - Testarea ARN-urilor ghid preferate în celule din punct de vedere al activității în afara-țintei

În timp ce editarea pe-țintă a genomului este fundamentală pentru o terapie de succes, detectarea oricăror evenimente de editare în afara-țintei este o componentă importantă pentru asigurarea siguranței produsului. O metodă pentru detectarea modificărilor la situsurile în afara-țintei implică îmbogățirea regiunilor genomului care sunt cele mai similare cu situs-ul pe-țintă prin intermediul secvențierii capturii hibride și cuantificarea oricăror indels care sunt detectați.

Secvențierea capturii hibride este o metodă care cuantifică editările în afara-țintei în celulele editate CRISPR-Cas9 și ADN. Detaliile legate de metoda de secvențiere a capturii hibride sunt următoarele:

MATERIALE ȘI METODE

Materiale și surse

1.1.1. ADN genomic

Deoarece scopul acestei metode a fost acela de a determina dacă editarea prin CRISPR-Cas9 a avut loc în situsurile în afara-țintei din genom s-au utilizat, în mod obișnuit, cel puțin două eșantioane de intrare - eșantioane tratate și eșantioane de control (netratate, fals electroporate, etc.). Fiecare eșantion are ADN-ul genomic (ADNg) extras printr-o metodă adecvată și acel ADNg s-a hibridizat cu bibliotecile hibride de captură (1.1.2) după care a urmat restul de protocol așa cum este descris în cele ce urmează.

1.1.2. Biblioteci hibride de captură

Bibliotecile hibride de captură așa cum este descris în (1.2.2) s-au generat prin furnizarea unei liste de până la 57.000 de secvențe de momeală de oligonucleotide 120-mer, care apoi s-au sintetizat sub forma unui kit hibrid de captură SureSelect XT personalizat.

1.2 Metode

1.2.1. Algoritmi de detectare a situsurilor în afara-țintei

Pentru a determina situsurile care sunt cele mai probabile să aibă editare în afara-țintei, s-au folosit mai mulți algoritmi cu caracteristici diferite pentru a se asigura că un domeniu larg de situsuri în afara-țintei a fost acoperit.

1.1.1.1. CCTop

Pentru o anumită secvență de ghid, CCTop utilizează algoritmul de cartografiere a secvenței Bowtie 1 pentru a căuta genomul situsurilor în afara-țintei, cu până la 5 incompatibilități între situs și ghid. Inventatorii au denumit aceste situsuri „situsuri omologe în afara-țintei” (mai degrabă decât „situsuri preconizate în afara-țintei”), deoarece numai omologia de secvență s-a utilizat pentru a determina situsurile în afara-țintei potențiale din genom. Aceste 5 incompatibilități sunt limitate la un maxim de 2 incompatibilități în regiunea de alignment seed a 5 baze cea mai apropiată de extremitatea PAM a secvențelor. Algoritmul CRISPOR (1.2.1.2) nu are nicio limitare în regiunea de seed și, prin urmare, completează CCTop.

1.2.1.1. COSMID

Deoarece unele situsuri de clivare Cas9, care nu sunt țintite pot avea indeli scurți (denumiți și bulges) între ele și ghid, de asemenea se caută cu algoritmul COSMID, care poate să detecteze situsuri în afara-țintei cu indeli (în mod obișnuit limitat la până la 2 indeli) și, astfel, completează căutarea efectuată cu CCTop.

1.2.1.2. CRISPOR

CRISPOR este un instrument care implementează multe funcții de notare (scoring) a sistemului CRISPR pe și în afara-țintei, publicate în scopul de a compara diferitele metode. Acesta folosește algoritmul BWA pentru căutarea secvențelor ghid în raport cu genomul pentru a găsi situsurile lor în afara-țintei. Acesta diferă de algoritmul Bowtie 1 utilizat în CCTop și permite o căutare care este ușor mai permisivă, în sensul că incompatibilitățile din vecinătatea regiunii PAM nu sunt limitate la 2 din 5 baze ca în CCTop.

1.2.1.3. PAM-uri

În mod implicit, testele (screens) s-au efectuat cu o căutare de ghiduri cu PAM-uri cu NGG sau NAG deoarece acestea au cea mai mare activitate. Testele din etapele ulterioare pot să includă mai multe PAM-uri pentru a se asigura că nu există situsuri în afara-țintei, chiar și acelea cu activitate foarte scăzută.

1.2.1.4. Combinație de algoritmi

Ieșirile (output-urile) ghidurilor de la fiecare algoritm sunt unite pentru a elimina situsurile în afara-țintei identice și sunt introduse în componenta de design a momelii hibridă de captură.

1.2.2. Momeli hibride de captură

1.2.2.1 Design

Lista de situsuri produsă de algoritmi de detectare a situsului în afara-țintei (1.2.1.) este apoi utilizată pentru a genera sonde hibride de captură care se vor îmbogăți pentru fiecare dintre situsurile în afara-țintei din eşantioanele de ADN de intrare. Cu toate că o momeală poate să fie suficientă pentru a îmbogăți cu succes o secvență de ADN țintă, mai multe momeli sunt, în general, concepute și plasate pe întreg situsul țintă (Figura 24) pentru a crește probabilitatea ca o momeală să atragă, în mod specific, o regiune țintă, chiar dacă aceasta este flancată pe o parte de o secvență repetitivă, care poate să fie dificil de legat în mod specific. Momeli hibride (120-mers, porțiuni de culoare închisă) plasate de-a lungul unei momeli (20-mer, porțiune deschisă marcată cu *) (Figura 24).

1.2.3. Secvențierea

După îmbogățirea capturii hibride, secvențierea se face pe un secvențiator Illumina HiSeq cu citiri de 125 bp la extremitatea împerecheată și o dimensiune de inserție de 175 bp. Secvențierea se face, în mod obișnuit, pentru a ținti o adâncime de acoperire care să aibă 5 citiri detectate dintr-un eveniment de frecvență minimă. Pentru a detecta, de exemplu, evenimente indel de 0,5%, secvențierea la o acoperire de 1000x este efectuată astfel încât un eveniment de 0,5% să aibă 5 citiri.

1.2.4. Eficacitatea momelii

Într-un experiment tipic, s-a constatat faptul că momelile acoperă marea majoritate a situsurilor țintă cu niveluri ridicate ale acoperirii de secvențiere. Există unele limitări ale acoperirii de secvențiere care pot să fie atinse prin metodele de secvențiere de generație următoare (NGS) datorate: procentului (%) de GC mare sau scăzut, secvențelor cu complexitate scăzută, afinității reduse pentru momeală, nespecificității pentru momeală precum și din alte motive. Puterea reală de detectare a indelilor într-un experiment este estimată prin calcularea puterii de eşantionare a diferitelor acoperiri de secvențiere pentru situsuri cu frecvențe de indel reale diferite. În general, o acoperire îmbunătățită a secvenței furnizează o putere îmbunătățită pentru a detecta situsurile cu indeluri de frecvență redusă. De exemplu, dacă un situs are o acoperire de secvențiere de 2500x, captura hibridă va avea o putere de 99% pentru a detecta situsuri cu frecvență de 0,4% indeli și o putere de 94% pentru a detecta situsuri cu frecvență de 0,3% indel (Figura 25).

1.2.5. Cuantificare

Datele de secvențiere sunt aliniate cu algoritmul BWA folosind parametrii implicați pentru construcția genomului uman hg38. Pentru fiecare situs în afara țintei potențial, toți indeli aflați în 3 pb din situsul potențial de clivare Cas9 s-au numărat și s-au împărțit la acoperirea din situsul de tăiere și astfel s-a obținut o cantitate de indeli într-un anumit loc de tăiere.

1.2.6. Evaluarea statistică a situsurilor de tăiere semnificative

Diverse evenimente pot să conducă la indeli care nu reprezintă rezultatul detectării CRISPR-Cas9 la situsuri pe întregul genom: variante sau polimorfisme ale liniei germinale, regiuni susceptibile la ruperi genomice, regiuni cu acumulări de homopolimer și regiuni care altfel sunt dificil de secvențiat.

1.2.6.1. Situsuri excluse din analiză

S-a exclus din analiză: orice situs cu un indel „germinal” pe bază de donor-la -donor (donorul are frecvență de indel > 30% în fiecare eşantion), orice situsuri cu cromozomul Y din eşantioanele provenite de la femei și orice situsuri cu acoperire 0.

1.2.6.2. Test statistic

Pentru a evalua dacă un indel observat la un situs potențial în afara-țintei este cu adevărat un eveniment indus de CRISPR-Cas9, s-a testat dacă eşantioanele tratate cu Cas9 și cu ghid au o frecvență semnificativ mai mare de indeli decât eşantioanele netratate folosind atât testul Mann-Whitney Wilcoxon cât și testul t Student. Dacă oricare dintre aceste teste este semnificativ ($p < 0,05$), s-a considerat că situsul s-a marcat pentru urmărire cu PCR, pentru a determina dacă există o editare semnificativă. Pentru a se asigura că se semnalizează situsurile pentru o urmărire cât mai agresivă posibil, nu s-a efectuat corecția pentru testarea ipotezelor multiple, ceea ce ar diminua numărul de situsuri care ar putea să fie considerate semnificative.

De asemenea, s-a stabilit o analiză de control negativ, în care s-a repetat analiza, cu excepția faptului că s-au căutat situsuri cu o frecvență de indeli mai ridicată în eşantionul netratat decât în eşantionul tratat. Din punct de vedere biologic, nu există niciun motiv pentru care putem să preconizăm să

obținem „true hits” (rezultate reale) în această analiză, care ne furnizează informații empirice despre numărul de rezultate fals pozitive, pe care ne putem aștepta să le găsim în acest set de date care pot să fie atribuite zgomotului de fond (background noise). În plus, se poate extinde acest lucru într-o distribuție nulă empirică valorificând încă două eșantioane de control negativ, care includ celule electroporate fără Cas9 sau fără ghid, și celule electroporate cu Cas9 și cu ghid GFP. Prin testarea rezultatelor (hit-urilor) în eșantioane care sunt „mai puțin tratate” în comparație cu eșantioanele care sunt „mai tratate”, se determină o distribuție empirică conservatoare nulă a hit-urilor fals pozitive, care poate să fie utilizată pentru informare privind credibilitatea rezultatelor în analiza efectuată inițial pentru eșantioanele tratate vs. eșantioane netratate.

Celulele CD34+ mPB umane editate cu ARNg SD2 și celulele CD34+ mPB umane editate cu ARNg SPY101 s-au analizat printr-o metodă de secvențiere a capturii hibrid descrisă în prezenta dezvoltare. Rezultatele prezentate în Figurile 26-27 au provenit de la 3-4 donori diferiți și au demonstrat 0 situsuri în afara-țintei cu evidențe de tăiere în celulele CD34+mPB editate-genic, care au fost editate cu SD2 ARNg (Figura 27) și CD34+ mPB editate-genic cu celule editate cu ARNg SPY101 (Figura 26). Frecvența indel pentru runda 1 este mai mare de ($>$) 0,5%. Frecvența indel pentru runda 2 este mai mare decât ($>$) 0,2%.

Exemplul 20 - Experimente de grefare

Celulele CD34+ din sângele periferic uman (mPB) mobilizate s-au izolat de la donori sănătoși folosind microperele CD34 CliniMACS cu CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec) și s-au cultivat în medii CellGro® fără ser, care includ 100 ng/ml factor recombinant de celule stem umane (SCF), 100 ng/ml Fit 3-Ligand uman recombinant (FLT3L) și 100 ng/ml Trombopoietină (TPO). Apoi celulele s-au electroporat folosind un dispozitiv Maxcyte®, conform cu instrucțiunile producătorului, folosind unul dintre următoarele: un vector gol care nu conține componente de editare CRISPR/Cas9 (eșantion de electroporare fals), cu proteina GFP ARNg și proteina Cas9 drept control negativ (GFP), cu proteina ARNg SPY101 și proteină Cas9 (SPY101), sau cu proteina ARNg SD2 și proteină Cas9 (SD2). Proteina Cas9 recombinantă codifică pentru Cas9 din specia *S. pyogenes* flancată de două secvențe de localizare nucleară SV40 (NLS-uri). Aceste experimente s-au efectuat folosind ribonucleoproteină (RNP) raport de greutate între ARNg și Cas9 de 1:1.

Fiecare dintre celulele umane CD34+ mPB editate-genic s-au injectat prin vena codală a unui număr de 16 șoareci imunodeficienți („NSG” sau NOD scid gamma -NOD) pentru a demonstra capacitățile de acomodare (homing) și de grefare. NSG este o tulpină de șoareci de laborator încrucișată și printre acelea descrise până în prezent care are imunodeficiența cea mai mare; *a se vedea*, de exemplu, Shultz și colaboratorii, Nat. Rev. Immunol. 7(2): 1 18-130 (2007). Detaliile legate de experimentul de grefare sunt prezentate în Figura 28. La interval de 8 săptămâni după injectare, șoarecilor NSG li s-a recoltat sânge și sângele periferic s-a analizat prin FACS din punct de vedere al celulelor vii CD45RA+ umane și CD45+ de șoarece. La interval de 16 săptămâni după injectare, șoarecii NSG au fost sacrificați, iar măduva osoasă, splina și sângele periferic au fost analizate prin FACS din punct de vedere al celulelor vii CD45RA+ umane și CD45+ de șoarece. Grefarea celulelor umane CD34+ derivate din mPB-uri, provenite de la șoarecii NSG iradiați din toate grupurile de tratament, a fost observată pentru toți cei trei donori sănătoși. Celulele CD45RA+ umane s-au detectat folosind FACS în toate cele 3 organe hematopoietice de la toți donorii. Celulele de control CD34+ netransfectate au prezentat procente de grefare puțin mai bune. Toate grupurile de celule transfectate au avut procente de grefare similare, inclusiv grupul transfectat fals pentru toți cei 3 donori sănătoși. În general, adăugarea de Cas9-ARNg RNP nu afectează grefarea în comparație cu controlul de transfecție fals (Figurile 29A-E și Figura 30). Punctele datelor din Figurile 29A-E reprezintă șoareci individuali și ilustrează procentul de celule vii care au fost celule CD45RA+ umane. Datele reprezintă valoarea medie +SEM.

Exemplul 21 - Evaluarea eficienței și eficacității editării SPY101 folosind RNP Cas9

Pentru obținerea celei mai mari eficacități folosind CRISPR-Cas9 pentru tratamentul SCD-ului și a β -talasemiei folosind SPY101, s-au evaluat două formate Cas9 diferite, ARNm Cas9 sau proteina Cas9, pentru eficiența lor în editare, eficacitatea lor în editare și toxicitatea lor la editare în celulele CD34+ umane din sângele periferic mobilizat (mPB). S-au comparat diferite surse pentru ARNm Cas9 cu proteina Cas9 prin electroporarea ARNm Cas9 și ARNg SPY101 sau proteina Cas9 complexată cu ARNg SPY101 (sub formă de complex de ribonucleoproteină (RNP)) în celule CD34+ derivate din mPB-uri umane și s-a evaluat din punct de vedere al eficienței editării și al viabilității celulare la interval de 48 de ore după electroporare. S-au comparat diverse surse de ARNm Cas9 cu proteina Cas9 și s-a constatat faptul că, deși s-au putut atinge niveluri similare de eficiență de editare între unele ARNm Cas9 și proteina Cas9 (Figura 31), majoritatea au avut o viabilitate celulară semnificativ mai mică în comparație cu eșantioanele de control (fără electroporare (fără EP)) sau electroporare fără substrat (controale (EP

fals)) prezentate în Figurile 32A-B, aceasta indică faptul că RNP Cas9 este cel mai bun format de utilizat pentru livrarea eficientă a Cas9 și a ARNg în celulele CD34+ derivate din mPB umane.

Apoi s-au comparat diferite surse de proteină Cas9, precum și proteina Cas9 cu un număr diferit de semnale de localizare nucleară (NLS) fie la N-terminal, fie la C-terminal, deoarece acest lucru poate să afecteze localizarea eficientă a Cas9 în nucleu pentru a permite editarea. Conform cu Figurile 33A-C, s-a constatat faptul că proteina Cas9 Aldevron cu un semnal de localizare nucleară (NLS) atât la N-terminal, cât și la C-terminal a condus la cea mai bună eficiență de editare fără nicio modificare a viabilității celulare.

Apoi, s-a compilat eficiența de editare a SPY101 examinată pe diverși donori umani de celule CD34+ mPB folosind fie ARNm Cas9, fie proteina Cas9 (Feldan sau Aldevron selectate din exemplul anterior) și s-a observat faptul că proteina Cas9 Aldevron a condus la cea mai mare eficacitate de editare (Figura 34A). În plus, s-a reușit obținerea unei rate similare ale eficienței de editare în producția compatibilă cu GMP, la scară clinică, folosind proteina Cas9 (Figura 34B).

Apoi s-a examinat eficacitatea SPY101 pentru mai mulți donori de celule CD34+ derivate din mPB (Figurile 35A-B) sau din măduva osoasă (BM, Figurile 36A-B). S-a observat faptul că de-a lungul întregului proces de optimizare, s-a obținut o eficacitate mai bună, măsurată prin gradul de exprimare al γ -globinei în raport cu α -globina sau cu globinele de tipul β -globinei (β -globină + γ -globină), folosind tehnica PCR cantitativă în timp real în celulele CD34+ diferențiate eritroide.

Apoi, s-a investigat dacă SPY101 ar fi eficientă în celulele obținute de la pacienți care suferă de SCD sau de β -talasemie. Celulele mononucleare din sângele periferic de la pacienți donori sau de la pacienți sănătoși au fost electroporate cu RNP SPY101 Cas9 și eritroide diferențiate similar cu exemplele prezentate mai sus înainte de extragerea ARN-ului pentru a măsura exprimarea γ -globinei. S-a constatat faptul că SPY101 a fost într-adevăr eficientă pentru creșterea γ -globinei în eșantioanele pacienților (Figurile 37 A-B).

Pentru o înțelegere mai bună a relației genotip-fenotip în celulele eritroide editate SPY101, s-a efectuat o analiză a unei singure colonii similară cu aceea din Exemplul 15 cu RNP Cas9 și s-a constatat faptul că aceasta crește o fracțiune mai mare de colonii editate bi-alelice folosind RNP Cas9 în comparație cu ARNm Cas9 (Figurile 38A-B). În plus, defalcarea detaliată a coloniilor needitate, între tulburarea mono-alelică a situsului de legare GATA1 ținut de SPY101 și tulburarea bi-alelică a situsului de legare GATA1 au evidențiat eficacitatea dependentă de doză a SPY101, măsurată prin gradul de creștere a γ -globinei în comparație cu celulele tratate cu ARNg GFP (Figurile 39A-B).

Pentru a examina procentul de celule care exprimă γ -globina, s-a efectuat analiza FACS pentru celulele CD34+ din mPB uman editate RNP Cas9 SPY101. În comparație cu celulele tratate cu ARNg GFP, s-a observat un procent mai mare de celule diferențiate eritroide, care exprimă γ -globina (Figurile 40A-D), precum și o creștere în ceea ce privește exprimarea γ -globinei per celulă (Figura 40E) în celulele tratate cu SPY101.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- MATTHEW C. CANVER ET AL: "BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis", NATURE, vol. 527, no. 7577, 1 November 2015 (2015-11-01), pages 192-197, XP55274680, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature15521
- WO-A1-2015/183025
- CANVER MATTHEW C ET AL: "Customizing the genome as therapy for the beta-hemoglobinopathies", 6 April 2016 (2016-04-06), BLOOD, VOL. 127, NR. 21, PAGE(S) 2536-2545, XP002771817, ISSN: 0006-4971(print) page 2539, column 1, paragraph 3 - page 2539, column 2, paragraph 4; figure 1 page 2541, column 1, paragraph 3
- WO-A2-2015/168547
- BAUER DANIEL E ET AL: "Hemoglobin switching's surprise: the versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin", CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT, vol. 33, 14 September 2015 (2015-09-14), pages 62-70, XP029324656, 14.09.2015 ISSN: 0959-437X, DOI: 10.1016/J.GDE.2015.08.001
- US-A1- 2015 044 772
- US-A1- 2015 166 969
- STUART H. ORKIN: "Recent advances in globin research using genome-wide association studies and gene editing", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol.

- 1368, no. 1, 11 February 2016 (2016-02-11), pages 5-10, XP055274553, US ISSN: 0077-8923, DOI: 10.1111/nyas.13001
- LI HOJUN ET AL: "Genome Editing in Erythroid Progenitor Cells Mediated By Crispr/Cas9", BLOOD, vol. 124, no. 21, December 2014 (2014-12), XP002771899, & 56TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; SAN FRANCISCO, CA, USA; DECEMBER 06 -09, 2014
 - US-A1- 2015 307 867
 - DANIEL E BAUER: "Blood Journal | Fine-Mapping and Genome Editing Reveal An Essential Erythroid Enhancer At The HbF-Associated BCL11A Locus", BLOOD, vol. 122, no. 21, 15 November 2013 (2013-11-15), pages 437-437, XP055203587, ISSN: 0006-4971
 - US-A1- 2016 029 604
 - BAUER DANIEL E ET AL: "Crispr-Cas9 Saturating Mutagenesis Reveals an Achilles Heel in the BCL11A Erythroid Enhancer for Fetal Hemoglobin Induction (by Genome Editing)", BLOOD, vol. 126, no. 23, December 2015 (2015-12), XP002771900, & 57TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; ORLANDO, FL, USA; DECEMBER 05 -08, 2015
 - D. E. BAUER ET AL: "An Erythroid Enhancer of BCL11A Subject to Genetic Variation Determines Fetal Hemoglobin Level", SCIENCE, vol. 342, no. 6155, 11 October 2013 (2013-10-11), pages 253-257, XP055203754, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1242088
 - BLOBEL GERD A ET AL: "An international effort to cure a global health problem: A report on the 19th Hemoglobin Switching Conference", EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 43, no. 10, 1 October 2015 (2015-10-01), pages 821-837, XP029284406, ISSN: 0301-472X, DOI: 10.1016/J.EXPHEM.2015.06.008
 - LI HOJUN ET AL: "Efficient CRISPR-Cas9 mediated gene disruption in primary erythroid progenitor cells.", HAEMATOLOGICA JUN 2016, vol. 101, no. 6, 11 March 2016 (2016-03-11), pages e216-e219, XP002773432, ISSN: 1592-8721

(57) Revendicări:

1. Un ARN ghid cu o singură moleculă (ARNsg) care cuprinde secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959, în care ARNsg cuprinde trei resturi de 2'-O-metil-fosforotioat la fiecare dintre extremitățile sale 5' și 3'.
2. Un ARN ghid cu o singură moleculă (ARNsg) care cuprinde secvența de acid nucleic din SECV ID NR: 71.959, în care bazele 1-3 și 97-99 sunt nucleotide 2'-O-metil-fosforotioat modificate.
3. Un acid nucleic care cuprinde o secvență nucleotidică care codifică ARNsg-ul conform revendicării 1 sau revendicării 2.
4. Un vector care cuprinde acidul nucleic definit în revendicarea 3.
5. ARNsg-ul conform revendicării 1 sau revendicării 2, acidul nucleic conform revendicării 3 sau vectorul conform revendicării 4, pentru utilizare în tratamentul unui pacient care suferă de hemoglobinopatie.
6. ARNsg pentru utilizare conform revendicării 5, acid nucleic pentru utilizare conform revendicării 5 sau vector pentru utilizare din revendicarea 5, în care hemoglobinopatia este anemia falciformă și talasemia.
7. ARNsg pentru utilizare conform revendicării 5, acid nucleic pentru utilizare conform revendicării 5 sau vector pentru utilizare conform revendicării 5, în care hemoglobinopatia este o talasemie iar talasemia este selectată din grupul care constă din α , β , δ , γ , și combinațiile acestora, opțional în care talasemia este β -talasemia.
8. O metodă *ex vivo* de editare a genei limfomului 11A cu celulă-B (BCL11A) într-o celulă umană prin editarea genomului, metodă care cuprinde:

introducerea în celula umană a unei sau a mai multor endonucleaze ale acidului dezoxiribonucleic (ADN) sau un acid nucleic care cuprinde o secvență nucleotidică care codifică una sau mai multe endonucleaze ADN sau un vector care cuprinde numitul acid nucleic pentru a produce una sau mai multe ruperi-monocatenare (SSB-uri) sau dublu-catenare (DSS-uri) în interiorul sau în vecinătatea genei BCL11A sau a unei alte secvențe ADN care codifică un element reglator al genei BCL11A, are drept rezultat o deleție permanentă, o modulară permanentă sau o inactivare permanentă a unei secvențe de control transcripțional a genei BCL11A,

în care metoda cuprinde în plus introducerea în celula ARNsg-ului conform revendicării 1 sau revendicării 2, a unui acid nucleic care cuprinde o secvență nucleotidică care codifică secvența acidului nucleic a numitului ARNsg, sau un vector care cuprinde numitul acid nucleic, și în care una sau mai multe endonucleaze ADN cuprind o endonuclează Cas9.

9. Metodă conform revendicării 8, în care acidul nucleic care cuprinde secvența nucleotidică care codifică una sau mai multe endonucleaze ADN este unul sau mai mulți acizi ribonucleici (ARN-uri).

10. Metodă conform revendicării 8 sau revendicării 9, în care una sau mai multe endonucleaze ADN fiecare cuprinde, la atomul N-terminal, la atomul C-terminal sau la ambele N-terminal și C-terminal, unul sau mai multe semnale de localizare nucleară (NLS-uri), în mod opțional în care unul sau mai multe NLS-uri cuprinde NLS SV40.

11. Metodă conform revendicării 8 sau revendicării 10, în care una sau mai multe endonucleaze ADN este pre-complexată cu ARNsg pentru a forma una sau mai multe ribonucleoproteine (RNP-uri), în mod opțional în care una sau mai multe endonucleaze ADN sunt combinate cu ARNsg într-un raport, în greutate de 1:1 endonuclează ADN la ARNsg pentru a forma una sau mai multe RNP-uri.

12. Metodă conform revendicării 11, în care una sau mai multe RNP-uri sunt livrate celulei umane prin electroporare, în mod opțional în care una sau mai multe endonucleaze ADN sunt o Cas9 din specia *S. pyogenes* care cuprinde NLS SV40 la N-terminal și NLS SV40 la C-terminal.

13. Metodă conform oricăreia dintre revendicările de la 8 la 12, în care celula umană este o celulă progenitoare hematopoietică, în mod opțional în care celula progenitoare hematopoietică este o celulă CD34+.

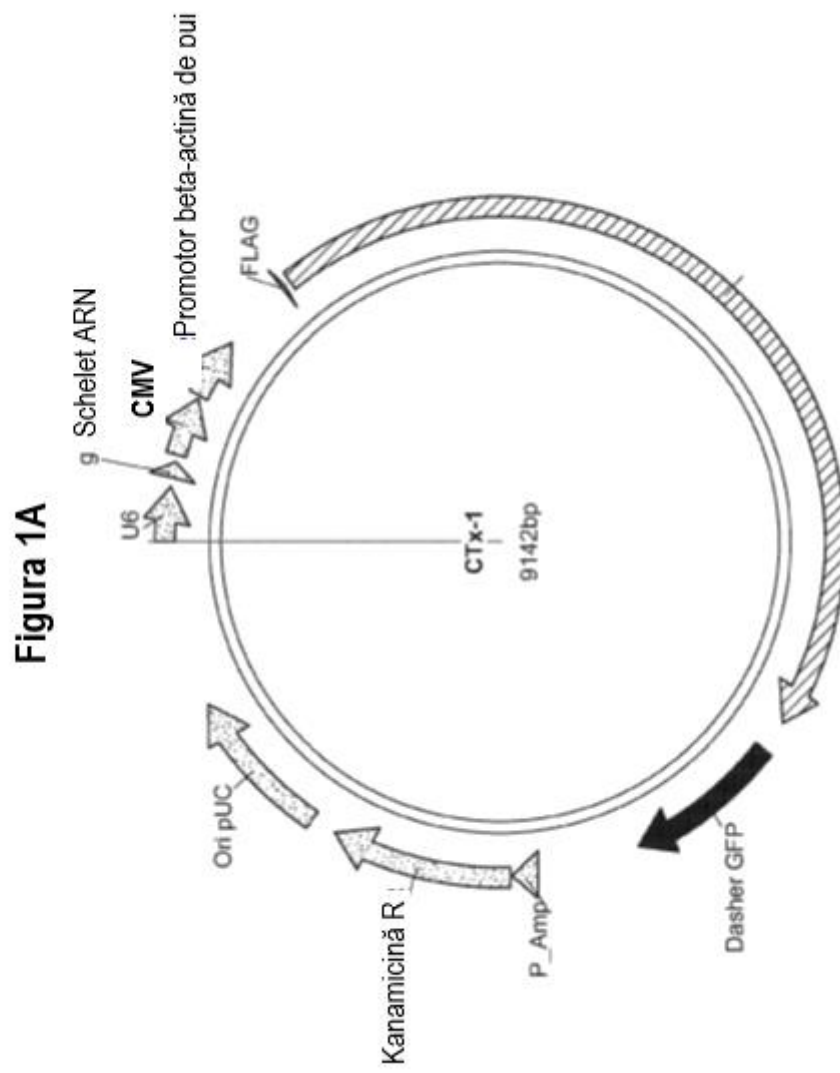


Figura 1B

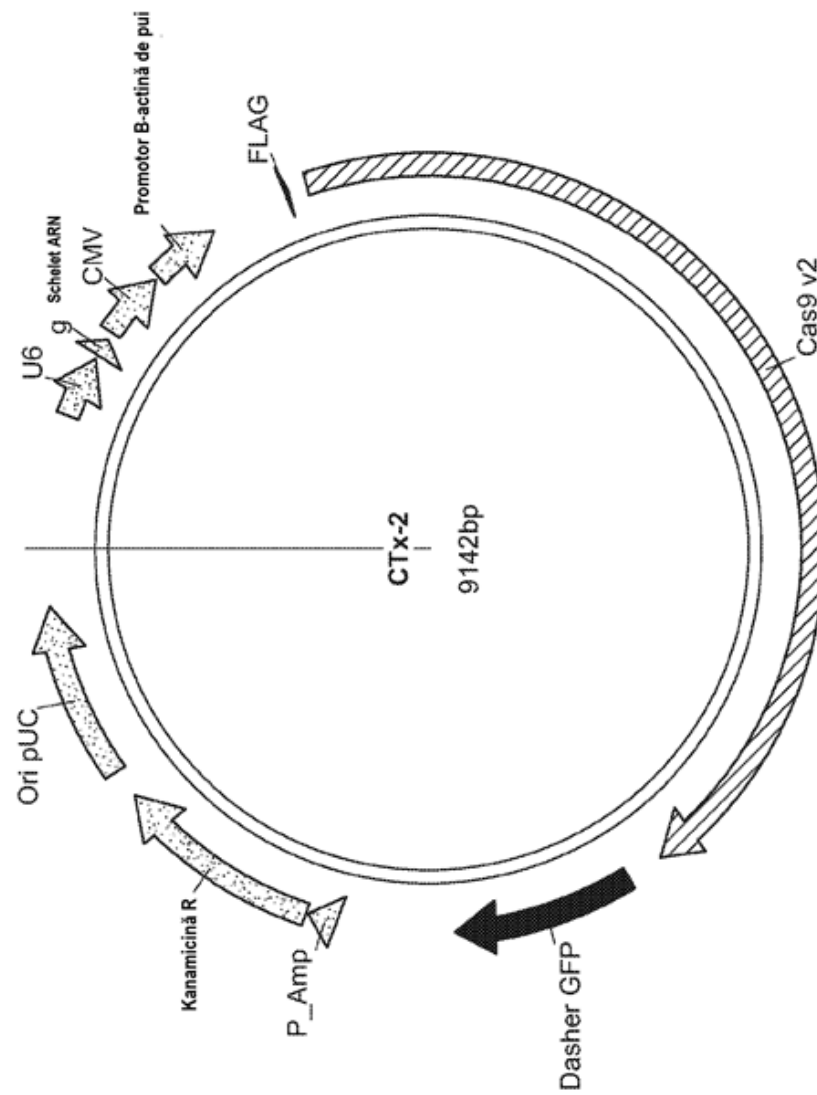


Figura 1C

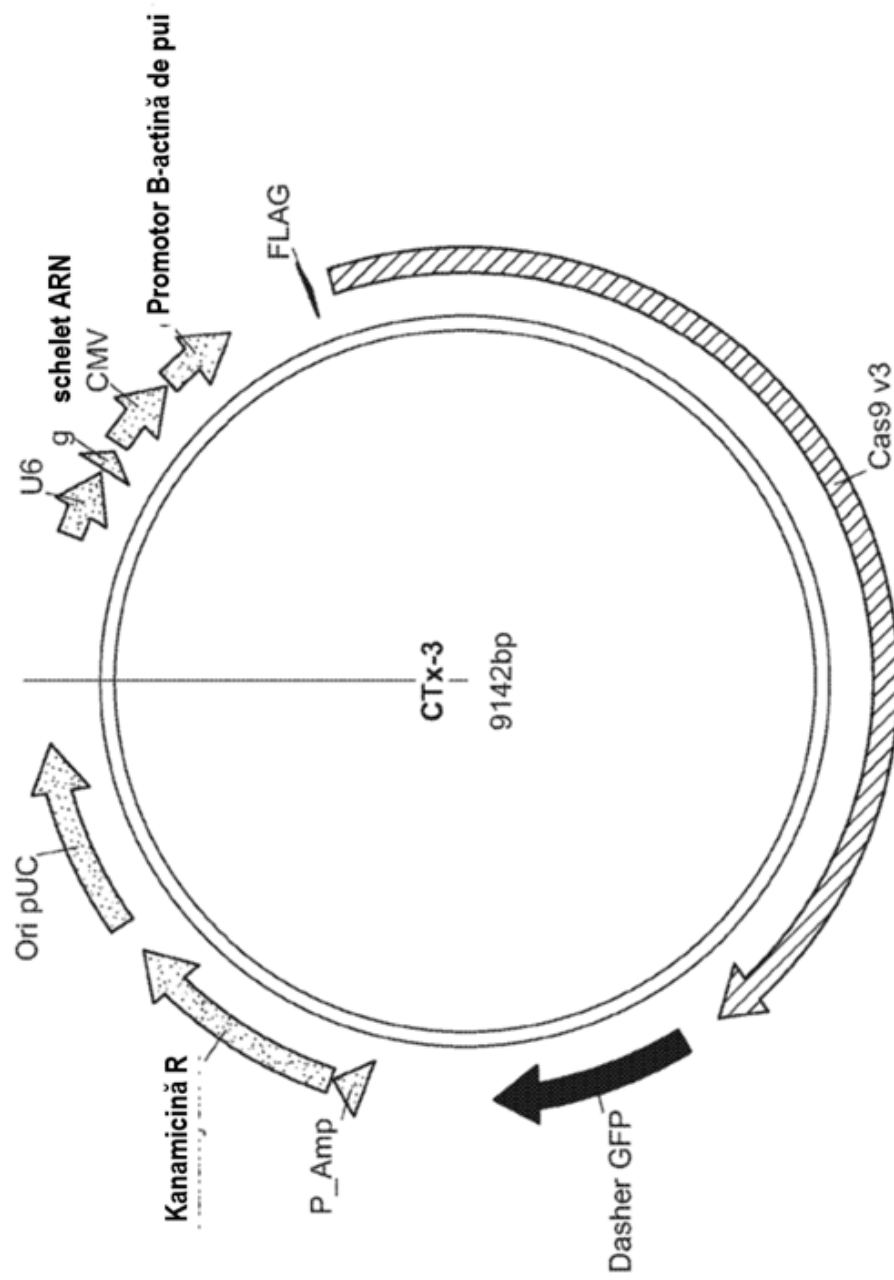


Figura 2A

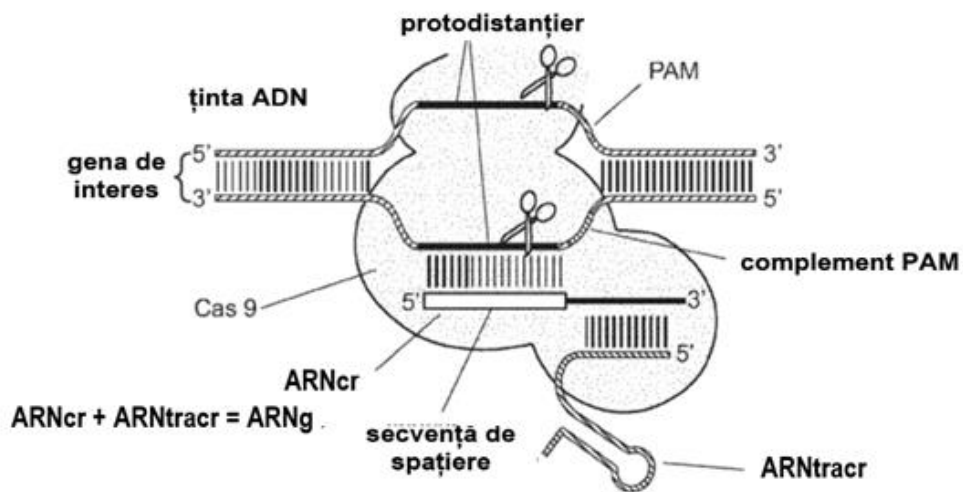


Figura 2B

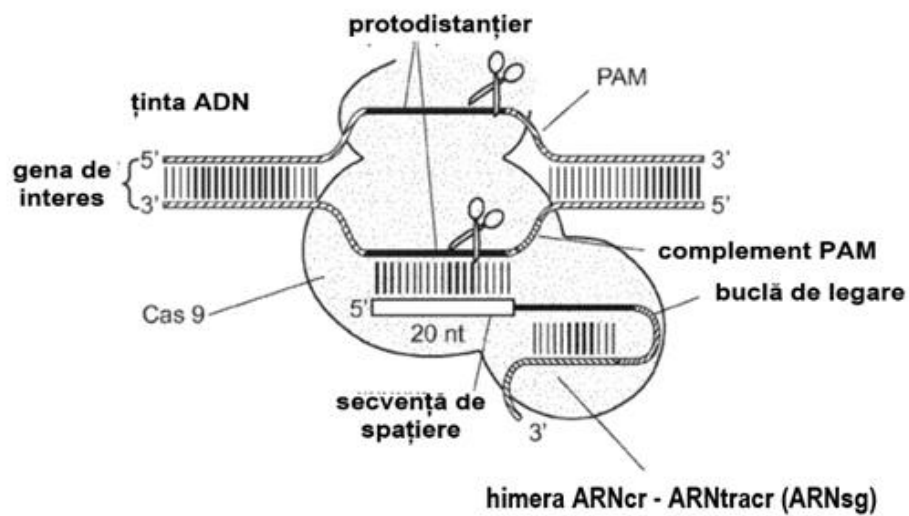


FIGURA 3

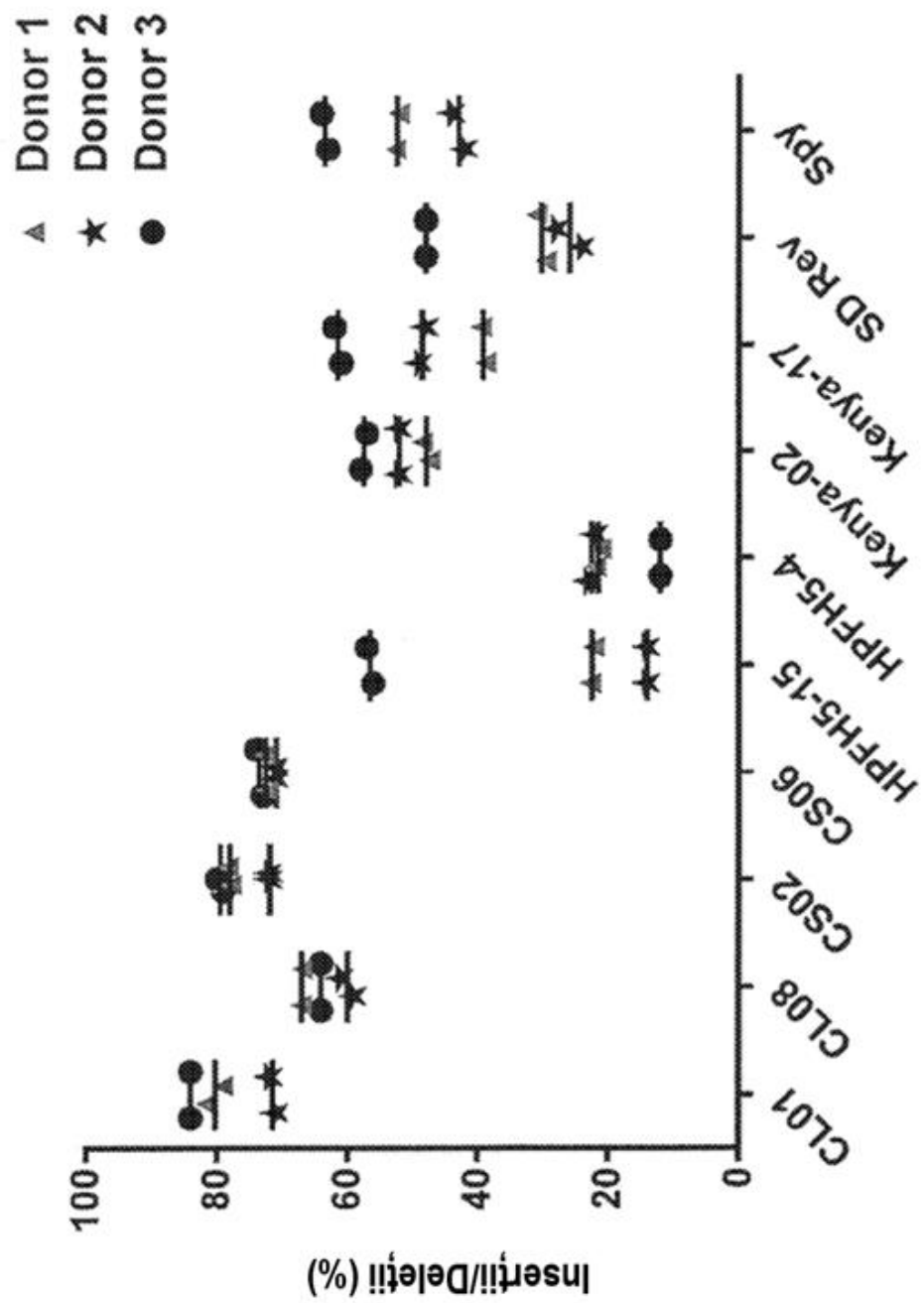


FIGURA 4A

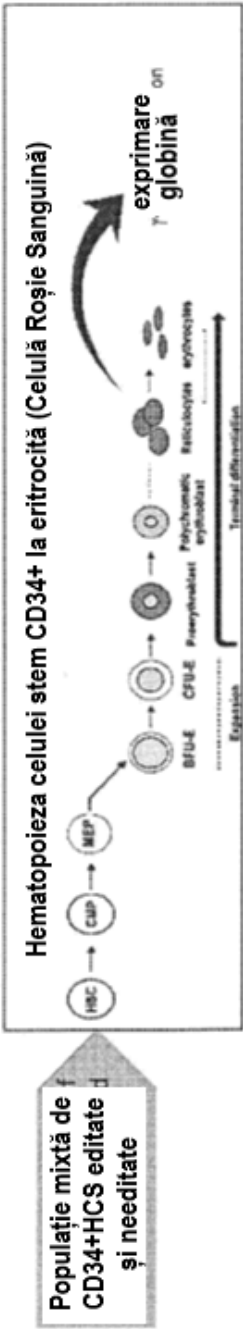


FIGURA 4B

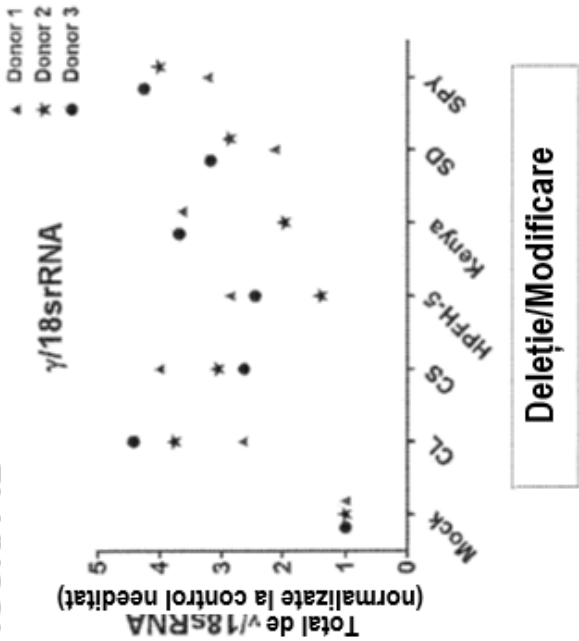
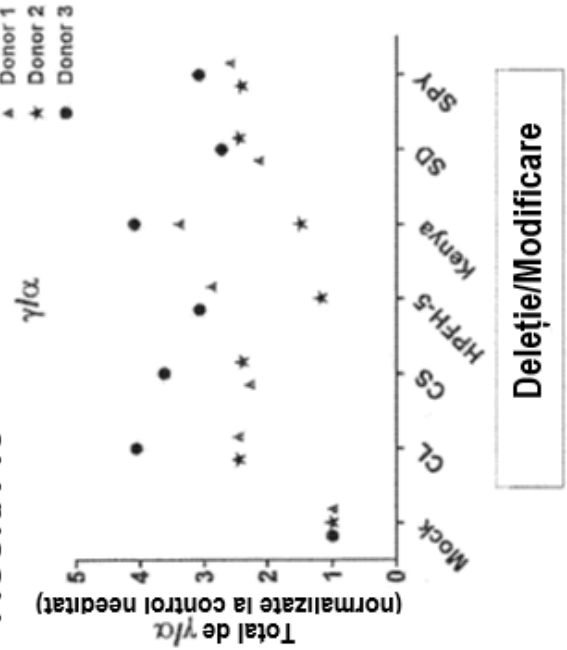
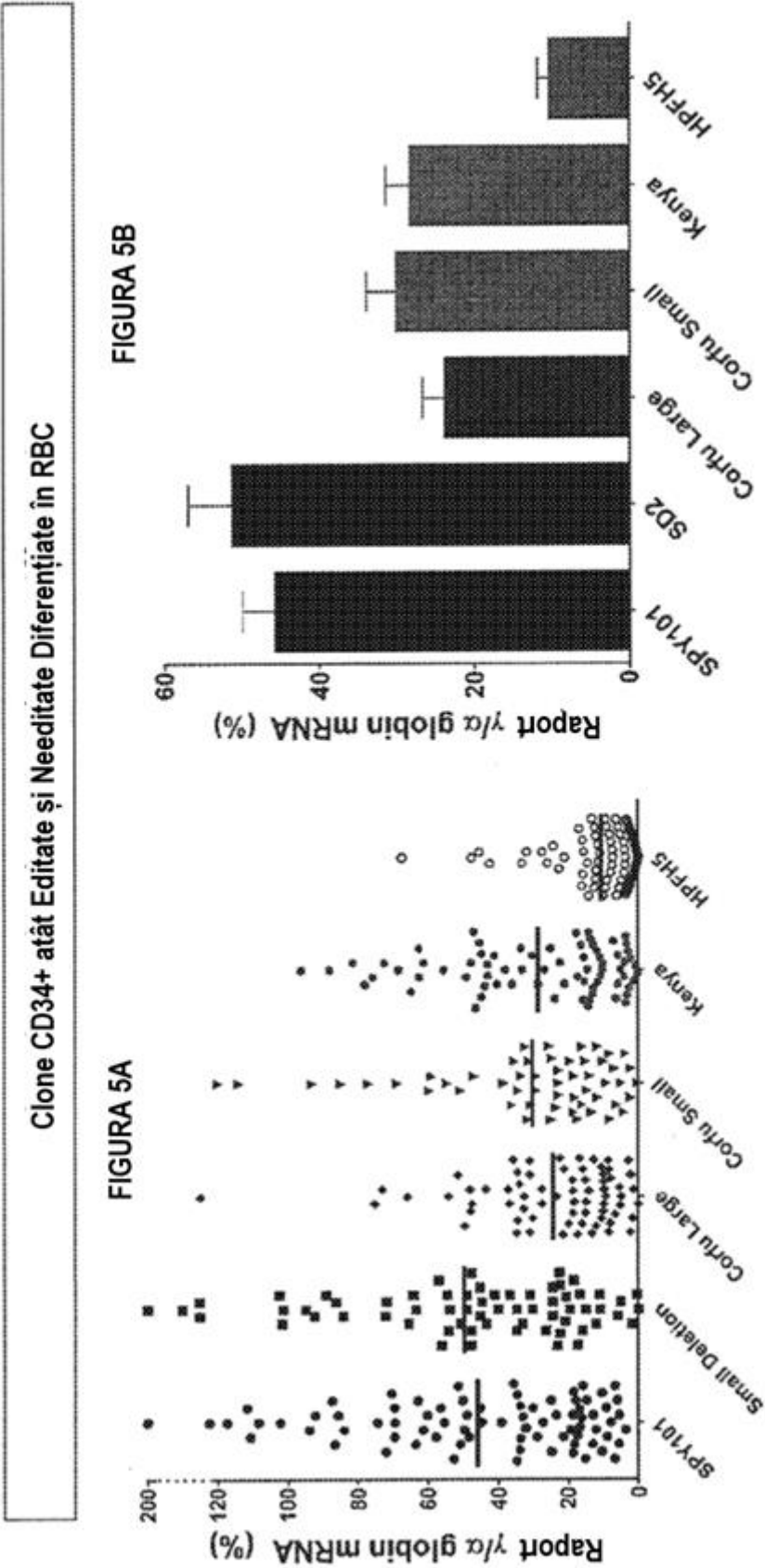
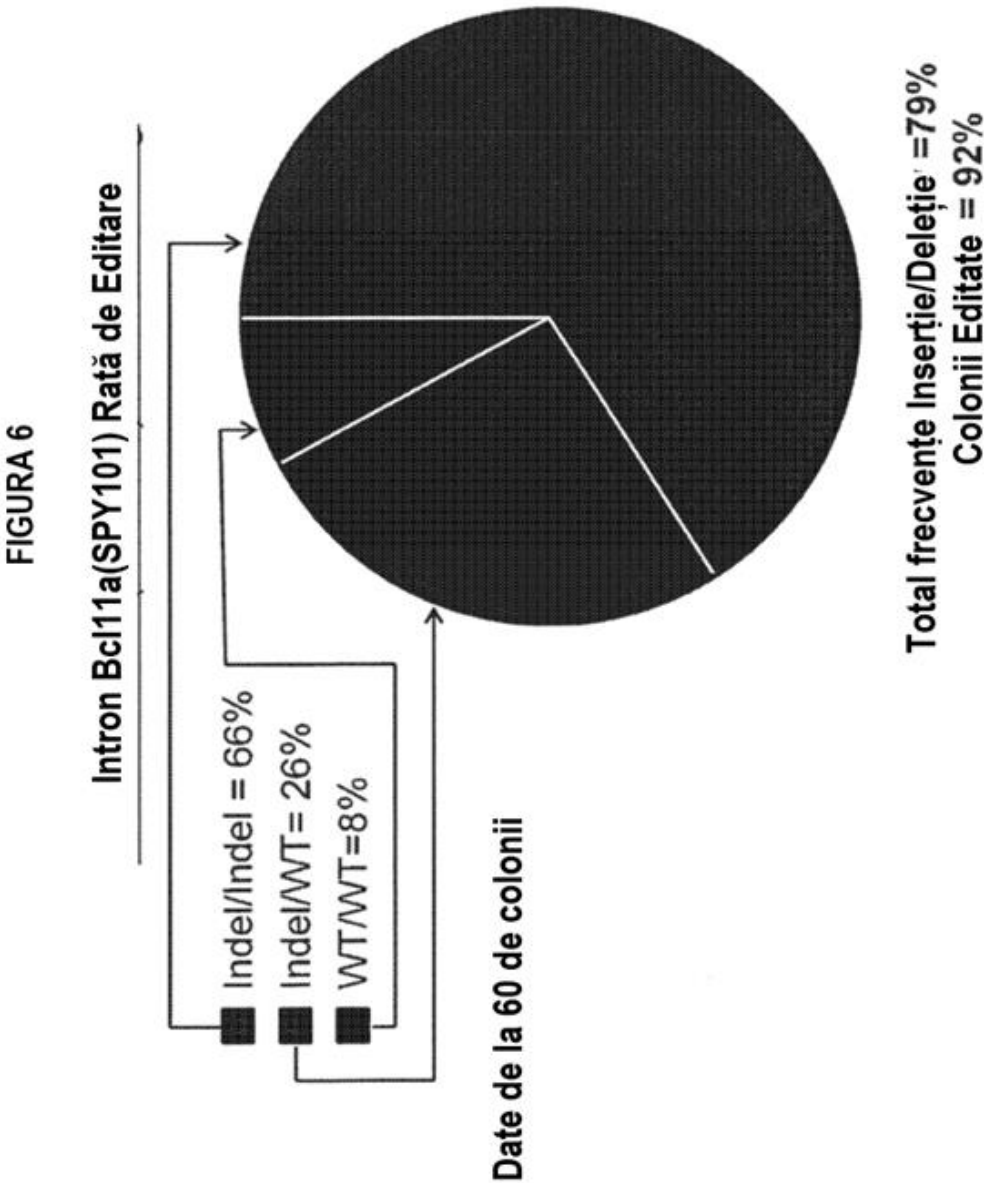


FIGURA 4C







Editare Intron Bcl11a (SPY101)

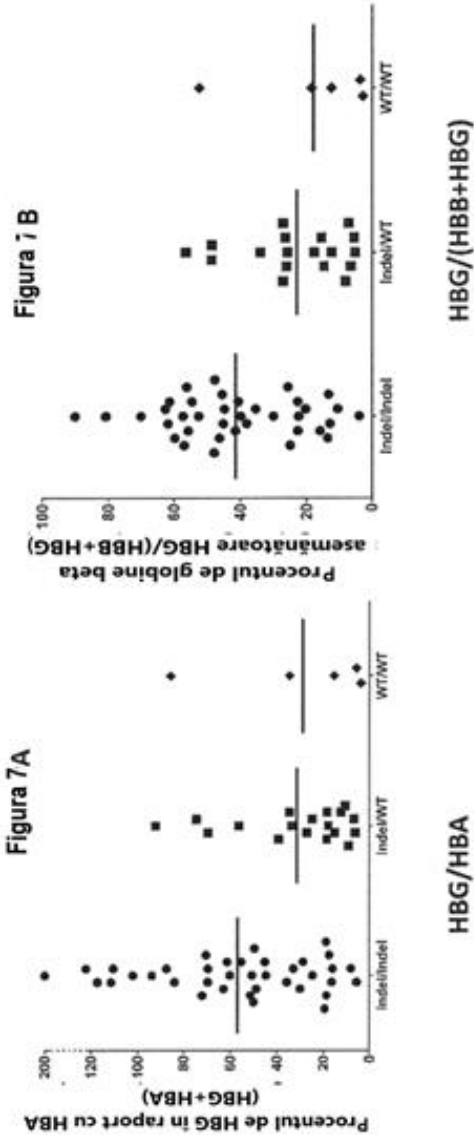


Figura 8

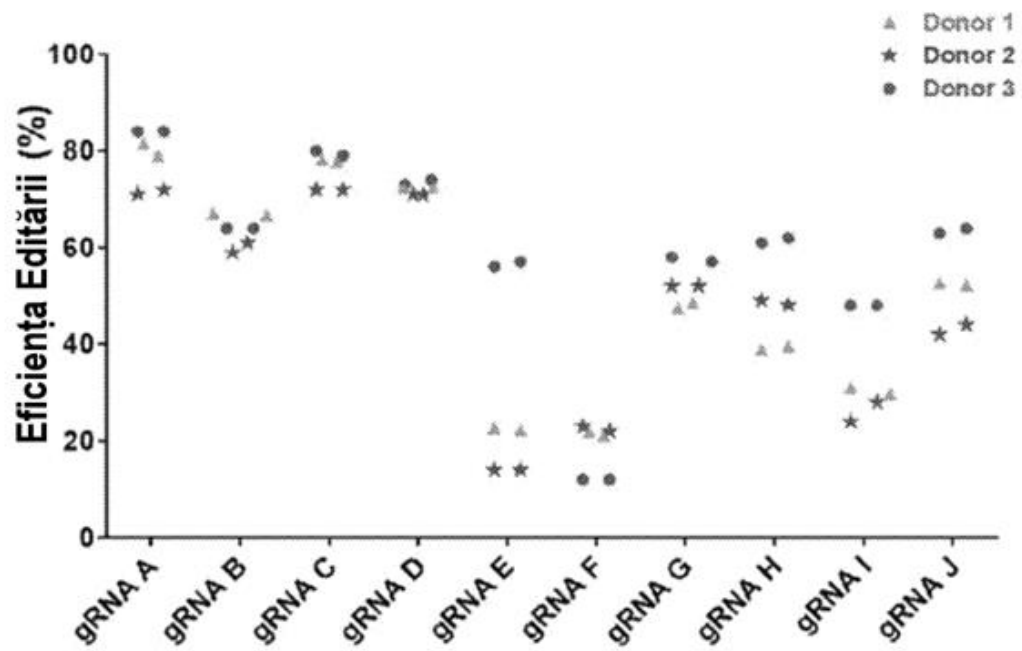


Figura 9A

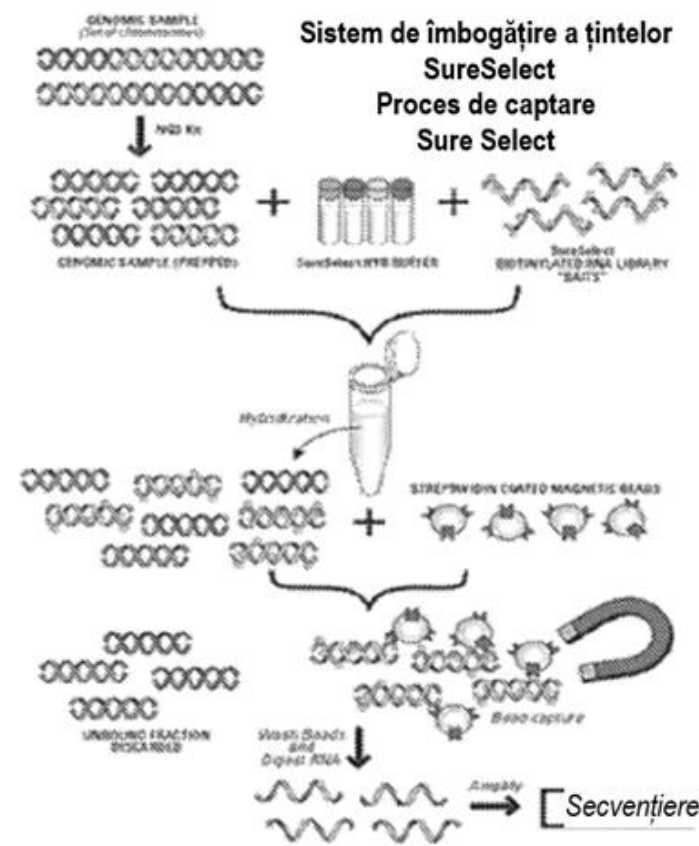


Figura 9B

gRNA	# de situri de tăiere în afara țintei examinate	# de situri tăiate în afara țintei detectate	Eficiența maximă de clivaj în afara țintei
A	365	0	-
B	576	0	-
D	330	0	-
E	696	0	-
F	483	0	-
H	676	0	-
I	677	0	-
J	840	0	-
C	419	8	3.6%
G	530	1	0.6%

Figura 10A

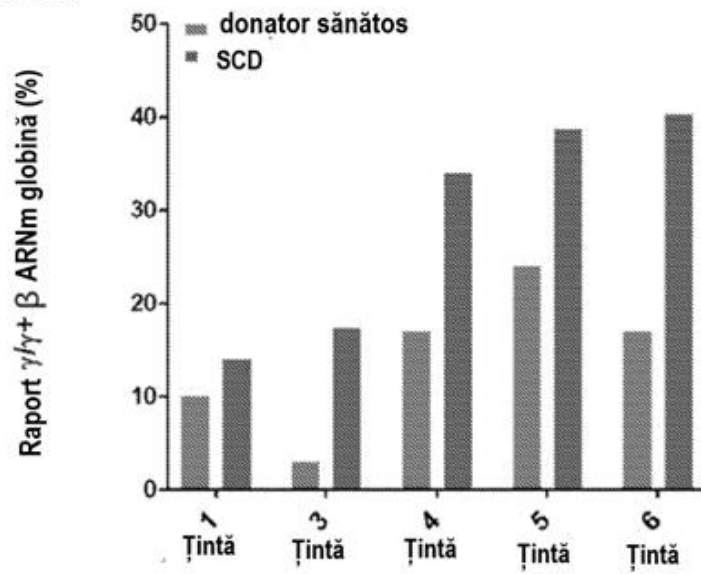


Figura 10B

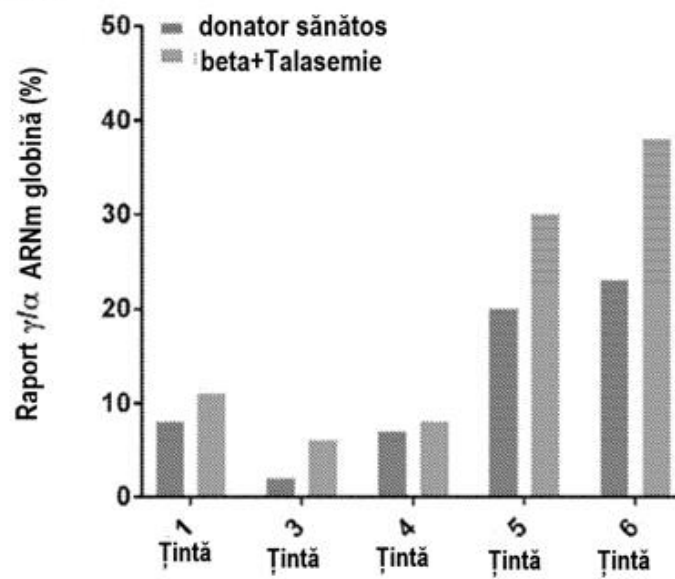


Figura 11A

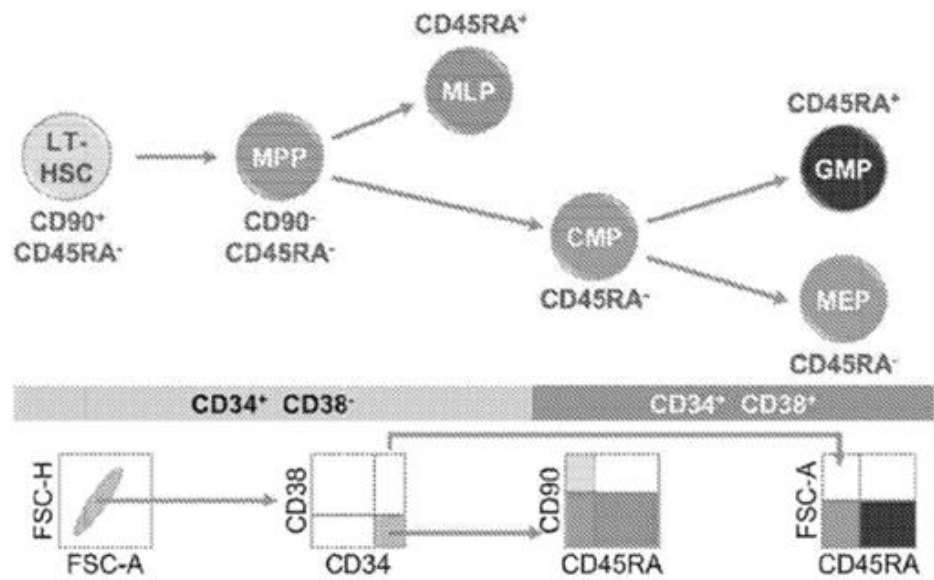


Figura 11B

Distribuția tipurilor de celule rămase nemodificate după editare

Populație	Frecvență	
	Simul	Editat
Bulk	94.83	94.30
LT-HSC	7.82	7.98
MPP	18.97	16.38
MLP	13.23	8.47
CMP/MEP	11.23	11.32
GMP	8.39	13.26

Figura 11C

Eficiențe ridicate ale editării în toate tipurile de celule

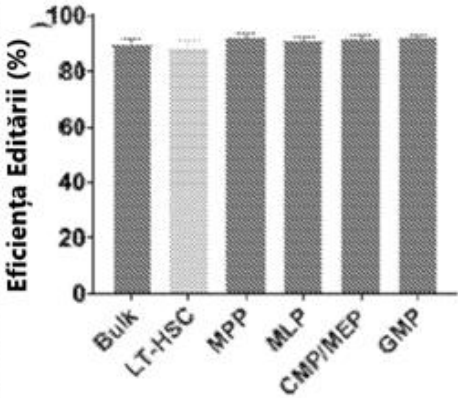


Figura 12

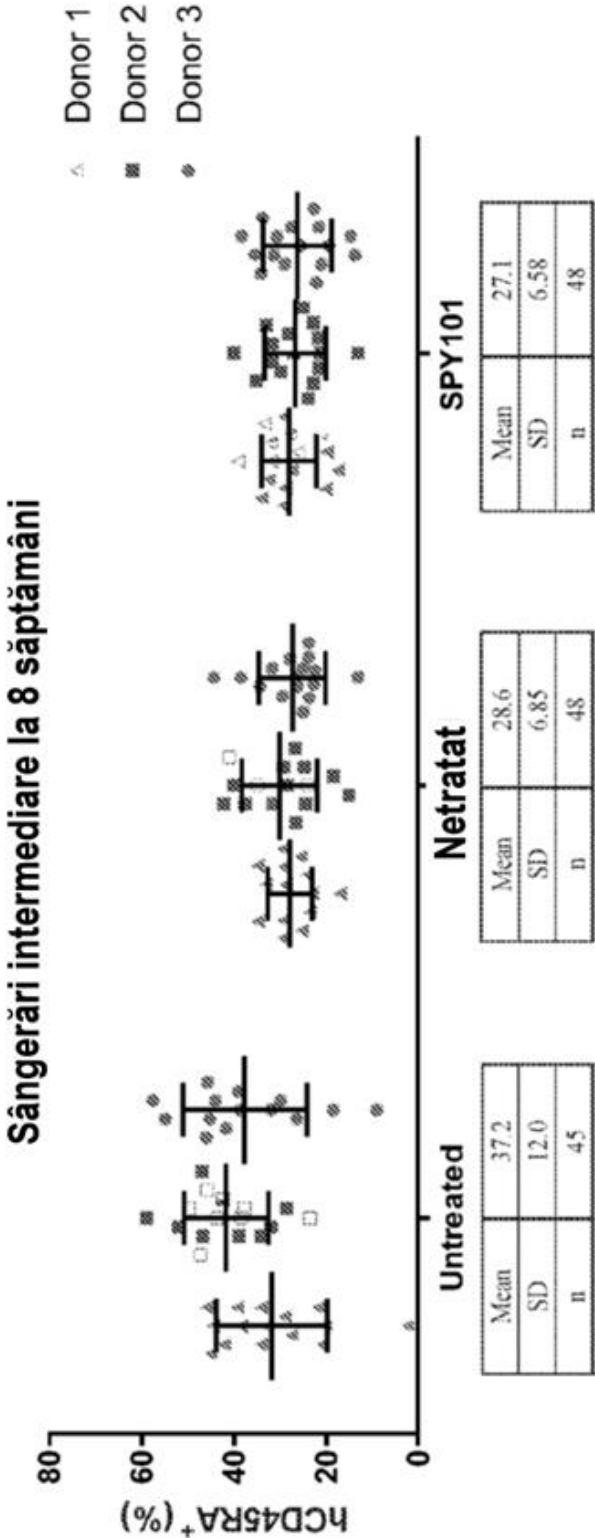


Figura 13

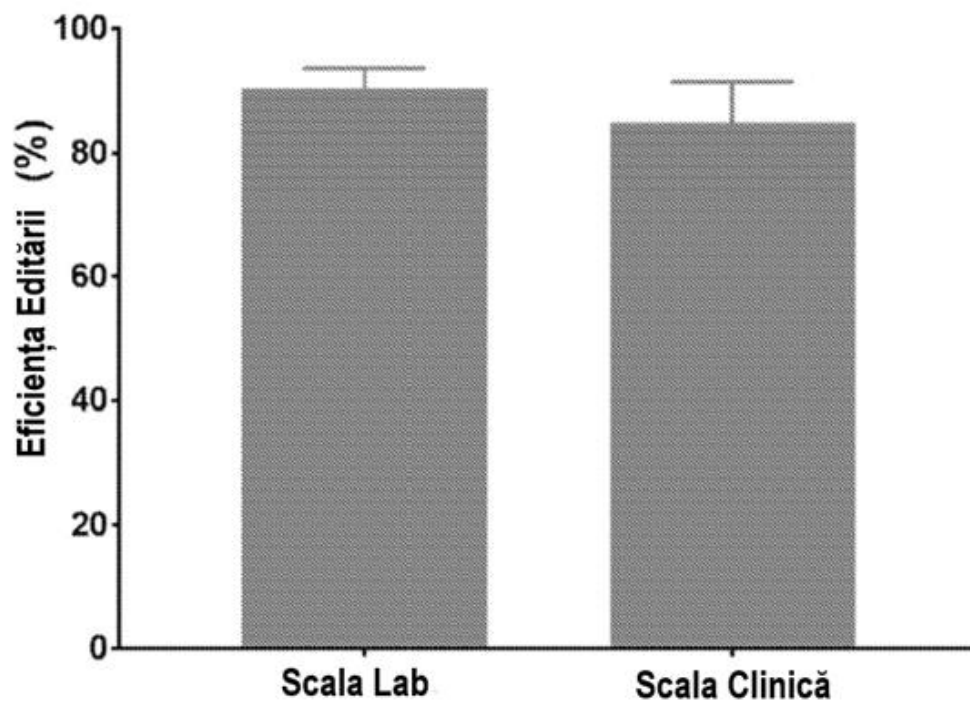
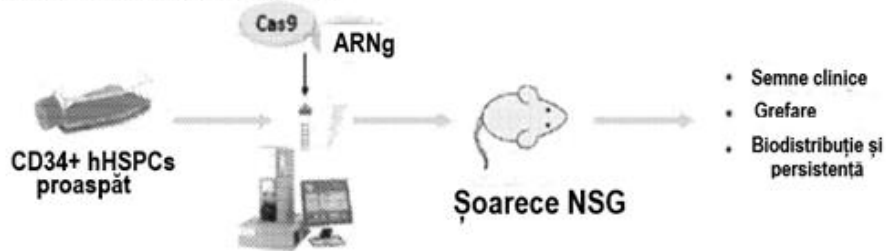


Figura 14

Studiu de biodistribuție/persistență



Studiu de tumorigenicitate/toxicologie generală

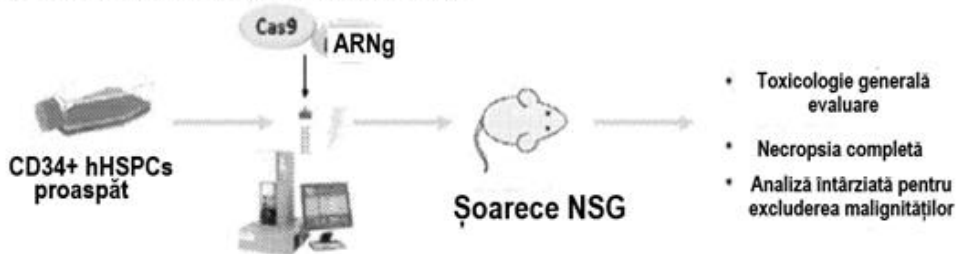


Figura 15

Configurația experimentală

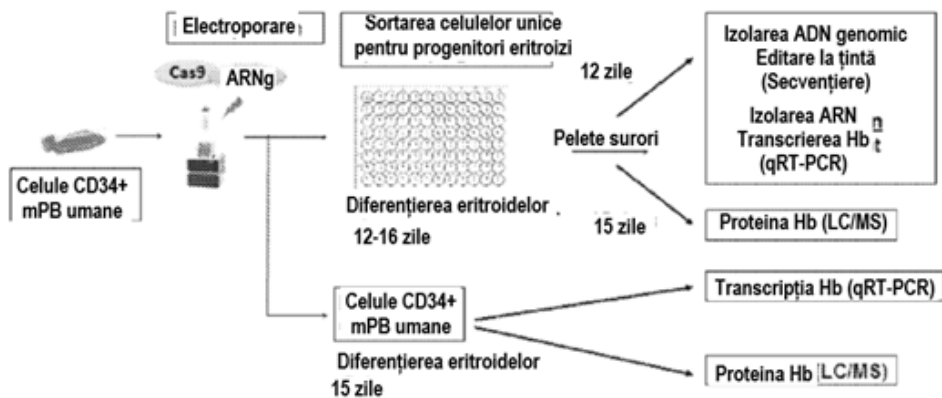


Figura 16A

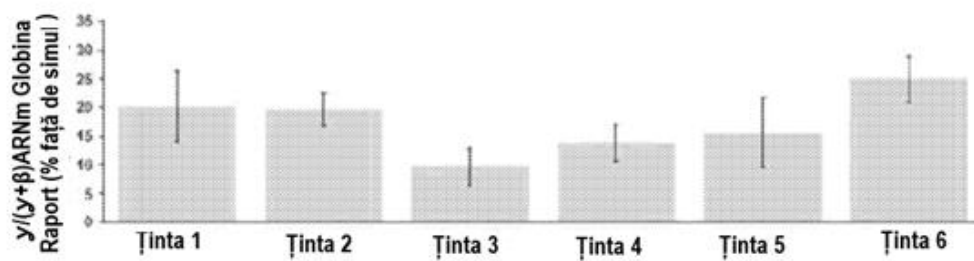


Figura 16B

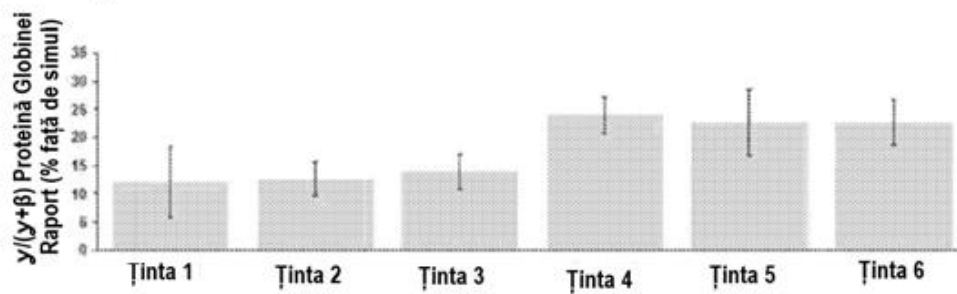


Figura 17

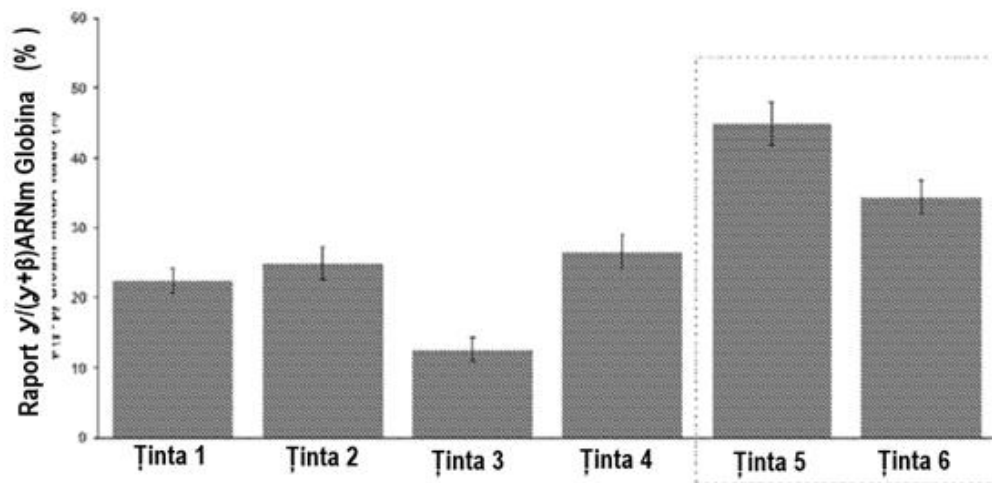


Figura 18A

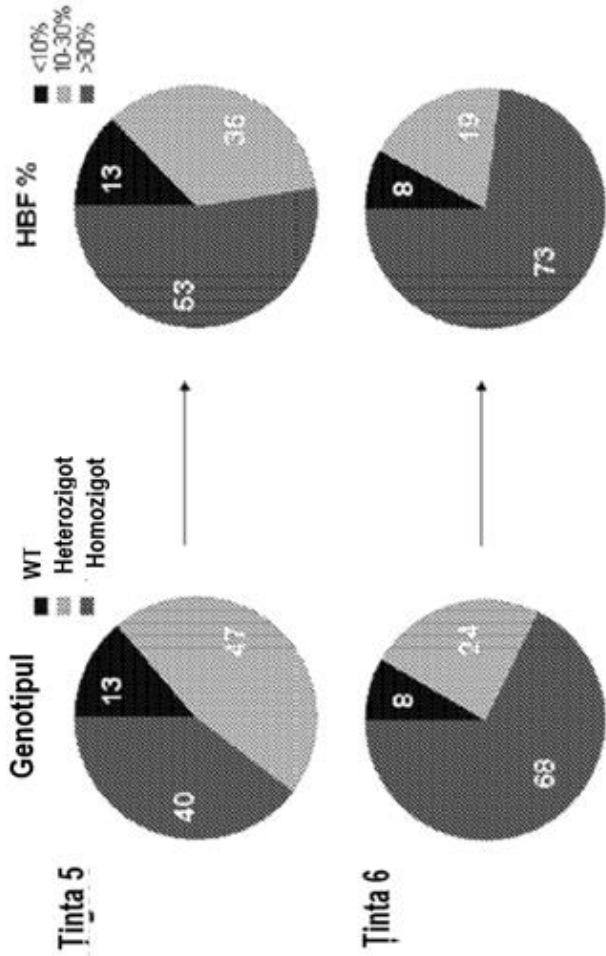
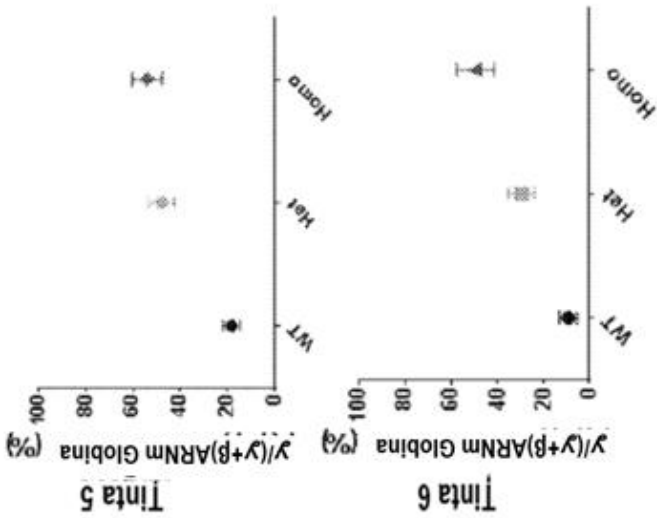
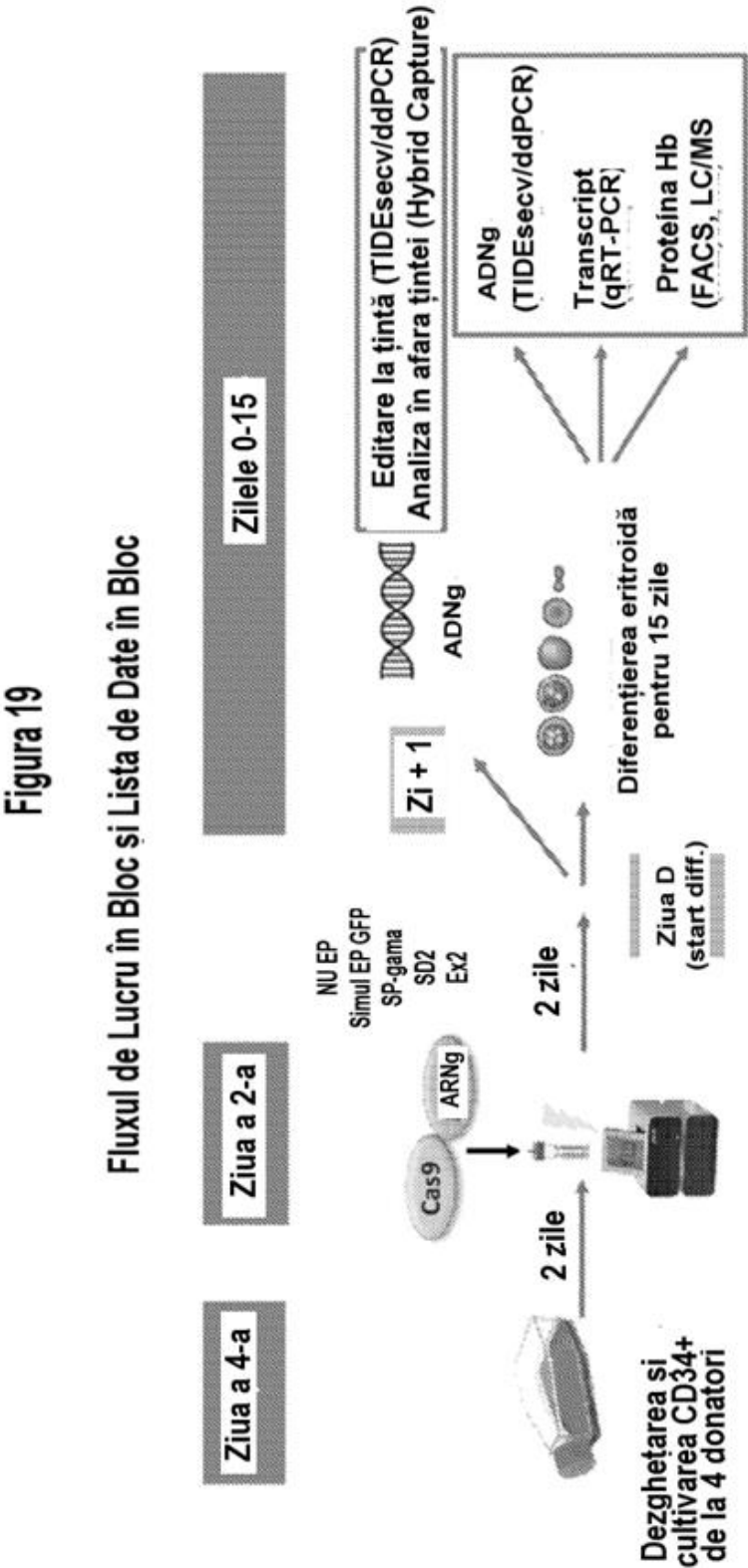


Figura 18B





Editare % menținută pe toată durata diferențierii
eritroidei ex vivo a celulelor mPBCD34+.

Figura 20A

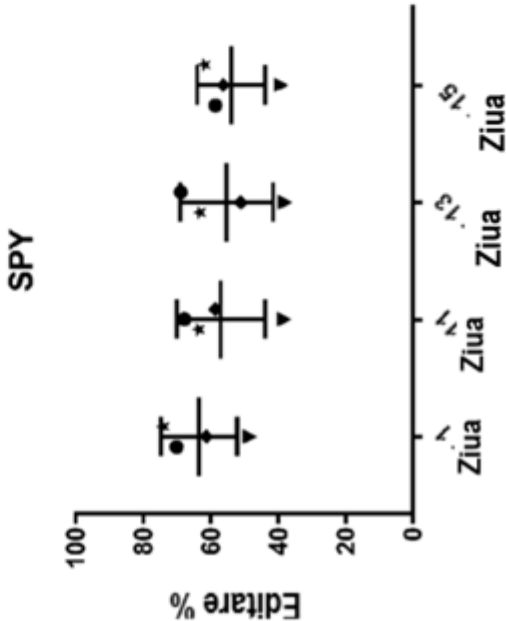
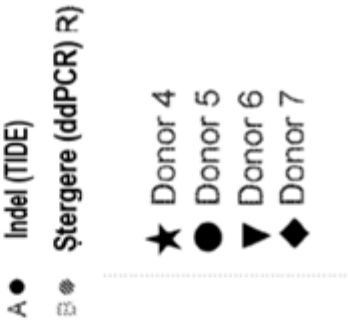
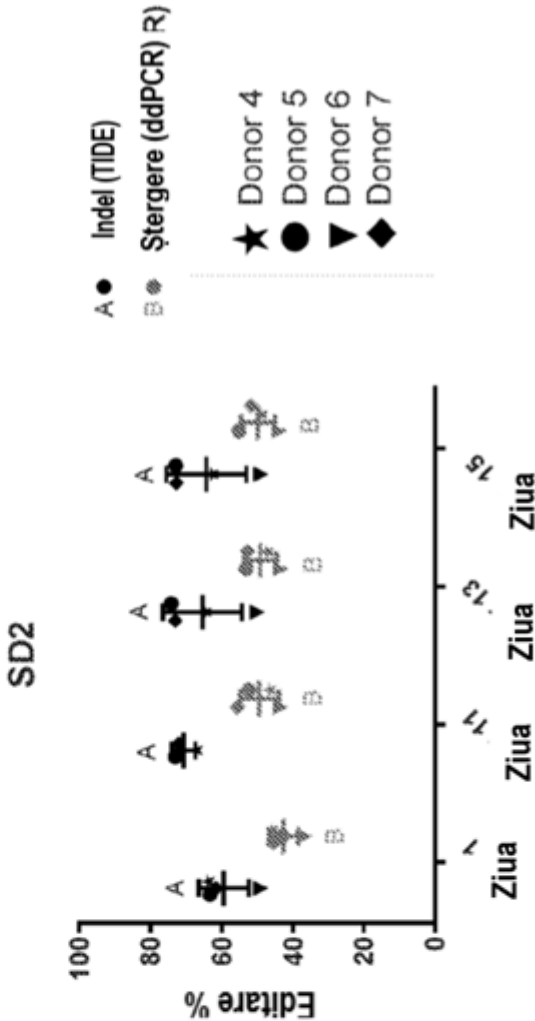


Figura 20B



Creșterea prin post editarea transcripului γ -globinei

Figura 21A

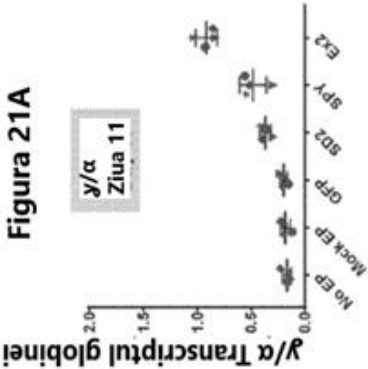


Figura 21B

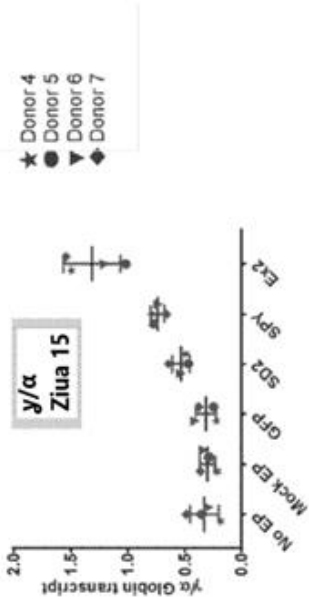


Figura 21C

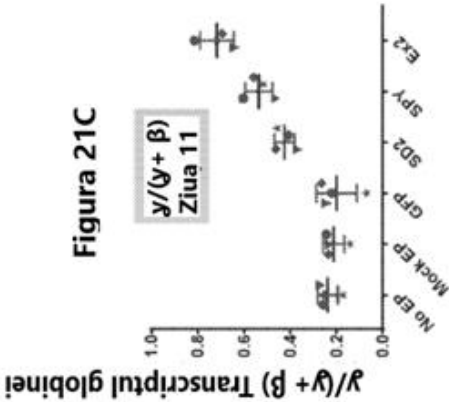
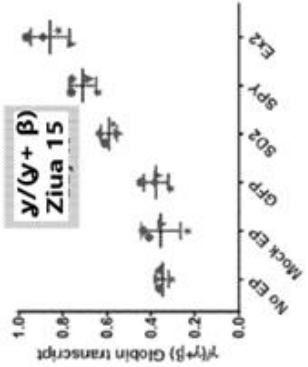


Figura 21D



Analiza FACS arată o creștere a γ -globinei în celulele editate.

Figura 22A

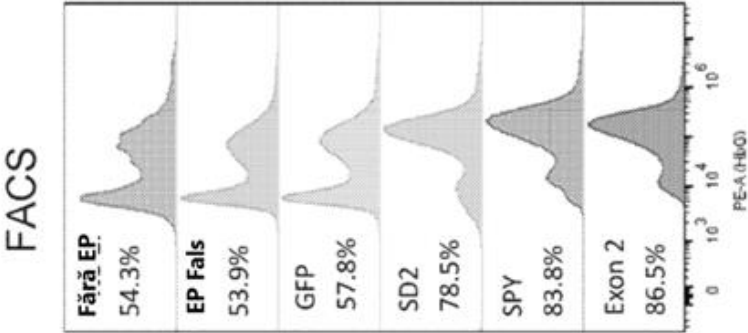
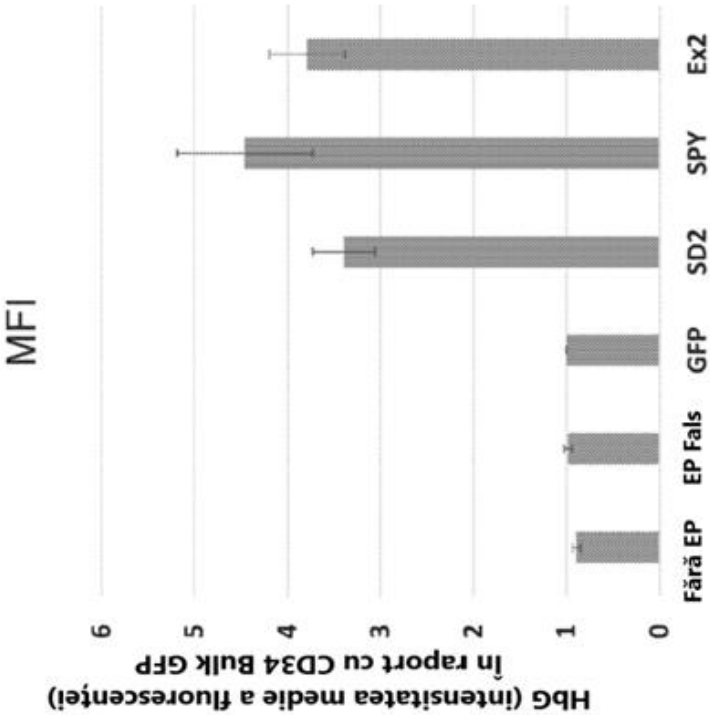


Figura 22B



LC-MS în vrac validează în continuare creșterea γ -globinei după editare

Figura 23A

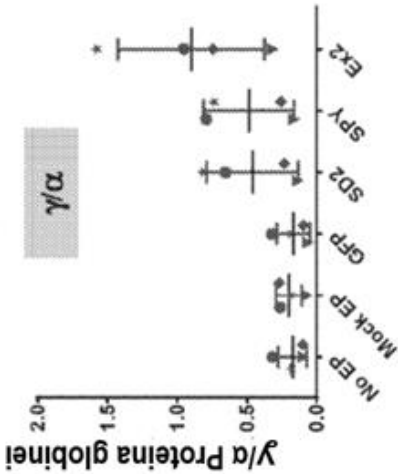


Figura 23B

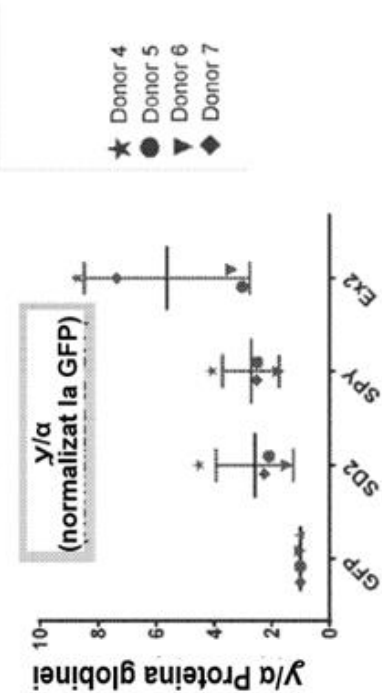


Figura 23C

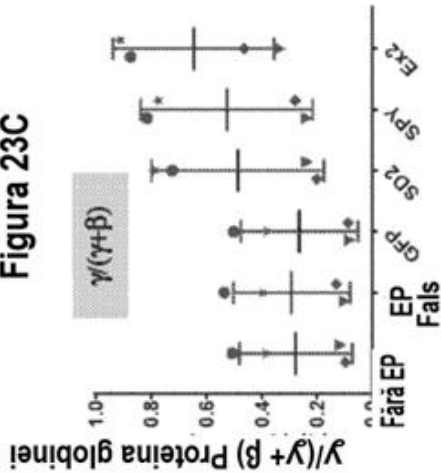


Figura 23D

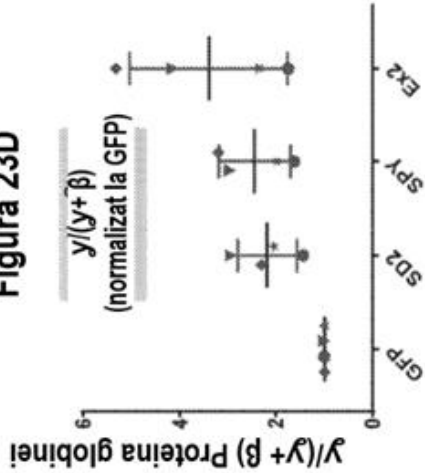
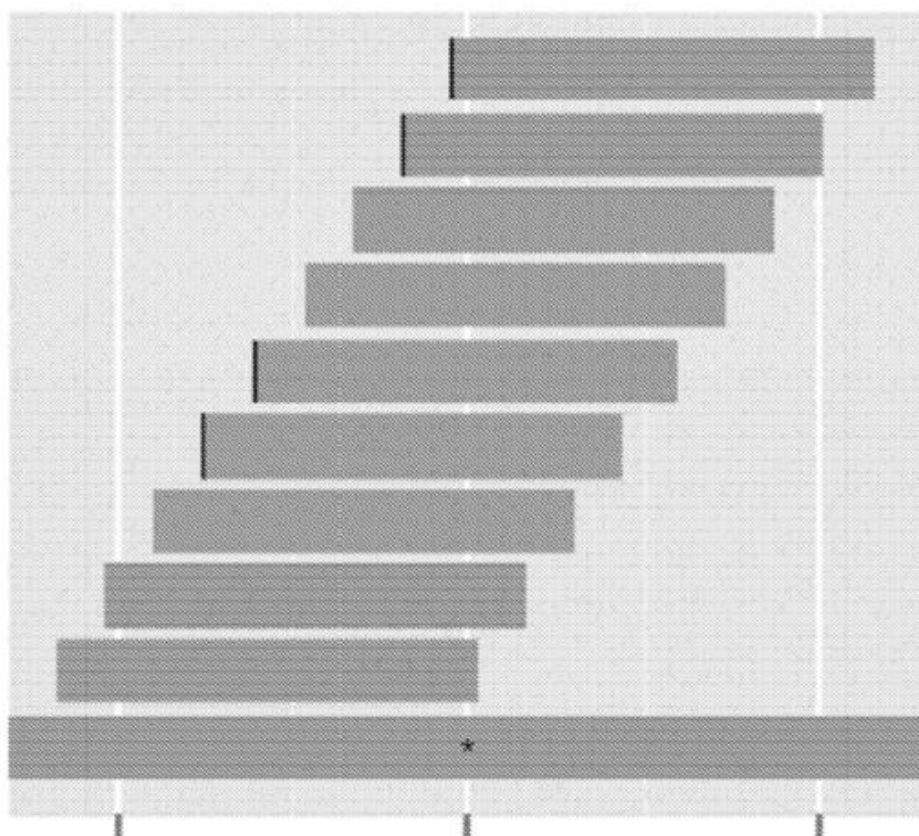


Figura 24



Design hibrid de captare momeală

Figura 25

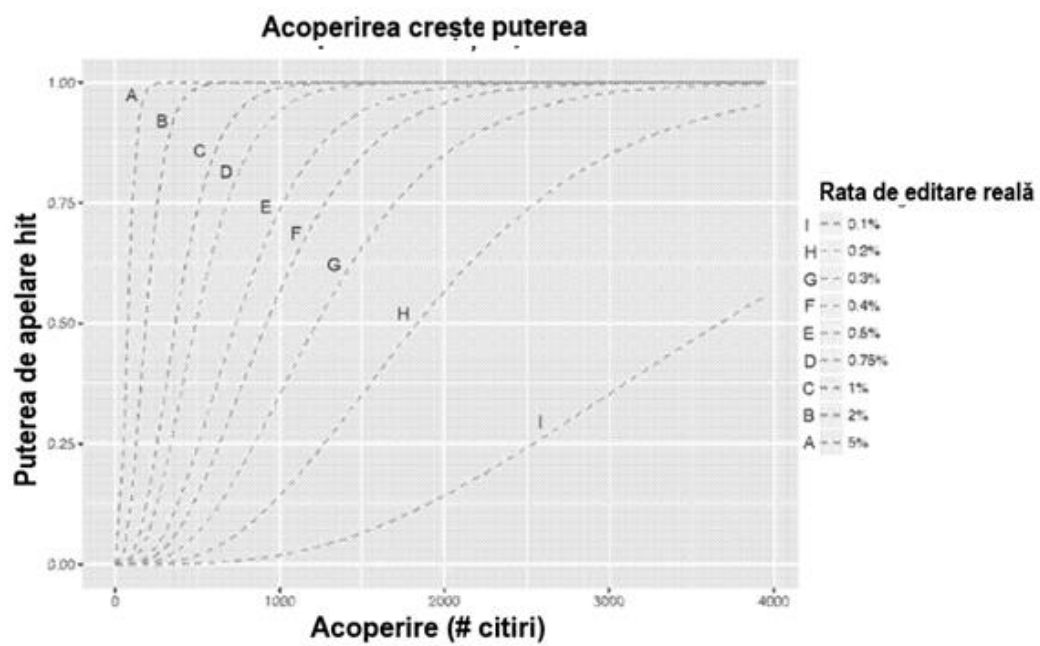


Figura 26
Rezumatul capturii hibride (SPY1010)

SPY101	Runda 1	Runda 2
Număr de donori	3	4
Format Cas9	mRNA	RNP
Acoperirea medie a secvențierii	~800	2492
Numărul de situs-uri	840	5003
Număr de neconcordanțe și tipuri de PAMS	4: NGG și NAG	5: NGG, NAG 4: NGA, NAA, NCG, NGC, NTG, NGT
# Numărul de situs-uri în afara tinteii cu dovezi de tăiere	0* Frecv. indel >0.5%	0 ^Δ Δ Frecv. indel >0.2%

Figura 27
Rezumatul capturii hibride (SD2)

SD2	Runda 1	Runda 2
Număr de donori	3	4
Format Cas9	mRNA	RNP
Acoperirea medie a secvențierii	~800	2775
Numărul de situs-uri	677	3272
Număr de neconcordanțe și tipuri de PAMS	4: NGG și NAG ³	5: NGG, NAG 4: NGA, NAA, NCG, NGC, NTG, NGT
# Numărul de situs-uri în afara țintei cu dovezi de tăiere	0* *Frecv. indel >0.5%	0 ^Δ ^Δ Frecv. indel>0.2%

Figura 28
Plan de studiu pilot de grefare

Grup	Tratament	Doza de radiații (cGy)	Rata Dozei de Radiație (cGy/min)	Number of Female Animals		
				Cohorta 1 origine celulară: Donator#1	Cohorta 2 origine celulară: Donator#2	Cohorta 3 origine celulară: Donator#3
1	Celule netratate	200	160	16	16	16
2	"electroporare simulată" de celule fără nicio componentă de editare CRISPR/Cas9	200		16	16	16
3	Eletroporarea celulelor cu ARN GFPGuide și proteina Cas9	200		16	16	16
4	Eletroporarea celulelor cu ARNg SPY101 și proteina Cas9	200		16	16	16
5	Eletroporare de celule cu SD2 gRNA și proteina Cas9	200		16	16	16
6	Control netratat	200		10	10	10

Figura 29A

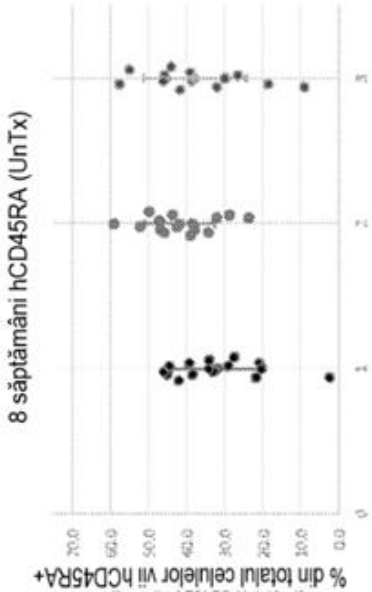


Figura 29B

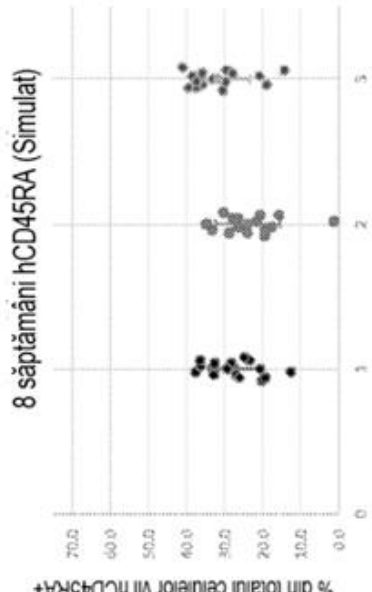


Figura 29C

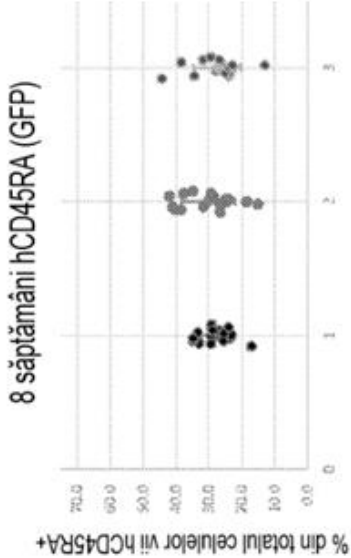
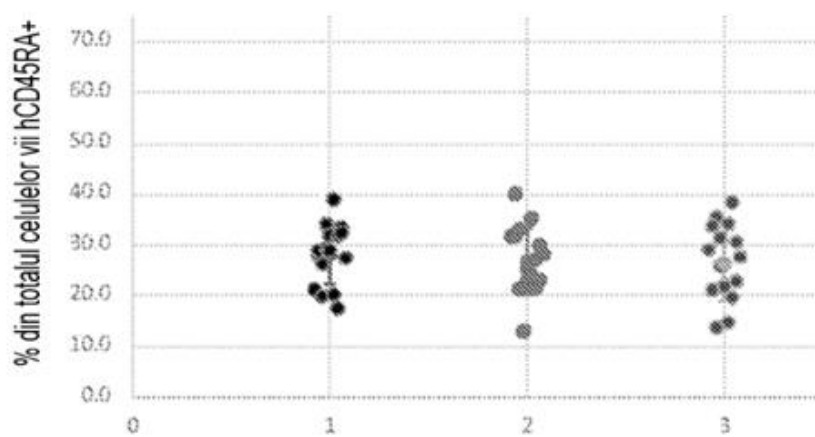


Figura 29D

8 săptămâni hCD45RA (Spy101)

**Figura 29E**

8 săptămâni hCD45RA (SD2)

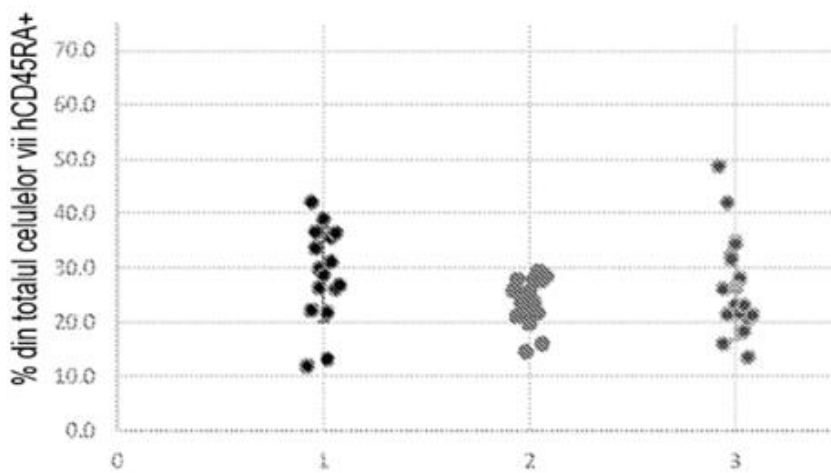


Figura 30

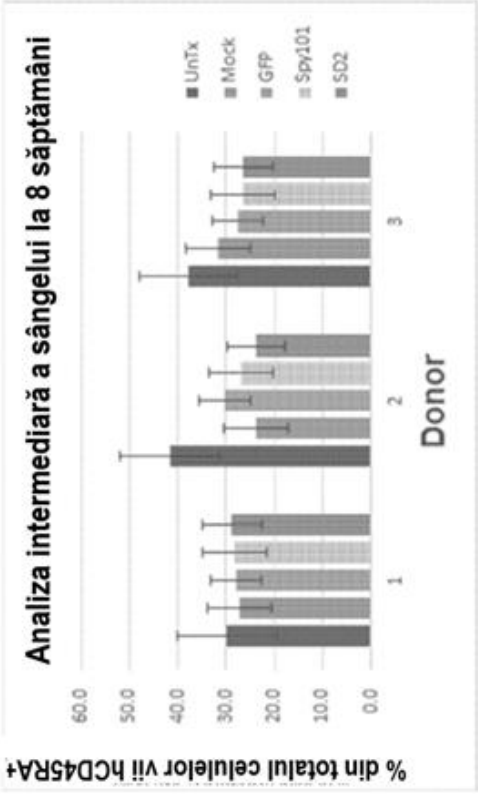
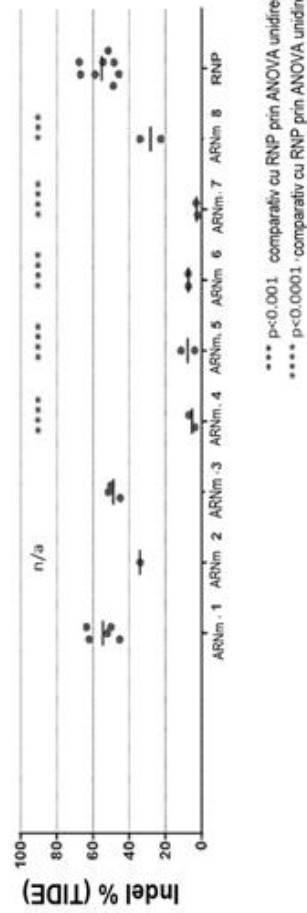


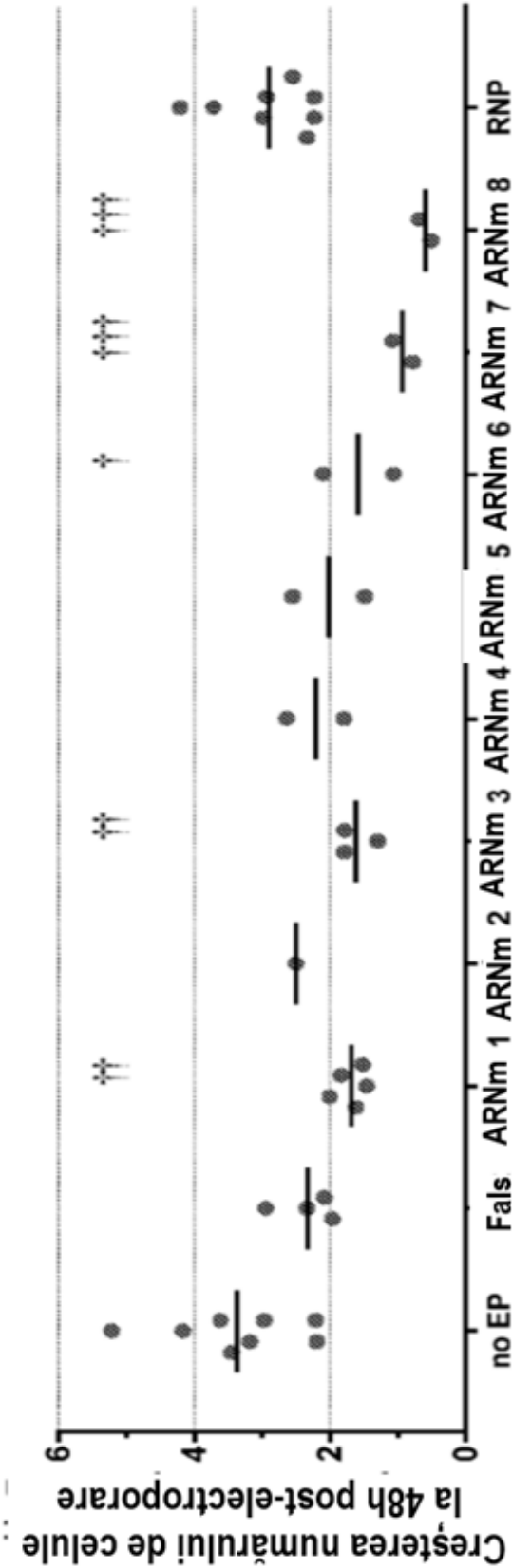
Figura 31

Cas9RNP este la fel de eficient în editare ca și ARNm
Cas9, dar superior în ceea ce privește viabilitatea
post-electroporare



Cas9RNP este superioară față de ARNm Cas9 în ceea ce privește viabilitatea celulelor în post-electroporare

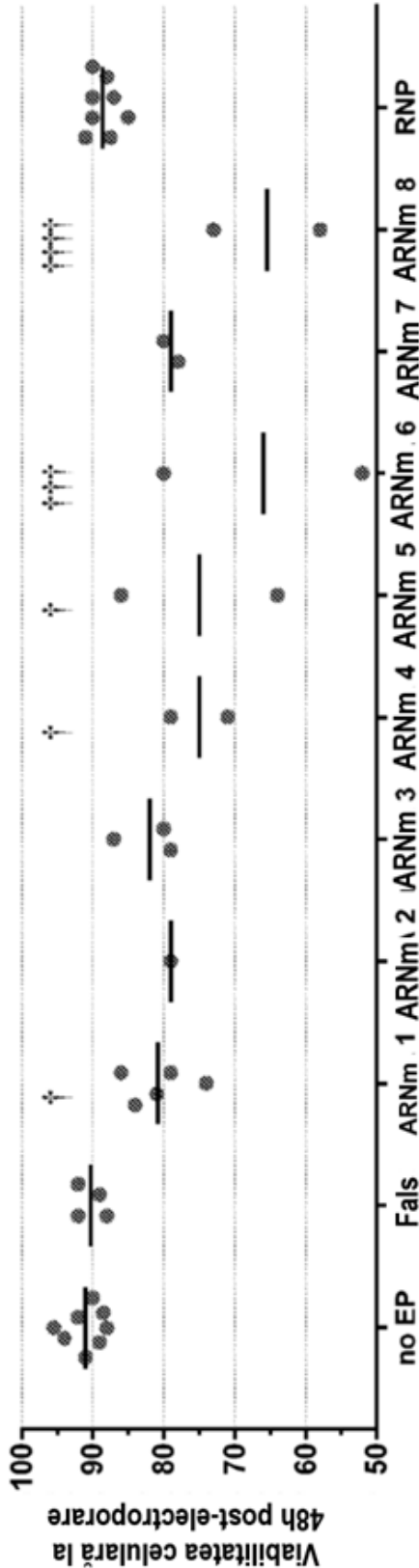
Figura 32A



† p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001, †††† p<0.0001 în comparație cu cea fără EP prin ANOVA unidirecțională

Cas9RNP este superioară față de ARNm Cas9
în ceea ce privește viabilitatea celulelor în
post- electroporare

Figura 32B



† p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001, †††† p<0.0001 în comparație cu cea fără EP prin ANOVA unidirecțională

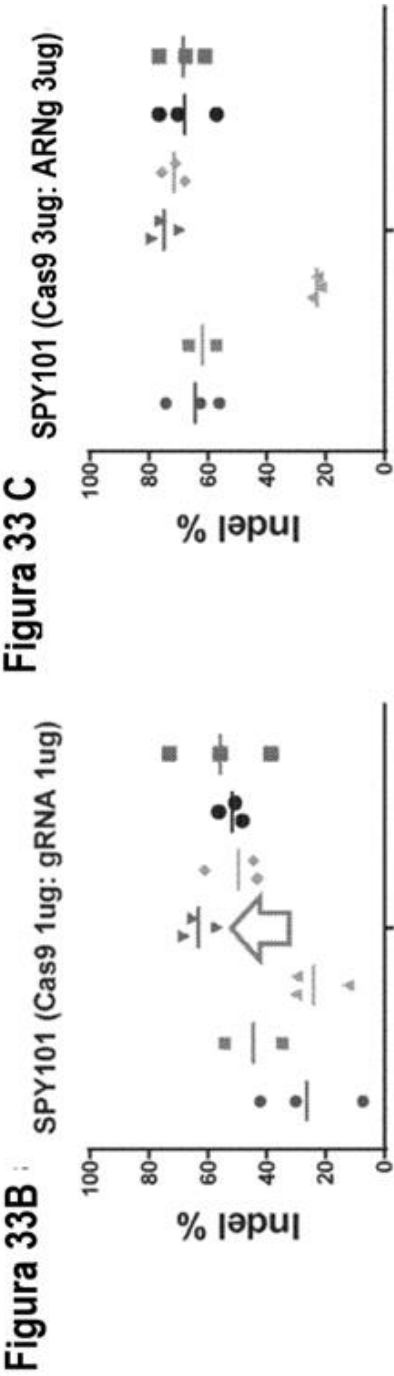
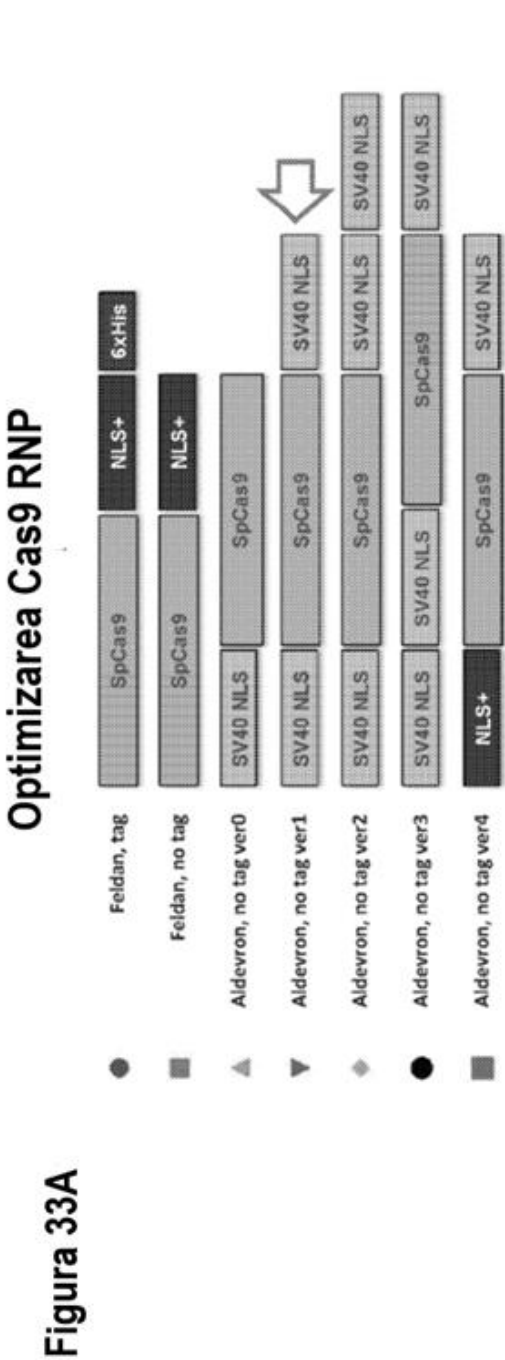


Figura 34A

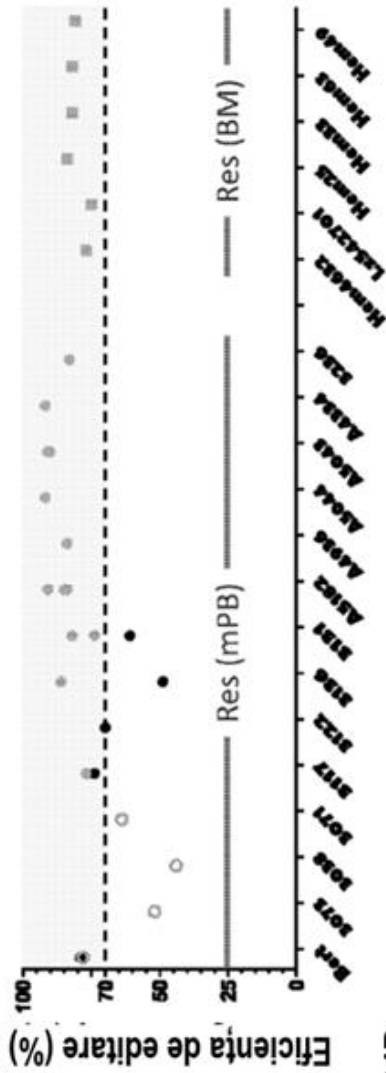


Figura 34B



Eficacitatea SPY 101 în celulele CD34+ mPB

Figura 35A

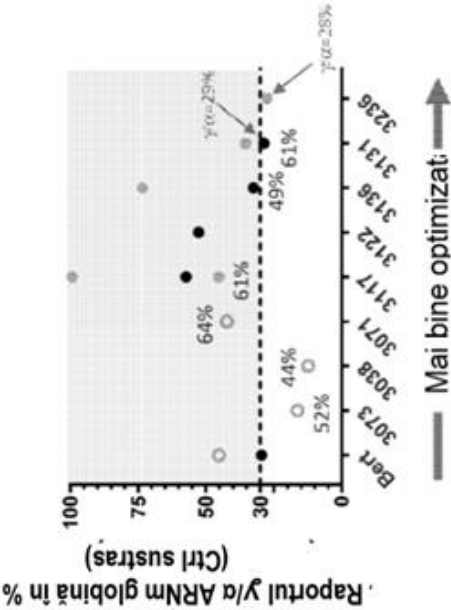
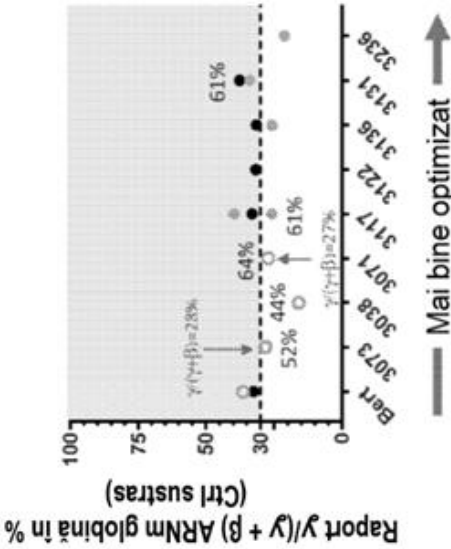


Figura 35B



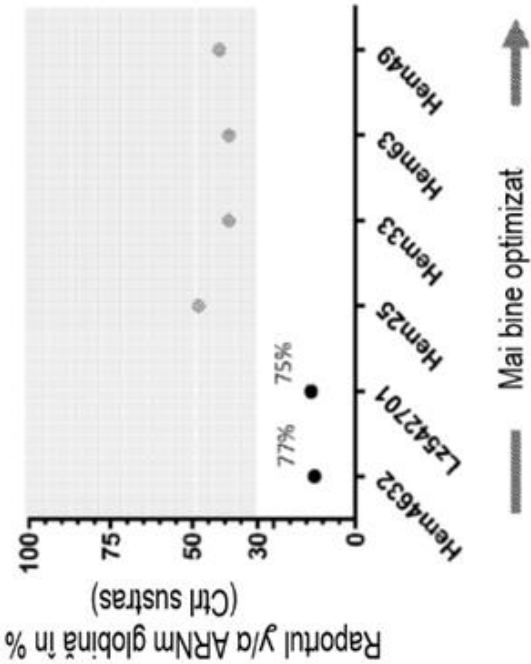
% = Eficiența de editare

Toate punctele de date neetichetate au avut
> 70% eficiență de editare

- Cas9 mRNA - Diferențiere non-optimizată
- Cas9 RNP - Diferențiere non-optimizată
- Cas9 RNP - Diferențiere optimizată

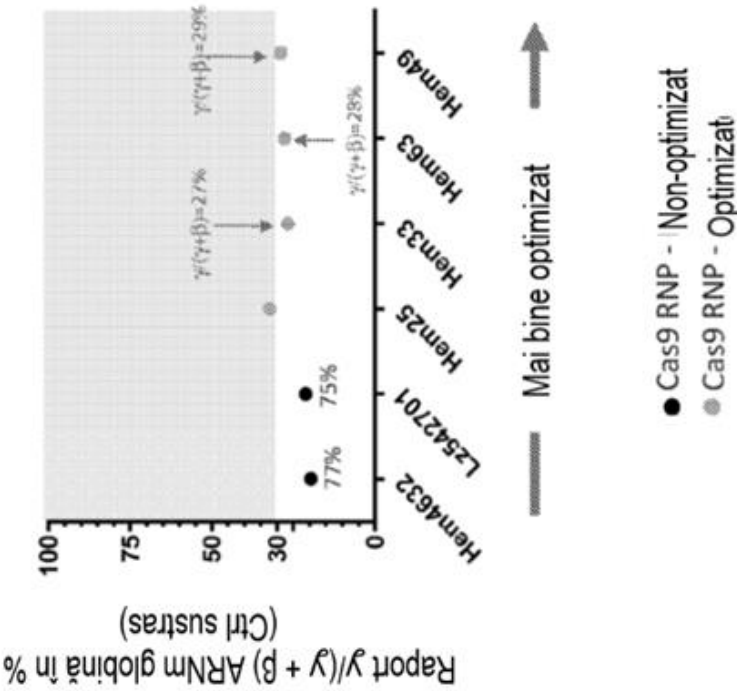
Eficacitatea SPY 101 în celulele CD34+ BM

Figura 36A



% = Eficiența de editare
Toate punctele de date neetichetate au avut
> 80% eficiență de editare

Figura 36B



Eficacitatea SPY 101 în eşantioanele
pacienţilor

Figura 37A

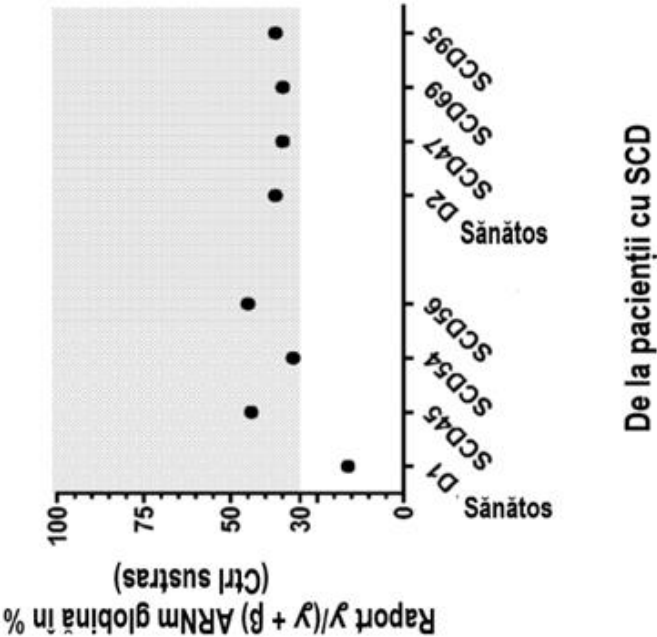
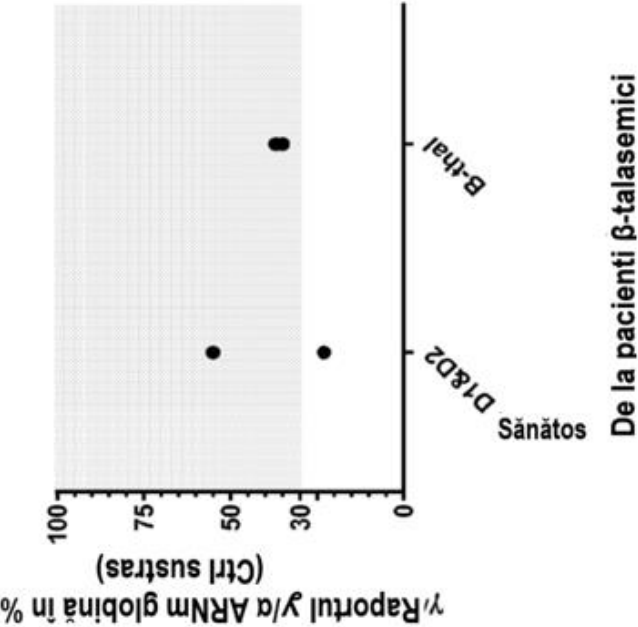


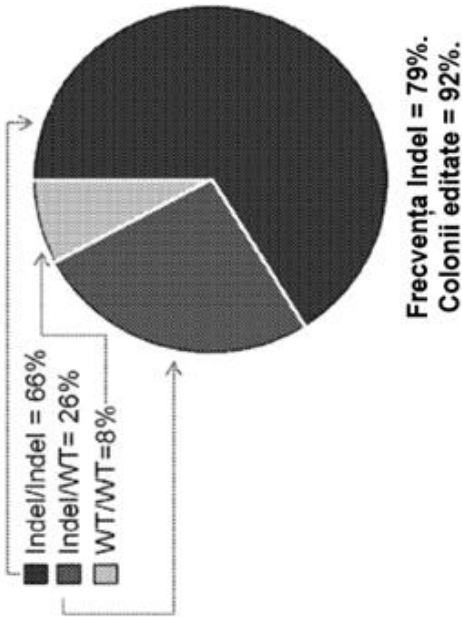
Figura 37B



Degradarea genotipului editat SPY 101

Figura 38A

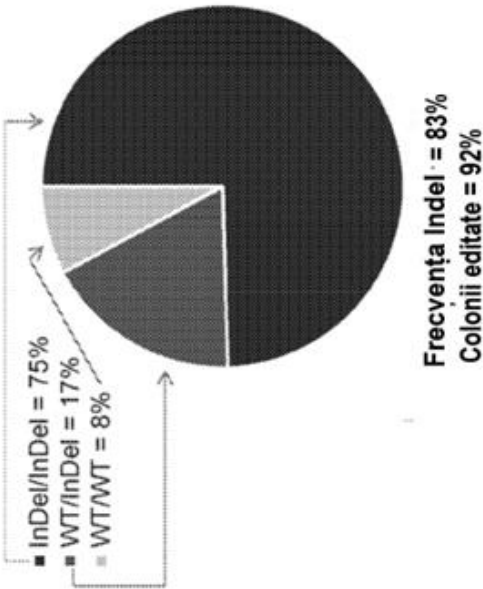
Cas9 ARNm



Date de la 60 de colonii
Data from 60 colonies

Figura 38B

Cas9 RNP



Date de la 164 de colonii

Perturbarea situsului de legare a Gata 1 de către SPY 101 față de exprimarea γ -globinei crescută

Figura 39A

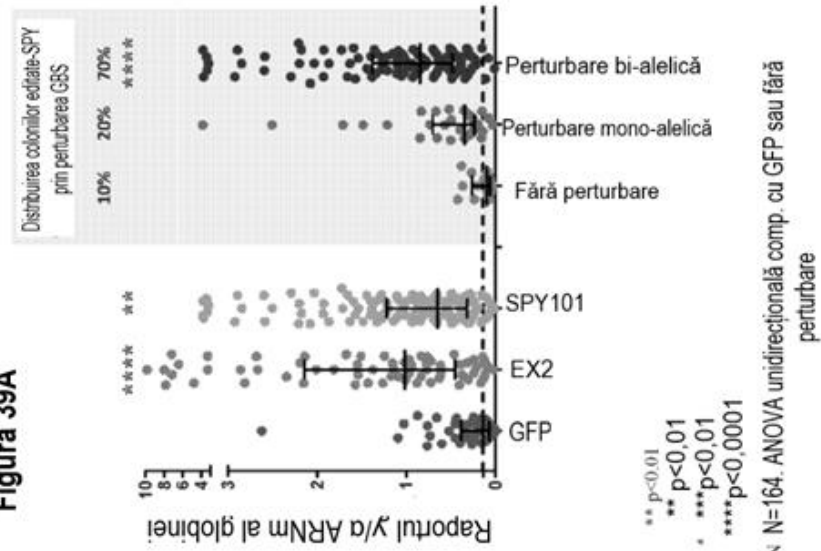
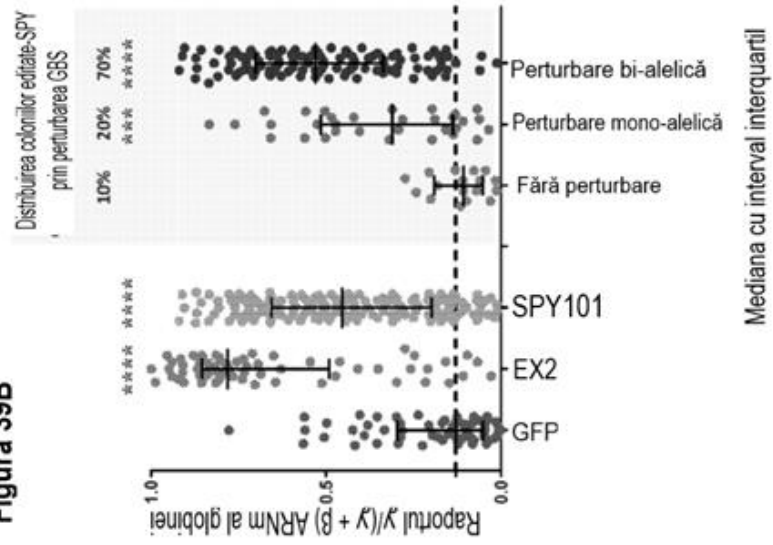


Figura 39B



SPY101 a crescut exprimarea γ -globinei

Figura 40A

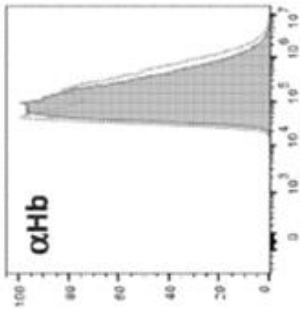


Figura 40B

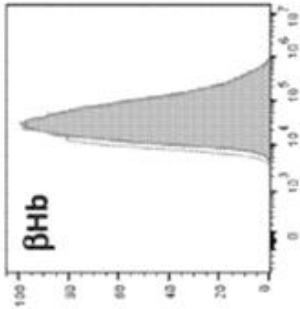


Figura 40C

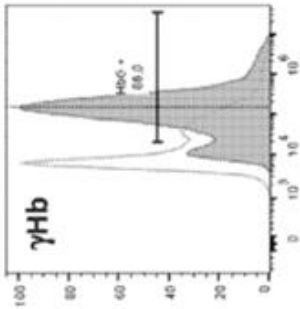


Figura 40D

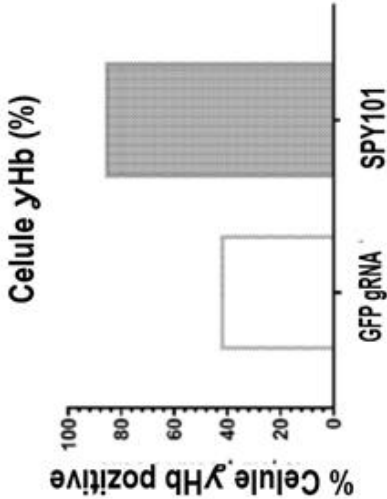


Figura 40E

