



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI - ABAPI

Bogotá D.C., 16 de agosto de 2018

Señores
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Ciudad

REFERENCIA: Expediente No. 14 – 259.531

TÍTULO: “MÉTODO Y COMPOSICIONES PARA LA MODIFICACIÓN DE ADN OBJETIVO DIRIGIDA POR ARN Y PARA LA MODULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DIRIGIDA POR ARN”

SOLICITANTE: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, UNIVERSITY OF VIENNA, EMMANUELLE CHARPENTIER

TRÁMITE: Respuesta a Concepto Técnico notificado mediante Oficio No. 3792 del 5 de abril de 2018.

JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS, en mi condición de apoderado de **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, UNIVERSITY OF VIENNA, EMMANUELLE CHARPENTIER**, dentro del término legal, presento respuesta a Concepto Técnico notificado mediante Oficio No. 3792 del 5 de abril de 2018.

1. NO ES UNA INVENCION (Art. 15 D 486 literal (b))

El Examinador objeto las Reivindicaciones 35 a 37 porque.

- *El objeto de las reivindicaciones 35 a 37 no se considera una invención, de acuerdo con el art. citado, toda vez que hace referencia a un ARN que va dirigido a ADN el cual comprende i) un primer segmento que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia en un ADN objetivo; y ii) un segundo segmento que interactúa con un polipéptido modificador dirigido al sitio. Por lo tanto, tal y como se encuentran redactadas las reivindicaciones, el alcance del objeto de las mismas*

Visite nuestra página web: www.mdelaw.com



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI - ABAPI

hacen referencia a un proceso natural de respuesta inmune presente en algunos microorganismos en respuesta a agentes exógenos. Además, aunque las reivindicaciones 36 y 37 se encabecen como “Kit” estas reclaman el mismo objeto de la reivindicación 35.

Asimismo, las reivindicaciones 40 a 60 en sus modalidades reclamadas de: uno o más ácidos nucleicos o el “Kit”, se considera que tampoco son patentables por las razones anteriormente expuestas.

R/: El solicitante **de acuerdo con las observaciones del Examinador**, manifiesta:

El Examinador objetado a las **Reivindicaciones 35-37 y 40-60** por supuestamente referirse a un proceso natural. La acción de oficial afirma: "tal y como se encuentran redactadas de las reivindicaciones, el alcance del objeto de las mismas hace referencia a un proceso natural de respuesta inmune presente en algunos microorganismos en respuesta a agentes exógenos." (énfasis añadido)

Con el único propósito de acelerar la tramitación de esta solicitud, las reivindicaciones han sido modificadas, por ejemplo, la **nueva Reivindicación 34** (anterior Reivindicación 35) dice explícitamente "un ARN dirigido a ADN no natural obtenido por ingeniería genética" - por lo tanto, las reivindicaciones explícitamente no se refieren a un proceso natural. Además, muchas de las reivindicaciones también especifican conjuntos de alternativas que aseguran aún más que las reivindicaciones no se refieren a un proceso natural. Por ejemplo, la **nueva Reivindicación 34** (anterior reivindicación 35) menciona "caracterizado por uno o más de los siguientes" y enumera varias alternativas, que incluyen:

(A) especifica que el ARN dirigido a ADN es un ARN dirigido a ADN de una sola molécula que se puede unir a un polipéptido Cas9 - * **tal ARN dirigido a ADN no existe de forma natural;**

Visite nuestra página web: www.mdelaw.com



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

- (B) especifica que la una o más secuencias de polinucleótidos que codifican dicho ARN dirigido a ADN están operativamente unidas a un promotor que es funcional en una célula eucariota- *** los sistemas CRISPR no existen de forma natural en las células eucarióticas y los componentes de los sistemas CRISPR no están naturalmente unidos de forma operativa a los promotores eucarióticos;**
- (C) especifica que el ADN diana está presente en una célula eucariota *** los ADN diana de los sistemas CRISPR naturales no están presentes en las células eucarióticas;**
- (D) especifica que dichos dos tramos complementarios de nucleótidos se hibridan para formar de 8 a 15 pares de bases ...*** los dos tramos complementarios de nucleótidos de ARN dirigidos al ADN de sistemas CRISPR de tipo natural ii no se hibridan para formar entre 8 y 15 pares de bases;**
- (E) especifica "operativamente unido a un promotor que es funcional en una célula eucariota"; "unido covalentemente ... A un dominio de transducción de proteínas"; "un polipéptido cas9 quimérico" - *** ninguno de los anteriores está presente en sistemas CRISPR tipo ii naturales.**

Algunas **reivindicaciones** (véase, por ejemplo, la **Reivindicación 35** (v) (anterior Reivindicación 36 (v)) también incluyen "en las que el ARN dirigido a ADN comprende una o más de: una nucleobase modificada, una estructura principal modificada o un enlace internucleosídico no natural, un resto de azúcar modificado, un ácido nucleico bloqueado y un ácido nucleico peptídico" como alternativa, y tales ARN dirigidos al ADN no existen de forma natural.



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI - ABAPI

Del mismo modo, las reivindicaciones tales como las **nuevas Reivindicaciones 39-50, 56-57 y 59** (anteriores reivindicaciones 40-51, 57-58 y 60) especifican características adicionales que excluyen los procesos naturales. Por ejemplo, la **Reivindicación 39** (anterior reivindicación 40) especifica que el "polipéptido cas9 comprende una o más mutaciones en un dominio Ruvc y/o un dominio HNH" y la **Reivindicación 40** (anterior reivindicación 41) especifica "donde el polipéptido Cas9 quimérico comprende una proteína Cas9 modificada que tiene actividad de nucleasa reducida comparada con una Cas9 de tipo silvestre correspondiente y comprende un polipéptido heterólogo que es un marcador proteico".

El solicitante respetuosamente sostiene que las **reivindicaciones no "se refieren a un proceso natural"** y solicitan respetuosamente la retirada de esta objeción.

2. EXCEPCIÓN DE PATENTABILIDAD (Art. 20 D 486 literal(es) (a) y (c))

El Examinador objeto las Reivindicaciones 1 a 68 porque:

"El objeto de las reivindicaciones 1 a 68 no es patentable de acuerdo con el art. 20 literal a) D. 486, toda vez que el alcance de las mismas incluye la modificación de animales y humanos in vitro o in vivo porque los métodos reclamados se refieren a la modificación específica del sitio de un ADN objetivo en células que son parte de un organismo".

"Asimismo, se evidencia incoherencia entre el objeto reclamado en la reivindicación independiente y las reivindicaciones dependientes. A modo de ejemplo, la reivindicación 1 reclama "Un método de dirección y de unión de un ADN diana, (...), en el que dicho contacto no es en una célula de un animal invertebrado ni vertebrado in vivo" y la reivindicación 4 dependiente menciona "El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que dicho contacto es en (...), una célula de un animal invertebrado o una célula de un animal vertebrado". Además, la reivindicación 12 dependiente reclama "El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en el que el ADN diana está presente en una célula bacteriana, una célula arquea, organismos eucariotas monocelular, una célula de un animal invertebrado o una célula de un animal vertebrado".



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI - ABAPI

“Por lo tanto, dichos métodos podrían incluir la manipulación genética de los individuos. (...)”.

“Del mismo modo, las reivindicaciones 31 a 68 reclaman una composición, el kit, la célula eucariota, el ARN de dirección a ADN o el uno o más ácidos nucleicos, lo cual la misma interpretación prejudicial 21-IP-2000 ha señalado que: “ (...) Sin embargo, si un producto — que reúne las condiciones necesarias para ser considerado como invención— es obtenido de la utilización de secuencias de ADN humano, podría, en principio, ser patentado, pues no se trataría de una materia que compone el cuerpo humano, sino de un producto (v.gr. una vacuna, un antibiótico, aditivos para la industria alimenticia) que no existe como tal en la naturaleza. Pero, no obstante, si el objeto del invento produce una vulneración al orden público o a las buenas costumbres, éste será el principal criterio a ser tenido en cuenta para denegar la patente”.

“Por lo tanto, tal y como se encuentran redactadas las reivindicaciones; los productos reclamados contienen material de seres humanos o animales con el objeto de ser transformados genéticamente, lo cual es considerada materia exceptuada de patentabilidad”.

“Se le sugiere a la solicitante realizar la respectiva exclusión de animales o humanos tanto in vivo como in vitro en las reivindicaciones independientes y dependientes”.

“Por otra parte, el objeto de las reivindicaciones 38 y 39 no es patentable de acuerdo con el art. 20 literal c) de la decisión 486, toda vez que se refiere a células, pero las mismas no están definidas como una línea celular. ahora bien, tal y como están reclamadas se evidencia que el objeto de la solicitud abarca células germinales y células madre las cuales dan origen a un individuo u organismo. asimismo, como lo señala el mismo solicitante: “las células somáticas se proporcionan con factores de reprogramación (por ejemplo, oct4, sox2, klf4, myc, nanog, lin28, etc.) conocidos en la técnica para reprogramar las células somáticas para convertirse en células madre pluripotentes” (pág. 92, líneas 15 - 21), por ende, al ser reprogramadas también darían origen a un individuo u organismo. por estas razones dichas reivindicaciones no son objeto de patentabilidad según el art. Citado”.

“Del mismo modo, las reivindicaciones 40 a 60 en su modalidad reclamada de célula, se considera que tampoco son patentables por las razones anteriormente expuestas”.

R/: El solicitante **de acuerdo con las observaciones del Examinador**, procedió a **modificar el Capítulo Reivindicatorio** de la siguiente forma

El Examinador ha objetado las **Reivindicaciones 1-68** por su objeto no ser patentable, toda vez que el alcance de las mismas incluye la modificación de animales y humanos in vitro o in vivo porque los métodos reclamados se



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

refieren a la modificación específica del sitio de un ADN objetivo en células que son parte de un organismo. (énfasis añadido)

Además, el Examinador cita que el objeto de las Reivindicaciones 38 y 39, y 40 a 60, no es patentable, toda vez que se refiere a células, pero las mismas no están definidas como una línea celular.

Reivindicaciones 1-30

En primer lugar, el Solicitante desea mencionar que, de acuerdo con las Directrices de Examen de Solicitudes de Patente, punto 2.4.1, no son patentables los siguientes procedimientos biotecnológicos:

- Procedimientos para clonar seres humanos. Este procedimiento consiste en crear un ser humano con la misma información genética nuclear de otro ser humano vivo, o muerto.
- Procedimientos para modificar la identidad genética de la línea germinal de seres humanos. Por ejemplo: Terapia génica germinal, en la cual la terapia no solo incide en el individuo, sino sobre su descendencia, pues altera o modifica su patrimonio genético. (énfasis añadido)
- Uso de embriones humanos para propósitos industriales, o comerciales.
- Procesos para modificar la identidad genética de animales que puedan causar sufrimiento al mismo sin un beneficio médico sustancial para el hombre, o para el animal. (énfasis añadido)



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

- El cuerpo humano, en las distintas etapas de su formación y desarrollo, y el simple descubrimiento de uno de sus elementos, incluso la secuencia total o la secuencia parcial de un gen, no podrá constituir invenciones patentables, tales etapas en la formación o desarrollo del cuerpo humano, incluye las células germinales. (énfasis añadido)
- Procedimientos para producir quimeras a partir de células germinales o células totipotenciales de seres humanos y animales. (énfasis añadido)

Además, el Solicitante señala que la Interpretación prejudicial 21 -IP-2000 del Tribunal Andino citada por el Examinador se refiere a procedimientos de mutación o modificación genética de individuos, tal como referido por el Examinador, y en concreto seres humanos. (énfasis añadido)

La **nueva Reivindicación 1** especifica “en el que dicho contacto no es en una célula germinal o célula pluripotente de un humano o animal, y no es en una célula de un animal invertebrado *in vivo*, de un animal vertebrado *in vivo*, ni de un humano *in vivo*, y en el que dicho método no modifica la identidad genética de la línea germinal de un ser humano.” (énfasis añadido)

Consecuentemente, la **nueva Reivindicación 1** no abarca ningún de los procedimientos biotecnológicos considerados no patentables según las Directrices de Examen de Solicitudes de Patente, punto 2.4.1, o la Interpretación prejudicial 21 -IP-2000 del Tribunal Andino. Por tanto, el Solicitante somete respetuosamente que el objeto de la nueva reivindicación 1 es patentable.



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

El Solicitante respetuosamente señala que la **Reivindicación 1** ya incluía la limitación "en el que dicho contacto no es en una célula de un invertebrado o animal vertebrado *in vivo*" y en consecuencia la misma limitación se aplicará a todas las **reivindicaciones** directa o indirectamente **dependientes de la Reivindicación 1**. Dicha limitación implica que el contacto no es en una célula de ningún animal, incluidos los humanos, *in vivo*. Esto significa que el contacto solo puede tener lugar en células que no son parte de un animal o ser humano, por ejemplo, el contacto puede ocurrir en células ex vivo o in vitro, por ejemplo, células en cultivo. Por consiguiente, el **alcance de la Reivindicación 1 no incluye la modificación genética de individuos**, animales o humanos *in vivo* y, por consiguiente, no se relaciona con la modificación específica del sitio de un ADN diana en células que son parte de un organismo tal como mencionado por el Examinador, porque la **Reivindicación 1** explícitamente especifica que el contacto no ocurre en las células que son parte de un animal invertebrado o vertebrado.

No obstante, el Solicitante ha **modificado las reivindicaciones** con el único propósito de acelerar la tramitación de la presente solicitud.

El Solicitante desea señalar que la intención del lenguaje de la **Reivindicación 1** es *inter alia* garantizar que las reivindicaciones no abarquen la generación de un individuo completo.

Además, el Solicitante desea **señalar que no existe ninguna incoherencia entre las Reivindicaciones independientes y dependientes** según lo sugerido por el Examinador. La **Reivindicación 1** abarca el contacto del ADN fuera de una célula (por ejemplo, en un tubo de ensayo) y también



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

dentro de las células, con la excepción de las limitaciones mencionadas en la **Reivindicación 1**. Por lo tanto, las **Reivindicaciones dependientes** tales como la **Reivindicación 4** **limitan** adicionalmente la **Reivindicación 1**, y son completamente consistentes con la **Reivindicación 1**.

Reivindicaciones 31-37

Relativamente a las **Reivindicaciones 31-37**, el Examinador afirma: "tal y como se encuentran redactadas las reivindicaciones; los productos reclamados contienen material de seres humanos o animales con el objeto de ser transformados genéticamente, lo cual es considerada materia exceptuada de patentabilidad". Sin embargo, esto claramente no es cierto. Las **Reivindicaciones 31-37** son dirigidas a composiciones que incluyen proteínas y / o ARN que derivan de células bacterianas, no de humanos o animales. Por ejemplo, una proteína Cas9 no es un material humano o animal. Del mismo modo, un sujeto ARN dirigido al ADN no es un material humano o animal.

Además, el pasaje citado por el Examinador afirma que "**podría**, en principio, **ser patentado**, ya que **no** sería un material que conforma el cuerpo humano ..." Por lo tanto, el pasaje citado por el Examinador de ninguna manera apoya su conclusión, y en su lugar apoya la noción de que tales reivindicaciones son elegibles para ser patentadas.

Reivindicaciones 38-60



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

El Solicitante señala que las anteriores **Reivindicaciones 38-60, nuevas Reivindicaciones 37-59, han sido modificadas** de modo a **definir las células como una línea celular.**

3. REIVINDICACIONES RELATIVAS A UN USO (art 14 D 486)

El Examinador objeto la **Reivindicación 61** porque.

"El uso de la reivindicación 61 no es patentable, de acuerdo con el art. 14. porque no definen las características esenciales del objeto de solicitud de patente, sino que usa la expresión "para su uso en un método de tratamiento terapéutico de un paciente". A diferencia de un producto o procedimiento, un uso no es patentable toda vez que no es susceptible de aplicación industrial".

R/: El solicitante **de acuerdo con las observaciones del Examinador, eliminó la Reivindicación 61.**

Por otro lado, el Solicitante procedió a **modificar el Capítulo Reivindicatorio** como sigue:

4. REIVINDICACIONES.

Todas las Reivindicaciones que están debida y completamente soportadas en la solicitud tal como fue originariamente presentada.

La **nueva Reivindicación 1** se basa en la anterior Reivindicación 1 **modificada de modo a restringir su objeto.** Específicamente, la **Reivindicación 1 ha sido modificada** de modo a citar que el contacto no es en una célula germinal o célula pluripotente de un humano o animal, y no es en una célula de un animal invertebrado in vivo, de un animal vertebrado in vivo, ni de un humano in vivo, y en el que dicho método no modifica la identidad genética de la línea germinal de



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

un ser humano. Soporte para esta modificación se puede encontrar por ejemplo en los párrafos 141 y 274-275 de la publicación de la correspondiente **PCT/US2013/032589**.

Las **nuevas Reivindicaciones 34-35** se basan en las anteriores Reivindicaciones 35-36, **modificadas** de modo a citar que el ARN de dirección a ADN **es no natural obtenido por ingeniería genética**.

Además, la **nueva Reivindicación 35** (anterior Reivindicación 36) **ha sido modificada** de modo a citar que el kit comprende (vii) (a) un polipéptido Cas9, o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9; y (b) un ARN dirigido a ADN, o un polinucleótido que codifica dicho ARN dirigido a ADN, en el que dicho ARN dirigido a ADN comprende: (i) un segmento dirigido a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y (ii) un segmento de unión a proteína que interacciona con el polipéptido Cas9 en el que el segmento de unión a proteína comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc), en donde (a) y/o (b) está liofilizado.

Las **nuevas Reivindicaciones 37-59** se basan en las anteriores reivindicaciones 38-60, **modificadas** de modo a **especificar que la célula eucariota modificada genéticamente es una línea celular eucariota modificada genéticamente**.

La **nueva Reivindicación 60** se basa en la anterior Reivindicación 62 modificada de modo a citar que (e) el ARN dirigido a ADN o el uno o más ácidos nucleicos está liofilizado; o (f) el ARN dirigido a ADN o el uno o más ácidos nucleicos está presente en una composición con uno o más seleccionados entre: un inhibidor de nucleasa, un agente tamponante, un detergente, una poliamina, un adyuvante, un



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI - ABAPI

agente humectante, un agente estabilizador, un antioxidante y un agente complejante.

Las Reivindicaciones 34 y 61 han sido eliminadas.

Las Reivindicaciones 67 y 68 son nuevas.

Las Reivindicaciones han sido reenumeradas y sus dependencias modificadas en conformidad.

5. DESCRIPCIÓN (Art. 28 y 29 D 486)

El Examinador objeto la Descripción porque:

“La descripción no divulga la invención de una manera suficientemente, clara y completa para su comprensión y para que una persona capacitada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla, puesto que las secuencias incorporadas en su totalidad mediante referencia del listado de secuencias proporcionado como archivo de texto “BERK-187WO-SeqList_ST25.txt”, no permite distinguir las secuencias específicas de la solicitud, ya que algunas secuencias contienen la letra “N”, por lo tanto, no son claras y no permiten distinguir el objeto de la solicitud del estado de la técnica. Además, dichas secuencias también pueden relacionarse con las secuencias tal cual como se encuentran en la naturaleza, teniendo en cuenta que en las posiciones donde se relaciona la letra “N” pueden reemplazarse por otra base nitrogenada que forman parte del ARN de un organismo, según lo enseñado por el solicitante “N en cada una de estas posiciones puede estar presente o ausente tal que esta región puede contener entre 12 y 80 nucleótidos. N es A, C, G, o U”, por lo cual, contienen 100% de identidad con las secuencias de la naturaleza, y al no ser posible determinar las bases nitrogenadas que representa la letra “N” la cobertura varía dependiendo del número de letras “N” que contiene la secuencia”.

R/: El solicitante **de acuerdo con las observaciones del Examinador**, procedió a **mencionar** lo siguiente:

El Examinador menciona que la **descripción no divulga suficiente, clara y completamente la invención** porque algunas secuencias en la lista de



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

secuencias incluyen Ns. Por ejemplo, el examinador afirma que la descripción "no permite distinguir las secuencias específicas de la solicitud, ya que algunas secuencias contienen la letra "N", por lo tanto, no son claras y no permiten distinguir el objeto de la solicitud del estado de la técnica".

El solicitante señala que, si bien algunas secuencias divulgadas en la lista de secuencias incluyen la letra "N", las mismas no están compuestas de Ns por completo. En otras palabras, los Ns que están presentes en secuencias tales como SEQ ID NO: 563, 564 y 566 (que son mencionados específicamente por el examinador), están acompañados por, y se adjuntan a, secuencias definidas.

Por ejemplo, la SEQ ID NO: 563 incluye una serie de Ns, seguida inmediatamente por "guuuuagagcuaugcuguuug". Un ejemplo de esta secuencia se representa como un "ARN dirigido" en la parte superior de la Figura 9 bajo el título "Emparejamientos de bases *in vivo* ..." la región 5' de esta molécula se representa en la figura como "variable 20 nt". Un experto en la materia entenderá fácilmente que esta región es el segmento de direccionamiento del ARN dirigido a ADN representado. Como se explica a lo largo de la memoria descriptiva, esta región es variable porque el usuario cambia esta secuencia de modo que se hibrida con la secuencia diana deseada del ADN diana. Por ejemplo, el párrafo 165 de la descripción cita:

"El segmento dirigido a ADN de un sujeto ARN dirigido a ADN comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia en un ADN objetivo. En otras palabras, el segmento dirigido a ADN de un sujeto ARN dirigido a ADN interacciona con un ADN diana de una manera específica de secuencia a través de hibridación (es decir, emparejamiento de



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

bases). Como tal, la secuencia de nucleótidos del segmento dirigido a ADN puede variar y determina la ubicación dentro del ADN objetivo de que el ARN dirigido a ADN y el ADN diana interactúen. El segmento dirigido a ADN de un sujeto ARN dirigido a ADN se puede modificar (por ejemplo, mediante ingeniería genética) para hibridar con cualquier secuencia deseada dentro de un ADN diana "(descripción, párrafo 165 de la publicación de la correspondiente PCT/US2013/032589).

Y el párrafo 166 de la descripción de la publicación de la correspondiente PCT/US2013/032589 establece "por ejemplo, la secuencia dirigida a ADN del segmento dirigido a ADN que es complementaria a una secuencia diana del ADN objetivo puede tener una longitud de aproximadamente 12 nucleótidos (nt) a aproximadamente 80 nt." véase también la figura 1, que ilustra claramente lo anterior.

Como otro ejemplo, algunas de las secuencias incluyen Ns como regiones enlazadoras. La descripción explica (ver, por ejemplo, los párrafos 177 y 178 de la publicación de la correspondiente PCT/US2013/032589): "un sujeto ARN dirigido a ADN de una sola molécula comprende dos tramos de nucleótidos (un ARN-dirigido y un ARN activador) que son complementarios entre sí, están unidos covalentemente por nucleótidos intermedios ("enlazadores" o "nucleótidos enlazadores"), e hibridan para formar el dúplex de ARN bicatenario (dúplex de ARNbc) del segmento de unión a proteína, dando como resultado una estructura de bucle de tallo (Figura 1b)". (descripción, párrafo 177 de la publicación de la correspondiente PCT/US2013/032589).



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI - ABAPI

"El enlazador de un ARN dirigido a ADN de una sola molécula puede tener una longitud de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos". (Descripción, párrafo 178 de la publicación de la correspondiente PCT/US2013/032589).

Los Ns que están presentes como secuencias enlazadoras en el listado de secuencias están acompañados por secuencias definidas y unidas a ellas.

Además, el Examinador toma la posición de que algunas de estas secuencias (definidas con Ns) pueden ser secuencias naturales. El solicitante señala que incluso si la parte "N" de la secuencia se produce de manera natural, las secuencias incluyen algo más que las Ns (las alineaciones del Examinador no tienen en cuenta esto). Además, el solicitante **no reivindica moléculas naturales. Una reivindicación puede incluir una molécula que se produce de forma natural** (por ejemplo, como parte de un método o composición) siempre que la **Reivindicación** como un todo no reivindique un proceso que se produce de manera natural o una composición/compuesto de origen natural. Por lo tanto, incluso **si una secuencia de la lista de secuencias se produce de manera natural**, esto **no significa que las reivindicaciones estén dirigidas a compuestos o procesos naturales.**

Por lo expresado anteriormente, el solicitante considera que las aclaraciones y modificaciones mencionadas supera todas las objeciones del Examinador. Por lo tanto, el solicitante pone a consideración del Examinador Técnico de Patentes un **NUEVO CAPITULO REIVINDICATORIO** el cual consta de sesenta y ocho (**68**) **nuevas reivindicaciones** en veintisiete folios.




MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –
2444938 - Fax (571) 2442496
E-mail: mde@mdelaw.com
MIEMBROS
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI
AAAPI – ABPI – ABAPI

Por lo anteriormente mencionado, solicito respetuosamente se proceda a **CONCEDER** la Patente de Invención titulada: **“MÉTODO Y COMPOSICIONES PARA LA MODIFICACIÓN DE ADN OBJETIVO DIRIGIDA POR ARN Y PARA LA MODULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DIRIGIDA POR ARN”** a nombre de **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, UNIVERSITY OF VIENNA, EMMANUELLE CHARPENTIER**, para las nuevas Reivindicaciones 1 a 68 inclusive.

Atentamente,



JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS
C.C. No. 19.270.955 Bogotá
T.P. No. 43.308 C.S.J.

Anexo:
Nuevas Reivindicaciones (68) en veintisiete folios.

NUEVAS REIVINDICACIONES

1. Un método de dirección y de unión de un ADN diana, de modificación de un ADN diana, de modulación de la transcripción específica del sitio a partir de un ADN diana o de modificación de un polipéptido asociado con un ADN diana, comprendiendo el método la puesta en contacto del ADN diana con un complejo obtenido por ingeniería genética y/o no natural que comprende:
- (a) un polipéptido Cas9 y
 - (b) un ARN de dirección a ADN que comprende:
 - (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana y
 - (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con dicho polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc),
- en el que dicho contacto no es en una célula germinal o célula pluripotente de un humano o animal, y no es en una célula de un animal invertebrado *in vivo*, de un animal vertebrado *in vivo*, ni de un humano *in vivo*, y en el que dicho método no modifica la identidad genética de la línea germinal de un ser humano.
2. El método de la Reivindicación 1, en el que:
- (I) el complejo comprende:
 - (a) un polipéptido Cas9; y
 - (b) un ARN de dirección a ADN de una sola molécula que comprende:
 - (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
 - (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc),
 - (II) el complejo comprende:
 - (a) un polipéptido Cas9; y
 - (b) un ARN de dirección a ADN que comprende:

- (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- 5 (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc), en el que dichos dos tramos complementarios de nucleótidos se hibridan para formar de 8 a 15 pares de bases o se hibridan para formar de 15 a 18 pares de bases; o
- 10 (III) el complejo comprende:
- (a) un polipéptido Cas9 quimérico, que comprende una proteína Cas9 modificada que tiene una actividad nucleasa reducida en comparación con un Cas9 de tipo silvestre correspondiente y que comprende un polipéptido heterólogo; y
- 15 (b) un ARN de dirección a ADN que comprende:
- (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- 20 (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9 quimérico, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc); o
- 25 (IV) el complejo comprende:
- (a) un polipéptido Cas9; y
- (b) un ARN de dirección a ADN que comprende:
- (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- 30 (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc), en el que el ARN de dirección a ADN comprende una o más de: una nucleobase modificada, una estructura principal modificada o un
- 35

enlace internucleosídico no natural, un resto de azúcar modificado, un ácido nucleico bloqueado y un ácido nucleico peptídico; o

(V) el complejo comprende:

5 (a) un polipéptido Cas9, en el que un dominio de transducción de proteínas, que facilita el recorrido del polipéptido Cas9 desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula, está unido covalentemente al extremo amino del polipéptido Cas9; y

(b) un ARN de dirección a ADN que comprende:

10 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y

15 (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc); o

(VI) el complejo comprende:

20 (a) un polipéptido Cas9, en el que un dominio de transducción de proteínas, que facilita el recorrido del polipéptido Cas9 desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula, está unido covalentemente al extremo carboxilo del polipéptido Cas9; y

(b) un ARN de dirección a ADN que comprende:

25 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y

(ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc).

30 3. El método de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, en el que dicho contacto es fuera de una célula bacteriana y fuera de una célula de arquea.

35 4. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en el que dicho contacto es en un organismo eucariota monocelular, una célula vegetal, una célula de un animal invertebrado o una célula de un animal vertebrado.

5. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en el que el polipéptido Cas9 comprende una o más mutaciones en un dominio RuvC y/o un dominio HNH.
- 5 6. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido Cas9 tiene actividad nucleasa reducida en comparación con una proteína Cas9 de tipo silvestre correspondiente.
7. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 2-6, en el que el
10 complejo comprende dicho polipéptido Cas9 quimérico, en el que el polipéptido heterólogo de dicho polipéptido Cas9 quimérico es un marcador proteico.
8. El método de la Reivindicación 7, en el que el marcador proteico se
15 selecciona del grupo que consiste en: un marcador de 6xHis, un marcador de hemaglutinina y una proteína verde fluorescente (GFP).
9. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 2-6, en el que el
complejo comprende dicho polipéptido Cas9 quimérico, en el que el polipéptido
heterólogo de dicho polipéptido Cas9 quimérico: (i) tiene actividad de modificación
20 del ADN o (ii) presenta la capacidad de aumentar o reducir la transcripción o (iii) tiene actividad enzimática que modifica un polipéptido asociado con el ADN.
10. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 2-9, en el que dicha
proteína Cas9 modificada de dicho polipéptido Cas9 quimérico no tiene
25 esencialmente actividad nucleasa.
11. El método de la Reivindicación 9 o la Reivindicación 10, en el que es:
- (i) un método de modificación del ADN diana, y el polipéptido heterólogo tiene
30 actividad modificadora del ADN seleccionada de: actividad metiltransferasa, actividad desmetilasa, actividad de reparación del ADN, actividad de daño del ADN, actividad de desaminación, actividad dismutasa, actividad de alquilación, actividad de despurinación, actividad de oxidación, actividad de formación de dímeros de pirimidina, actividad integrasa, actividad transposasa, actividad recombinasa, actividad polimerasa, actividad ligasa,
35 actividad helicasa, actividad fotoliasa y actividad glicosilasa; o
- (ii) un método de modulación de la transcripción específica del sitio dentro de

- un ADN diana, y el polipéptido heterólogo es un activador de la transcripción o un polipéptido represor de la transcripción; o
- (iii) un método de modificación de un polipéptido asociado con un ADN diana, y el polipéptido heterólogo tiene actividad enzimática que modifica un polipéptido asociado con ADN, actividad que es actividad modificadora de histonas; o
- (iv) un método de modificación de un polipéptido asociado con un ADN diana, y el polipéptido heterólogo tiene actividad enzimática que modifica un polipéptido asociado con ADN, actividad que se selecciona de: actividad metiltransferasa, actividad desmetilasa, actividad acetiltransferasa, actividad desacetilasa, actividad quinasa, actividad fosfatasa, actividad ubiquitina ligasa, actividad de desubiquitinación, actividad de adenilación, actividad de desadenilación, actividad de SUMOilación, actividad de desSUMOilación, actividad de ribosilación, actividad de desribosilación, actividad de miristoilación, actividad de desmiristoilación, actividad de glicosilación (por ejemplo, de O-GlcNAc transferasa) y actividad de desglicosilación.
12. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 2-11, en el que el ADN diana está presente en una célula bacteriana, una célula de arquea, un organismo eucariota monocelular, una célula vegetal, una célula de un animal invertebrado o una célula de un animal vertebrado.
13. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-12, en el que el contacto comprende la introducción en una célula de al menos uno de: (a) dicho polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9, o dicho polipéptido Cas9 quimérico o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9 quimérico; y (b) dicho ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN.
14. El método de la Reivindicación 13, en el que el polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9, el polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9 quimérico y/o el uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN son uno o más vectores de expresión recombinantes.
15. El método de la Reivindicación 14, en el que el uno o más vectores de

expresión recombinantes son uno o más vectores víricos.

16. El método de la Reivindicación 15, en el que uno o más vectores víricos se seleccionan del grupo que consiste en vectores del virus vacuna, del virus de la poliomielitis, retrovíricos, lentivíricos, adenovíricos, adeno-asociados y del virus del herpes simple.

17. El método de la Reivindicación 14, en el que el uno o más vectores de expresión recombinantes se seleccionan del grupo que consiste en plásmidos, cósmidos, minicírculos, fagos y vectores víricos.

18. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-17, en el que el método comprende la introducción de un polinucleótido donante en una célula.

19. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-18, en el que un dominio de transducción de proteínas se une covalentemente al extremo amino del polipéptido Cas9 o del polipéptido Cas9 quimérico, en el que dicho dominio de transducción de proteínas facilita el recorrido del polipéptido Cas9 o del polipéptido Cas9 quimérico desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula.

20. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-18, en el que un dominio de transducción de proteínas se une covalentemente al extremo carboxilo del polipéptido Cas9 o del polipéptido Cas9 quimérico, en el que dicho dominio de transducción de proteínas facilita el recorrido del polipéptido Cas9 o del polipéptido Cas9 quimérico desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula.

21. El método de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-20, en el que el ADN diana se edita a través de un mecanismo de reparación de unión de extremos no homólogos (NHEJ).

22. El método de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-20, en el que el ADN diana se edita a través de un mecanismo de reparación dirigida por homología (HDR).

23. El método de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-20, en el que la molécula de ADN diana se edita a través de la inserción de una secuencia

de un polinucleótido donante en una cadena escindida de la molécula de ADN diana.

24. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-23, en el que el ADN
5 diana es ADN cromosómico.

25. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-24, en el que dichos
dos tramos complementarios de nucleótidos se hibridan para formar de 8 a 30
10 pares de bases.

26. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-24, en el que dichos
dos tramos complementarios de nucleótidos se hibridan para formar de 8 a 15
pares de bases o se hibridan para formar de 15 a 18 pares de bases.

15 27. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-26, en el que el
porcentaje de complementariedad entre los nucleótidos que se hibridan para
formar el dúplex de ARNbc es superior al 70 %.

20 28. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-27, en el que el ARN
de dirección a ADN es un ARN de dirección a ADN de dos moléculas y comprende
dos moléculas de ARN separadas, cada una de las cuales comprende uno de los
dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar el dúplex
de ARNbc.

25 29. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-27, en el que el ARN
de dirección a ADN es un ARN de dirección a ADN de una sola molécula y
comprende una sola molécula de ARN.

30 30. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-29, en el que el ARN
de dirección a ADN:

- (i) comprende una o más de una nucleobase modificada, una estructura principal modificada o un enlace internucleosídico no natural, un resto de azúcar modificado, un ácido nucleico bloqueado y un ácido nucleico peptídico; o
- 35 (ii) comprende un enlace internucleosídico no natural que comprende uno o más de: un fosforotioato, un fosforamidato, un no fosfodiéster, un

heteroátomo, un fosforotioato quiral, un fosforoditioato, un fosfotriéster, un aminoalquilfosfotriéster, un 3'-alquilen-fosfonato, un 5'-alquilen-fosfonato, un fosfonato quiral, un fosfinato, un 3'-amino-fosforamidato, un aminoalquilfosforamidato, un fosforodiamidato, un tionofosforamidato, un tionoalquilfosfonato, un tionoalquilfosfotriéster, un selenofosfato y un boranofosfato; o

(iii) comprende uno o más de: (a) un enlace internucleosídico no natural seleccionado entre un fosforotioato, un enlace de polaridad invertida y un enlace nucleosídico abásico; (b) un ácido nucleico bloqueado (LNA); y (c) un resto de azúcar modificado seleccionado de 2'-O-metoxietilo, 2'-O-metilo y 2'-fluoro; o

(iv) comprende uno o más restos de azúcar modificados seleccionados de: 2'-O-(2-metoxietilo), 2'-dimetilaminoxietoxi, 2'-dimetilaminoetoxietoxi, 2'-O-metilo y 2'-fluoro; o

(v) comprende una nucleobase que comprende uno o más de: una 5-metilcitosina; una 5-hidroximetil-citosina; una xantina; una hipoxantina; una 2-aminoadenina; un derivado 6-metilo de adenina; un derivado 6-metilo de guanina; un derivado 2-propilo de adenina; un derivado 2-propilo de guanina; un 2-tiouracilo; una 2-tiotimina; una 2-tiocitosina; un 5-halouracilo; una 5-halocitosina; un 5-propinil-uracilo; una 5-propinil-citosina; un 6-azouracilo; una 6-azo-citosina; una 6-azo-timina; un pseudouracilo; un 4-tiouracilo; un 8-halo; un 8-amino; un 8-tiol; un 8-tioalquilo; un 8-hidroxilo; un 5-halo; un 5-bromo; un 5-trifluorometilo; un uracilo 5-sustituido; una citosina 5-sustituida; una 7-metilguanina; una 7-metiladenina; una 2-F-adenina; una 2-amino-adenina; una 8-azaguanina; una 8-azaadenina; una 7-desazaguanina; una 7-desazaadenina; una 3-desazaguanina; una 3-desazaadenina; una pirimidina tricíclica; una fenoxazina-citidina; una fenotiazina-citidina; una fenoxazina-citidina sustituida; una carbazol-citidina; una piridoindol-citidina; una 7-desaza-adenina; una 7-desazaguanosina; una 2-aminopiridina; una 2-piridona; una pirimidina 5-sustituida; una 6-azapirimidina; una purina N-2-, N-6- u O-6-sustituida; una 2-aminopropiladenina; un 5-propiniluracilo; y una 5-propinilcitosina; o

(vi) está conjugado con un resto seleccionado de: una poliamina; una poliamida; un polietilenglicol; un poliéter; un resto de colesterol; un ácido cólico; un tioéter; un tiocolesterol; una cadena alifática; un fosfolípido; un ácido acético de adamantano; un resto de palmitilo; un resto octadecilamina

5 o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol; una biotina; una fenazina; un folato; una fenantridina; una antraquinona; una acridina; una fluoresceína; una rodamina; un colorante; una cumarina; un resto que mejora la absorción, mejora la resistencia a la degradación y/o refuerza la hibridación específica de la secuencia; y un resto que mejora la absorción, la distribución, el metabolismo o la excreción.

31. Una composición que comprende un complejo obtenido por ingeniería genética y/o no natural que comprende:

10 (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9 y

(b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:

15 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana y

(ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con dicho polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc).

20

32. La composición de la Reivindicación 31, que comprende:

(I) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9; y

25 (b) un ARN de dirección a ADN de una sola molécula o un polinucleótido que codifica dicho ARN de dirección a ADN de una sola molécula, en el que dicho ARN de dirección a ADN de una sola molécula comprende:

30 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y

(ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc), en el que dichos dos tramos complementarios de nucleótidos están

35

unidos covalentemente mediante nucleótidos intermedios; o

(II) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9; y

5 (b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:

10 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana, en el que el ADN diana está presente en un organismo eucariota monocelular, una célula vegetal, una célula de un animal invertebrado o una célula de un animal vertebrado; y

15 (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc); o

20 (III) (a) un polipéptido Cas9 quimérico o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9 quimérico, en el que el polipéptido Cas9 quimérico comprende una proteína Cas9 modificada que tiene una actividad nucleasa reducida en comparación con un Cas9 de tipo silvestre correspondiente y comprende un polipéptido heterólogo; y

(b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos de ADN que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:

25 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y

30 (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc); o

(IV) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9; y

35 (b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:

(i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia

- de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- 5 (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc), en el que dichos dos tramos complementarios de nucleótidos se hibridan para formar de 8 a 15 pares de bases o se hibridan para formar de 15 a 18 pares de bases; o
- 10 (V) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9; y
- (b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:
- 15 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas
- 20 comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc), en el que el ARN de dirección a ADN comprende una o más de: una nucleobase modificada, una estructura principal modificada o un enlace internucleosídico no natural, un resto de azúcar modificado, un
- 25 ácido nucleico bloqueado o un ácido nucleico peptídico; y
- (VI) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9, en el que un dominio de transducción de proteínas, que facilita el recorrido del polipéptido Cas9 desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula, está unido covalentemente al
- 30 extremo amino del polipéptido Cas9; y
- (b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:
- (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia
- 35 de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y

- (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc); o
- 5 (VII) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9, en el que un dominio de transducción de proteínas, que facilita el recorrido del polipéptido Cas9 desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula, está unido covalentemente al extremo carboxilo del polipéptido Cas9; y
- 10 (b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:
- (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- 15 (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc).

20 33. La composición de la Reivindicación 31 o la Reivindicación 32, en la que: (1) el ARN de dirección a ADN está codificado por una o más secuencias de ADN que están cada una unida operativamente a un promotor funcional en una célula eucariota; y/o (2) el polipéptido Cas9 está codificado por una secuencia de ADN

25 que está unida operativamente a un promotor funcional en una célula eucariota.

34. Uno o más ácidos nucleicos, que comprenden:

una o más secuencias de polinucleótidos que codifican un ARN de dirección a ADN no natural obtenido por ingeniería genética, ARN de dirección a

30 ADN que comprende:

(i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana y

(ii) un segmento de unión a proteínas que se puede unir a un polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos

35 tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc);

caracterizados por uno o más de los siguientes:

(A) el ARN de dirección a ADN es un ARN de dirección de ADN de una sola molécula y dichos dos tramos complementarios de nucleótidos están unidos covalentemente mediante nucleótidos intermedios;

5 (B) la una o más secuencias de polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN están unidas operativamente a un promotor que es funcional en una célula eucariota;

(C) el ADN diana está presente en un organismo eucariota monocelular, una célula vegetal, una célula de un animal invertebrado o una célula de un animal
10 vertebrado;

(D) dichos dos tramos complementarios de nucleótidos se hibridan para formar de 8 a 15 pares de bases o se hibridan para formar de 15 a 18 pares de bases; y

(E) el uno o más ácidos nucleicos comprenden además:

15 (a) una secuencia polinucleotídica que: (i) codifica un polipéptido Cas9 e (ii) está unida operativamente a un promotor que es funcional en una célula eucariota; o

(b) una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido Cas9 unido covalentemente en su extremo amino a un dominio de transducción de proteínas que facilita el recorrido del polipéptido Cas9 desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula;
20 o

(c) una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido Cas9 unido covalentemente en su extremo carboxilo a un dominio de transducción de proteínas que facilita el recorrido del polipéptido Cas9 desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula;
25 o

(d) una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido Cas9 quimérico que comprende una proteína Cas9 modificada que tiene una actividad nucleasa reducida en comparación con un Cas9 de tipo silvestre correspondiente y que comprende un polipéptido heterólogo.
30

35. Un kit que comprende:

35 (I) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9; y

- (b) un ARN de dirección a ADN de una sola molécula o un polinucleótido que codifica dicho ARN de dirección a ADN de una sola molécula, en el que dicho ARN de dirección a ADN de una sola molécula comprende:
- 5 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas
- 10 comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc), en el que dichos dos tramos complementarios de nucleótidos están unidos covalentemente mediante nucleótidos intermedios; o
- (II) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho
- 15 polipéptido Cas9; y
- (b) un ARN de dirección a ADN no natural obtenido por ingeniería genética, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:
- 20 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana, en el que el ADN diana está presente en un organismo eucariota monocelular, una célula vegetal, una célula de un animal invertebrado o una célula de un animal vertebrado; y
- 25 (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc); o
- (III) (a) un polipéptido Cas9 quimérico o un polinucleótido que codifica dicho
- 30 polipéptido Cas9 quimérico, en el que el polipéptido Cas9 quimérico comprende una proteína Cas9 modificada que tiene una actividad nucleasa reducida en comparación con un Cas9 de tipo silvestre correspondiente y comprende un polipéptido heterólogo o (iii) tiene actividad enzimática que modifica un polipéptido asociado con ADN; y
- 35 (b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de

dirección a ADN comprende:

- 5 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc); o
- 10 (IV) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9; y
- (b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:
- 15 (i) un segmento de dirección a ADN no natural obtenido por ingeniería genética que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc),
- 20 en el que dichos dos tramos complementarios de nucleótidos se hibridan para formar de 8 a 15 pares de bases o se hibridan para formar de 15 a 18 pares de bases; o
- (V) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9; y
- 25 (b) un ARN de dirección a ADN no natural obtenido por ingeniería genética, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:
- 30 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc),
- 35

en el que el ARN de dirección a ADN comprende una o más de: una nucleobase modificada, una estructura principal modificada o un enlace internucleosídico no natural, un resto de azúcar modificado, un ácido nucleico bloqueado y un ácido nucleico peptídico; o

- 5 (VI) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9, en el que un dominio de transducción de proteínas, que facilita el recorrido del polipéptido Cas9 desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula, está unido covalentemente al extremo amino del polipéptido Cas9; y
- 10 (b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:
- 15 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc); o
- 20 (VII) (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9, en el que un dominio de transducción de proteínas, que facilita el recorrido del polipéptido Cas9 desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula, está unido covalentemente al extremo carboxilo del polipéptido Cas9; y
- 25 (b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN comprende:
- 30 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana; y
- (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc), o
- 35 (VII) (a) un polipéptido Cas9, o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9; y

(b) un ARN dirigido a ADN, o un polinucleótido que codifica dicho ARN dirigido a ADN, en el que dicho ARN dirigido a ADN comprende:
(i) un segmento dirigido a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana;
5 y
(ii) un segmento de unión a proteína que interacciona con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteína comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc),
10 en donde (a) y/o (b) está liofilizado,
en el que (a) y (b) están en el mismo recipiente o en recipientes separados.

36. El kit de la Reivindicación 35, en el que: (1) el ARN de dirección a ADN está codificado por una o más secuencias de ADN que están cada una unida
15 operativamente a un promotor funcional en una célula eucariota; y/o (2) el polipéptido Cas9 está codificado por una secuencia de ADN que está unida operativamente a un promotor funcional en una célula eucariota.

37. Una línea celular eucariota modificada genéticamente, que comprende al
20 menos uno de:

(a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9; y

(b) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos de ADN que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de
25 dirección a ADN comprende:

(i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana
y

(ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con dicho polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas
30 comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc),

en el que la línea celular eucariota modificada genéticamente está *ex vivo* o está en cultivo *in vitro*.

35

38. La línea celular eucariota modificada genéticamente de la Reivindicación 37,

que comprende uno o más de:

(1) un ARN de dirección a ADN de una sola molécula o un polinucleótido que codifica dicho ARN de dirección a ADN de una sola molécula, en el que dicho ARN de dirección a ADN de una sola molécula comprende:

- 5 (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana y
(ii) un segmento de unión a proteínas que puede interactuar con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se
10 hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc),
en el que dichos dos tramos complementarios de nucleótidos están unidos covalentemente mediante nucleótidos intermedios;

(2) un ARN de dirección a ADN, o uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, en el que dicho ARN de dirección a ADN
15 comprende:

- (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana y
(ii) un segmento de unión a proteínas que puede interactuar con el polipéptido Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas
20 comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc); y

(3) una proteína o un polinucleótido seleccionado de:

- (a) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9;
25 (b) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9, en el que un dominio de transducción de proteínas, que facilita el recorrido del polipéptido Cas9 desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula, está unido covalentemente al extremo amino del polipéptido Cas9;
30 (c) un polipéptido Cas9 o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9, en el que un dominio de transducción de proteínas, que facilita el recorrido del polipéptido Cas9 desde el citosol hasta el interior de un orgánulo de una célula, está unido covalentemente al extremo carboxilo del polipéptido Cas9; y
35 (d) un polipéptido Cas9 quimérico o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9 quimérico, en el que el polipéptido Cas9 quimérico

comprende una proteína Cas9 modificada que tiene una actividad nucleasa reducida en comparación con un Cas9 de tipo silvestre correspondiente y comprende un polipéptido heterólogo.

- 5 39. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33, el uno o más ácidos nucleicos de la Reivindicación 34, el kit de la Reivindicación 35 o la Reivindicación 36, o la línea celular eucariota modificada genéticamente de la Reivindicación 37 o la Reivindicación 38, comprendiendo dicho polipéptido Cas9 una o más mutaciones en un dominio RuvC y/o un dominio HNH.
- 10
40. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39, el uno o más ácidos nucleicos de la Reivindicación 34 o la Reivindicación 39, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39, o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-39, que
- 15 comprende el polipéptido Cas9 quimérico o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9 quimérico, en la que el polipéptido Cas9 quimérico comprende una proteína Cas9 modificada que tiene actividad nucleasa reducida en comparación con una Cas9 de tipo silvestre correspondiente y comprende un polipéptido heterólogo que es un marcador proteico.
- 20
41. La composición, el uno o más ácidos nucleicos, el kit o la línea celular eucariota modificada genéticamente de la Reivindicación 40, en los que el marcador proteico se selecciona del grupo que consiste en: un marcador de 6xHis, un marcador de hemaglutinina y una proteína verde fluorescente (GFP).
- 25
42. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-41, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-41, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-41, o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-
- 30 41, que comprende un polipéptido Cas9 quimérico o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9 quimérico, en la que el polipéptido Cas9 quimérico comprende una proteína Cas9 modificada que tiene actividad nucleasa reducida en comparación con una Cas9 de tipo silvestre correspondiente y comprende un polipéptido heterólogo que: (i) tiene actividad de modificación del ADN o (ii)
- 35 presenta la capacidad de aumentar o reducir la transcripción o (iii) tiene actividad enzimática que modifica un polipéptido asociado con el ADN.

43. La composición, el uno o más ácidos nucleicos, el kit o la línea celular eucariota modificada genéticamente de la Reivindicación 42, en los que el polipéptido heterólogo:

5 (i) tiene actividad modificadora del ADN seleccionada de: actividad metiltransferasa, actividad desmetilasa, actividad de reparación del ADN, actividad de daño del ADN, actividad de desaminación, actividad dismutasa, actividad de alquilación, actividad de despurinación, actividad de oxidación, actividad de formación de dímeros de pirimidina, actividad integrasa, actividad transposasa,
10 actividad recombinasa, actividad polimerasa, actividad ligasa, actividad helicasa, actividad fotoliasa y actividad glicosilasa; o

(ii) presenta la capacidad de aumentar o disminuir la transcripción; o

(iii) es un polipéptido activador de la transcripción o represor de la transcripción; o

15 (iv) tiene actividad enzimática que modifica un polipéptido asociado con el ADN, actividad que es actividad modificadora de histonas; o

(v) tiene actividad enzimática que modifica un polipéptido asociado con el ADN, actividad que se selecciona de: actividad metiltransferasa, actividad desmetilasa, actividad acetiltransferasa, actividad desacetilasa, actividad quinasa ,
20 actividad fosfatasa, actividad ubiquitina ligasa, actividad de desubiquitinación, actividad de adenilación, actividad de desadenilación, actividad de SUMOilación, actividad de desSUMOilación, actividad de ribosilación, actividad de desribosilación, actividad de miristoilación, actividad de desmiristoilación, actividad de glicosilación (por ejemplo, de O-GlcNAc transferasa) y actividad de
25 desglicosilación.

44. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-43, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-43, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-43 o la línea celular
30 eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-43, que comprende un polipéptido Cas9 quimérico o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9 quimérico, en la que el polipéptido Cas9 quimérico comprende una proteína Cas9 modificada que no tiene esencialmente actividad nucleasa en comparación con una Cas9 de tipo silvestre correspondiente y
35 comprende un polipéptido heterólogo.

45. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-44, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-44, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-44, o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-44, en la que el polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9, el polinucleótido que codifica dicho polipéptido Cas9 quimérico y/o el uno o más polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN son uno o más vectores de expresión recombinantes.
46. La composición, el uno o más ácidos nucleicos, el kit o la línea celular eucariota modificada genéticamente de la Reivindicación 45, en los que el uno o más vectores de expresión recombinantes son uno o más vectores víricos.
47. La composición, el uno o más ácidos nucleicos, el kit o la línea celular eucariota modificada genéticamente de la Reivindicación 46, en los que el uno o más vectores víricos se seleccionan del grupo que consiste en vectores del virus vacuna, del virus de la poliomielitis, retrovíricos, lentivíricos, adenovíricos, adeno-asociados y del virus del herpes simple.
48. La composición, el uno o más ácidos nucleicos, el kit o la línea celular eucariota modificada genéticamente de la Reivindicación 45, en los que el uno o más vectores de expresión recombinantes se seleccionan del grupo que consiste en plásmidos, cósmidos, minicírculos, fagos y vectores víricos.
49. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-48, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-48, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-48 o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-48, que comprenden además un polinucleótido donante.
50. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-49, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-49, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-49 o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-49, en los que el ADN diana es ADN cromosómico.

51. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-50, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-50, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-50 o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-50, en los que dichos dos tramos complementarios de los nucleótidos se hibridan para formar de 8 a 30 pares de bases.
52. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-50, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-50, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-50 o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-50, en los que dichos dos tramos complementarios de los nucleótidos se hibridan para formar de 8 a 15 pares de bases.
53. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-50, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-50, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-50 o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-50, en los que dichos dos tramos complementarios de los nucleótidos se hibridan para formar de 15 a 18 pares de bases.
54. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-53, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-53, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-53 o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-53 en los que el porcentaje de complementariedad entre los nucleótidos que se hibridan para formar el dúplex de ARNbc es superior al 70 %.
55. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-54, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-54, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-54 o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-54, en los que el ARN de dirección a ADN es un ARN de dirección a ADN de dos molécula y comprende dos moléculas de ARN separadas, cada una de las cuales comprende uno de los dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar el dúplex de ARNbc.

56. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-54, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-54, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-54 o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-54, en los que el ARN de dirección a ADN es un ARN de dirección a ADN de una sola molécula y comprende una sola molécula de ARN.

57. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-56, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-56, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-56 o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-56, en los que el ARN de dirección a ADN:

(i) comprende una o más de: una nucleobase modificada, una estructura principal modificada o un enlace internucleosídico no natural, un resto de azúcar modificado, un ácido nucleico bloqueado y un ácido nucleico peptídico; o

(ii) comprende un enlace internucleosídico no natural que comprende uno o más de: un fosfortioato, un fosforamidato, un no fosfodiéster, un heteroátomo, un fosfortioato quiral, un fosforoditioato, un fosfotriéster, un aminoalquilfosfotriéster, un 3'-alquilen-fosfonato, un 5'-alquilen-fosfonato, un fosfonato quiral, un fosfinato, un 3'-amino-fosforamidato, un aminoalquilfosforamidato, un fosforodiamidato, un tionofosforamidato, un tionoalquilfosfonato, un tionoalquilfosfotriéster, un selenofosfato y un boranofosfato; o

(iii) comprende uno o más de: (a) un enlace internucleosídico no natural seleccionado entre un fosfortioato, un enlace de polaridad invertida y un enlace nucleosídico abásico; (b) un ácido nucleico bloqueado (LNA); y (c) un resto de azúcar modificado seleccionado de 2'-O-metoxietilo, 2'-O-metilo y 2'-fluoro; o

(iv) comprende uno o más restos de azúcar modificados seleccionados de: 2'-O-(2-metoxietilo), 2'-dimetilaminoxietoxi, 2'-dimetilaminoetoxietoxi, 2"-O-metilo y 2'-fluoro; o

(v) comprende una nucleobase que comprende uno o más de: una 5-metilcitosina; una 5-hidroximetil-citosina; una xantina; una hipoxantina; una 2-aminoadenina; un derivado 6-metilo de adenina; un derivado 6-metilo de guanina; un derivado 2-propilo de adenina; un derivado 2-propilo de guanina; un 2-tiouracilo; una 2-tiotimina; una 2-tiocitosina; un 5-halouracilo; una 5-halocitosina; un 5-propinil-uracilo; una 5-propinil-citosina; un 6-azo-uracilo; una 6-azo-citosina;

una 6-azo-timina; un pseudouracilo; un 4-tiouracilo; un 8-halo; un 8-amino; un 8-tiol; un 8-tioalquilo; un 8-hidroxilo; un 5-halo; un 5-bromo; un 5-trifluorometilo; un uracilo 5-sustituido; una citosina 5-sustituida; una 7-metilguanina; una 7-metiladenina; una 2-F-adenina; una 2-amino-adenina; una 8-azaguanina; una 8-azaadenina; una 7-desazaguanina; una 7-desazaadenina; una 3-desazaguanina; una 3-desazaadenina; una pirimidina tricíclica; una fenoxazina-citidina; una fenotiazina-citidina; una fenoxazina-citidina sustituida; una carbazol-citidina; una piridoindol-citidina; una 7-desaza-adenina; una 7-desazaguanosina; una 2-aminopiridina; una 2-piridona; una pirimidina 5-sustituida; una 6-azapirimidina; una purina N-2-, N-6- u O-6-sustituida; una 2-aminopropiladenina; un 5-propiniluracilo; y una 5-propinilcitosina; o

(vi) está conjugado con un resto seleccionado de: una poliamina; una poliamida; un polietilenglicol; un poliéter; un resto de colesterol; un ácido cólico; un tioéter; un tiocolesterol; una cadena alifática; un fosfolípido; un ácido acético de adamantano; un resto de palmitilo; un resto octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol; una biotina; una fenazina; un folato; una fenantridina; una antraquinona; una acridina; una fluoresceína; una rodamina; un colorante; una cumarina; un resto que mejora la absorción, mejora la resistencia a la degradación y/o refuerza la hibridación específica de la secuencia; y un resto que mejora la absorción, la distribución, el metabolismo o la excreción.

58. El método de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-30, la composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-57, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-57, el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-57 o la línea celular eucariota modificada genéticamente de una cualquiera de las Reivindicaciones 37-57, en los que:

(A) el polipéptido Cas9 no es un polipéptido Cas9 de *S. thermophilus*; o

(B) el polipéptido Cas9 es un polipéptido Cas9 de *S. pyogenes*.

30

59. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 31-33 y 39-58, el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 34 y 39-58 o el kit de una cualquiera de las Reivindicaciones 35-36 y 39-58, en los que el ADN diana está presente en un organismo eucariota unicelular, una célula vegetal, una línea celular de un animal invertebrado o una línea celular de un animal vertebrado.

35

60. Un ARN de dirección a ADN obtenido por ingeniería genética y/o no natural, o uno o más ácidos nucleicos que comprenden una o más secuencias de polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN, ARN de dirección a ADN que comprende:
- 5
- (i) un segmento de dirección a ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ADN diana y
 - (ii) un segmento de unión a proteínas que interactúa con el polipéptido
- 10 Cas9, en el que el segmento de unión a proteínas comprende dos tramos complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc), en el que:
- (A) el ARN de dirección a ADN es un ARN de dirección de ADN de una sola molécula y dichos dos tramos complementarios de nucleótidos están unidos
- 15 covalentemente mediante nucleótidos intermedios; o
- (B) la una o más secuencias de polinucleótidos que codifican dicho ARN de dirección a ADN están unidas operativamente a un promotor que es funcional en una célula eucariota; o
 - (C) el ADN diana está presente en un organismo eucariota monocelular, una célula vegetal, una célula de un animal invertebrado o una célula de un animal
- 20 vertebrado; o
- (D) dichos dos tramos complementarios de nucleótidos se hibridan para formar de 8 a 15 pares de bases o se hibridan para formar de 15 a 18 pares de bases; o
- 25
- (E) el ARN dirigido a ADN o el uno o más ácidos nucleicos está liofilizado; o
 - (F) el ARN dirigido a ADN o el uno o más ácidos nucleicos está presente en una composición con uno o más seleccionados entre: un inhibidor de nucleasa, un agente tamponante, un detergente, una poliamina, un adyuvante, un agente humectante, un agente estabilizador, un antioxidante y un agente complejante; o
- 30
- (G) el ARN de dirección a ADN:
 - (a) comprende una o más de: una nucleobase modificada, una estructura principal modificada o un enlace internucleosídico no natural, un resto de azúcar modificado, un ácido nucleico bloqueado y un ácido nucleico peptídico; o
 - (b) comprende un enlace internucleosídico no natural que comprende uno o más de: un fosforotioato, un fosforamidato, un no fosfodiéster,
- 35

- un heteroátomo, un fosforotioato quirál, un fosforoditioato, un fosfotriéster, un aminoalquilfosfotriéster, un 3'-alquilen-fosfonato, un 5'-alquilen-fosfonato, un fosfonato quirál, un fosfinato, un 3'-amino-fosforamidato, un aminoalquilfosforamidato, un fosforodiamidato, un tionofosforamidato, un tionoalquilfosfonato, un tionoalquilfosfotriéster, un selenofosfato y un boranofosfato; o
- 5
- (c) comprende uno o más de: (i) un enlace internucleosídico no natural seleccionado entre un fosforotioato, un enlace de polaridad invertida y un enlace nucleosídico abásico; (ii) un ácido nucleico bloqueado (LNA); e (iii) un resto de azúcar modificado seleccionado de 2'-O-metoxietilo, 2'-O-metilo y 2'-fluoro; o
- 10
- (d) comprende uno o más restos de azúcar modificados seleccionados de: 2'-O-(2-metoxietilo), 2'-dimetilaminoxietoxi, 2'-dimetilaminoetoxietoxi, 2'-O-metilo y 2'-fluoro; o
- 15
- (e) comprende una nucleobase que comprende uno o más de: una 5-metilcitosina; una 5-hidroximetil-citosina; una xantina; una hipoxantina; una 2-aminoadenina; un derivado 6-metilo de adenina; un derivado 6-metilo de guanina; un derivado 2-propilo de adenina; un derivado 2-propilo de guanina; un 2-tiouracilo; una 2-tiotimina; una 2-tiocitosina; un 5-halouracilo; una 5-halocitosina; un 5-propiniluracilo; una 5-propinil-citosina; un 6-azo-uracilo; una 6-azo-citosina; una 6-azo-timina; un pseudouracilo; un 4-tiouracilo; un 8-halo; un 8-amino; un 8-tiol; un 8-tioalquilo; un 8-hidroxilo; un 5-halo; un 5-bromo; un 5-trifluorometilo; un uracilo 5-sustituido; una citosina 5-sustituida; una 7-metilguanina; una 7-metiladenina; una 2-F-adenina; una 2-amino-adenina; una 8-azaguanina; una 8-azaadenina; una 7-desazaguanina; una 7-desazaadenina; una 3-desazaguanina; una 3-desazaadenina; una pirimidina tricíclica; una fenoxazina-citidina; una fenotiazina-citidina; una fenoxazina-citidina sustituida; una carbazol-citidina; una piridoindol-citidina; una 7-desaza-adenina; una 7-desazaguanosina; una 2-aminopiridina; una 2-piridona; una pirimidina 5-sustituida; una 6-azapirimidina; una purina N-2-, N-6- u O-6-sustituida; una 2-aminopropiladenina; un 5-propiniluracilo; y una 5-propinilcitosina; o
- 20
- 25
- 30
- 35
- (f) está conjugado con un resto seleccionado de: una poliamina; una poliamida; un polietilenglicol; un poliéter; un resto de colesterol; un

- ácido cólico; un tioéter; un tiocolesterol; una cadena alifática; un fosfolípido; un ácido acético de adamantano; un resto de palmitilo; un resto octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol; una biotina; una fenazina; un folato; una fenantridina; una antraquinona; una acridina; una fluoresceína; una rodamina; un colorante; una cumarina; un resto que mejora la absorción, mejora la resistencia a la degradación y/o refuerza la hibridación específica de la secuencia; y un resto que mejora la absorción, la distribución, el metabolismo o la excreción.
- 5
- 10
61. El ARN de dirección a ADN o el uno o más ácidos nucleicos de la Reivindicación 60, en los que el uno o más ácidos nucleicos son uno o más vectores de expresión recombinantes.
- 15
62. El ARN de dirección a ADN o el uno o más ácidos nucleicos de la Reivindicación 61, en los que el uno o más vectores de expresión recombinantes son uno o más vectores víricos.
63. El ARN de dirección a ADN o el uno o más ácidos nucleicos de la Reivindicación 62, en los que uno o más vectores víricos se seleccionan del grupo que consiste en vectores del virus vacuna, del virus de la poliomielitis, retrovíricos, lentivíricos, adenovíricos, adeno-asociados y del virus del herpes simple.
- 20
64. El ARN de dirección a ADN o el uno o más ácidos nucleicos de la Reivindicación 61, en los que el uno o más vectores de expresión recombinantes se seleccionan del grupo que consiste en plásmidos, cósmidos, minicírculos, fagos y vectores víricos.
- 25
65. El ARN de dirección a ADN o el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 60-64, en los que el porcentaje de complementariedad entre los nucleótidos que se hibridan para formar el dúplex de ARNbc es superior al 70 %.
- 30
66. El ARN de dirección a ADN o el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 60-65, en los que el ARN de dirección a ADN es un ARN de dirección a ADN de dos moléculas y comprende dos moléculas de ARN separadas, cada una de las cuales comprende uno de los dos tramos
- 35

complementarios de nucleótidos que se hibridan para formar el dúplex de ARNbc.

67. El ARN dirigido a ADN o uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 60-65, en el que el ARN dirigido a ADN es un ARN dirigido a ADN de molécula única y dichos dos tramos complementarios de nucleótidos están unidos covalentemente por nucleótidos intermedios.

68. El ARN dirigido a ADN o el uno o más ácidos nucleicos de una cualquiera de las Reivindicaciones 60-67, en el que el ARN dirigido a ADN o el uno o más ácidos nucleicos es parte de una composición liofilizada.