

MÉTODO PARA TRATAR DISTROFIA MUSCULAR POR DIRECCIONAMIENTO DEL GEN DMPK

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos N.º 62/853.373, presentada el 28 de mayo de 2019, y la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos N.º 63/025.417, presentada el 15 de mayo de 2020, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a métodos para tratar la distrofia muscular dirigiéndose al gen de la proteína quinasa de miotonina humana (DMPK; proteína quinasa de distrofia miotónica) y similares. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para tratar o prevenir la distrofia muscular reprimiendo la expresión del gen DMPK humano mediante el uso de un ARN guía dirigido a una secuencia particular del gen DMPK humano y una proteína de fusión de un represor transcripcional y una proteína efectora CRISPR (repetición palindrómica corta agrupada regularmente espaciada) y similares.

DISCUSIÓN DE LOS ANTECEDENTES

La distrofia muscular es un término genérico para enfermedades hereditarias asociadas con atrofia muscular progresiva y debilidad muscular. Incluso hoy, no existe un medicamento terapéutico fundamental efectivo para la distrofia muscular, y solo se realizan tratamientos

sintomáticos. Entre las distrofias musculares, la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) es causada por mutaciones en el gen DMPK.

DM1 es una enfermedad genética autosómica dominante causada por el alargamiento de las repeticiones CTG en la región no traducida 3' (UTR 3') del gen DMPK y es un tipo de enfermedad de repetición de triplete. Se ha informado que, en DM1, el ARN que contiene una repetición de CUG expandida aísla las proteínas de unión de repetición de CUG tales como MBNL (tipo Muscleblind) de dianas de ARN endógenos, causando patrones de empalme aberrantes, cambios en la estabilidad/localización de ARN y similares. Estos hallazgos sugieren que el silenciamiento de loci repetidos expandidos tiene valor terapéutico, y se utilizan diversos enfoques como oligonucleótidos antisentido, ARN pequeño, moléculas pequeñas y similares para silenciar el ARN tóxico (véase Pinto B et al., Mol Cell. 2017, 2 de noviembre de 2017, 68 (3): 479-490, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad).

Por ejemplo, Jauvin et al. trataron ratones DMSXL, que es un modelo de ratón de DM1, con un oligonucleótido antisentido (ASO) dirigido a 3' UTR del gen DMPK, y mostró que el nivel de ARNm de DMPK disminuyó, los agregados de ARN nuclear (focos de ARN) disminuyeron y la fuerza muscular aumentó, mientras que no se detectó toxicidad aparente (véase Jauvin D et al., Mol Ther Nucleic Acids. 2017 Jun 16, 7: 465-474, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad).

El documento WO2018/002812 describe un método para editar un gen DMPK en una célula mediante la edición del genoma, por ejemplo, usando el sistema CRISPR/Cas9, que puede usarse para tratar una afección o trastorno relacionado con

DMPK tal como DM1 (véase el documento WO2018/002812, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad).

Pinto et al. y Batra et al. demostraron la posibilidad de la aplicación de Cas9 desactivada/nucleasa muerta (dCas9) al tratamiento de DM1. Para ser específicos, Pinto et al. combinaron dCas9 y la región de repetición de gARN a CTG y mostraron que dCas9 bloquea efectivamente la transcripción de la repetición de microsatélites expandida, por lo que los fenotipos característicos de DM1, que se deben a la expansión repetida, pueden mejorarse *in vitro* e *in vivo* (en HSA^{LR}mouse, que es un modelo de ratón de DM1) (véase Pinto B et al., Mol Cell. 2017 Nov 2, 68 (3): 479-490, que se incorpora en el presente documento aquí como referencia en su totalidad). Por otro lado, Batra et al. mostraron que una combinación de dCas9 fusionada con ARN endonucleasa y ARNg para la región de repetición CUG de ARNm de DMPK puede reducir el nivel de ARN de expansión repetida CUG y mejorar la anomalía de empalme en las células de pacientes con DM1 (véase Batra R et al., Cell. 2017 agosto 24, 170 (5): 899-912, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad).

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos métodos terapéuticos para la distrofia muscular (particularmente DM1).

Es otro objeto de la presente invención proporcionar agentes novedosos que sean útiles para tratar la distrofia muscular.

Estos y otros objetos, que serán evidentes durante la siguiente descripción detallada, se han logrado mediante el

descubrimiento de los inventores de que la expresión del gen DMPK humano puede ser fuertemente suprimida usando un ARN guía dirigido a una secuencia particular del gen DMPK humano (ID del gen: 1760) y una proteína de fusión de un represor transcripcional y una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas. En base a estos hallazgos, los presentes inventores han completado la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona lo siguiente:

(1) Un polinucleótido que comprende las siguientes secuencias de bases:

(a) una secuencia de bases que codifica una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, y

(b) una secuencia de bases que codifica un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano.

(2) El polinucleótido del punto (1) mencionado con anterioridad, que comprende las siguientes secuencias de bases:

(a) una secuencia de bases que codifica una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, y

(b) una secuencia de bases que codifica un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO:

91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano.

(3) El polinucleótido del punto (1) o (2) mencionado con anterioridad, que comprende las siguientes secuencias de bases:

(a) una secuencia de bases que codifica una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, y

(b) una secuencia de bases que codifica un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 111 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano.

(4) El polinucleótido del punto (1) mencionado con anterioridad, en donde la secuencia de bases que codifica el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID

NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119, en donde se deletan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases.

(5) El polinucleótido de cualquiera de los puntos (1) a (4) mencionados con anterioridad, que comprende al menos dos secuencias de bases que codifican los ARN guía, en donde las al menos dos secuencias de bases son diferentes.

(6) El polinucleótido de cualquiera de los puntos (1) a (5) mencionados con anterioridad, en el que el represor transcripcional se selecciona del grupo KRAB, MeCP2, SIN3A, HDT1, MBD2B, NIPPI1 y HP1A.

(7) El polinucleótido del punto (6) mencionado con anterioridad, en el que el represor transcripcional es KRAB.

(8) El polinucleótido de cualquiera de los puntos (1) a (7) mencionados con anterioridad, en el que la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dCas9.

(9) El polinucleótido del punto (8) mencionado con anterioridad, en donde el dCas9 se deriva de *Staphylococcus aureus*.

(10) El polinucleótido de cualquiera de los puntos (1) a (9) mencionados con anterioridad, que comprende además una secuencia promotora para la secuencia de bases que codifica el ARN guía y/o una secuencia promotora para la secuencia de bases que codifica la proteína de fusión de la nucleasa deficiente en la proteína efectora CRISPR y el represor transcripcional.

(11) El polinucleótido del punto (10) mencionado con anterioridad, en el que la secuencia promotora para la secuencia de bases que codifica el ARN guía se selecciona del grupo promotor U6, promotor SNR6, promotor SNR52,

promotor SCR1, promotor RPR1, promotor U3 y promotor H1.

(12) El polinucleótido del punto (11) mencionado con anterioridad, en el que la secuencia promotora para la secuencia de bases que codifica el ARN guía es el promotor U6.

(13) El polinucleótido de cualquiera de los puntos (10) a (12) mencionados con anterioridad, en el que la secuencia promotora para la secuencia de bases que codifica la proteína de fusión de la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasa y el represor transcripcional es un promotor ubicuo o un promotor muscular específico.

(14) El polinucleótido del punto (13) mencionado con anterioridad, en el que el promotor ubicuo se selecciona del grupo promotor EFS, promotor CMV y promotor CAG.

(15) El polinucleótido del punto (13) mencionado con anterioridad, en el que el promotor específico del músculo se selecciona del promotor del grupo CK8, el promotor de la minasina de la quinasa de cadena pesada (MHCK), el promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), el promotor sintético C5-12 (Syn) y promotor Des.

(16) El polinucleótido del punto (15) mencionado con anterioridad, en el que el promotor específico del músculo es el promotor CK8.

(17) El polinucleótido de cualquiera de los puntos (10) a (16) mencionados con anterioridad, en donde la secuencia de bases que codifica el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, o SEQ ID NO: 99, o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, o SEQ ID NO: 99 en el que se deleccionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases, el represor transcripcional es KRAB,

la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dCas9 derivada de *Staphylococcus aureus*,
la secuencia promotora para la secuencia de bases que codifica el ARN guía es el promotor U6, y
la secuencia promotora para la secuencia de bases que codifica la proteína de fusión de la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y el represor transcripcional es el promotor CK8.

(18) El polinucleótido del punto (17) mencionado con anterioridad,
en donde la secuencia de bases que codifica el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 83, o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 83 en la cual se deletan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases.

(19) Un vector que comprende un polinucleótido de cualquiera de los puntos (1) a (18) mencionados con anterioridad.

(20) El vector del punto (19) mencionado con anterioridad, en el que el vector es un vector plasmídico o un vector viral.

(21) El vector del punto (20) mencionado con anterioridad, en el que el vector viral se selecciona del grupo de vectores de virus adenoasociados (AAV), vectores de adenovirus y vectores de lentivirus.

(22) El vector del punto (21) mencionado con anterioridad, en el que el vector AAV se selecciona del grupo AAV1, AAV2, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, Anc80, AAV₅₈₇MTP, AAV₅₈₈MTP, AAV-B1, AAVM41 y AAVrh74.

(23) El vector del punto (22), en el que el vector AAV es AAV9.

(24) Una composición farmacéutica que comprende un

polinucleótido de cualquiera de los puntos (1) a (18) mencionados con anterioridad o un vector de cualquiera de los puntos (19) a (23) mencionados con anterioridad.

(25) La composición farmacéutica del punto (24) mencionado con anterioridad para tratar o prevenir la distrofia miotónica tipo 1.

(26) Un método para tratar o prevenir la distrofia miotónica tipo 1, que comprende administrar un polinucleótido de cualquiera de los puntos (1) a (18) mencionados con anterioridad, o un vector de cualquiera de los puntos (19) a (23) mencionados con anterioridad, a un sujeto que lo necesite.

(27) Uso de un polinucleótido de cualquiera de los puntos (1) a (18) mencionados con anterioridad, o un vector de cualquiera de los puntos (19) a (23) mencionados con anterioridad para el tratamiento o prevención de la distrofia miotónica tipo 1.

(28) Uso de un polinucleótido de cualquiera de los puntos (1) a (18) mencionados con anterioridad, o un vector de cualquiera de los puntos (19) a (23) mencionados con anterioridad en la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento o profilaxis de la distrofia miotónica tipo 1.

(29) Una ribonucleoproteína que comprende lo siguiente:
(c) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, y
(d) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la

expresión del gen DMPK humano.

(30) La ribonucleoproteína del punto (29) mencionado con anterioridad, que comprende lo siguiente:

(c) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, y

(d) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano.

(31) La ribonucleoproteína de los puntos (29) o (30) mencionados con anterioridad, que comprende lo siguiente:

(c) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, y

(d) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 109, o SEQ ID NO: 111 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano.

(32) La ribonucleoproteína del punto (29) mencionado con anterioridad, en la que el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO:

184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases.

(33) La ribonucleoproteína de cualquiera de los puntos (29) a (32) mencionados con anterioridad, en donde el represor transcripcional se selecciona del grupo KRAB, MeCP2, SIN3A, HDT1, MBD2B, NIPP1 y HP1A.

(34) La ribonucleoproteína de cualquiera de los puntos (29) a (33) mencionados con anterioridad, en donde el represor transcripcional es KRAB.

(35) La ribonucleoproteína de cualquiera de los puntos (29) a (34) mencionados con anterioridad, en donde la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasa es dCas9.

(36) La ribonucleoproteína del punto (35) mencionado con anterioridad, en donde el dCas9 se deriva de *Staphylococcus aureus*.

(37) La ribonucleoproteína de cualquiera de los puntos (29) a (36), en donde el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, o SEQ ID NO: 177, o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, o SEQ ID NO: 177 en las que se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases, en donde el represor transcripcional es KRAB, y

en donde la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dCas9 derivada de *Staphylococcus aureus*.

(38) La ribonucleoproteína del punto (37), en la que el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 171, o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 171, en donde se deleccionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases.

(39) Una composición o kit para suprimir una expresión del gen DMPK humano, que comprende lo siguiente:

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y

(f) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, o un polinucleótido que codifica el ARN guía.

(40) La composición o kit del punto (39) antes mencionado, que comprende lo siguiente:

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y

(f) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en

la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, o un polinucleótido codificando la guía ARN.

(41) La composición o kit de los puntos (39) o (40) mencionados con anterioridad, que comprende lo siguiente:

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y

(f) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 109, o SEQ ID NO: 111 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, o un polinucleótido que codifica el ARN guía.

(42) La composición o kit del punto (39) mencionado con anterioridad, en donde el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO:

186, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases.

(43) La composición o kit de los puntos (39) a (42) mencionados con anterioridad, que comprende al menos dos ARN guía diferentes, o un polinucleótido que codifica al menos dos ARN guía diferentes, o al menos dos polinucleótidos que codifican los ARN guía, en donde los al menos dos polinucleótidos son diferentes.

(44) La composición o kit de cualquiera de los puntos (39) a (43) mencionados con anterioridad, en donde el represor transcripcional se selecciona del grupo KRAB, MeCP2, SIN3A, HDT1, MBD2B, NIPP1 y HP1A.

(45) La composición o kit del mencionado con anterioridad (44), en el que el represor transcripcional es KRAB.

(46) La composición o kit de cualquiera de los puntos (39) a (45) mencionados con anterioridad, en donde la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dCas9.

(47) La composición o kit del punto (46) mencionado con anterioridad, en donde el dCas9 se deriva de *Staphylococcus aureus*.

(48) La composición o kit de cualquiera de los puntos (39) a (47) mencionados con anterioridad, en donde la composición o kit comprende un polinucleótido que codifica la proteína de fusión y un polinucleótido que codifica el ARN guía y en donde el polinucleótido que codifica la proteína de fusión comprende además una secuencia promotora para la proteína de fusión y/o el polinucleótido que codifica el ARN guía comprende además una secuencia promotora para el ARN guía.

(49) La composición o kit del mencionado con anterioridad (48), en el que la secuencia promotora para el

ARN guía se selecciona del promotor del grupo U6, promotor SNR6, promotor SNR52, promotor SCR1, promotor RPR1, promotor U3 y promotor H1.

(50) La composición o kit del punto (48) mencionado con anterioridad, en donde la secuencia promotora para la proteína de fusión es un promotor ubicuo o un promotor específico del músculo.

(51) La composición o kit del punto (50) mencionado con anterioridad, en donde el promotor ubicuo se selecciona del grupo promotor EFS, promotor CMV y promotor CAG.

(52) La composición o kit del punto (50) mencionado con anterioridad, en el que el promotor específico del músculo se selecciona del promotor del grupo CK8, promotor de la miosina de la quinasa de cadena pesada (MHCK), promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), promotor sintético C5-12 (Syn) y promotor Des.

(53) La composición o kit de cualquiera de los puntos (48) a (52) mencionados con anterioridad, en donde el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, o SEQ ID NO: 177, o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, o SEQ ID NO: 177 en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases, en donde el represor transcripcional es KRAB, en donde la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dCas9 derivada de *Staphylococcus aureus*, en donde la secuencia promotora para el ARN guía es el promotor U6, y en donde la secuencia promotora para la proteína de fusión es el promotor CK8.

(54) La composición o kit del punto (53) mencionado con anterioridad, en el que el ARN guía comprende la secuencia

de bases establecida en la SEQ ID NO: 171, o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 171, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases.

(55) Un método para tratar o prevenir la distrofia miotónica tipo 1, que comprende un paso de administrar los siguientes (e) y (f):

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y

(f) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, o un polinucleótido que codifica el ARN guía.

(56) El método del punto (55) mencionado con anterioridad, que comprende una etapa de administración de los siguiente (e) y (f):

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y

(f) un ARN guía que se dirige a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano o un polinucleótido que codifica el ARN guía.

(57) El método de los puntos (55) o (56) mencionados con anterioridad, que comprende una etapa de administración de los siguientes (e) y (f):

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y

(f) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 109, o SEQ ID NO: 111 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, o un polinucleótido que codifica el ARN guía.

(58) El método del punto (55) mencionado con anterioridad, en donde el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan

1 a 3 bases.

(59) El método de los puntos (55) a (58) mencionados con anterioridad, que comprende administrar al menos dos ARN guía diferentes, o un polinucleótido que codifica al menos dos ARN guía diferentes, o al menos dos polinucleótidos que codifican los ARN guía, en donde al menos dos polinucleótidos son diferentes.

(60) El método de los puntos (55) a (59) mencionados con anterioridad, en el que el represor transcripcional se selecciona del grupo KRAB, MeCP2, SIN3A, HDT1, MBD2B, NIPPI1 y HP1A.

(61) El método del (60) mencionado con anterioridad, en el que el represor transcripcional es KRAB.

(62) El método de cualquiera de los puntos (55) a (61) mencionados con anterioridad, en el que la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dCas9.

(63) El método del (62) mencionado con anterioridad, en donde el dCas9 se deriva de *Staphylococcus aureus*.

(64) El método de cualquiera de los puntos (55) a (63) mencionados con anterioridad, en donde el método comprende administrar un polinucleótido que codifica la proteína de fusión y un polinucleótido que codifica el ARN guía y en donde el polinucleótido que codifica la proteína de fusión comprende además una secuencia promotora para la proteína de fusión y/o el polinucleótido que codifica el ARN guía comprende además una secuencia promotora para el ARN guía.

(65) El método del punto (64) mencionado con anterioridad, en el que la secuencia promotora para el ARN guía se selecciona del promotor del grupo U6, el promotor SNR6, el promotor SNR52, el promotor SCR1, el promotor RPR1, el promotor U3 y el promotor H1.

(66) El método del punto (64) mencionado con anterioridad, en el que la secuencia promotora para la proteína de fusión es un promotor ubicuo o un promotor específico del músculo.

(67) El método del punto (66) mencionado con anterioridad, en el que el promotor ubicuo se selecciona del grupo promotor EFS, promotor CMV y promotor CAG.

(68) El método del punto (66) mencionado con anterioridad, en el que el promotor específico del músculo se selecciona del promotor del grupo CK8, promotor de la miosina quinasa de cadena pesada (MHCK), promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), promotor sintético C5-12 (Syn) y promotor Des.

(69) El método de cualquiera de los puntos (64) a (68) mencionados con anterioridad, en el que el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, o SEQ ID NO: 177, o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, o SEQ ID NO: 177 en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases, en donde el represor transcripcional es KRAB, en donde la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dCas9 derivada de *Staphylococcus aureus*, en donde la secuencia promotora para el ARN guía es el promotor U6, y en donde la secuencia promotora para la proteína de fusión es el promotor CK8.

(70) El método del punto (69) mencionado con anterioridad, en el que el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 171, o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 171, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases.

(71) Uso de

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y

(f) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, o un polinucleótido que codifica el ARN guía en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de la distrofia miotónica tipo 1.

(72) El uso de los siguientes (e) y (f) del punto (71) mencionado con anterioridad:

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y

(f) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, o un polinucleótido codificando la guía ARN en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de la distrofia miotónica tipo 1.

(73) El uso de los siguientes (e) y (f) de los puntos (71) o (72) mencionados con anterioridad:

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y
(f) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 111 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, o un polinucleótido que codifica el ARN guía
en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de la distrofia miotónica tipo 1.

(74) El uso del punto (71) mencionado con anterioridad, en donde el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases.

(75) El uso de los puntos (71) a (74) mencionados con anterioridad, que comprende el uso de al menos dos ARN guía diferentes, o un polinucleótido que codifica al menos dos ARN guía diferentes, o al menos dos polinucleótidos que codifican los ARN guía, en donde los al menos dos polinucleótidos son diferentes.

(76) El uso de los puntos (71) a (75) mencionados con anterioridad, en los que el represor transcripcional se selecciona del grupo KRAB, MeCP2, SIN3A, HDT1, MBD2B, NIPP1 y HP1A.

(77) El uso del punto (76) mencionado con anterioridad, en el que el represor transcripcional es KRAB.

(78) El uso de cualquiera de los puntos (71) a (77) mencionados con anterioridad, en donde la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dCas9.

(79) El uso del punto (78) mencionado con anterioridad, en donde el dCas9 se deriva de *Staphylococcus aureus*.

(80) El uso de cualquiera de los puntos (71) a (79) mencionados con anterioridad, en donde el uso comprende el uso de un polinucleótido que codifica la proteína de fusión y el uso de un polinucleótido que codifica el ARN guía y en donde el polinucleótido que codifica la proteína de fusión comprende además una secuencia promotora para la proteína de fusión y/o el polinucleótido que codifica el ARN guía comprende además una secuencia promotora para el ARN guía.

(81) El uso del punto (80) mencionado con anterioridad, en el que la secuencia promotora para el ARN guía se selecciona del promotor del grupo U6, el promotor SNR6, el promotor SNR52, el promotor SCR1, el promotor RPR1, el promotor U3 y el promotor H1.

(82) El uso del punto (80) mencionado con anterioridad,

en el que la secuencia promotora para la proteína de fusión es un promotor ubicuo o un promotor específico del músculo.

(83) El uso del punto (82) mencionado con anterioridad, en el que el promotor ubicuo se selecciona del grupo promotor EFS, promotor CMV y promotor CAG.

(84) El uso del punto (82) mencionado con anterioridad, en el que el promotor específico del músculo se selecciona del promotor del grupo CK8, el promotor de la quinasa de cadena pesada de miosina (MHCK), el promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), el promotor sintético C5-12 (Syn) y promotor Des.

(85) El uso de los puntos (80) a (84) mencionados con anterioridad, en donde el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, o SEQ ID NO: 177, o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, o SEQ ID NO: 177, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases, en donde el represor transcripcional es KRAB, en donde la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dCas9 derivada de *Staphylococcus aureus*, en donde la secuencia promotora para el ARN guía es el promotor U6, y en donde la secuencia promotora para la proteína de fusión es el promotor CK8.

(86) El uso del punto (85) mencionado con anterioridad, en el que el ARN guía comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 171, o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 171, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases.

EFFECTO DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, la expresión del gen DMPK humano puede suprimirse y, en consecuencia, se espera que la presente invención pueda tratar y/o prevenir la DM1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Una apreciación más completa de la invención y muchas de las ventajas que conlleva se obtendrán fácilmente a medida que ella se comprenda mejor con referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considere en relación con los dibujos adjuntos, en los que:

La Fig. 1 muestra las posiciones de las secuencias de direccionamiento establecidas en las SEQ ID NO: 4 a 126, en las que el recuadro negro muestra la posición de la secuencia de direccionamiento que mostró una reducción no menor del 50% en la expresión del gen DMPK humano.

La Fig. 2 muestra los resultados de la acción supresora de la expresión en el gen DMPK humano evaluado usando dSaCas9-KRAB y ARNsg que comprende ARNcr codificado por la secuencia de direccionamiento establecida en las SEQ ID NOs: 4 a 126, respectivamente. El eje horizontal muestra el ARNg que comprende el ARNc codificado por cada secuencia de selección, el eje vertical muestra la proporción del nivel de expresión del gen DMPK cuando se usa cada ARNg al nivel de expresión (100%) del gen DMPK cuando se usa el ARNg de control, y la barra de error muestra la desviación estándar.

La Fig. 3 muestra la relación entre las posiciones de las secuencias de direccionamiento establecidas en las SEQ ID NO: 4 a 126 y el nivel de expresión del gen DMPK humano cuando la expresión del gen DMPK humano se controló usando dSaCas9-KRAB y ARNsg que comprende ARNcr codificado por las secuencias de orientación, respectivamente.

La Fig. 4 muestra la regulación negativa de DMPK en células musculares humanas.

La Fig. 5 muestra que AAV9-695 suprimió la expresión de DMPK en ratones DMSXL (A; Tibialis Anterior, B; Corazón, C; Hígado).

La Fig. 6 muestra que AAV9-245 suprimió la expresión de DMPK en ratones DMSXL (A; Tibialis Anterior, B; Corazón, C; Hígado).

La Fig. 7 muestra que AAV9-257 suprimió la expresión de DMPK en ratones DMSXL (A; Tibialis Anterior, B; Corazón, C; Hígado).

La Fig. 8 muestra que AAV9-695 mejoró la formación de focos de ARN en ratones DMSXL.

La Fig. 9 muestra la supresión de la expresión del gen DMPK en células iDM que expresan ARNsg hDMPK.

La Fig. 10 muestra la mejora de la formación de focos de ARN en células iDM que expresan ARNsg de hDMPK (A; Imágenes típicas de células iDM-695 y células iDM-Ctrl, B; Las proporciones de núcleos positivos de focos de ARN en cada célula).

La Fig. 11 muestra la mejora de los defectos de empalme en células iDM que expresan ARNsg de hDMPK (A; Imágenes de gel y patrones de exón de los genes, B; Las proporciones de productos empalmados normalmente).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

1. Polinucleótido

La presente invención proporciona un polinucleótido que comprende las siguientes secuencias de bases (de aquí en adelante a veces también denominadas "el polinucleótido de la presente invención"):

(a) una secuencia de bases que codifica una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, y

(b) una secuencia de bases que codifica un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos (es decir, 18 a 24 nucleótidos contiguos) de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano.

El polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula deseada y se transcribe para producir una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, y un ARN guía dirigido a una región particular de la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano. Estas proteínas de fusión y ARN guía forman un complejo (en adelante, el complejo se denomina a veces "ribonucleoproteína; RNP") y actúan cooperativamente en la región particular mencionada con anterioridad, reprimiendo así la transcripción del gen DMPK humano. En una forma de realización de la presente invención, la expresión del gen DMPK humano puede suprimirse, por ejemplo, no menos de aproximadamente el 40%, no menos de aproximadamente el 50%, no menos de aproximadamente el 60%, no menos de aproximadamente el 70%, no menos de aproximadamente el 75%, no menos de aproximadamente el 80%, no menos de aproximadamente el 85%, no menos de aproximadamente el 90%, no menos de aproximadamente el 95% o aproximadamente el 100%.

(1) Definición

En la presente memoria descriptiva, "la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano" significa cualquier región en la que la expresión del gen DMPK humano puede ser reprimida uniendo RNP a esa región. Es decir, la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano puede existir en cualquier región, como la región promotora, la región potenciadora, el intrón, el exón del gen DMPK humano y los genes vecinos del gen DMPK humano (por ejemplo, DMWD humano (locus DM1, WD que contiene el gen), siempre que la expresión del gen DMPK humano sea reprimida por la unión de RNP. En la presente memoria descriptiva, cuando la secuencia reguladora de la expresión muestra la región reguladora de la expresión, la región reguladora de la expresión incluye conceptualmente tanto la secuencia de la cadena sentido como la secuencia de la cadena antisentido.

En la presente invención, una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional es reclutada por un ARN guía en una región particular en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano. En la presente especificación, la "guía de ARN dirigida..." significa una "guía de ARN que recluta una proteína de fusión en...".

En la presente especificación, el "ARN guía (que también se denominará "ARNg") es un ARN que comprende un ARN CRISPR específico del genoma (que se denominará "ARNcr"). El ARNcr es un ARN que se une a una secuencia complementaria de una secuencia dirigida (descrita más adelante). Cuando se usa Cpf1 como la proteína efectora CRISPR, el "ARN guía" se refiere a un ARN que comprende un ARN que consiste en ARNcr y una secuencia específica unida a su terminal 5' (por ejemplo, una secuencia de ARN establecida en la SEQ ID NO: 138 en el caso de FnCpf1). Cuando se usa Cas9 como la proteína

efectora CRISPR, el "ARN guía" se refiere a un ARN quimera (que se denominará "ARN guía único (ARNsg)") que comprende ARNcr y ARNc de trans-activación unido a su terminal 3' (para ser referido como "ARNtracr") (ver, por ejemplo, Zhang F. et al., Hum Mol Genet. 2014, 15 de septiembre; 23 (R1): R40-6 y Zetsche B. et al., Cell. 2015 Oct 22; 163 (3): 759-71, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad).

En la presente memoria descriptiva, una secuencia complementaria a la secuencia a la que se une el ARNcr en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano se denomina "secuencia de direccionamiento". Es decir, en la presente memoria descriptiva, la "secuencia de direccionamiento" es una secuencia de ADN presente en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano y adyacente a PAM (motivo adyacente protoespaciador). PAM es adyacente al lado 5' de la secuencia de orientación cuando Cpf1 se usa como la proteína efectora CRISPR. PAM es adyacente al lado 3' de la secuencia de selección cuando Cas9 se usa como la proteína efectora CRISPR. La secuencia de direccionamiento puede estar presente en el lado de la secuencia de hebra sentido o en el lado de la secuencia de hebra antisentido de la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano (véase, por ejemplo, el mencionado Zhang F. et al., Hum Mol Genet. 2014 Sep 15; 23 (R1): R40-6 y Zetsche B. et al., Cell. 22 de octubre de 2015; 163 (3): 759-71, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad).

(2) Proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasa

En la presente invención, usando una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas, se recluta un represor

transcripcional fusionado a la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano. La proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas (de aquí en adelante en ocasiones denominada simplemente "proteína efectora CRISPR") para usar en la presente invención no está particularmente limitada siempre que forme un complejo con ARNg y se reclute en la región reguladora de la expresión del gen humano DMPK. Por ejemplo, puede incluirse Cas9 deficiente en nucleasas (en adelante, a veces también denominado "dCas9") o Cpf1 deficientes en nucleasas (en adelante, en ocasiones denominadas también "dCpf1").

Los ejemplos de dCas9 mencionados con anterioridad incluyen, pero sin limitación, una variante deficiente en nucleasas de Cas9 derivado de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9; secuencia PAM: NGG (N es A, G, T o C, en adelante igual)), *Streptococcus thermophilus* derivado Cas9 (St1Cas9; secuencia PAM: NNAGAAW (W es A o T, en adelante igual), St3Cas9; secuencia PAM: NGGNG), Cas9 derivado de *Neisseria meningitidis* (NmCas9; secuencia PAM: NNNNGATT), o Staphylococ Cas9 derivado (SaCas9; secuencia PAM: NNGRRT (R es A o G, en adelante igual)) y similares (ver, por ejemplo, Nishimasu et al., Cell. 2014 27 de febrero; 156 (5): 935-49, Esvelt KM et al., Nat Methods. 2013 Nov; 10 (11): 1116-21, Zhang Y. Mol Cell. 2015 Oct 15; 60 (2): 242-55, y Friedland AE et al., Genome Biol. 2015 Nov 24; 16: 257, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad). Por ejemplo, en el caso de SpCas9, un mutante doble en el que el residuo Asp en la décima posición se convierte en residuo Ala y el residuo His en la posición 840 se convierte en residuo Ala (a veces denominado "dSpCas9") puede ser utilizado (ver, por ejemplo, el mencionado Nishimasu et al., Cell. 2014, que se incorpora en el presente

documento como referencia en su totalidad). Alternativamente, en el caso de SaCas9, se puede usar un mutante doble en el que el residuo Asp en la décima posición se convierte en un residuo Ala y el residuo Asn en la posición 580 se convierte en un residuo Ala (SEQ ID NO: 139), o un doble mutante en el que el residuo Asp en la décima posición se convierte en un residuo Ala y el residuo His en la posición 557 se convierte en un residuo Ala (SEQ ID NO: 140) (en lo sucesivo, cualquiera de estos mutantes dobles a veces se denominará "dSaCas9") (ver, por ejemplo, los mencionados Friedland AE et al., Genome Biol. 2015, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad).

Además, en una forma de realización de la presente invención, como dCas9, una variante obtenida modificando una parte de la secuencia de aminoácidos de la dCas9 mencionada con anterioridad, que forma un complejo con ARNg y se recluta en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, también se puede usar. Los ejemplos de tales variantes incluyen una variante truncada con una secuencia de aminoácidos parcialmente eliminada. En una forma de realización de la presente invención, la variante descrita en los documentos WO2019/235627 y WO2020/085441, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad, se puede usar como dCas9. Específicamente, también se puede usar dSaCas9 obtenido eliminando los aminoácidos 721 a 745 de dSaCas9 que es un doble mutante en el que el residuo Asp en la posición 10 se convierte en residuo Ala y el residuo Asn en la posición 580 se convierte en residuo Ala (SEQ ID NO: 141), o dSaCas9 en el que la parte eliminada está sustituida por un conector peptídico (por ejemplo, uno en el que la parte eliminada está sustituida por un conector GGSGGS (SEQ ID NO: 142) se establece en la

SEQ ID NO: 143) (en adelante cualquiera de estos mutantes dobles a veces se denomina "dSaCas9[-25]"), o dSaCas9 obtenido al eliminar los aminoácidos 482 a 648 de dSaCas9 que es el mutante doble mencionado con anterioridad (SEQ ID NO: 144), o dSaCas9 en el que la parte eliminada está sustituida por un conector peptídico (uno en el que la parte eliminada está sustituida por un conector GGSGGS se establece en SEQ ID NO: 145).

Los ejemplos de la dCpf1 mencionada con anterioridad incluyen, pero sin limitación, una variante deficiente en nucleasas de Cpf1 derivada de *Francisella novicida* (FnCpf1; secuencia PAM: TTN), Cpf1 derivada de *Acidaminococcus* sp. (AsCpf1; secuencia PAM: TTTN), o Cpf1 derivada de la bacteria *Lachnospiraceae* (LbCpf1; secuencia PAM: TTTA, TCTA, TCCA o CCCA) y similares (véase, por ejemplo, Zetsche B. et al., Cell. 22 de octubre de 2015; 163 (3): 759-71, Yamano T et al., Cell. 2016, 5 de mayo; 165 (4): 949-62, y Yamano T et al., Mol Cell. 2017, 17 de agosto; 67 (4): 633-45, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). Por ejemplo, en el caso de FnCpf1, puede usarse un mutante doble en el que el residuo Asp en la posición 917 se convierte en residuo Ala y el residuo Glu en la posición 1006 se convierte en residuo Ala (véase, por ejemplo, Zetsche B et al., Cell. 2015, mencionado con anterioridad, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad). En una forma de realización de la presente invención, como dCpf1, también se puede usar una variante obtenida modificando una parte de la secuencia de aminoácidos de la dCpf1 mencionada con anterioridad, que forma un complejo con ARNg y se recluta en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano.

En una forma de realización de la presente invención,

dCas9 se usa como la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas. En una forma de realización, el dCas9 es dSaCas9, y, en una forma de realización particular, dSaCas9 es dSaCas9[-25].

Un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas puede clonarse, por ejemplo, sintetizando un cebador de oligoADN que cubre una región que codifica una parte deseada de la proteína basándose en la información de la secuencia de ADNc de la misma, y amplificando el polinucleótido por PCR método que usa ARN total o fracción de ARNm preparado a partir de las células que producen la proteína como plantilla. Además, se puede obtener un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas mediante la introducción de una mutación en una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína efectora CRISPR clonada mediante un método conocido de mutagénesis dirigida al sitio para convertir los residuos de aminoácidos (por ejemplo, residuo de Asp en la décima posición, su residuo en la posición 557 y residuo de Asn en la posición 580 en el caso de SaCas9; residuo de Asp en la posición 917 y residuo de Glu en la posición 1006 en el caso de FnCpf1, y similares se pueden incluir, pero no se limitan a estos) en un sitio importante para la actividad de la nucleasa a otros aminoácidos.

Alternativamente, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas puede obtenerse mediante síntesis química o una combinación de síntesis química y método de PCR o método de ensamblaje de Gibson, en base a la información de secuencia de ADNc del mismo, y también puede

construirse en forma adicional como una secuencia de bases que se sometió a optimización de codones para ser codones adecuados para la expresión en humanos.

(3) Represor transcripcional

En la presente invención, la expresión del gen DMPK humano se reprime por la acción del represor transcripcional fusionado con la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas. En la presente memoria descriptiva, el "represor transcripcional" significa una proteína que tiene la capacidad de reprimir la transcripción génica del gen DMPK humano o un fragmento peptídico que retiene la función del mismo. El represor transcripcional por utilizar en la presente invención no está particularmente limitado siempre que pueda reprimir la expresión del gen DMPK humano. Incluye, por ejemplo, caja asociada a Kruppel (KRAB), MBD2B, v-ErbA, SID (incluido el estado de la cadena de SID (SID4X)), MBD2, MBD3, familia DNMT (por ejemplo, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), Rb, MeCP2, ROM2, LSD1, AtHD2A, SET1, HDAC11, SETD8, EZH2, SUV39H1, PHF19, SALL1, NUP, SUVR4, KYP, DIM5, HDAC8, SIRT3, SIRT6, MESOLO4, SET8, HST2, COBB, SET-TAF1B SIN3A, HDT1, NIPP1, HP1A, dominio represor ERF (ERD), y sus variantes con capacidad de represión transcripcional, fusiones de ellos y similares. En una forma de realización de la presente invención, KRAB se usa como represor transcripcional.

Un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un represor transcripcional puede construirse mediante síntesis química o una combinación de síntesis química y método de PCR o método de ensamblaje de Gibson. Además, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un represor transcripcional también se puede construir como una secuencia de ADN con codones

optimizados para ser codones adecuados para la expresión en humanos.

Se puede preparar un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una proteína de fusión de un represor transcripcional y una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas ligando una secuencia de bases que codifica la proteína efectora CRISPR a una secuencia de bases que codifica el represor transcripcional directamente o después de agregar una secuencia de bases que codifica un enlazador, NLS (señal de localización nuclear) (por ejemplo, una secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 189 o SEQ ID NO: 191), una etiqueta y/u otros. En la presente invención, el represor transcripcional puede fusionarse N-terminal o C-terminal con la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasa. Como conector, se puede usar un conector con un número de aminoácidos de aproximadamente 2 a 50, y sus ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación, un conector GSGS en el que la glicina (G) y la serina (S) se unen alternativamente, y similares. En una forma de realización de la presente invención, se pueden utilizar como el polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 151, que codifica SV40 NLS, dSaCas9, NLS y KRAB como una proteína fusionada.

(4) ARN guía

En la presente invención, una proteína de fusión de proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y represor transcripcional puede reclutarse a la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano mediante ARN guía. Como se

describe en la "(1) Definición" mencionada con anterioridad, el ARN guía comprende ARNcr, y el ARNcr se une a una secuencia complementaria de la secuencia de direccionamiento. El ARNcr puede no ser completamente complementario a la secuencia complementaria de la secuencia de direccionamiento siempre que el ARN guía pueda reclutar la proteína de fusión a la región diana, y puede ser una secuencia en la que al menos 1 a 3 bases se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan.

Cuando se usa dCas9 como la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas, por ejemplo, la secuencia de direccionamiento puede determinarse usando un sitio web de diseño de ARNg publicado (herramienta de diseño CRISPR, CRISPR directo, etc.). Para ser específicos, a partir de la secuencia del gen diana (es decir, el gen DMPK humano) y el gen vecino del mismo, se enumeran secuencias de direccionamiento candidatas de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud para las cuales PAM (por ejemplo, NNGRRT en el caso de SaCas9) es adyacente a 3', y una que tiene un pequeño número de sitios fuera del objetivo en el genoma humano entre estas secuencias de direccionamiento candidato puede usarse como secuencia de direccionamiento. La longitud de la base de la secuencia de direccionamiento es de 18 a 24 nucleótidos de longitud, preferentemente de 18 a 23 nucleótidos de longitud, más preferentemente de 18 a 22 nucleótidos de longitud. Como un cribado primario para la predicción del número de sitio fuera del objetivo, se conocen varias herramientas bioinformáticas y están disponibles públicamente, y se pueden usar para predecir la secuencia de orientación con el menor efecto fuera del objetivo. Algunos ejemplos incluyen herramientas bioinformáticas como Benchling (<https://benchling.com>) y COSMID (sitios CRISPR fuera de objetivo con coincidencias, inserciones y

deleciones) (disponible en <https://crispr.bme.gatech.edu> en Internet). Utilizándolos, se puede resumir la similitud con la secuencia de bases dirigida por el ARNg. Cuando el software de diseño de ARNg que se utilizará no tiene una función para buscar el sitio fuera del objetivo del genoma diana, por ejemplo, se puede buscar el sitio fuera del objetivo sometiendo el genoma diana a la búsqueda Blast con respecto a 8 12 nucleótidos en el lado 3' de la secuencia de direccionamiento candidato (secuencia semilla con alta capacidad de discriminación de la secuencia de nucleótidos dirigida).

En una forma de realización de la presente invención, en la región existente en la posición GRCh38.p12 del cromosoma humano 19 (Chr19), región cercana al punto de inicio de la transcripción del gen DMPK: 45,777,342 - 45,784,715 puede ser la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano. Como se muestra en los Ejemplos, los presentes inventores han encontrado que la expresión del gen DMPK humano puede regularse dirigiéndose a la región 45,778,884 - 45,783,985 (Zona 2 en la Fig. 3), en las regiones mencionadas con anterioridad. En una forma de realización de la presente invención, por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede ser una secuencia de bases de 18 a 24 nucleótidos de longitud, preferentemente de 18 a 23 nucleótidos de longitud, más preferentemente de 18 a 22 nucleótidos de longitud, en la siguiente región: 45,778,884 - 45,783,985 en la región existente en la posición GRCh38.p12 del cromosoma 19 humano (Chr19).

Además, los presentes inventores han encontrado que la región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133,

SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 existentes en la región mencionada con anterioridad 45,778,884 - 45.783.985 es preferible como región para diseñar la secuencia de direccionamiento para reprimir la expresión del gen DMPK. En una forma de realización de la presente invención, por lo tanto, la secuencia de direccionamiento puede ser una secuencia de bases de 18 a 24 nucleótidos continuos de longitud, preferentemente de 18 a 23 nucleótidos de longitud, más preferentemente de 18 a 22 nucleótidos de longitud, en estas regiones. La posición de cada secuencia en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano es como se describe en la Tabla 1 y la Fig. 1.

En una forma de realización de la presente invención, la secuencia de direccionamiento puede ser una secuencia de bases de 18 a 24 nucleótidos continuos de longitud, preferentemente de 18 a 23 nucleótidos de longitud, más preferentemente de 18 a 22 nucleótidos de longitud, en la región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119, existente en las regiones mencionadas con anterioridad 45,778,884 - 45,783,985, que se considera que muestra no menos del 50% de reducción en la expresión del gen DMPK humano. La posición de cada secuencia en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano es como se describe en la Tabla 1 y la Fig. 1.

En otra forma de realización de la presente invención, la secuencia de direccionamiento puede ser una secuencia de bases de 18 a 24 nucleótidos continuos de longitud, preferentemente de 18 a 23 nucleótidos de longitud, más

preferentemente de 18 a 22 nucleótidos de longitud, en la región establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 109, o SEQ ID NO: 111, existente en las regiones mencionadas con anterioridad 45,778,884 - 45,783,985, que se considera que muestra no menos del 75% de reducción de la expresión del gen DMPK humano. La posición de cada secuencia en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano es como se describe en la Tabla 1 y la Fig. 1.

En otra forma de realización más de la presente invención, la secuencia de direccionamiento puede ser una secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 Las secuencias de bases establecidas en la SEQ ID NO: 43 y 44 son secuencias de direccionamiento comprendidas en una región establecida en la SEQ ID NO: 127. Las secuencias de bases establecidas en la SEQ ID NO: 62 y 63 son secuencias de direccionamiento comprendidas en una región establecido en SEQ ID NO: 128. Las secuencias de bases establecidas en la SEQ ID NO: 66 a 68 son secuencias de direccionamiento comprendidas en una región establecida en la SEQ ID NO: 129. Las secuencias de bases establecidas en las SEQ ID NOs: 70 a 73 son secuencias dirigidas comprendidas en una región establecida en la SEQ ID NO: 130. Las secuencias de base establecidas en las SEQ ID NOs: 80 a 83 son secuencias dirigidas comprendidas en una región

establecida en la SEQ ID NO: 131. Las secuencias de bases establecidas en la SEQ ID NO: 85 y 86 son secuencias de direccionamiento comprendidas en una región establecida en la SEQ ID NO: 132. Las secuencias de bases establecidas en la SEQ ID NO: 95 a 100 son secuencias de direccionamiento comprendidas en una región establecido en SEQ ID NO: 133. Las secuencias de bases establecidas en las SEQ ID NOs: 103, 105 y 106 son secuencias de direccionamiento comprendidas en una región establecida en la SEQ ID NO: 134. Las secuencias de bases establecidas en las SEQ ID NOs: 105 y 106 son secuencias de direccionamiento comprendidas en una región establecida en la SEQ ID NO: 135. Las secuencias de base establecidas en la SEQ ID NO: 70 y 71 son secuencias de direccionamiento comprendidas en una región establecida en la SEQ ID NO: 136. Las secuencias de bases establecidas en la SEQ ID NO: 103 a 112 son secuencias de direccionamiento comprendidas en una región establecida en la SEQ ID NO: 137. La posición de cada secuencia en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano es como se describe en la Tabla 1 y la Fig. 1.

En una forma de realización de la presente invención, una secuencia de bases que codifica ARNcr puede ser la misma secuencia de bases que la secuencia de direccionamiento. Por ejemplo, cuando la secuencia de direccionamiento establecida en la SEQ ID NO: 5 (CCCAGTCGAGGCCAAAGAAGA) se introduce en la célula como una secuencia de bases que codifica ARNcr, ARNcr transcripto de la secuencia es CCCAGUCGAGGCCAAAGAAGA (SEQ ID NO: 146) y se une con TCTTCTTTGGCCTCGACTGGG (SEQ ID NO: 147), que es una secuencia complementaria a la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 5 y está presente en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano. En otra forma de realización, una secuencia de bases que es una

secuencia de direccionamiento en donde al menos 1 a 3 bases se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden se puede usar como la secuencia de bases que codifica ARNcr siempre que el ARN guía pueda reclutar una proteína de fusión para la región diana. En consecuencia, en una forma de realización de la presente invención, como una secuencia de bases que codifica ARNcr, se puede usar la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119, en donde 1 a 3 bases se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden. En otra forma de realización de la presente invención, como una secuencia de bases que codifica ARNcr, se puede usar la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 111 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO:

111, en donde 1 a 3 bases se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden. En otra forma de realización más de la presente invención, como una secuencia de bases que codifica ARNcr, se puede usar la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 99 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 99, en donde 1 a 3 bases se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden can be used. En una forma de realización de la presente invención, como una secuencia de bases que codifica ARNcr, se puede usar la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 83 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 83 en donde 1 a 3 bases se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden.

En una forma de realización de la presente invención, la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119, en donde 1 a 3 bases se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden se puede

usar como la secuencia de bases que codifica ARNcr para producir ARNg que comprende ARNcr establecido en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186 o ARNcr establecido en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases, respectivamente. En otra forma de realización de la presente invención, el ARNg puede comprender la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ

ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases. En una forma de realización de la presente invención, el ARNg puede comprender la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 183 o SEQ ID NO: 184 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 183 o SEQ ID NO: 184 en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases. En otra forma de realización de la presente invención, el ARNg puede comprender la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171 o SEQ ID NO: 177 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171 o SEQ ID NO: 177 en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases. En otra forma de realización más de la presente invención, el ARNg puede comprender la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 171 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 171, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases.

Cuando se usa dCpf1 como la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas, se puede diseñar una secuencia de bases que codifique el ARNg como una secuencia de ADN que codifica el ARNcr con ARN particular unido al terminal 5'.

Tal ARN unido al terminal 5' de ARNcr y una secuencia de ADN que codifica dicho ARN puede seleccionarse apropiadamente por los expertos en la técnica de acuerdo con el dCpf1 a utilizar. Por ejemplo, cuando se usa dFnCpf1, una secuencia de bases en la cual SEQ ID NO: 148; AATTTCTACTGTTGTAGAT se adjunta al lado 5' de la secuencia de direccionamiento puede usarse como una secuencia de base que codifica el ARNg (cuando se transcribe al ARN, las secuencias de las partes subrayadas forman pares de bases para formar una estructura de bucle de tallo). La secuencia que se agregará al terminal 5' puede ser una secuencia generalmente utilizada para diversas proteínas Cpf1 en las que se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan al menos 1 a 6 bases, siempre que el ARNg pueda reclutar una proteína de fusión para la región reguladora de la expresión después de la transcripción.

Cuando se usa dCas9 como la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas, se puede diseñar una secuencia de bases que codifique el ARNg como una secuencia de ADN en la que una secuencia de ADN que codifica el ARNtracr conocido se une al terminal 3' de una secuencia de ADN que codifica el ARNr. Tal ARNtracr y una secuencia de ADN que codifica el ARNtracr pueden ser seleccionados apropiadamente por los expertos en la técnica de acuerdo con el dCas9 que se utilizará. Por ejemplo, cuando se usa dSaCas9, la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 149 se usa como la secuencia de ADN que codifica el ARNtracr. La secuencia de ADN que codifica el ARNtracr puede ser una secuencia de bases que codifica el ARNtracr generalmente utilizado para diversas proteínas Cas9 en las que al menos 1 a 6 bases se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan, siempre que el ARNg pueda reclutar una proteína de fusión para la expresión reguladora región después de la transcripción.

Un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica ARNg diseñado de esta manera puede sintetizarse químicamente usando un método de síntesis de ADN conocido.

En otra forma de realización de la presente invención, el polinucleótido de la presente invención puede comprender al menos dos diferentes secuencias de bases, respectivamente, que codifican un ARNg que se dirige a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender al menos dos diferentes secuencias de bases respectivamente que codifican un ARN guía, en donde las al menos dos diferentes secuencias de bases se seleccionan de una secuencia de bases que comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119 o una secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106,

SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases. En una forma de realización de la presente invención, el polinucleótido puede comprender al menos dos diferentes secuencias de bases respectivamente que codifican un ARN guía, en donde las al menos dos diferentes secuencias de bases se seleccionan de una secuencia de bases que comprenden la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 111 o una secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 111, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases. En una forma de realización de la presente invención, el polinucleótido puede comprender al menos dos diferentes secuencias de bases respectivamente que codifican un ARN guía, en donde las al menos dos diferentes secuencias de bases se seleccionan de una secuencia de bases que comprenden la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 99 o una secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 99, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases.

(5) Secuencia promotora

En una forma de realización de la presente invención, una secuencia promotora puede estar operativamente unida corriente arriba de cada una de una secuencia de bases que codifica la proteína de fusión de la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y el represor transcripcional y/o

una secuencia de bases que codifica el ARNg. El promotor a unir posiblemente no está particularmente limitado siempre que muestre una actividad promotora en la célula diana. Los ejemplos de la secuencia promotora posiblemente unida al flujo ascendente de la secuencia de bases que codifica el ARNg incluyen, pero sin limitación, promotor U6, promotor SNR6, promotor SNR52, promotor SCR1, promotor RPR1, promotor U3, promotor H1 y promotor ARNt, que son promotores de pol III, y similares. En una forma de realización de la presente invención, el promotor U6 puede usarse como la secuencia promotora para la secuencia de bases que codifica el ARN guía. En una forma de realización de la presente invención, cuando un polinucleótido comprende dos o más secuencias de bases que codifican respectivamente un ARN guía, una única secuencia promotora puede estar operativamente unida a la corriente arriba de las dos o más secuencias de bases. En otra forma de realización, cuando un polinucleótido comprende dos o más secuencias de bases que codifican respectivamente un ARN guía, una secuencia promotora puede estar operativamente unida a la corriente arriba de cada una de las dos o más secuencias de bases, en donde la secuencia promotora operativamente unida a cada secuencia de bases puede ser igual o diferente.

Como la secuencia promotora mencionada con anterioridad posiblemente se une a la secuencia corriente arriba de la proteína de fusión que codifica la secuencia base, se puede usar un promotor ubicuo o un promotor específico del músculo. Los ejemplos del promotor ubicuo incluyen, pero sin limitación, promotor EF-1 α , promotor EFS, promotor CMV (citomegalovirus), promotor hTERT, promotor SR α , promotor SV40, promotor LTR, promotor CAG, promotor RSV (virus del sarcoma de Rous), y similares. En una forma de realización

de la presente invención, el promotor EFS, el promotor CMV o el promotor CAG pueden usarse como el promotor ubicuo. Los ejemplos del promotor específico del músculo incluyen, pero sin limitación, el promotor CK8, el promotor CK6, el promotor CK1, el promotor CK7, el promotor CK9, el promotor de la troponina C del músculo cardíaco, el promotor de la actina α , el promotor de la quinasa de cadena pesada (MHCK) de miosina, promotor MHCK7, etc.), promotor MHC, promotor de la cadena liviana de miosina 2A, promotor distrofina, promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), promotor dMCK, promotor tMCK, promotor enh348 MCK, promotor sintético C5-12 (Syn), promotor Myf5, promotor MLC1/3f, promotor MLC-2, promotor MYOD, promotor Myog, promotor Pax7, promotor Des, promotor cTnC y similares (para el detalle del promotor específico del músculo, ver, US2011/0212529A1, McCarthy JJ et al., Skeletal Muscle. 2012 Mayo; 2 (1): 8, Wang B. et al., Gene Ther. 2008 Nov; 15 (22): 1489-99, y similares, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad). En una forma de realización de la presente invención, el promotor CK8, el promotor de la quinasa de cadena pesada de miosina (MHCK), el promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), el promotor sintético C5-12 (Syn) o el promotor Des se pueden usar como promotor específico del músculo. En una forma de realización de la presente invención, el promotor CK8 puede usarse como el promotor específico del músculo. El promotor mencionado con anterioridad puede tener cualquier modificación y/o alteración siempre que tenga actividad promotora en la célula diana.

En una forma de realización de la presente invención, U6 se usa como un promotor para una secuencia de bases que codifica el ARN guía, y el promotor CK8 se puede usar como la secuencia promotora para la secuencia de bases que

codifica la proteína de fusión. Específicamente, en cuanto al promotor U6, se pueden usar las siguientes secuencias de bases; (i) la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 155, (ii) una secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 155 en la que 1 o varias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) bases se deletorean, sustituyen, insertan y/o agregan con una actividad promotora en la célula diana, o (iii) una secuencia de bases no menor al 90% (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) idéntica a la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 155 que muestra una actividad promotora en la célula diana. En cuanto al promotor CK8, se pueden usar las siguientes secuencias de bases; (i) la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 187, (ii) una secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 187 en la que 1 o varias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) bases se deletorean, sustituyen, insertan y/o agregan con una actividad promotora en la célula diana, o (iii) una secuencia de bases no menor al 90% (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99% o más) idéntico a la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 187 que muestra una actividad promotora en la célula diana.

(6) Otra secuencia de bases

Además, el polinucleótido de la presente invención puede comprender además secuencias conocidas tales como señal de poliadenilación (poliA), secuencia consenso de Kozak y similares además de las mencionadas con anterioridad con el fin de mejorar la eficiencia de traducción del ARNm producido por la transcripción de una secuencia de bases que codifica un proteína de fusión de la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y represor transcripcional. Además, el polinucleótido de la presente invención puede comprender

una secuencia de bases que codifica una secuencia enlazadora, una secuencia de bases que codifica NLS y/o una secuencia de bases que codifica una etiqueta.

(7) Formas de realización ejemplificadas de la presente invención.

En una forma de realización de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende:

una secuencia de bases que codifica una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional,

una secuencia promotora para la secuencia de bases que codifica la proteína de fusión de la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y el represor transcripcional,

una o dos secuencias de bases que codifican respectivamente un ARN guía, en el que las una o dos secuencias de bases se seleccionan de una secuencia de bases que comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 111, o la secuencia de bases que comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 109, o SEQ ID NO: 111, en el que se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases, y

una secuencia promotora para la secuencia de bases que codifica el ARNg,

en donde la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dSaCas9 o dSaCas9[-25],

en donde el represor transcripcional se selecciona del grupo KRAB, MeCP2, SIN3A, HDT1, MBD2B, NIPP1 y HP1A,

en donde la secuencia promotora para la secuencia de base

que codifica la proteína de fusión se selecciona del grupo promotor EFS, promotor CMV, promotor CAG, promotor CK8, promotor de la quinasa de cadena pesada de miosina (MHCK), promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), promotor sintético C5-12 (Syn), y promotor Des, y en donde la secuencia promotora para la secuencia de bases que codifica el ARNg se selecciona del promotor del grupo U6, el promotor SNR6, el promotor SNR52, el promotor SCR1, el promotor RPR1, el promotor U3 y el promotor H1.

En una forma de realización de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende: una secuencia de bases que codifica una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, el promotor CK8 para la secuencia de bases que codifica la proteína de fusión de la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y el represor transcripcional, una o dos secuencias de bases que codifican respectivamente un ARN guía, en el que las una o dos secuencias de bases se seleccionan de una secuencia de bases que comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 99, o una secuencia de bases que comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, o SEQ ID NO: 99, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases, y promotor U6 para la secuencia de bases que codifica el ARN guía, en donde la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dSaCas9, y en donde el represor transcripcional es KRAB.

En una forma de realización de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende:

una secuencia de bases que codifica una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional,
el promotor CK8 para la secuencia de bases que codifica la proteína de fusión de la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y el represor transcripcional,
una secuencia de bases que codifica un ARN guía que comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 83, o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 83 en la que se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases,
y
promotor U6 para la secuencia de bases que codifica el ARN guía,
en donde la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas es dSaCas9 y
en donde el represor transcripcional es KRAB.

En una forma de realización del polinucleótido de la presente invención, el polinucleótido comprende, en orden desde el extremo 5' (i), la secuencia de bases que codifica la proteína de fusión de la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y el represor transcripcional y (ii) la secuencia de bases codificando el ARNg. En otra forma de realización, el polinucleótido comprende en orden desde el extremo 5' (ii) la secuencia de bases que codifica el ARNg y (i) la secuencia de bases que codifica la proteína de fusión de la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y el represor transcripcional.

2. Vector

La presente invención proporciona un vector que comprende el polinucleótido de la presente invención (en adelante denominado a veces "el vector de la presente

invención"). El vector de la presente invención puede ser un vector plasmídico o un vector viral.

Cuando el vector de la presente invención es un vector plasmídico, el vector plasmídico a utilizar no está particularmente limitado y puede ser cualquier vector plasmídico tal como el vector plasmídico de clonación y el vector plasmídico de expresión. El vector plasmídico se prepara insertando el polinucleótido de la presente invención en un vector plasmídico mediante un método conocido.

Cuando el vector de la presente invención es un vector viral, los ejemplos del vector viral por usar incluyen, pero sin limitación, vector de virus adenoasociados (AAV), vector de adenovirus, vector de lentivirus, vector de retrovirus, vector de Sendaivirus, y similares. En la presente memoria descriptiva, el "vector de virus" o "vector viral" también incluye sus derivados. Teniendo en cuenta el uso en terapia génica, el vector AAV se usa preferentemente por las razones que pueden expresar el transgén durante mucho tiempo, y se deriva de un virus no patógeno y tiene una alta seguridad.

Un vector viral que comprende el polinucleótido de la presente invención puede prepararse mediante un método conocido. En resumen, se prepara un vector plasmídico para la expresión del virus en el que se ha insertado el polinucleótido de la presente invención, el vector se transfecta en una célula huésped apropiada para permitir la producción transitoria de un vector viral que comprende el polinucleótido de la presente invención, y se recoge el vector viral.

En una forma de realización de la presente invención, cuando se usa el vector AAV, el serotipo del vector AAV no está particularmente limitado siempre que se pueda reprimir la expresión del gen DMPK humano en el sujeto, y se puede

usar cualquiera de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.10 y similares (para los diversos serotipos de AAV, véanse, por ejemplo, los documentos WO 2005/033321 y EP2341068 (A1), que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad). En otra forma de realización de la presente invención, AAV aislado de mono (por ejemplo, AAVrh74 (véase Mol Ther. 2017, 5 de abril; 25(4):855-869, etc., que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad), aislado de AAV de porcino (por ejemplo, AAVpo1 (por ejemplo, véase Gene Ther. 2009 Nov; 16 (11): 1320-8, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad)), Anc 80, que es un antepasado predicho de AAV1, AAV2, AAV8 y AAV9 (véase Cell Rep. 2015 11 de agosto; 12 (6): 1056-68, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad) y similares también se pueden usar siempre que se pueda reprimir la expresión del gen DMPK humano en el sujeto. Los ejemplos de las variantes de AAV incluyen, pero sin limitación, un nuevo serotipo con una cápside modificada (por ejemplo, documento WO 2012/057363, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad) y similares. Por ejemplo, en una forma de realización de la presente invención, puede usarse un nuevo serotipo con una cápside modificada que mejora la infectividad para las células musculares, tales como AAV587MTP, AAV588MTP, AAV-B1, AAVM41 y similares (véase Yu et al., Gene Ther. 2009 agosto; 16 (8): 953-62, Choudhury et al., Mol Ther. 2016 Aug; 24 (7): 1247-57, y Yang et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 10 de marzo; 106 (10): 3946-51, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad).

Cuando se prepara un vector AAV, un método conocido como (1) un método que usa un plásmido, (2) un método que

usa un baculovirus, (3) un método que usa un virus herpes simple, (4) un método que usa un adenovirus, o (5) se puede usar un método que utiliza levadura (por ejemplo, Appl Microbiol Biotechnol. 2018; 102 (3): 1045-1054, etc., que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad). Por ejemplo, cuando se prepara un vector de AAV mediante un método que usa un plásmido, primero, se prepara un plásmido de vector que comprende la repetición terminal invertida (ITR) en ambos extremos de la secuencia genómica de AAV de tipo salvaje y el polinucleótido de la presente invención insertado en lugar del ADN que codifica la proteína Rep y la proteína de la cápside. Por otro lado, el ADN que codifica la proteína Rep y la proteína de la cápside que son necesarias para formar partículas de virus se insertan en otros plásmidos. Además, un plásmido que comprende genes (E1A, E1B, E2A, VA y E4orf6) responsables de la acción auxiliar del adenovirus necesario para la proliferación de AAV se prepara como un plásmido auxiliar de adenovirus. La cotransfección de estos tres tipos de plásmidos en la célula huésped provoca la producción de AAV recombinante (es decir, vector de AAV) en la célula. Como célula huésped, se usa preferentemente una célula capaz de suministrar una parte de los productos génicos (proteínas) de los genes responsables de la acción auxiliar mencionada con anterioridad (por ejemplo, células 293, etc.). Cuando se usa dicha célula, no es necesario portar el gen que codifica una proteína que puede suministrarse desde la célula huésped en el plásmido auxiliar adenoviral mencionado con anterioridad. El vector AAV producido está presente en el medio de cultivo y/o célula. Por lo tanto, se prepara un vector AAV deseado mediante la recolección del virus del medio de cultivo después de destruir la célula huésped con congelación-descongelación o

similar y luego someter la fracción de virus a separación y purificación mediante un método de ultracentrifugación en gradiente de densidad usando cloruro de cesio, método de columna o similar.

El vector AAV tiene grandes ventajas en términos de seguridad, eficiencia de transducción génica y similares, y se usa para terapia génica. Sin embargo, se sabe que el tamaño del polinucleótido que se puede empaquetar es limitado. Por ejemplo, en una forma de realización de la presente invención, la longitud completa que incluye la longitud de base del polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica una proteína de fusión de dSaCas9 y KRAB, una secuencia de base que codifica el ARNg dirigido a una región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, y la secuencia promotora CK8 y la secuencia promotora U6 como las secuencias promotoras, y la región ITR es de aproximadamente 4,9 kb y el polinucleótido puede transportarse en un único vector AAV.

3. Composición farmacéutica para tratar o prevenir DM1

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido de la presente invención o el vector de la presente invención (en lo sucesivo a veces denominada "la composición farmacéutica de la presente invención"). La composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir DM1.

La composición farmacéutica de la presente invención comprende el polinucleótido de la presente invención o el vector de la presente invención como ingrediente activo, y puede prepararse como una formulación que comprende dicho ingrediente activo (es decir, el polinucleótido de la

presente invención o el vector de la presente invención) y, en general, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral y puede administrarse por vía tópica o sistémica. La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse, pero sin limitación, por ejemplo, administración intravenosa, administración intraarterial, administración subcutánea, administración intraperitoneal o administración intramuscular.

La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto no está particularmente limitada siempre que sea una cantidad eficaz para el tratamiento y/o prevención. Se puede optimizar adecuadamente de acuerdo con el ingrediente activo, la forma de dosificación, la edad y el peso corporal del sujeto, el programa de administración, el método de administración y similares.

En una forma de realización de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse no solo al sujeto afectado con DM1 sino también profilácticamente a sujetos que pueden desarrollar DM1 en el futuro basándose en el análisis de antecedentes genéticos y similares. El término "tratamiento" en la presente especificación también incluye la remisión de la enfermedad, además de la cura de enfermedades. Además, el término "prevención" también puede incluir retrasar la aparición de la enfermedad, además de la profilaxis de la aparición de la enfermedad. La composición farmacéutica de la presente invención también puede denominarse "el agente de la presente invención" o similar.

4. Método para el tratamiento o prevención de DM1

La presente invención también proporciona un método para tratar o prevenir la DM1, que comprende administrar el polinucleótido de la presente invención o el vector de la presente invención a un sujeto que lo necesite (en lo sucesivo denominado en ocasiones "el método de la presente invención"). Además, la presente invención incluye el polinucleótido de la presente invención o el vector de la presente invención para su uso en el tratamiento o prevención de DM1. Además, la presente invención incluye el uso del polinucleótido de la presente invención o el vector de la presente invención en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de DM1.

El método de la presente invención se puede practicar administrando la composición farmacéutica mencionada con anterioridad de la presente invención a un sujeto afectado con DM1, y la dosis, la ruta de administración, el sujeto y similares son los mismos que los mencionados con anterioridad.

La medición de los síntomas puede realizarse antes del comienzo del tratamiento utilizando el método de la presente invención y en cualquier momento después del tratamiento para determinar la respuesta del sujeto al tratamiento.

El método de la presente invención puede mejorar, pero sin limitación, cualquier síntoma de DM1 tal como la función del músculo esquelético y/o músculo cardíaco. Los músculos o tejidos a mejorar en la función de los mismos no están particularmente limitados, y pueden mencionarse cualquier músculo y tejido, y grupos musculares.

5. Ribonucleoproteína

La presente invención proporciona una ribonucleoproteína que comprende lo siguiente (en adelante denominado a veces "RNP de la presente invención"):

(c) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, y
(d) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano.

Como la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas, se pueden usar el represor transcripcional y el ARN guía comprendidos en el RNP de la presente invención, la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas, el represor transcripcional y el ARN guía explicados en detalle en la sección mencionada con anterioridad de "1. Polinucleótido". La proteína de fusión de la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y el represor transcripcional que se incluirá en el RNP de la presente invención se puede producir, por ejemplo, introduciendo un polinucleótido que codifica la proteína de fusión en la célula, bacteria u otro organismo para permitir la expresión, o un sistema de traducción *in vitro* utilizando el polinucleótido. Además, el ARN guía comprendido en el RNP de la presente invención puede producirse, por ejemplo, mediante síntesis química o un sistema de transcripción *in vitro* utilizando un polinucleótido que codifica el ARN guía. La proteína de fusión así preparada y el ARN guía se mezclan para preparar el RNP de la presente invención. Cuando sea necesario, se pueden mezclar otras sustancias como partículas de oro. Para administrar directamente el RNP de la presente invención a la célula, tejido y similares diana, el RNP puede encapsularse en una nanopartícula lipídica (LNP)

o cargarse en una vesícula extracelular mediante un método conocido. El RNP de la presente invención se puede introducir en la célula diana, el tejido y similares mediante un método conocido. Por ejemplo, Lee K., et al., Nat Biomed Eng. 2017; 1: 889-901, WO 2016/153012 y similares se pueden referir para encapsulación en LNP y método de introducción, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

En una forma de realización de la presente invención, el ARN guía comprendido en RNP de la presente invención se dirige a 18 a 24 nucleótidos continuos de longitud, preferentemente de 18 a 23 nucleótidos de longitud, más preferentemente de 18 a 22 nucleótidos de longitud, en la siguiente región: 45,778,884 - 45,783,985 existentes en la posición GRCh38.p12 del cromosoma humano 19 (Chr 19).

En una forma de realización, el ARN guía se dirige a una secuencia de bases de 18 a 24 nucleótidos continuos de longitud, con preferencia, 18 a 23 nucleótidos de longitud, con mayor preferencia, 18 a 22 nucleótidos de longitud, en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119. En otra forma de realización, el ARN guía se dirige a una secuencia de bases de 18 a 24 nucleótidos continuos de longitud, con preferencia, 18 a 23 nucleótidos de longitud, con mayor preferencia, 18 a 22 nucleótidos de longitud, en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID

NO: 117 o SEQ ID NO: 119. En otra forma de realización más, el ARN guía se dirige a una secuencia de bases de 18 a 24 nucleótidos continuos de longitud, con preferencia, 18 a 23 nucleótidos de longitud, con mayor preferencia, 18 a 22 nucleótidos de longitud, en una región establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 111. En otra forma de realización más, el ARN guía se dirige a una región que comprende toda o parte de la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 119. En otra forma de realización de la presente invención, el ARN guía se dirige a una región que comprende toda o parte de la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 111. En otra forma de realización más de la presente invención, el ARN guía se dirige a una región que comprende toda o parte de la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 99. En una forma de realización de la presente invención, el ARN guía se dirige a una región que comprende toda o parte de la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 83.

En una forma de realización de la presente invención, se puede usar el ARN guía que comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO:

159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 186, en donde se deletan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases, respectivamente. En una forma de realización de la presente invención, se puede usar el ARN guía que comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 183 o SEQ ID NO: 184 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 183 o SEQ ID NO: 184 en donde se deletan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases, respectivamente. En otra forma de realización de la presente invención, se puede usar el ARN guía que comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171 o SEQ ID NO: 177 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171 o SEQ ID NO: 177 en

donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases respectivamente. En otra forma de realización más de la presente invención, se puede usar el ARN guía que comprende la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 171 o la secuencia de bases establecida en la SEQ ID NO: 171, en donde se delecionan, sustituyen, insertan y/o agregan 1 a 3 bases, respectivamente.

6. Otros

La presente invención también proporciona una composición o kit que comprende lo siguiente para la represión de la expresión del gen DMPK humano:

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y

(f) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, o un polinucleótido que codifica el ARN guía.

La presente invención también proporciona un método para tratar o prevenir la distrofia miotónica tipo 1, que comprende una etapa de administración de los siguientes (e) y (f):

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y

(f) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ

ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, o un polinucleótido que codifica el ARN guía.

La presente invención también proporciona el uso de los siguientes (e) y (f):

(e) una proteína de fusión de una proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas y un represor transcripcional, o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, y

(f) un ARN guía dirigido a una región continua de 18 a 24 nucleótidos de longitud en una región establecida en la SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 119 en la región reguladora de la expresión del gen DMPK humano, o un polinucleótido que codifica el ARN guía,

en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de DM1.

Como la proteína efectora CRISPR deficiente en nucleasas, el represor transcripcional, el ARN guía, así como los polinucleótidos que los codifican y los vectores en los que se transportan en estas invenciones, se pueden utilizar los explicados en detalle en las secciones mencionadas con anterioridad de "1. Polinucleótido", "2. Vector" y "5. Ribonucleoproteína". La dosis, la vía de administración, el sujeto, la formulación y similares de los puntos (e) y (f) mencionados con anterioridad son los mismos que los explicados en la sección "3. Composición farmacéutica para tratar o prevenir DM1".

Otras características de la invención serán evidentes en el curso de las siguientes descripciones de formas de realización ejemplares que se dan para ilustrar la invención y no pretenden ser limitantes de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Detección de ARNgs para el gen DMPK humano usando células iCM e iDM

(1) Métodos experimentales

Selección de secuencias dirigidas a DMPK

Aproximadamente 7,4 kb de secuencia alrededor de la región promotora del gen DMPK humano (Chr19: GRCh38.p12; 45,777,342 – 45,784,715) se escanearon en busca de secuencias que pueden ser atacadas por un SaCas9 deficiente en nucleasa (mutante D10A y N580A; dSaCas9 (SEQ ID NO: 139)) complejo con ARNg, definida aquí como una secuencia de direccionamiento. Las secuencias de direccionamiento se especificaron inicialmente por el segmento de 19-21 nucleótidos adyacente a un motivo adyacente protoespaciador (PAM) que tenía la secuencia NNGRRT (secuencia de direccionamiento 5'-19-21nt-NNGRRT-3'), y se filtraron para incluir solo aquellos con una combinación perfecta (secuencia de direccionamiento y secuencias PAM) para la región correspondiente del genoma del mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (enumerado como "VERDADERO" en la Tabla 1). También se seleccionaron secuencias adicionales de direccionamiento de 21 nucleótidos que dirigen RNP a regiones que exhiben una alta sensibilidad a ADNasa en experimentos de DNase-Seq seleccionados por The ENCODE Project (The ENCODE Project Consortium, *Nature*. 6 de septiembre de 2012; 489 (7414): 57-74; <https://www.encodeproject.org>).

Construcción del plásmido de transferencia lentiviral (pED162)

pLentiCRISPR v2 se adquirió de Genscript (<https://www.genscript.com>) y se realizaron las siguientes modificaciones: la secuencia de andamio de ARNc SpCas9 se reemplazó por la secuencia de andamio de ARNg SaCas9 (SEQ ID NO: 150); SpCas9 se reemplazó con dSaCas9 fusionado a dominios de represión transcripcional de caja asociada a Krüppel (KRAB) con dos NLSes intercalando dSaCas9 (SV40 NLS-dSaCas9-NLS-KRAB [SEQ ID NO: 151 (ADN) y 152 (proteína)]); y el casete puroR fue reemplazado por un casete blastR [SEQ ID NO: 153 (ADN) y SEQ ID NO: 154 (proteína)]. dSaCas9 se unió con dos señales de localización nuclear (NLS) en su término N (secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 188, secuencia de ADN mostrada por la SEQ ID NO: 189) y término C (secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 190, secuencia de ADN mostrada por SEQ ID NO: 191) para permitir la localización eficiente de las moléculas efectoras en el núcleo. KRAB puede reprimir la expresión génica cuando se localiza en promotores al inhibir la transcripción (Gilbert LA, et al., Cell, 18 de julio de 2013; 154 (2): 442-51). KRAB estaba atado al término C de dSaCas9 (mutante D10A y N580A), que se denomina dSaCas9-KRAB en lo sucesivo, y se dirige a regiones promotoras DMPK humanas cuando se dirige por secuencias de direccionamiento (Fig. 1). El plásmido generado se denominó pED162.

Clonación de ARNg

Se clonaron tres secuencias de direccionamiento no dirigidas de control (Tabla 1, SEQ ID NO: 1 a 3) y 123 secuencias de direccionamiento (Tabla 1, SEQ ID NO: 4 a 126) en pED162. Los oligos directos e inversos fueron sintetizados

por Integrated DNA Technologies en el siguiente formato: directo; 5' CACC(G) - secuencia de direccionamiento de 19-21 pares de bases - 3', e inverso: 5' AAAC - secuencia de direccionamiento de complemento inverso de 19-21 pares de bases - (C) - 3', donde se agregaron bases entre paréntesis si el objetivo no comienza con un G. Los oligos se resuspendieron en tampón Tris-EDTA (pH 8,0) a 100 µM. Se combinaron 1,5 µl de cada oligo complementario en una reacción de 50 µl en tampón NE 3.1 (New England Biolabs (NEB) # B7203S). La reacción se calentó a 95 °C en 1 L de H₂O y se dejó enfriar a 25 °C, fusionando así oligos con salientes finales adhesivos compatibles con la clonación a pED162. Los oligos fusionados se combinaron con el plásmido de transferencia lentiviral pED162 que había sido digerido con BsmBI y purificado en gel, y ligado con ADN ligasa T4 (NEB # M0202S) de acuerdo con el protocolo del fabricante. 2 µl de la reacción de ligación se transformaron en células competentes estables de NEB® (NEB # C3040I) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El constructo resultante impulsa la expresión de ARNsgs que comprenden ARNcr codificado por secuencias de direccionamiento individuales fusionadas a su extremo 3' con ARNtracr (GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCAC GUCAACUUGUUGGCGAGAUUUUUU) (SEQ ID NO: 156), que es codificada por la secuencia de andamio de SaCas9 ARNg añadida con una señal de terminación de U6 polimerasa TTTTTT, por un promotor U6 (SEQ ID NO: 155).

Generación de lentivirus

La línea celular Lenti-Pac 293Ta (Genecopoeia # LT008) se sembró a 0,8-1,0 x 10⁶ células/pocillo en placas de cultivo celular de 6 pocillos (VWR # 10062-892) en 2 ml de

medio de crecimiento (medio DMEM suplementado con FBS al 10% y 2 mM de glutamina fresca, 1 mM de piruvato sódico y aminoácidos no esenciales MEM (Thermo Fisher # 11140050)) y se incubaron a 37 °C/5% de CO₂ durante 24 horas. Al día siguiente, las reacciones de transfección TransIT-VirusGEN® (Mirus Bio # MIR6700) se establecieron de acuerdo con el protocolo del fabricante con una mezcla de plásmido de empaque de 1,5 µg [plásmido de empaque de 1 µg (pCMV delta R8.2; plásmido addgene # 12263) y un plásmido de expresión de envuelta de 0,5 µg (pCMV-VSV-G; addgene Plasmid # 8454)] y 1 µg de plásmido de transferencia pED162 que contiene la secuencia que codifica dSaCas9-KRAB y los ARNsg indicados. El lentivirus se cosechó 48 horas después de la transfección pasando el sobrenadante de medio a través de un filtro PES de 0,45 µm (VWR # 10218-488).

Transducción de células iCM e iDM

El mioblasto de control inmortalizado sin DM (Ctrl) (denominado iCM) y mioblasto de DM1 inmortalizado (denominado iDM) se obtuvieron del Institut de Myologie, que estableció estas líneas celulares mediante los métodos descritos en Dis Model Mech. 1 de abril de 2017; 10(4): 487-497, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Para la transducción, las células se sembraron a 0,05 x 10⁶ células/pocillo en placas de cultivo celular de 12 pocillos (VWR # 10062-894) en 1 ml de medio que contenía medio de crecimiento [Kit de medio de crecimiento de células musculares esqueléticas PromoCell; número de pieza: C-23160 (nota: los medios se suplementaron con 20% de FBS, en lugar de 5% como lo indica el kit, y 30 µg/ml de Gentamicina S)] y se incubaron a 37 °C/5% de CO₂ durante 24 horas. Al día siguiente, el medio se reemplazó

con 1 ml de medio de crecimiento suplementado con 10 µg/ml de Polybrene (Sigma # TR-1003-G) y 0,3 ml de sobrenadante de lentivirus (véase arriba) correspondiente a cada ARNsg que comprende ARNcr codificado por secuencias de direccionamiento individuales (Tabla 1) fusionado con ARNtracr se añadieron a cada pocillo. Las células se incubaron con lentivirus durante 48 horas antes de eliminar los medios virales y reemplazarlos con medios de selección [medios de crecimiento suplementados con 10 µg/ml de blasticidina (Thermo Fisher # A1113903)]. Después de 48 horas de incubación en los medios de selección, un tercio de las células se pasaron a nuevos pocillos (de placas de 12 pocillos) en medios de crecimiento. Después de permitir que las células se siembren durante 24 horas, los medios de crecimiento se reemplazaron con medios de selección. Después de 48 horas de cultivo en medios de selección, las células se cosecharon y el ARN se extrajo con el kit RNeasy® 96 (Qiagen # 74182) según las indicaciones del fabricante.

Análisis de expresión génica

Para el análisis de expresión génica, se generó ADNc a partir de 0,2 µg de ARN total de acuerdo con el protocolo del kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Thermo Fisher # 4368813) en un volumen de 20 µl. El ADNc se diluyó 10 veces y se analizó utilizando Taqman™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher # 4444557) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las sondas Taqman (DMPK: Id. De ensayo Hs01094336_m1 FAM; HPRT: Id. de ensayo Hs99999909_m1 VIC_PL) se obtuvieron de Thermo Fisher. Las reacciones de PCR en tiempo real basadas en la sonda Taqman se procesaron y analizaron mediante el sistema QuantStudio 5 Real-Time PCR dirigido por el protocolo Taqman Fast Advanced Master Mix.

Análisis de los datos

Para cada muestra y tres controles, se calcularon los valores deltaCt restando los valores promedio de Ct de 3 réplicas técnicas de la sonda HPRT de la sonda DMPK (DMPK Ct promedio - HPRT Ct promedio). Los valores de expresión se determinaron para cada muestra utilizando la fórmula $2^{-(\text{deltaCt})}$. Los valores de expresión de la muestra (Tabla 1; SEQ ID NOs: 4-126) se normalizaron luego al promedio de 3 valores de expresión de control (Tabla 1; SEQ ID NOs: 1 a 3) para cada experimento para determinar la expresión DMPK relativa para cada muestra. Se analizaron dos réplicas biológicas para cada línea celular y se calculó el promedio de todos los experimentos (Tabla 1).

(2) Resultados

Represión de la expresión del gen DMPK por el RNP

Se produjo un lentivirus que entrega casetes de expresión para dSaCas9-KRAB y ARNsgs para cada secuencia dirigida a las células iCM e iDM. Las células transducidas se seleccionaron por su resistencia a la blasticidina, y la expresión de DMPK se cuantificó usando el ensayo Taqman (Tabla 1). Los valores de expresión de cada muestra se normalizaron a un promedio de expresión de DMPK en células transducidas con ARNsg de control (Tabla 1; SEQ ID NO: 1, 2 y 3). Los niveles promedio de expresión se midieron a través de duplicados de líneas celulares iCM e iDM (Tabla 1; promedio DMPK ALL y Fig. 2).

Tabla 1 Secuencias de direccionamiento utilizadas para seleccionar la región reguladora de la expresión del gen DMPK

Tabla 1-1

SEQ ID	Coordenada (Chr19: GRCh38.p12)	nt long.	cadena más o menos	Secuencia (5'→3')	Cyno-Match	iCM_RE Rep1_DMPK	iCM_RE Rep2_DMPK	iDM_RE Rep1_DMPK	iDM_RE Rep2_DMPK	DMPK ALL prom.
1	NA	20	-	acggaggctaagcgctcgcaa	-	87.02	87.02	91.11	91.11	89.06
2	NA	20	-	cgcttcggcgggcccggtcaa	-	113.39	113.39	115.89	115.89	114.64
3	NA	20	-	gtaggcgcgccgctctctac	-	97.39	97.39	116.90	116.90	107.14
4	45777464	21	-1	cccttcttctttggcctcgac	VERD.	138.80	73.27	97.97	144.53	113.64
5	45777440	21	1	cccagtcgaggccaaagaaga	VERD.	120.25	39.62	103.63	129.09	98.15
6	45777515	21	-1	ccccgggagacacggctgggc	VERD.	99.27	55.29	113.56	81.75	87.47
7	45777507	21	1	ctccggggggacacagcaaccg	FALSO	96.04	39.70	67.89	128.91	83.13
8	45777800	21	-1	ctgggacaggcagctacgggc	VERD.	117.97	62.26	80.33	119.89	95.11
9	45777799	21	1	aggccacccgcccacagcctg	VERD.	195.53	68.11	105.18	131.07	124.97
10	45777823	21	1	gatctcgggggacaggtagtc	VERD.	149.35	68.70	92.68	144.93	113.91
11	45777934	21	-1	gccagagctggtgggcccag	VERD.	128.08	62.02	73.11	139.73	100.74
12	45778175	21	1	gatgtggccacagcggtccag	VERD.	127.90	70.42	-	154.76	117.69
13	45778185	21	1	cagcggtccagcaggatgttg	VERD.	110.91	66.59	80.54	146.00	101.01
14	45778470	21	-1	gatagcaagcttcttccctgg	VERD.	148.46	77.17	87.79	145.43	114.71
15	45778549	21	1	gtagaagcgcgccatctcggc	VERD.	71.09	69.25	78.23	125.77	86.08
16	45778600	21	-1	actgctgagcaagtttgggga	VERD.	62.07	116.61	130.87	131.02	110.14
17	45778652	21	-1	cccttctctcagtcacctgtca	VERD.	113.82	67.08	86.42	61.15	82.12
18	45778627	21	1	ctccatgaccaggtactgaga	VERD.	92.43	73.49	79.85	70.43	79.05
19	45778638	21	1	ggtactgagaaggggttcgtc	VERD.	122.63	98.65	108.90	111.73	110.48
20	45778758	21	-1	tgggctgcaggtctctgccc	VERD.	89.95	128.02	122.31	100.95	110.31
21	45778902	21	-1	tcccagaacatctcaggggga	VERD.	183.05	102.82	165.03	136.15	146.76
22	45778906	21	-1	tctttccagaacatctcagg	VERD.	58.11	64.67	49.83	39.37	52.99
23	45778946	21	-1	ctgggacctattctctgggtg	VERD.	92.68	83.80	99.29	87.70	90.87
24	45778953	21	-1	ggagtgtctgggacctattct	VERD.	109.17	124.48	129.33	95.68	114.67
25	45778975	21	-1	aacggggccactgcctaggga	VERD.	94.69	95.11	89.77	73.35	88.23

Tabla 1-2

26	45778955	20	1	tcacctagggcagtggtcccggt	VERD.	88.30	92.69	79.72	98.60	89.83
27	45779018	20	-1	gggggggtctcttacctggaa	VERD.	88.10	95.30	82.72	79.91	86.51
28	45779108	21	-1	gggggccttccctatctgagac	FALSO	143.89	69.50	142.21	111.02	116.65
29	45779137	21	-1	tgccggttaagaggggtgtgtcag	FALSO	120.88	53.88	126.17	98.73	99.91
30	45779150	21	-1	gggaaagtctgtgtggtgtaa	FALSO	107.77	73.33	124.12	121.33	106.64
31	45779196	21	-1	gggagaggaagctctaggatt	VERD.	117.72	27.13	65.48	55.27	66.40
32	45779203	21	-1	ggaggtggggagaggaagctc	VERD.	104.85	21.91	54.68	95.18	69.16
33	45779271	21	-1	actacctggtgagctccgggc	VERD.	122.88	85.40	138.00	94.83	110.28
34	45779330	21	-1	gttggtgaatggggaccggcg	VERD.	-	12.04	24.88	137.55	58.16
35	45779347	21	-1	cgtgaggagagggacgtgttg	VERD.	119.05	91.71	106.22	91.81	102.20
36	45779522	21	1	cctgaggtcagagatagtgaga	FALSO	79.64	54.05	94.91	100.06	82.17
37	45779608	21	-1	tgggtgcagaagcgggtggag	FALSO	86.59	72.53	99.66	98.20	89.24
38	45779613	21	-1	acggctgggtgcagaagcggg	FALSO	87.68	78.74	58.35	94.72	79.87
39	45779720	21	-1	ggggcgggggccttagaaaattg	FALSO	157.32	77.19	101.23	107.10	110.71
40	45779748	21	-1	gactcgtggtggcggggcacat	FALSO	150.18	78.33	144.03	121.12	123.41
41	45779721	21	1	aaccctatgccccggccacc	FALSO	132.60	74.37	168.61	110.00	121.39
42	45779787	21	1	cgccccgcgtccgatcacctt	VERD.	141.13	78.50	162.94	116.70	124.82
43	45779878	19	1	gtggtgggggaaaagaacc	VERD.	45.08	48.99	45.68	45.89	46.41
44	45779966	21	-1	agagagaaggggagacagaca	FALSO	42.68	24.74	47.03	39.60	38.51
45	45780114	21	1	tccaaggggtgtgcaggatggt	FALSO	138.00	49.69	77.81	82.81	87.08
46	45780119	21	1	gggtgtgcaggatggttaggg	FALSO	42.45	24.16	42.40	66.67	43.92
47	45780127	21	1	aggatggttagggtggggttaa	FALSO	110.52	59.01	88.97	88.04	86.64
48	45780194	21	-1	tttccttctcccttgttctt	VERD.	125.85	65.70	144.19	124.99	115.18
49	45780225	21	-1	tcagggtggaaggtggaagaa	FALSO	87.95	58.19	95.31	101.33	85.69
50	45780244	20	-1	cctgaactgtcacctggagt	VERD.	104.19	90.84	79.54	117.75	98.08
51	45780244	20	-1	cctgaactgtcacctggagt	VERD.	70.57	82.39	55.60	55.60	66.04
52	45780251	21	-1	ggctgcacctgaactgtcacc	FALSO	63.71	49.98	55.08	88.96	64.43
53	45780286	21	-1	ggacattctacatgagaacgt	FALSO	71.53	64.93	62.82	119.58	79.72
54	45780256	21	1	ccccacccccacgttctcatg	FALSO	110.55	59.09	120.30	160.26	112.55
55	45780267	19	1	cgttctcatgtagaatgtc	VERD.	94.64	96.41	89.90	75.60	89.14

Tabla 1-3

56	45780284	21	1	tcctgggtaacgggccagacg	FALSO	120.72	78.62	145.16	97.50	110.50
57	45780355	21	-1	tggttcaagaaccacctgcat	FALSO	131.59	62.02	108.62	119.04	105.32
58	45780349	21	1	tgaaccacactttgaaaacc	FALSO	139.28	108.34	145.53	80.53	118.42
59	45780519	21	-1	cctgattgtcatctgtaata	VERD.	109.23	110.74	120.19	97.35	109.38
60	45780526	21	1	agaagtcaaggctcctatgact	VERD.	69.46	88.66	90.23	77.02	81.34
61	45780618	21	1	gacagggaggcctggactccc	VERD.	123.54	114.65	127.61	94.15	114.98
62	45780650	21	1	aagtggaggcaggatggagag	VERD.	50.95	39.97	40.95	40.91	43.20
63	45780654	21	1	ggaggcaggatggagagaggg	VERD.	12.64	31.01	20.01	29.32	23.25
64	45780867	21	-1	gcctggggcgggggagggggc	VERD.	62.65	103.41	70.14	79.23	78.86
65	45780888	21	1	agatgcagctcggggccacaaa	VERD.	81.20	94.72	86.48	80.35	85.68
66	45780967	21	-1	gcagggtaaactgagaccggg	VERD.	29.66	22.91	49.61	30.58	33.19
67	45781030	21	1	gggagaagggtttttccagagg	VERD.	64.97	65.44	48.21	58.86	59.37
68	45781243	21	1	gacatatgagggccagagggg	FALSO	32.32	24.32	33.78	35.39	31.46
69	45781252	21	1	ggggccagaggggcagggtgct	VERD.	84.09	66.39	119.69	62.95	83.28
70	45781282	21	1	agaaaccagtgaccagtgagc	VERD.	23.14	20.64	23.21	21.86	22.22
71	45781387	21	-1	gcctggggccagggtggaag	VERD.	20.97	10.79	40.92	25.22	24.48
72	45781498	21	-1	tcagccaccattcccgcacc	FALSO	23.89	44.36	21.25	45.84	33.84
73	45781524	21	-1	gtctcgggttcctatgagccgt	FALSO	27.57	26.85	24.56	36.90	28.97
74	45781519	21	1	cgagactttgggggctgggggt	VERD.	73.14	34.44	75.45	88.95	67.99
75	45781523	21	1	actttgggggctgggggtgggg	VERD.	114.18	57.79	101.92	155.65	107.39
76	45781602	21	-1	gagggacaactttgggttctt	VERD.	85.52	58.90	74.19	114.90	83.38
77	45781582	21	1	aagaacccaaagtgtccctc	VERD.	120.44	42.36	70.41	105.09	84.58
78	45781648	21	1	tggtttctccacagggccccgc	FALSO	104.83	47.04	54.25	71.38	69.38
79	45781819	21	1	catagagcccacttttggggg	FALSO	89.86	74.17	85.96	56.05	76.51
80	45781967	21	-1	tgtgactcagagccatggctt	FALSO	32.90	31.73	46.30	59.56	42.62
81	45781937	21	1	tgtgactcctaagccatggct	VERD.	52.83	14.62	30.71	22.30	30.11
82	45781965	19	-1	tgactcagagccatggctt	VERD.	43.14	45.50	25.17	38.77	38.14
83	45781997	21	-1	cagagtaagggtcagcagaggc	VERD.	18.87	15.39	23.48	22.27	20.00
84	45781983	21	1	gctgaccttactctgccctc	VERD.	127.49	57.38	69.11	108.98	90.74
85	45782175	19	-1	gggctcctgcagatggggt	VERD.	44.15	43.85	44.43	24.14	39.14

Tabla 1-4

86	45782213	21	-1	tggccgacttcttgcagtgagg	VERD.	71.85	22.88	38.12	21.26	38.53
87	45782217	21	-1	tacgtggccgacttcttgcag	VERD.	92.60	114.52	110.26	9.39	81.69
88	45782280	21	1	ggggctccagccccaggaagc	VERD.	76.77	14.27	36.77	42.05	42.47
89	45782374	21	1	ccccccccggggccgggggct	VERD.	130.26	77.49	110.57	131.13	112.36
90	45782563	21	-1	ggcgggaggggggctggacca	VERD.	100.09	18.98	52.22	56.49	56.95
91	45782651	21	-1	attccccctactctagcaactg	FALSO	29.90	29.88	39.24	38.95	34.49
92	45782707	21	-1	ctctgtgctctacctttttat	VERD.	121.48	65.22	146.53	256.57	147.45
93	45782805	21	-1	ggagcaaggggggtggttgcta	VERD.	-	54.40	97.95	126.58	92.98
94	45782702	21	1	acagaggaagccacaggtgtg	VERD.	138.42	60.02	96.44	-	98.29
95	45782893	19	1	gggaggccagggcagcttc	VERD.	72.39	48.88	33.91	52.60	51.94
96	45782906	21	1	agcttcttgggtgactcagag	VERD.	54.89	8.50	30.23	-	31.21
97	45782945	21	-1	tgtccgagtcggaatccatct	VERD.	70.35	25.78	48.04	86.59	57.69
98	45782957	21	-1	gctaaatttaactgtccgagt	VERD.	59.16	43.62	40.66	60.66	51.03
99	45782963	21	-1	ctgagggctaaatttaactgt	VERD.	20.26	17.60	22.85	34.48	23.80
100	45783081	21	-1	ggtcaccctgttcaggctct	VERD.	22.62	9.80	29.57	38.39	25.09
101	45783051	21	1	gggcaccctcagagcctgaac	VERD.	97.13	33.39	52.77	66.97	62.57
102	45783167	21	-1	ccaggggccaaggagctatct	VERD.	119.69	54.63	75.27	134.51	96.02
103	45783206	21	-1	gtttctaatccagcctgggc	VERD.	49.83	27.77	43.30	49.19	42.52
104	45783174	20	1	agccacattctcgccaggc	VERD.	80.51	64.79	81.96	86.44	78.42
105	45783198	21	1	attagaaacagaaacatttctg	VERD.	24.86	14.08	21.43	22.78	20.79
106	45783205	21	1	acagaaacatttccggggggtg	VERD.	30.70	9.33	18.48	32.23	22.68
107	45783273	21	-1	ctcttggtctctcgagccgca	FALSO	107.28	44.44	37.83	71.88	65.36
108	45783251	21	1	cctgcggctccagagcccaag	FALSO	64.13	37.14	34.19	57.31	48.19
109	45783374	21	1	gaaactaggaggaaggaccg	FALSO	15.29	7.19	25.40	16.57	16.11
110	45783472	21	1	atgaggggcccctggctgctggg	FALSO	66.04	35.62	63.12	67.56	58.08
111	45783492	21	1	gcaggatgtctcttctcccaa	FALSO	25.51	13.73	34.08	12.31	21.41
112	45783516	21	1	ggtcctgctccagccgctggt	FALSO	79.19	53.78	58.44	79.21	67.65
113	45783584	21	1	ccggcttttctgctatgaaa	VERD.	114.69	80.57	112.83	128.55	109.16
114	45783666	21	-1	gcagtcgcttctccagagg	VERD.	60.18	58.59	47.44	45.52	52.93
115	45783655	21	1	aaagcggactgcctagaacca	FALSO	83.49	29.31	29.64	74.09	54.13

Tabla 1-5

116	45783834	21	-1	ttgctattgtctgtgcttttg	VERD.	87.37	85.12	101.17	85.36	89.76
117	45783821	21	1	acagacaatagcaagggcagc	VERD.	36.68	36.14	42.16	52.36	41.83
118	45783956	21	1	gaccagtcacatgctggggac	VERD.	53.49	79.58	84.52	58.10	68.92
119	45783962	21	1	tcacatgctggggacagggat	VERD.	16.32	32.12	31.38	23.36	25.80
120	45784192	21	1	atggctaggaggctgggggca	VERD.	67.44	80.24	82.09	78.30	77.02
121	45784257	19	-1	ggcacagtgggtgtgaagcc	VERD.	100.96	107.71	94.81	92.64	99.03
122	45784350	21	1	gtcaaggggagggagccagcc	VERD.	88.94	97.88	86.05	78.71	87.89
123	45784387	21	1	gctgccaccctggccttgccc	VERD.	74.58	91.91	94.32	27.60	72.10
124	45784627	21	-1	tgagttctttccccagcacct	VERD.	99.38	101.58	87.81	106.90	98.92
125	45784649	21	-1	gtggtagaggtaggactgtcc	VERD.	86.07	-	51.37	-	68.72
126	45784636	21	1	cctacctctaccactgacttg	VERD.	111.67	112.66	120.50	-	114.94

En la Tabla 1, "Coordenada" indica la coordenada del extremo 5' de cada secuencia establecida en las SEQ ID NO: 4-126.

30 secuencias de direccionamiento mostraron una reducción en la expresión de DMPK de no menos del 50% (SEQ ID NOs: 43, 44, 46, 62, 63, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 80, 81, 82, 83, 85, 86, 88, 91, 96, 99, 100, 103, 105, 106, 108, 109, 111, 117 y 119), nueve secuencias de selección mostraron una reducción en la expresión de DMPK de no menos del 75% (SEQ ID NOs: 63, 70, 71, 83, 99, 105, 106, 109 y 111), y una secuencia de selección mostró una reducción en la expresión de DMPK de no menos del 80% (SEQ ID NO: 109).

Las zonas se identificaron y caracterizaron en función de la probabilidad del sistema descrito con anterioridad de suprimir la expresión de DMPK. En la Zona 1 (Fig. 3: Chr19: GRCh38.p12; 45,777,342-45,778,884), se halló que las secuencias de direccionamiento fueron ineficaces para modular la expresión de DMPK. Sin embargo, en la Zona 2 (Fig. 3: GRCh38.p12; 45,778,884 - 45,783,985) dirigidas a dSaCas9-KRAB pudo suprimir la expresión de DMPK. Como se esperaba, esta región abarca el promotor DMPK y el sitio de inicio de la transcripción, lo que sugiere que el objetivo de esta región tiene el mayor efecto sobre la expresión de DMPK. Finalmente, la Zona 3 (Fig. 3; Chr19: GRCh38.p12; 45,783,985 - 45,784,715) tiene menor efecto sobre la expresión de DMPK y está más distante de la región promotora de DMPK.

Ejemplo 2: Producción de virus adenoasociados (AAV)

(1) Métodos experimentales

Construcción de plásmidos para la administración y expresión de dSaCas9-KRAB: ARNg y generación de AAV

pAAV-CMV se adquirió de Takara (# 6230) y la secuencia

promotora EFS (SEQ ID NO: 204) y SV40 NLS-dSaCas9-NLS-KRAB (SEQ ID NO: 151) con un codón de parada terminal adicional [SEQ ID NO: 200 (ADN) y SEQ ID NO: 152 (proteína)] se subclonaron de pED162 (véase el Ejemplo 1). Una secuencia de bGlobin polyA (SEQ ID NO: 201), la secuencia promotora U6 (SEQ ID NO: 202) y la secuencia de andamio de ARNg SaCas9 (SEQ ID NO: 150) se subclonaron de pED0001 (SEQ ID NO: 203), reemplazando así las secuencias que codifica todos los componentes funcionales de pAAV-CMV (es decir, promotor CMV, intrón de beta-globina, MCS y hGH polyA) entre los ITR. Finalmente, el promotor EFS se reemplazó con el promotor CK8 (SEQ ID NO: 187) por clonación de restricción (XhoI y AgeI), dando como resultado el plásmido pED148. La secuencia de direccionamiento establecida en la SEQ ID NO: 83, 70, 81 o 99 se clonó digiriendo pED148 con BsaI, generando así salientes compatibles con oligos sintéticos recocidos. Los oligos sintéticos se diseñaron de modo que el cebador directo tuviera una secuencia CACC (G) en el extremo 5' [5'CACC-(G) - secuencia de direccionamiento - 3'], y el cebador inverso contenía una secuencia AAAC adicional en el extremo 5' [5'AAAC - secuencia de direccionamiento del complemento inverso - (C) - 3']. Se añadió un G adicional al comienzo de la secuencia de direccionamiento para mejorar la expresión del promotor U6. Los plásmidos generados se denominaron pED148-h695 (que comprende la secuencia de selección establecida en la SEQ ID NO: 83), pED148-h245 (que comprende la secuencia de selección establecida en la SEQ ID NO: 70), pED148-h257 (que comprende el conjunto de secuencia de selección adelante en SEQ ID NO: 81), y pED148-h269 (que comprende la secuencia de direccionamiento establecida en la SEQ ID NO: 99), respectivamente.

Producción de virus adenoasociados (AAV)

Se generaron partículas de serotipo 9 del virus adenoasociado (AAV9) usando células 293T (ATCC # CRL-3216) sembradas a una densidad de $0,86 \times 10^7$ células por Hyperflask (Corning # 10030) y cultivadas en medio DMEM (Sigma # D5796) suplementado con 10% de FBS. Cuatro días después de la siembra, los medios se cambiaron a medios DMEM suplementados con FBS al 2% y HEPES 63 mM (Gibco # 15630-080). El plásmido pRC9 se construyó de la siguiente manera: la secuencia de la cápside AAV9 (véase JP5054975B) se subclonó en un vector pRC2-mi342 (Takara # 6230) reemplazándolo con el de la secuencia de la cápside AAV2. Las células se transfectaron con 135 µg del plásmido pRC9, 121 µg del vector pHelper incluido en el sistema AAVpro® Helper Free (Takara # 6230) y 133 µg de uno de pED148-h695, con 388 µl de reactivo de transfección de ADN *in vitro* PEIpro® (Polyplus # 115-010) por Hyperflask. Después de 3 días, se añadió TritonX-100 al 0,2% a Hyperflask y se recogieron las células.

Después de la cosecha, su sobrenadante y lisado celular se clarificaron con filtros de cartucho (GE Healthcare # KGF-A-0506GG, KMP-HC9206GG). Después de la clarificación, se ultrafiltró con filtración de flujo tangencial usando la fibra hueca usando el cartucho de ultrafiltración Xampler™, 750 kD (GE Healthcare # UFP-750-C-6MA). Después de reducir el volumen, la muestra se sometió a cromatografía de afinidad (POROSTM CaptureSelect™ AAVX Affinity Resin (ThermoFisher Scientific # A36739)) para purificar AAV. Después de la etapa de cromatografía de afinidad, la muestra eluida se sometió a centrifugación en gradiente de densidad para separar el AAV de las partículas intermedias de AAV. Las

partículas de AAV separadas con centrifugación en gradiente de densidad de CsCl, se sometieron a intercambio de tampón con diálisis de solución salina tamponada con fosfato. Después del intercambio de tampón, la muestra de AAV se concentró usando la unidad de filtro centrífugo Ultra-4 Amicon® (Merck millipore # UFC801024) y se esterilizó usando la unidad de filtro de jeringa Millex-GV, 0.22 µm (Merck millipore # SLGV033RS). El genoma de AAV se purificó con DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN # 69506). El título del genoma de AAV purificado se midió usando el kit de titulación AAVpro® (para PCR en tiempo real) (Takara # 6233). El AAV resultante denota AAV9-695.

Los AAV que usan pED148-h245, pED148-h257 o pED148-h269, se fabricaron como se describió con anterioridad y se denominaron AAV9-245, AAV9-257 y AAV9-269, respectivamente. Cada uno de AAV9-695, AAV9-245 y AAV9-257 se fabricó dos veces y se usó para experimentos *in vitro* e *in vivo*.

(2) Resultados

El título del genoma de los AAV se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Nombre de AAV	Concentración (vg/mL)	Lote N.º
AAV9-695	2.8×10^{12}	Lote 1
AAV9-245	3.6×10^{12}	Lote 1
AAV9-257	4.5×10^{12}	Lote 1
AAV9-269	5.5×10^{12}	Lote 1
AAV9-695	3.6×10^{13}	Lote 2
AAV9-245	3.7×10^{13}	Lote 2
AAV9-257	4.6×10^{13}	Lote 2

Ejemplo 3: Evaluación farmacológica *in vitro* de AAV9 recombinante que porta la secuencia de bases que codifica dSaCas9, represor transcripcional y ARNsg en la represión del gen DMPK

(1) Métodos experimentales

Cultivo celular e infección por AAV

Las células iCM se suspendieron en un kit de medio de crecimiento de células del músculo esquelético (Promocell # C23060) (nota: los medios se suplementaron con 20% de FBS, en lugar de 5% como lo indica el kit, y 50 µg/ml de Gentamicina S) y se sembraron en una placa de 24 pocillos con recubrimiento de colágeno tipo I (IWAKI # 4820-010) a una densidad de 20.000 células en 900 µl de medio por pocillo. Para la infección por AAV, se añadieron 100 µl de PBS con 0,001% de Pluronic™ F-68 (GE healthcare # SH30594.01) que contiene 2,8, 3,6, 4,5 o 5,5 × 10¹² vg/ml de AAV9-695, AAV9-245, AAV9-257 o AAV9-269 al medio y se cultivaron e incubaron a 37 °C/5% de CO₂ durante 2 días. Para los pocillos de control, se añadieron al medio 100 µl de PBS con Pluronic F-68 al 0,001%. El experimento se realizó por triplicado. Los medios se reemplazaron con medios de diferenciación (medios DMEM (Thermo Fisher #

61965-026) suplementados con 10 µg/ml de insulina (Sigma # I9278)) y las células se cultivaron durante 4 días a 37 °C con 5% de CO₂. Después de lavar con 500 µl de PBS, se extrajo el ARN total utilizando el Mini Kit RNeasy Plus (Qiagen # 74134) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN de las células sin infección por AAV se estableció como control y se mostró como Ctrl en la Fig. 4.

Análisis de expresión génica

Para Taqman qPCR, se convirtieron 80 ng de ARN total en ADNc usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript™ VILO™ (Thermo Fisher # 11754250) en 20 µl de volumen de reacción. El ADNc se diluyó 160 veces con agua y se usaron 2 µl para la qPCR. La qPCR se ejecutó en 5 µl de volumen final que contiene sondas Taqman para DMPK (Thermo Fisher # Hs01094329_m1, FAM) o GAPDH (Thermo Fisher # Hs99999905_m1, FAM), y Taqman™ Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher # 4369016) con QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher). La condición de ciclo de qPCR fue la siguiente: 95 °C durante 10 minutos después de 50 °C durante 2 minutos seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los datos se analizaron con el software QuantStudio™ 12K Flex (Thermo Fisher). Los valores de expresión se analizaron con la curva estándar para cada gen y el nivel de expresión del gen DMPK se normalizó al del gen GAPDH.

(2) Resultados

Al aplicar AAV9-695, AAV9-245, AAV9-257 o AAV9-269 en células iCM, se encontró una disminución de la regulación de ARNm de DMPK, lo que sugiere que AAV9 transporta transgenes de dSaCas9, KRAB y ARNsg que comprenden ARNcr

codificado por la secuencia de selección establecida en La SEQ ID NO: 83, 70, 81 o 99 tiene un efecto farmacológico sobre la regulación negativa de DMPK en células musculares humanas (Fig. 4).

Ejemplo 4. Supresión de la expresión del gen DMPK en ratones DMSXL

(1) Métodos experimentales

Tratamiento animal

Se inyectó AAV9-695, AAV9-245 o AAV9-257 a ratones homo DMSXL (denominados ratones DMSXL), ratones transgénicos que llevan el locus DM1 humano y expansiones muy grandes > 1,000 CTG (PLoS Genet. 2012; 8 (11): e1003043), por vía intravenosa (machos n = 2 y hembras n = 2, en total n = 4, respectivamente). Las dosis fueron las siguientes; $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg, 5×10^{13} vg/kg, $1,5 \times 10^{14}$ vg/kg y 5×10^{14} vg/kg para AAV9-695, AAV9-245 y AAV9-257, respectivamente. Como control, se inyectó PBS que contenía 0,001% de Pluronic F-68 (GE healthcare # SH30594.01). Después de 4 semanas, se sacrificaron ratones DMSXL y se recogieron muestras (tibial anterior (TA), corazón e hígado) de estos ratones. El análisis de expresión génica se realizó en estas muestras como sigue. Las muestras se almacenaron en una cámara de congelación de -80 °C hasta la extracción de ARN.

Extracción de ARN y análisis de expresión génica

Las muestras de tejido se homogeneizaron usando TissueLyser II (Qiagen) en 1 ml de ISOGEN (NIPPON GENE # 319-90211). Después de la separación centrífuga, se transfirieron 700 µl de sobrenadante a un tubo de 1,5 ml que contenía 150 µl de cloroformo (Wako # 034-02603). Después de vórtex y centrífuga, se agregaron 187 µl de

capa de agua a 150 µl de isopropanol (WAKO # 166-04836) y se mezclaron. El extracto de ARN se transfirió a columnas de rotación RNeasy del Mini Kit RNeasy® Plus (QIAGEN # 74134) y se purificó adicionalmente siguiendo el protocolo del fabricante.

Para Taqman qPCR, 700-1,000 ng de ARN total se convirtieron en ADNc usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript™ VILO™ (Thermo Fisher # 11754250) en un volumen de reacción de 20 µl. El ADNc se diluyó 20 veces con agua y se usaron 3-4 µl para el qPCR. El qPCR se ejecutó en 10 µl de volumen final que contiene sondas Taqman para DMPK (Thermo Fisher # Hs01094329_m1, FAM) o GAPDH (Thermo Fisher # Mm99999915_g1, FAM), y Taqman Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher # 4369016) con QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher). La condición de ciclo qPCR fue la siguiente: 95 °C durante 10 minutos después de 50 °C durante 2 minutos seguido de 40-45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los datos se analizaron con el software QuantStudio™ 12K Flex (Thermo Fisher). Los valores de expresión se analizaron con la curva estándar para cada gen y el nivel de expresión del gen DMPK se normalizó al del gen GAPDH.

(2) Resultados

AAV9-695, AAV9-245 y AAV9-257 expresaron cada transgén en ratones. La regulación por disminución de ARNm de DMPK no se encontró en el hígado, pero se encontró en los músculos esqueléticos y los músculos cardíacos, lo que sugiere que AAV9 transporta el transgén de dSaCas9, KRAB y ARNsg que comprende ARNcr codificado por la secuencia de direccionamiento establecida en la SEQ ID NO: 83, 70 u 81 un efecto farmacológico sobre la regulación negativa de DMPK en ratones DMSXL (Fig. 5-7).

sonda fue sintetizada por GeneDesign, Inc., Japón.) En 2 × SSC que contiene 30% de formamida) durante 2 horas a 37 °C. Después de la hibridación, la solución de la sonda se retiró y los portaobjetos se incubaron en 2x SSC que contenía formamida al 30% durante 30 minutos a 50 °C. Los portaobjetos se lavaron una vez con 1 × SSC y se incubaron en 1 × SSC durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron tres veces con PBS durante 10 minutos y se añadió al portaobjetos ProLong™ Diamond Antifade Mountant con DAPI (Thermo Fisher # P36971). Los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos y se almacenaron a 4 °C.

Se observó la formación de focos de ARN usando un microscopio láser confocal LSM700 (ZEISS).

(2) Resultados

Las imágenes típicas de la sección muscular TA de ratones DMSXL administrados con el vehículo o AAV9-695 se muestran en la Fig. 8. Las flechas indican focos de ARN (los focos de ARN se definieron como un punto rojo claramente detectable que se localiza en el núcleo de color azul).

El número de focos de ARN observados en los músculos TA de ratones DMSXL administrados con AAV9-695 fue menor que en los músculos TA de ratones DMSXL administrados con vehículo, lo que sugiere que la administración de AAV9-695 mejoró la formación de focos de ARN en ratones DMSXL.

Ejemplo 6. Supresión de la expresión del gen DMPK en células iDM que expresan ARNsg hDMPK.

(1) Métodos experimentales

Generación de lentivirus

Se sembraron células Lenti-X™ 293T (Takara # 632180)

a 5×10^6 células/placa en una placa recubierta con colágeno tipo I de 100 mm (IWAKI # 4020-010) en 10 ml de DMEM (Thermo Fisher # 10569-010) suplementado con 10% de FBS y MEM Solución de aminoácidos no esenciales (Thermo Fisher # 11140050)) y se incubaron a 37 °C/5% de CO₂ durante la noche. Al día siguiente, el reactivo de transfección Lipofectamine™ 3000 (Thermo Fisher # L3000008) se configuró de acuerdo con el protocolo del fabricante con 7 µg de Lentiviral High Titer Packaging Mix (Takara # 6194) y 5,5 µg del plásmido de transferencia pED162 que contenía la secuencia que codificaba dSaCas9-KRAB e indicaba la secuencia diana establecida en la SEQ ID NO: 1 u 83 (Ejemplo 1). Los plásmidos se nombran como se describe en la Tabla 3. Se recogieron 10 ml de medio que contiene lentivirus 48 horas después de la transfección haciendo pasar el sobrenadante de medio a través de un filtro de 0,45 µm. Para concentrar la solución de virus, se agregó 1/4 de volumen de solución de precipitación de virus PEG-it™ (SBI # LV810A-1) y se incubó durante la noche a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó a $1.500 \times g$ durante 30 minutos. Después de desechar el sobrenadante, se añadieron 200 µl de DMEM al tubo y la solución de virus se resuspendió suavemente y se almacenó a -80 °C.

Tabla 3

Plásmido	SEQ ID NO
pED162-C1	1
pED162-695	83

Los títulos de lentivirus variaron de 5×10^{10} a 7×10^{10} partículas/ml, medidos usando NucleoSpin® RNA Virus (MACHEREY-NAGEL # 740956.250) y Lenti-XTM qRT-PCR Titration Kit (Clontech # 631235).

Transducción de células iDM

Se sembraron células iDM a 50.000 células/pocillo en una placa de 12 pocillos recubierta con colágeno tipo I (IWAKI # 4815-010) en 1 ml de medio que contenía medio de crecimiento [Kit de medio de crecimiento de células musculares esqueléticas PromoCell; número de pieza: C-23060 (nota: los medios se suplementaron con 20% de FBS, en lugar de 5% según las instrucciones del kit, y 50 µg/ml de Gentamicina S)] y se incubaron a 37 °C/5% de CO₂ durante la noche. Al día siguiente, el medio se reemplazó con 1 ml de medio de crecimiento suplementado con 5 µg/ml de Polybrene (Sigma, # TR-1003-G) y 0,03 ml de sobrenadante de lentivirus (véase arriba) correspondiente a cada ARNsg que comprende ARNcr codificado por secuencias de direccionamiento individuales (SEQ ID No: 1 u 83) fusionado con ARNtracr se añadió a cada pocillo. Las células se incubaron con lentivirus durante 48 horas antes de eliminar los medios virales y reemplazarlos con medios de selección [medios de crecimiento suplementados con 10 µg/ml de blasticidina (Nacalai # 03759-71)]. Después de 24 horas de incubación en los medios de selección, un tercio de las células se pasaron a nuevos pocillos con medios de crecimiento. Después de permitir que las células se siembren durante 72 horas, los medios de crecimiento se reemplazaron con medios de selección. Después de 48 horas de cultivo en medios de selección, las células fueron cosechadas y almacenadas.

Transducción de células iCM

Se sembraron células iCM a 50.000 células/pocillo en placa de 6 pocillos recubierta con colágeno tipo I (IWAKI # 4810-010) en 2 ml de medio que contiene medio de

crecimiento [Kit de medio de crecimiento de células musculares esqueléticas PromoCell; número de pieza: C-23060 (nota: los medios se suplementaron con 20% de FBS, en lugar de 5% según las instrucciones del kit, y 50 µg/ml de Gentamicina S)] y se incubaron a 37 °C/5% de CO₂ durante la noche. Al día siguiente, el medio se reemplazó con 2 ml de medio de crecimiento suplementado con 5 µg/ml de Polybrene (Sigma # TR-1003-G) y 2×10^9 vg de sobrenadante de lentivirus (véase arriba) correspondiente al control de ARNsg que comprende ARNcr codificado por selección individual. Se añadió a cada pocillo la secuencia (SEQ ID No: 1) fusionada con ARNtracr. Las células se incubaron con lentivirus durante 48 horas antes de eliminar los medios virales y reemplazarlos con medios de selección [medios de crecimiento suplementados con 10 µg/ml de blasticidina (Nacalai # 03759-71)]. Después de 24 horas de incubación en medios de selección, dos tercios de las células se pasaron a una placa recubierta con colágeno tipo I de 100 mm (iwaki # 4020-010) con medios de crecimiento. Después de permitir que las células se siembren durante 72 horas, los medios de crecimiento se reemplazaron con medios de selección. Después de 48 horas de cultivo en medios de selección, las células fueron cosechadas y almacenadas.

Cultivo celular, extracción de ARN y preparación de ADNc

Células iDM que expresan dSaCas9 y hDMPK ARNsg que comprende ARNcr codificado por la secuencia de selección establecida en la SEQ ID: 83, células iDM que expresan dSaCas9 y control ARNsg que comprende ARNcr codificado por la secuencia de selección establecida en la SEQ ID NO: 1, y células iCM que expresan dSaCas9 y ARNsg de control que comprende ARNcr codificado por la secuencia de

direccionamiento establecida en la SEQ ID NO: 1, denominadas células iDM-695 (iDM_695), células iDM-Ctrl (iDM_Ctrl) y células iCM-Ctrl (iCM_Ctrl), respectivamente, se sembraron en un placa de 24 pocillos con recubrimiento de colágeno tipo I (IWAKI # 4820-010) a una densidad de 25.000 células en 500 µl o 50.000 células por pocillo en 1 ml de kit de medio de crecimiento de células del músculo esquelético (Promocell # C23060) suplementado con 20% de FBS inactivado por calor e incubado a 37 °C/CO₂ al 5% durante 2 días (sembrado a 50.000 células/pocillo) o 3 días (sembrado a 25.000 células/pocillo).

Después de lavar con 200 µL de PBS, se extrajo el ARN total usando el Mini Kit RNeasy (Qiagen # 74106) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se convirtieron 500 ng de ARN total en ADNc usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript™ VILO™ (Thermo Fisher # 11754-250) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se almacenó a -20 °C.

Análisis de expresión génica

El ADNc se diluyó 100 veces con agua y se usaron 2 µl para el qPCR. El qPCR se ejecutó en 10 µl de volumen final que contiene sondas Taqman para DMPK (Thermo Fisher # Hs01094329_m1, FAM) o para GAPDH (Thermo Fisher # Hs99999905_m1, FAM), y Taqman Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher # 4369016) con ViiA7 Real Time PCR System (Thermo Fisher). La condición de qPCR fue la siguiente: precalentado con 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los valores de expresión se analizaron con la curva estándar para cada gen y el nivel de expresión del gen DMPK se normalizó al del gen GAPDH.

(2) Resultados

Las expresiones del gen DMPK en las células iDM-695 y las de las células -iDM-Ctrl se muestran en la Fig. 9.

La expresión del gen DMPK se suprimió en células iDM que expresan ARNsg hDMPK.

Ejemplo 7. Mejora de la formación de focos de ARN en células iDM que expresan ARNsg hDMPK.

(1) Métodos experimentales

Hibridación fluorescente in situ: FISH

Las células iDM-695, las células iDM-Ctrl y las células iCM-Ctrl, que se construyeron en el Ejemplo 6, se sembraron por cuadruplicado en una placa de 96 pocillos recubierta de colágeno (Thermo Fisher Scientific # 152038) a una densidad de 2.500 células o 5.000 células por pocillo en el kit de medio de crecimiento de células del músculo esquelético (Promocell # C23060) suplementado con 20% de FBS inactivado por calor e incubado a 37 °C/5% de CO₂ durante 2 días (sembrado a 5.000 células/pocillo) o 3 días (sembrado a 2.500 células/pocillo).

Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 15 minutos, se lavaron dos veces con PBS y se almacenaron a 4 °C.

Después de la incubación en PBS que contenía Triton X-100 al 0,2% durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células se lavaron y se incubaron en 2x SSC que contenían formamida al 40% durante 10 minutos a temperatura ambiente. 50 µl de solución de sonda (albúmina de suero bovino al 0,02% (SIGMA # A7030-100G), 0,066 mg/ml de ARNt de levadura (Thermo Fisher Scientific # 15401-011),

complejo de ribonucleósido vanadilo 2 mM (SIGMA # R3380-5ML), y 0,1 ng/μl de Cy3- (CAG) Sonda 5-LNA (y_5 (L) A (L) G (L) cagcagcag5 (L) A (L) G (L), y significa Cy3, 5 (L) significa LNA-mC, N (L) significa LNA, y minúscula significa ADN. Esta sonda fue sintetizada por GeneDesign, Inc.) en 2 × SSC que contiene 40% de formamida) se añadió a cada pocillo y las células se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Después de la hibridación, la solución de la sonda se retiró y las células se incubaron en 2x SSC que contenía formamida al 40% durante 30 minutos a 37 °C. Las células se lavaron una vez con 1 × SSC y se incubaron en 1 × SSC durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 μl de PBS que contenía 2 μg/ml de DAPI (Dojindo # 340-07971) a cada pocillo y las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y se almacenaron a 4 °C.

La formación de focos de ARN se detectó y analizó utilizando IN Cell Analyzer 6000 (GE healthcare). Se capturaron las imágenes de 9 puntos en cada pocillo y se contó el número de núcleos positivos para focos de ARN y el número total de núcleos en cada imagen. Se analizó la relación de núcleos focos positivos en cada pocillo y se calcularon los promedios.

(2) Resultados

Las imágenes típicas de las células iDM-695 y las células iDM-Ctrl se muestran en la Fig. 10A.

Las proporciones de núcleos de focos positivos de ARN en cada célula se muestran en la Fig. 10B.

Las proporciones de núcleos de focos positivos de ARN en las células iDM-695 fueron más bajas que las de las células iDM-Ctrl.

Ejemplo 8. Mejora de defectos de empalme en células iDM que expresan ARNsg de hDMPK.

(1) Métodos experimentales

Análisis de empalme

Las preparaciones de ADNc a partir de células iDM-695, células iDM-Ctrl y células iCM-695 se describieron en el Ejemplo 6.

La PCR se realizó utilizando PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (TaKaRa # R050A) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se diluyó 10 veces con agua y se usó 1 µl. Los cebadores de PCR utilizados fueron los siguientes:

Tabla 4

Diana	5'→3' directo	5'→3' inverso
DMD exón 78	TTAGAGGAGGTGATGGAGCA (SEQ ID NO: 192)	GATACTAAGGACTCCATCGC (SEQ ID NO: 193)
MBNL1 exón 7	GCTGCCCAATACCAGGTCAAC (SEQ ID NO: 194)	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC (SEQ ID NO: 195)
RIF13A exón 21	ACCTGTGCAGCATTTCAGGGACAC (SEQ ID NO: 196)	CTCGTCGTTTAAATGAGTGCATCTG (SEQ ID NO: 197)
TNNT2 exón 5	ATAGAAGAGGTGGTGGGAAGAGTAC (SEQ ID NO: 198)	GTCTCAGCCTCTGCTTCAGCATCC (SEQ ID NO: 199)

La condición del ciclo de PCR fue la siguiente: 35 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 15 segundos y 68 °C durante 30 segundos seguidos de 72 °C durante 7 minutos.

Los productos de PCR se cargaron en el kit Agilent DNA1000 (Agilent # 5067-1504), se sometieron a electroforesis y se analizaron usando el sistema Agilent 2100 BioAnalyzer de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se midieron las AUC de los picos de productos empalmados normal y anormalmente, y se calcularon las

proporciones de los productos empalmados normalmente en cada célula.

(2) Resultados

Las imágenes de gel y los patrones de exón de cada gen, es decir, DMD, MBNL1, KIF13A y TNNT2, se muestran en la Fig. 11A.

La Fig. 11B muestra las proporciones de productos empalmados normalmente, que son más abundantes en las células iCM y menos en las células iDM, en cada célula.

Los defectos de empalme de todos los genes probados se mejoraron en células iDM-695.

Cuando se establece un límite o rango numérico en este documento, se incluyen los puntos finales. Además, todos los valores y subrangos dentro de un límite o rango numérico se incluyen específicamente como si estuvieran explícitamente escritos.

Como se usa en este documento, las palabras "un" y "una" y similares tienen el significado de "uno o más".

Obviamente, son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, debe entenderse que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede llevarse a la práctica de una forma distinta a la descrita específicamente aquí.

Todas las patentes y otras referencias mencionadas con anterioridad se incorporan en su totalidad en este documento mediante esta referencia, lo mismo que si se establece en detalle.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, la expresión del gen DMPK se puede suprimir en las células derivadas de

pacientes con DM1 y los ratones modelo DM1. Por lo tanto, se espera que la presente invención sea extremadamente útil para el tratamiento y/o prevención de DM1.