

REIVINDICACIONES

1. Un método para inducir una ruptura bicatenaria (DSB) dentro del gen *TTR* o para modificar el gen *TTR*, que comprende suministrar una composición a una célula, en donde la composición comprende:

- a. un ARN de guía, en donde el ARN de guía es uno de guía única (ARNsg) que comprende una secuencia de guía de SEQ ID NO: 9 y comprende:
 - i. enlaces fosforotioato (PS) entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5';
 - ii. enlaces fosforotioato (PS) entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3';
 - iii. nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5';
 - iv. nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3'; o
 - v. una combinación de dos o más de i-iv; y
- b. un agente de unión al ADN guiado por ARN o un ácido nucleico que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN es una nucleasa Cas.

2. Una composición para inducir una ruptura bicatenaria (DSB) dentro del gen *TTR* o para modificar el gen *TTR*, la composición comprende:

- a. un ARN de guía, en donde el ARN de guía es uno de guía única (ARNsg) que comprende una secuencia de guía de SEQ ID NO: 9 y comprende:
 - i. enlaces fosforotioato (PS) entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5';
 - ii. enlaces fosforotioato (PS) entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3';
 - iii. nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5';
 - iv. nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3'; o
 - v. una combinación de dos o más de i-iv; y
- b. un agente de unión al ADN guiado por ARN o un ácido nucleico que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN, en donde el agente de unión al ADN guiado

por ARN es una nucleasa Cas.

3. El método o la composición de la Reivindicación 1 o 2, en donde la composición da como resultado la edición del gen *TTR*.
4. El método o la composición de la Reivindicación 3, en donde la edición se calcula como un porcentaje de la población que se edita (porcentaje de edición), y en donde el porcentaje de edición es entre 30 y 99% de la población.
5. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde el ARNsg comprende una secuencia de guía de SEQ ID NO: 9 y los nucleótidos de la SEQ ID NO: 125 en el extremo 3' de la secuencia de guía.
6. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en donde el ARNsg comprende una secuencia
mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm
GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 93), en
donde * denota que el nucleótido se une al siguiente nucleótido con un enlace PS y una
"m" minúscula denota que el nucleótido es sustituido con 2'-O-Me.
7. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en donde el ARN de guía además comprende una modificación seleccionada de:
 - a. un nucleótido modificado con 2'-O-metil (2'-O-Me);
 - b. un enlace de fosforotioato (PS) entre los nucleótidos;
 - c. un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F);
 - d. una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en el extremo 5';
 - e. una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3';
 - f. nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5';
 - g. nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3'; o
 - h. mezclas de estos.

8. El método o la composición de la Reivindicación 7, en donde el ARN de guía comprende los nucleótidos modificados de la SEQ ID NO: 3 (mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU), en donde * denota que el nucleótido se une al siguiente nucleótido con un enlace PS y una “m” minúscula denota que el nucleótido es sustituido con 2'-O-Me, donde “N” es cualquier nucleótido.

9. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en donde el ARN de guía está formulado en una nanopartícula lipídica (LNP).

10. El método o la composición de la Reivindicación 9, en donde la LNP comprende (i) un lípido ionizable, (ii) lípido neutro, (iii) un lípido auxiliar, (iv) un lípido furtivo o mezclas de estos.

11. El método o la composición de la Reivindicación 10, en donde el lípido ionizable es el Lípido A (((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3 (dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propiloctadeca-9,12-dienoato o el Lípido B ((5-((dimetilamino)metil)-1,3-fenileno)bis(oxi))bis(octano-8,1-diil)bis(decanoato).

12. El método o la composición de la Reivindicación 10 u 11, en donde el lípido neutro es DSPC (diestearoilfosfatidilcolina).

13. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 12, en donde el lípido auxiliar es el colesterol.

14. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 13, en donde el lípido furtivo es PEG-DMG (polietilenglicol -dimiristoilglicerol).

15. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 14, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN es una endonucleasa Cas.

16. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 14, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN es una Cas9 endonucleasa.

17. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 16, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN o el ARNm que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN se modifica.
18. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 17, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN es una nickasa.
19. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 18, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN modificado comprende una señal de localización nuclear (NLS).
20. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 19, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN es un Cas de un sistema CRISPR/Cas de tipo II.
21. El método o composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 20, en donde la composición es una formulación farmacéutica y además comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables.
22. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 21, en donde la unión de extremos no homólogos (NHEJ) conduce a una mutación durante la reparación de la DSB en el gen *TTR*.
23. El método o la composición de la Reivindicación 22, en donde la NHEJ conduce a una delección o inserción de uno o más nucleótidos durante la reparación de la DSB en el gen *TTR*.
24. El método o la composición de la Reivindicación 23, en donde la delección o la inserción de uno o más nucleótidos induce un cambio de marco o mutación sin sentido en el gen *TTR*.
25. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 24, en donde el ARN de guía no produce indeles en el sitio o los sitios fuera de la diana que se producen en una región de codificación de proteínas en el genoma de los hepatocitos primarios humanos.

26. El método o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 25, en donde la composición o la formulación farmacéutica se libera de un vector viral o a través de nanopartículas lipídicas.
27. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 26, en donde la célula es una célula hepática.
28. El método de la Reivindicación 27, en donde la célula hepática es un hepatocito.