

contra futuras invasiones. Doudna, *Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*” *Science* 346(6213):1258096 (2014).

Como se usa en el presente documento, el término "Cas" o “CRISPR asociadas (cas)” se refiere a genes a menudo asociados con matrices de repetición-espaciador de CRISPR.

5 Como se usa en el presente documento, el término "Cas9" se refiere a una nucleasa de sistemas CRISPR de tipo II, una enzima especializada para generar cortes de doble cadena en el ADN, con dos sitios de corte activos (los dominios HNH y RuvC), uno para cada hebra de la doble hélice. El tracrARN y el ARN espaciador se pueden combinar en una molécula de "ARN de guía única" (sgARN) que, mezclada con Cas9, podría encontrar y escindir objetivos de ADN a través del apareamiento de Watson-Crick entre la secuencia de guía dentro del sgARN y la secuencia de ADN objetivo, Jinek, “*A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in*
10 *adaptive bacterial immunity*” *Science* 337(6096):816-821 (2012).

Como se usa en el presente documento, el término "Cas9 catalíticamente activa" se refiere a una nucleasa Cas9 no modificada que comprende actividad de nucleasa completa.

15 El término "nickasa", como se usa en el presente documento, se refiere a una nucleasa que escinde solo una cadena de ADN, ya sea debido a su función natural o porque ha sido modificada para escindir solo una cadena de ADN. Las variantes de nickasa cas9 que tienen el dominio RuvC o HNH mutado proporcionan control sobre qué cadena de ADN se escinde y cuál permanece intacta. Jinek, “*A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive*
20 *bacterial immunity*” *Science* 337(6096):816-821 (2012) y Cong, “*Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*” *Science* 339(6121):819-823 (2013).

El término "transactivador crARN", "tracrARN" como se usa en el presente documento, se refiere a un ARN pequeño trans-codificado. Por ejemplo, CRISPR/Cas (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas/ proteínas asociadas a CRISPR)
25 constituye un sistema de defensa mediado por ARN, que protege contra virus y plásmidos. Este camino defensivo tiene tres pasos. Primero, una copia del ácido nucleico invasor se integra en el locus CRISPR. A continuación, los ARN CRISPR (crARN) se transcriben de este locus CRISPR. Los crARN se incorporan a los complejos efectores, donde el crARN guía el complejo hacia el ácido nucleico invasor y las proteínas Cas degradan este ácido nucleico. Hay varias vías de
30 activación CRISPR, una de las cuales requiere un tracrARN, que desempeña un papel en la maduración del crARN. TracrARN es complementario a la secuencia de repetición del pre-

crARN, formando un dúplex de ARN. Esto es escindido por RNase III, una ribonucleasa específica a ARN, para formar un híbrido crARN/tracrARN. Este híbrido actúa como una guía para la endonucleasa Cas9, que escinde el ácido nucleico invasor.

El término "motivo adyacente al protoespaciador" (o PAM) como se usa en este documento, se refiere a una secuencia de ADN que puede ser necesaria para que una Cas9/sgARN forme un bucle R para hibridizar con una secuencia de ADN específica a través del apareamiento de Watson-Crick de su ARN guía con el genoma. La especificidad de PAM puede ser una función de la especificidad de unión al ADN de la proteína Cas9 (ej., un "dominio de reconocimiento de motivo adyacente al protoespaciador" en el extremo C-terminal de Cas9).

Los términos "dominio de reconocimiento de motivo adyacente al protoespaciador", "Dominio de interacción PAM" o "PID", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos Cas9 que comprende un sitio de unión a una secuencia PAM objetivo de ADN.

El término "sitio de unión", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier disposición molecular que tenga una estructura terciaria y/o cuaternaria específica que experimente una unión física o asociación estrecha con un componente de unión. Por ejemplo, la disposición molecular puede comprender una secuencia de aminoácidos. Alternativamente, la disposición molecular puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos. Además, la disposición molecular puede comprender una bicapa lipídica u otro material biológico.

Como se usa en el presente documento, el término "sgARN" se refiere al ARN de guía única usado junto con los sistemas CRISPR asociados (Cas). Los sgARN son una fusión de crARN y tracrARN y contienen nucleótidos de secuencia complementarios al sitio objetivo deseado. Jinek, "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity" *Science* 337(6096):816-821 (2012). El apareamiento de Watson-Crick del sgARN con el sitio objetivo permite la formación del bucle R, que junto con un PAM funcional permite la escisión del ADN o, en el caso de Cas9 deficiente en nucleasas, se une al ADN en ese locus.

Como se usa en el presente documento, el término "ortogonal" se refiere a objetivos que no se superponen, no están correlacionados o son independientes. Por ejemplo, si se utilizaran dos isoformas ortogonales Cas9, emplearían sgARN ortogonales que solo programan una de las isoformas Cas9 para el reconocimiento y la escisión del ADN. Esvelt, "Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing" *Nat Methods* 10(11):1116-1121 (2013).

Figura 58B: Albino (izquierda) y chinchilla o ratones abigarrados (medio) generados por 3×10^9 GC, y chinchilla o ratones abigarrados (derecha) generados por 3×10^8 GC de cigotos con AAV6.Nme2Cas9: sgTyr.

Figura 58C: Resumen de los experimentos de edición de *Tyr ex vivo* de AAV único Nme2Cas9.sgTyr a dos dosis de AAV.

La Figura 59 muestra una alineación de secuencias de nucleótidos Nme1Cas9 y Nme2Cas9. Leyenda: Diferencias no PID aa (sombreado turquesa); diferencias PID aa (sombreado amarillo); residuos del sitio activo (letras rojas).

La Figura 60 muestra una alineación de las secuencias de nucleótidos Nme1Cas9 y Nme3Cas9. Leyenda: Diferencias no PID aa (sombreado turquesa); diferencias PID aa (sombreado amarillo); residuos del sitio activo (letras rojas).

La Figura 61 muestra una modalidad de una secuencia de aminoácidos Nme2Cas9. Leyenda: SV40 NLS (sombreado amarillo); 3X-HA-Tag (sombreado verde); NLS tipo cMyc (sombreado turquesa); Linker (sombreado morado).

La Figura 62 muestra una modalidad de una secuencia de aminoácidos Nme2Cas9. Leyenda: SV40 NLS (sombreado amarillo); 3X-HA-Tag (sombreado verde); NLS de tipo nucleoplasmina (sombreado rojo); NLS c-myc (sombreado turquesa); Linker (sombreado morado).

La Figura 63 muestra una modalidad de una secuencia de aminoácidos recombinante Nme2Cas9 (rNme2Cas9). Leyenda: SV40 NLS (sombreado amarillo); NLS de tipo nucleoplasmina (sombreado rojo); Linker (sombreado morado).

La Figura 64 muestra una modalidad de una secuencia de nucleótidos del plásmido AAV-sgARN-hNmeCas9 todo en uno. Leyenda: andamio sgARN (letras marrones); Secuencia GUIDE (letras negras); *Promotor U6* (letras azules); *Promotor U1a* (letras moradas); NLS NLS (letras verdes); hNmeCas9 (letras rojas); NLS 3X-HA y NLS BGH-pA (letras verdes/negras alternas).

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención está relacionada con composiciones y métodos para terapia génica. Varios enfoques descritos en este documento utilizan el sistema *Neisseria meningitidis* Cas9 que proporciona una plataforma de edición de genes CRISPR hiperprecisa. Además, la invención