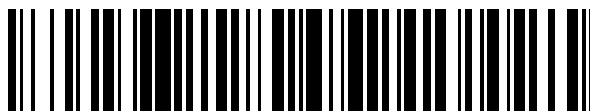


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 833**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2014 PCT/US2014/031674**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14165349**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2014 E 14779556 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2981612**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para la escisión in vivo del ADN proviral del vih-1**

30 Prioridad:

**04.04.2013 US 201361808437 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.03.2020**

73 Titular/es:

**TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE (50.0%)  
11 Rope Ferry Road  
Hanover, NH 03755-1404, US y  
UNITED STATES GOVERNMENT AS  
REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF  
VETERANS AFFAIRS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOWELL, ALEXANDRA, L. y  
ESZTERHAS, SUSAN, K.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 747 833 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para la escisión in vivo del ADN proviral del VIH-1

## 5 Antecedentes

- La CRISPR (repetición palindrómica corta agrupada intercalada regularmente); SPIDR (repeticiones directas espaciadas intercaladas), VNTR (número variable de repeticiones en tándem), SRVR (repeticiones cortas regularmente variables variables) o loci SRSR (repeticiones cortas regularmente espaciadas), descritas por Jansen y col. ((2002) OMICS J. Integr. Biol. 6:23-33), constituyen una nueva familia de secuencias repetidas que está presente en bacterias y arqueas pero no en eucariotas. Los loci de repetición se componen típicamente de tramos repetitivos de nucleótidos con una longitud de 25 a 37 pares de bases alternados por separadores de ADN no repetitivos de aproximadamente la misma longitud.
- Los productos principales de los loci CRISPR parecen ser ARN cortos que contienen las secuencias diana del invasor y se denominan ARN silenciadores procariotas (psiRNA) en función de su papel en la vía (Makarova y col. (2006) Biol. Direct 1:7; Hale y col. (2008) RNA 14:2572-2579). El análisis de ARN indica que las transcripciones de locus CRISPR se escinden dentro de las secuencias repetidas para liberar intermedios de ARN de 60 nt a 70 nt que contienen secuencias diana de invasor individuales y fragmentos de repetición flanqueantes (Tang y col. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:7536-7541; Tang y col. (2005) Mol. Microbiol 55:469-481; Lillestøl y col. (2006) Archaea 2:59-72; Brouns y col. (2008) Science 321:960-964; Hale y col. (2008) RNA 14:2572-2579). En el arqueon *Pyrococcus furiosus*, estos ARN intermedios se procesan adicionalmente hasta obtener abundante y estable PsiRNA maduro de 35 nt a 45 nt (Hale, y col. (2008) *anteriormente*). Se ha sugerido el uso del sistema CRISPR/CRISPR asociado (Cas) para biología sintética, la perturbación directa y multiplexada de redes de genes y la terapia génica dirigida *ex vivo* e *in vivo* (Mali y col. (2013) Science 339:823-6). Wang, en el documento "Ingeniería genética y genómica humana guiada por ARN y extensión radical de la vida, prevención de enfermedades y curas" (2013), describe el principio de los sistemas CRISPR/CRISPR asociados (Cas) que usan ARN corto para dirigir la degradación de ácidos nucleicos extraños. Seung Woo Cho y col., en el documento "Ingeniería de genoma dirigida en células humanas con la endonucleasa guiada por ARN Cas9", Nature Biotechnology, vol. 31, no. 3, páginas 230 - 232, (20130129), aplican el sistema CRISPR con ARN guía personalizado a células humanas y revelan la aplicabilidad general de la tecnología.
- Habu Y. y col., en el documento "Inhibición de la expresión génica del VIH-1 por ARN guía pequeño mediado por vector retroviral que dirige la escisión de ARN específico por tRNase ZL", Nucleic Acids Research (20050101), vol. 33, no. 1 describe la inhibición de la expresión del gen VIH-1 por ARN guía pequeño mediado por vector retroviral. El documento [US2005042620](#) se centra en un procedimiento para escindir un sustrato de ARN con un catalizador de ARN sintético.
- El documento [US2012052483](#) describe un kit para detectar VIH-1 que comprende cebadores y una sonda.

Sin embargo, no se han descrito moléculas concretas para dirigirse al ADN exógeno integrado en el genoma humano.

## Resumen de la invención

- Esta invención es un procedimiento in vitro para inhibir la función o la presencia de una secuencia de ADN del virus de inmunodeficiencia humana diana 1 (VIH-1) en una célula eucariota mediante el contacto de una célula eucariota que alberga una secuencia de ADN del VIH-1 diana con (a) uno o más ARN guía, o ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía, y (b) una proteína (cas) asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas, o ácidos nucleicos que codifican dicha proteína cas, donde dicho ARN guía se hibrida con dicha secuencia de ADN de VIH-1 diana inhibiendo de ese modo la función o presencia de dicha secuencia de ADN diana de VIH-1, donde la secuencia de ADN diana de VIH-1 se selecciona del grupo constituido por SEC ID NO:2, SEC ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO: 8. En realizaciones, la proteína cas es cas9, optimizada por codones para la expresión en células humanas y/o incluye una secuencia de localización nuclear.
- Un kit que contiene (a) uno o más ARN guía, o ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía, donde dicho ARN guía se hibrida con una secuencia de ADN de VIH-1 diana; y (b) una proteína cas; o también se proporciona un ácido nucleico que codifica dicha proteína. La secuencia de ADN del VIH-1 diana se selecciona del grupo constituida por SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO: 8. En realizaciones, la proteína cas es cas9, optimizada por codones para la expresión en células humanas y/o incluye una secuencia de localización nuclear.
- Un vector que alberga ácidos nucleicos que codifican uno o más ARN guía, donde dicho ARN guía se hibrida con una secuencia de ADN diana del virus de inmunodeficiencia humana 1 seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO: 8 se proporciona además.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la estructura secundaria de una transcripción de ARN guía con la secuencia espaciadora de LTR de VIH-1.

- 5 La figura 2 muestra la administración del ARN guía (ARNg) y la proteína cas con la posterior transcripción, traducción y escisión de la secuencia diana del VIH-1.

La figura 3A muestra el efecto de la expresión de ARN guía específico para el VIH y hCas9 sobre la expresión de la expresión de GFP endógena impulsada por el promotor LTR. La transfección de un vector vacío activa modestamente la expresión de GFP (15% de células GFP + frente al 6% de células GFP + en controles no tratados). La co-transfección del plásmido de expresión de hCas y los plásmidos de expresión de ARN guía indicados (U3A, U3B, U3C, TAR, U5, 5'UT y GAG) en algunos casos (más notablemente U3B y U5) redujeron la expresión por debajo del 10%, mientras que otros ARN guía no tuvieron efecto (*p. ej.*, U3A, U3C y TAR). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las estadísticas ANOVA indican diferencias significativas entre el vector vacío y algunos ARN guía con \* $p < 0,05$ ; \*\* $p = 0,005$ ; \*\*\* $p = 0,0005$ .

La figura 3B muestra el efecto de la expresión de ARN guía específico para el VIH y hCas9 sobre la expresión de la expresión de GFP endógena impulsada por el promotor LTR en presencia de TNF- $\alpha$ . Este análisis indicó que la activación moderada de células J-Lat con la exposición a 5 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante solo seis horas no alteró los resultados presentados en la figura 3A, lo que indica alteraciones duraderas en la integridad de la LTR resultante de escisión guiada por ARN guía específico. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las estadísticas ANOVA indican diferencias significativas entre el vector vacío y algunos ARN guía con \* $p < 0,05$ ; \*\* $p = 0,005$ ; \*\*\* $p = 0,0005$ .

La figura 4A muestra que el ARN guía específico reduce la expresión de GFP de un plásmido indicador de LTR. Las células Jurkat se transfectaron con tres plásmidos: ARN guía, hCas y plásmido indicador de VIH-1 donde una LTR intacta y la secuencia 5' promueven la expresión de GFP. Los resultados muestran una reducción en el porcentaje de células que expresan GFP con varios plásmidos de ARN guía, pero no con ARN guía para U3C y TAR. El gráfico representa la compilación de dos experimentos separados, cada uno con pocillos por triplicado, \* $p < 0,05$ .

30 La figura 4B muestra la integridad relativa del plásmido indicador de LTR. Las células Jurkat se transfectaron con tres plásmidos: ARN guía, hCas y plásmido indicador de VIH-1 donde una LTR intacta y la secuencia 5' promueven la expresión de GFP. Se aisló el ADN total y se analizó la integridad del plásmido indicador recuperado mediante PCR en tiempo real usando cebadores que flanquean los sitios de unión de U3B a través de los ARN guía de GAG.

### 35 Descripción detallada de la invención

Esta invención proporciona procedimientos y kits *in vitro* para usar el sistema CRISPR para interferir con la función y/o presencia de segmentos de ADN del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), que están integrados en el genoma de la célula huésped (*p. ej.*, situados *in vitro* o en un sujeto) y son la fuente de nuevas partículas virales. Sin este segmento integrado de ADN viral, la célula infectada no puede producir nuevas partículas virales, reduciendo así la carga viral en una persona infectada.

Por consiguiente, esta invención es un procedimiento *in vitro* para inhibir la función y/o presencia de una secuencia de ADN del VIH-1 diana en una célula eucariota mediante la administración de uno o más ARN guía y una proteína cas, o ácidos nucleicos que codifican dicho ARN guía o proteína cas, a una célula eucariota que alberga una secuencia de ADN diana de VIH-1, donde dicho ARN guía se hibrida con dicha secuencia de ADN diana de VIH-1 interfiriendo de ese modo con la función y/o presencia de dicha secuencia de ADN diana de VIH-1. La función de una secuencia diana de ADN del VIH-1 se inhibe cuando, *p. ej.*, la secuencia diana ya no se transcribe y/o traduce. A este respecto, la diana de ADN del VIH-1 puede mutar o escindirse. La presencia de una secuencia diana de ADN del VIH-1 se inhibe cuando la secuencia diana, *p. ej.*, se escinde del genoma del huésped.

En bacterias y arqueas, las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas (CRISPR)/sistema asociado a CRISPR (Cas) utilizan ARN corto para dirigir la degradación de ácidos nucleicos extraños (ADN/ARN). La defensa CRISPR implica la adquisición e integración de nuevos "espaciadores" dirigidos desde el virus invasor o el ADN plasmídico al locus CRISPR, la expresión y el procesamiento de ARN CRISPR guía cortos (crRNA) compuestos por unidades de repetición espaciadoras y la escisión de ácidos nucleicos (más comúnmente ADN) complementarios al espaciador.

Se han descrito tres clases de sistemas CRISPR (Tipo I, II y III). Se emplea el sistema CRISPR Tipo II, ya que utiliza una sola enzima efector, Cas9, para escindir dsDNA, mientras que los sistemas Tipo I y Tipo III requieren múltiples efectores distintos que actúan como un complejo (Makarova y col. (2011) *Nat. Rev. Microbiol.* 9:467). El sistema efector Tipo II está compuesto por un precursor de RNA transcrito de CRISPR largo transcrito desde el locus CRISPR que

- contiene espaciadores, la proteína Cas9 multifuncional y un tracrRNA para el procesamiento de gRNA. Los tracrRNA se hibridan con las regiones repetidas que separan los espaciadores del precursor de RNA transcrito de CRISPR, iniciando la escisión de dsRNA por RNasa III endógena, que es seguida por un segundo evento de escisión dentro de cada espaciador por Cas9, produciendo crRNA maduros que permanecen asociados con tracrRNA y Cas9.
- 5 Sin embargo, se ha demostrado que una fusión tracrRNA:crRNA, denominada ARN guía (gRNA) puede funcionar *in vitro* obviando la necesidad de RNasa III y el procesamiento de crRNA en general (Jinek y col. (2012) Science 337:816). Por consiguiente, en una realización particular de esta invención, se usa una molécula de ARN guía para dirigirse a una secuencia de ADN de VIH-1. Las moléculas de ARN guía de esta invención pueden variar en tamaño de 80 a 130 nucleótidos, de 90 a 120 nucleótidos o de 100 a 110 nucleótidos de longitud y estar compuestas de una combinación
- 10 de ARN y ADN. En realizaciones particulares, el ARN guía tiene la secuencia R-GU UUU AGA GCU AGA AAU AGC AAG UUA AAA UAA GGC UAG UCC GUU AUC AAC UUG AAA AAG UGG CAC CGA GUC GGU GCT TTT TT (SEQ ID NO:1), donde R es una secuencia espaciadora que se hibrida específicamente con una secuencia diana de ADN del VIH-1.
- 15 La interferencia CRISPR tipo II es el resultado de que Cas9 desenrolla el dúplex de ADN y busca secuencias que coincidan con el crRNA para escindirlas. El reconocimiento de la diana se produce al detectar la complementariedad entre una secuencia "protoespaciadora" en el ADN diana y la secuencia espaciadora restante en el crRNA. La Cas9 corta el ADN solo si también está presente un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) correcto en el extremo 3'. Los diferentes sistemas de Tipo II tienen diferentes requisitos de PAM. El sistema con *S. pyogenes* requiere una
- 20 secuencia NGG, donde N puede ser cualquier nucleótido (Mali y col. (2013) Science 339:823-6). Los sistemas tipo II con *S. thermophilus* requieren NGGNG (Horvath y Barrangou (2010) Science 327:167) y NNAGAAW (Deveau y col. (2008) J. Bacteriol. 190:1390), respectivamente, aunque los diferentes sistemas con *S. mutans* toleran NGG o NAAR (van der Ploeg y col. (2009) Microbiology 155:1966).
- 25 En algunas realizaciones, el ARN guía se dirige a un sitio en la secuencia de ADN del VIH-1. En otras realizaciones, se usa más de un ARN guía para dirigirse a múltiples sitios dentro de la secuencia de ADN del VIH-1. En ciertas realizaciones, el espaciador del ARN guía tiene una secuencia diana seleccionada de las presentadas en la Tabla 1. Sin embargo, los análisis bioinformáticos han generado bases de datos extensas de loci CRISPR en diversas bacterias y se usan para determinar PAM e identificar secuencias de VIH-1 dirigibles mediante CRISPR adicionales (Rho y col.
- 30 (2012) PLoS Genet. 8:e1002441; Pride y col. (2011) Genome Res. 21:126).

TABLA 1

Región de correspondencia VIH-1	de en	Ubicación en la región de correspondencia	Secuencia diana de ARN guía	SEQ ID NO:
LTR		U3	TCTACTTGCTCTGGTTCAAC <u>IGG</u>	2
LTR		U3	GGGCCATGTGACGAAATGCT <u>AGG</u>	3
LTR		U3	CAGCAGTCTTTGTAGTACTC <u>CGG</u>	4
LTR		U5	TACCAGAGTCACACAACAGAC <u>CGG</u>	6
GAG		5'UT	GCTGAAGCGCGCACGGCAAG <u>AGG</u>	7
GAG		Término N	GCGAGAGCGTCGGTATTAAG <u>CGG</u>	8

- LTR, repetición terminal larga; u3, un elemento de control; TAR, región activadora de Tat; U5, un elemento de control;
- 35 UT, secuencia no traducida de Gag; Término N, porción N-terminal de Gag; codificación, dentro de la secuencia de codificación de proteínas de Gag. Los nucleótidos subrayados indican un motivo adyacente al protoespaciador (PAM).

- En realizaciones particulares de esta invención, el ARN guía se dirige a la porción LTR del ADN del VIH-1. La LTR funciona para promover y regular la transcripción de los genes que son esenciales para ensamblar nuevos viriones,
- 40 así como para transcribir todo el genoma del VIH-1, que está empaquetado en partículas infecciosas. Hay dos copias de la LTR en el provirus integrado, duplicando así el tamaño de la diana instantánea. Las secuencias diana LTR identificadas anteriormente tienen la secuencia PAM requerida y son exclusivas del VIH-1 y no tienen homologías de reacción cruzada en el genoma humano. Esto es de particular importancia porque el genoma humano contiene muchos otros retrovirus con secuencias similares a LTR. Por lo tanto, se espera una citotoxicidad muy baja o nula en las células

no infectadas.

Los sistemas CRISPR tipo II incluyen el sistema tipo "HNH" (similar a *Streptococo*; también conocido como el subtipo Nmeni, para *Neisseria meningitidis* serogrupo A cepa Z2491 o CASS4), donde Cas9 es suficiente para generar crRNA y escindir el ADN diana. Cas9 contiene al menos dos dominios de nucleasa, un dominio de nucleasa similar a RuvC cerca del extremo amino y el dominio de nucleasa HNH (o similar a McrA) en medio de la proteína. Dado que el dominio de nucleasa HNH es abundante en enzimas de restricción y posee actividad endonucleasa (Kleanthous y col. (1999) Nat. Struct. Biol. 6:243-52; Jakubauskas y col. (2007) J. Mol. Biol. 370:157-169), se ha sugerido que este dominio es responsable de la escisión de la diana. Además, para el sistema CRISPR-Cas tipo II de *S. thermophilus*, se ha demostrado la señalización del ADN de plásmidos y fagos *en vivo* (Garneau y col. (2010) Nature 468:67-71) y se ha demostrado que la inactivación de Cas9 elimina la interferencia (Barrangou y col. (2007) Science 315:1709-12). En algunas realizaciones de esta invención, la proteína cas utilizada en la escisión de la secuencia diana del VIH-1 es una proteína cas de tipo II. En otras realizaciones, la proteína cas es una proteína cas de tipo II aislada de *Streptococcus thermophilus*, *Listeria innocua*, *Neisseria meningitidis* o *S. pyogenes*. En otras realizaciones, la proteína cas es una proteína cas9 aislada de *Streptococcus thermophilus* (véase GENBANK núm. de acceso YP\_820832), *Listeria innocua* (véase GENBANK núm. de acceso NP\_472073), *Neisseria meningitidis* (véase GENBANK núm. de acceso YP\_002342100) o *S. pyogenes* (Véanse los números de acceso GENBANK. AAK33936 y NP\_269215). En ciertas realizaciones, la proteína cas9 se ha optimizado con codones para la expresión en humanos (SEQ ID NO:11). Los plásmidos que albergan ácidos nucleicos que codifican proteínas cas9 están disponibles en repositorios como Addgene (Cambridge, MA). Ejemplos de tales plásmidos incluyen pMJ806 (*S. pyogenes* cas9), pMJ823 (*L. innocua* cas9), pMJ824 (*S. thermophilus* cas9), pMJ839 (*N. meningitidis* cas9) y pMJ920 (cas9 optimizado con codón humano).

Para facilitar la entrada en el núcleo, la proteína cas de la invención puede incluir una secuencia de localización nuclear (NLS). El término "secuencia de localización nuclear" significa una secuencia de aminoácidos que induce el transporte de moléculas que tienen tales secuencias o que se unen a tales secuencias en el núcleo de células eucariotas. En este contexto, el término "tener" significa preferiblemente que la secuencia de localización nuclear forma parte de la molécula, es decir que está unida a las partes restantes de la molécula por enlaces covalentes, p. ej. una fusión de proteínas "in-frame". El término "unido" en este contexto significa cualquier posible enlace entre la secuencia de localización nuclear y otra molécula que se introducirá en el núcleo de una célula eucariota, p. ej., mediante enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas. El término "transporte al núcleo" en este contexto significa que la molécula se transloca al núcleo.

La translocación nuclear puede detectarse por medios directos e indirectos. Por ejemplo, la observación directa se puede lograr mediante fluorescencia o microscopía confocal láser cuando la secuencia de localización nuclear o la molécula translocada (por ejemplo, la proteína cas o el ARN guía) se marcan con un tinte fluorescente (los kits de marcado están disponibles comercialmente, p. ej., en Pierce o Molecular Probes). La translocación también se puede evaluar mediante microscopía electrónica si la secuencia de localización nuclear o la molécula translocada (p. ej., la proteína cas o el ARN guía) están marcados con un material denso en electrones como el oro coloidal (Oliver (1999) Methods Mol. Biol. 115:341-345). La translocación se puede evaluar de manera indirecta, p. ej., midiendo la escisión de una secuencia de ADN de VIH-1 diana.

Se han descrito varias secuencias de localización nuclear en la técnica. Estas incluyen la secuencia de localización nuclear del antígeno T grande del virus SV40, cuya unidad funcional mínima es la secuencia de siete aminoácidos PKKKRKV (SEQ ID NO:12). Otros ejemplos de secuencias de localización nuclear incluyen la NLS bipartita de nucleoplasmina con la secuencia NLSKRPAAIKAGQAKKKK (SEQ ID NO:13) (Michaud y Goldfarb (1991) J. Cell Biol. 112:215-223), la secuencia de localización nuclear de c-myc que tiene la secuencia de aminoácidos PAAKRVKLD (SEQ ID NO:14) o RQRRNELKRSF (SEQ ID NO:15) (Chesky y col. (1989) Mol. Cell Biol. 9:2487-2492) y el hRNP1 M9 NLS que tiene la secuencia NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY (SEQ ID NO:16) (Siomi y Dreyfuss (1995) J. Cell Biol. 129:551-560). Otros ejemplos de NLS incluyen las secuencias RMRKFKNKGDTAELRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV (SEQ ID NO:17) del dominio IBB de importina-alfa (Gorlich y col. (1995) Nature 377:246-248); VSRKRPRP (SEQ ID NO:18) y PPKKARED (SEQ ID NO: 19) de la proteína T del mioma; PPKKKPL (SEQ ID NO:20) de p53 humano; SALIKKKKMAP (SEQ ID NO:21) de ratón c-abl IV (Van Etten y col. (1989) Cell 58:669-678); DRLRR (SEQ ID NO:22) y PKQKKRK (SEQ ID NO:23) del virus de la gripe NS1 (Greenspan y col. (1988) J. Virol. 62:3020-3026), RKLKKKIKKL (SEQ ID NO:24) del antígeno delta del virus de la hepatitis (Chang y col. (1992) J. Virol. 66:6019-6027); y REKKKFLKRR (SEQ ID NO:25) de la proteína Mx1 de ratón (Zurcher y col. (1992) J. Virol. 66:5059-5066). También es posible utilizar secuencias de localización nuclear bipartitas como la secuencia KRKGDEVDGVDEVAKKSKK (SEQ ID NO:26) de la polimerasa de poli (ADP-ribosa) humana (Schreiber y col. (1992) EMBO J. 11:3263-3269) o la secuencia RKCLQAGMNLEARKTKK (SEQ ID NO:27) de los glucocorticoides de los receptores de hormonas esteroideas (humanas) (Cadepond y col. (1992) Exp. Cell Res. 201:99-108). En algunas realizaciones, la NLS está ubicada en el extremo N de la proteína cas. En otras realizaciones, la NLS está ubicada en el extremo C de la proteína cas.

El uno o más ARN guía y proteína cas pueden usarse según los procedimientos de esta invención como ARN y proteína aislados, respectivamente. Como se usa en el presente documento, una molécula aislada (*p. ej.*, un ácido nucleico aislado tal como ADN, ARN o un polipéptido aislado) significa una molécula separada o sustancialmente libre de al menos algunos de los otros componentes del organismo presente en la naturaleza, como por ejemplo, los componentes estructurales de la célula u otros polipéptidos o ácidos nucleicos que se encuentran comúnmente asociados con la molécula. En general, una molécula aislada presenta al menos aproximadamente el 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más de pureza (p/p).

Alternativamente, el uno o más ARN guía y proteína cas pueden proporcionarse a una célula o sujeto mediante ácidos nucleicos aislados que codifican el ARN guía y la proteína cas, respectivamente. En una realización, los ácidos nucleicos aislados que codifican el ARN guía y la proteína cas se proporcionan como ADN desnudo. En otra realización, los ácidos nucleicos aislados que codifican el ARN guía y la proteína cas están incorporados en un vector de transferencia de genes. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión. Los vectores ejemplares incluyen plásmidos, vectores lipídicos y vectores virales. El término expresar, expresa o expresión de un ácido nucleico significa que la secuencia se transcribe y, en el caso de la proteína cas, se traduce dando como resultado la producción de la proteína cas.

Los procedimientos de la presente invención proporcionan un medio para transferir y expresar ácidos nucleicos que codifican un ARN guía y una proteína cas en células humanas. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se expresan transitoriamente en la célula diana. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos se incorporan de manera estable en la célula diana, por ejemplo, mediante integración en el genoma de la célula o mediante expresión persistente de episomas mantenidos establemente (*p. ej.*, derivados del virus Epstein Barr).

Según un aspecto, los ácidos nucleicos aislados, los vectores, los procedimientos y los kits de la invención encuentran uso en un procedimiento de administración de un ARN guía y proteína cas a un sujeto. De esta manera, el ARN guía y la proteína cas pueden así ser producidos *en vivo* en el sujeto. El sujeto puede padecer o estar en riesgo de padecer una infección por VIH-1, de modo que el ARN guía y la proteína cas producen un efecto terapéutico, *p. ej.*, reduciendo la carga viral o la propagación.

Será evidente para los expertos en la técnica que se puede usar cualquier vector adecuado para administrar los ácidos nucleicos aislados de esta invención a la(s) célula(s) diana o sujeto de interés. La elección del vector de transferencia se puede hacer en función de una serie de factores conocidos en la técnica, que incluyen la edad y la especie del huésped diana, el nivel y la persistencia de la expresión deseada, la célula u órgano objetivo, la ruta de transferencia, el tamaño del ácido nucleico aislado, las preocupaciones de seguridad y similares.

Los vectores adecuados incluyen vectores de virus (*p. ej.*, retrovirus, alfavirus; virus vaccinia; adenovirus, virus adenoasociado o virus herpes simple), vectores de lípidos, vectores de polilisina, vectores de polímeros poliamino sintéticos, plásmidos y similares.

Como se usa en el presente documento, el término vector viral o vector de transferencia viral puede referirse a una partícula viral que funciona como un vehículo de administración de ácido nucleico y que contiene el genoma del vector empaquetado dentro de un virión. Alternativamente, estos términos pueden usarse para referirse al genoma del vector cuando se usan como un vehículo de transferencia de ácido nucleico en ausencia del virión.

Los protocolos para producir vectores virales recombinantes y para usar vectores virales para la transferencia de ácido nucleico se pueden encontrar en el documento Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. y col. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989) y otros manuales de laboratorio estándar (*p. ej.* Vectors for Gene Therapy. En: Current Protocols in Human Genetics. John Wiley and Sons, Inc.: 1997). Los ejemplos particulares de vectores virales incluyen, por ejemplo, retrovirus, adenovirus, AAV, virus del herpes y vectores de poxvirus.

En ciertas realizaciones de esta invención, el vector de transferencia es un vector de adenovirus. El término adenovirus, como se usa en el presente documento, pretende abarcar todos los adenovirus, incluidos los géneros *Mastadenovirus* y *Aviadenovirus*. Hasta la fecha, se han identificado al menos cuarenta y siete serotipos humanos de adenovirus (véase, *p. ej.*, Fields y col., Virology, volume 2, chapter 67 (3d ed., Lippincott-Raven Publishers). En una realización, el adenovirus es un adenovirus del serogrupo C humano; en otra realización, el adenovirus es el serotipo 2 (Ad2) o el serotipo 5 (Ad5) o un adenovirus de mono tal como AdC68.

Los expertos en la materia apreciarán que los vectores pueden modificarse o dirigirse como se describe en los documentos Douglas y col. (1996) Nature Biotechnology 14:1574 y la patente estadounidense 5.922.315; la patente estadounidense 5.770.442 y/o la patente estadounidense 5.712.136.

Un genoma de adenovirus puede manipularse de modo que codifique y exprese un ácido nucleico de interés pero se

inactivo en términos de su capacidad de replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. Véanse, por ejemplo, los documentos Berkner y col. (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld y col. (1991) *Science* 252:431-434; y Rosenfeld y col. (1992) *Cell* 68:143-155.

- 5 Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias porque no son capaces de infectar células que no se dividen y pueden usarse para infectar una amplia variedad de tipos de células. Además, la partícula viral es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración y puede modificarse para afectar el espectro de infectividad. Además, el ADN adenoviral introducido (y el ADN extraño contenido en el mismo) no está integrado en el genoma de una célula huésped sino que permanece episomal, evitando así los posibles problemas que pueden
- 10 ocurrir como resultado de la mutagénesis de inserción en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el genoma del huésped. (*p. ej.*, como ocurre con el ADN retroviral). Además, la capacidad de carga del genoma adenoviral para ADN extraño es grande en relación con otros vectores de transferencia (Haj-Ahmand and Graham (1986) *J. Virol.* 57:267).
- 15 En realizaciones particulares, el genoma de adenovirus contiene una delección en el mismo, de modo que al menos una de las regiones genómicas de adenovirus no codifica una proteína funcional. Por ejemplo, un vector de adenovirus puede tener genes E1 y empaquetarse utilizando una célula que expresa las proteínas de E1 (*p. ej.*, 293 células). La región E3 también se elimina con frecuencia, ya que no hay necesidad de complementar esta delección. Además, se han descrito delecciones en las regiones E4, E2a, proteína IX y proteína de fibra, *p. ej.*, por Armentano y col. (1997) *J.*
- 20 *Virology* 71:2408; Gao y col. (1996) *J. Virology* 70:8934; Dedieu y col. (1997) *J. Virology* 71:4626; Wang y col. (1997) *Gene Therapy* 4:393 y la patente estadounidense 5.882.877. En general, las delecciones se seleccionan para evitar la toxicidad para la célula de empaquetamiento. Los expertos en la materia pueden seleccionar rutinariamente combinaciones de delecciones que evitan la toxicidad u otros efectos nocivos sobre la célula huésped.
- 25 Los expertos en la materia apreciarán que, por lo general, con la excepción de los genes E3, será necesario complementar cualquier delección para propagar (replicar y empaquetar) virus adicionales, *p. ej.*, por transcomplementación con una célula de empaquetamiento.

La presente invención también se puede practicar con vectores de adenovirus destripados (como se entiende ese

30 término en la técnica, véase, *p. ej.*, el documento Lieber y col. (1996) *J. Virol.* 70:8944-60) donde esencialmente se eliminan todas las secuencias genómicas de adenovirus.

Los virus adenoasociados (AAV) también se han empleado como vectores de transferencia de ácidos nucleicos. Para una revisión, véase Muzyczka y col. (1992) *Curr. Topics Micro. Immunol.* 158:97-129). Los AAV se encuentran entre

35 los pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no se dividen y exhiben una alta frecuencia de integración estable en el cromosoma 19 humano (véase, por ejemplo, Flotte y col. (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356; Samulski y col., (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; McLaughlin y col. (1989) *J. Virol.* 62:1963-1973). Se ha introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferentes tipos de células usando vectores AAV (véase, por ejemplo, Hermonat y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470; Tratschin y col. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Wondisford y col.

40 (1988) *Mol. Endocrinol.* 2:32-39; Tratschin y col. (1984) *J. Virol.* 51:611-619; y Flotte y col. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790).

Se puede usar cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica para producir vectores AAV que expresen los ácidos nucleicos de esta invención (véanse, *p. ej.*, la patente estadounidense 5.139.941; la patente estadounidense

45 5.858.775 y la patente estadounidense 6.146.874 para procedimientos ilustrativos). En un procedimiento particular, las reservas de AAV pueden producirse mediante la co-transfección de un vector rep/cap que codifica funciones de empaquetamiento de AAV y la plantilla que codifica el vDNA de AAV en células humanas infectadas con el adenovirus auxiliar (Samulski y col. (1989) *J. Virology* 63:3822). Los genes rep y/o cap de AAV pueden ser proporcionados, alternativamente, por una célula de empaquetamiento que exprese de manera estable los genes (véase *p. ej.*, Gao y

50 col. (1998) *Human Gene Therapy* 9:2353; Inoue y col. (1998) *J. Virol.* 72:7024; la patente estadounidense 5.837.484, el documento WO 98/27207; la patente estadounidense 5.658.785; el documento WO 96/17947)

Otro vector para usar en la presente invención es el virus del herpes simple (HSV). El HSV puede modificarse para el suministro de ácidos nucleicos a las células mediante la producción de un vector que exhibe solo la función latente

55 para el mantenimiento de genes a largo plazo. Los vectores de HSV son útiles para el suministro de ácido nucleico porque permiten una inserción de ADN grande de hasta 20 kilobases o más; se pueden producir con títulos extremadamente altos; y se ha demostrado que expresan ácidos nucleicos durante un largo período de tiempo en el sistema nervioso central siempre que no se produzca el ciclo lítico.

60 En otras realizaciones de la invención, el vector de transferencia de interés es un retrovirus. El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas células de empaquetamiento) que producen solo retrovirus con replicación defectuosa ha aumentado la utilidad de los retrovirus para la terapia génica y los retrovirus defectuosos se caracterizan

por su uso en la transferencia génica con fines de terapia génica (para una revisión, véase Miller (1990) Blood 76:271). Un retrovirus con replicación defectuosa puede empaquetarse en viriones que pueden usarse para infectar una célula diana mediante el uso de un virus auxiliar mediante técnicas estándar.

- 5 Además de los procedimientos de transferencia viral, como los ilustrados anteriormente, también se pueden emplear procedimientos no virales. Muchos procedimientos no virales de transferencia de ácido nucleico se basan en mecanismos normales utilizados por las células de mamíferos para la absorción y el transporte intracelular de macromoléculas. En realizaciones particulares, los sistemas de transferencia de ácido nucleico no víricos dependen de rutas endocíticas para la absorción de la molécula de ácido nucleico por la célula diana. Los sistemas ejemplares  
10 de transferencia de ácido nucleico de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, conjugados de poli-lisina y envolturas virales artificiales.

En realizaciones particulares, los vectores plasmídicos se usan en la puesta en práctica de esta invención. Los plásmidos desnudos se pueden introducir en las células mediante inyección en el tejido. La expresión puede  
15 extenderse durante muchos meses, aunque el número de células positivas es generalmente bajo (Wolff y col. (1989) Science 247:247). Se ha demostrado que los lípidos catiónicos ayudan en la introducción de ácidos nucleicos en algunas células en cultivo (Felgner y Ringold (1989) Nature 337:387). Se ha demostrado que la inyección de complejos de ADN de plásmidos lipídicos catiónicos en la circulación de ratones da como resultado la expresión del ADN en el pulmón (Brigham y col. (1989) Enm. J. Med. Sci. 298:278). Una ventaja del ADN plasmídico es que puede introducirse  
20 en células no replicantes.

En una realización representativa, una molécula de ácido nucleico (*p. ej.* un plásmido) puede quedar atrapado en una partícula lipídica con cargas positivas en su superficie y, opcionalmente, etiquetarse con anticuerpos contra los  
25 antígenos de la superficie celular del tejido diana (Mizuno y col. (1992) No Shinkei Geka 20:547; el documento WO 91/06309; la patente japonesa 1047381).

Los liposomas que se componen de moléculas catiónicas anfífilas son vectores no virales útiles para la administración de ácidos nucleicos *in vitro* e *in vivo* (revisado en Crystal (1995) Science 270:404-410; Blaese y col. (1995) Cancer Gene Ther. 2:291-297; Behr y col. (1994) Bioconjugate Chem. 5:382-389; Remy y col. (1994)  
30 Bioconjugate Chem. 5:647-654; y Gao y col. (1995) Gene Therapy 2:710-722). Se cree que los liposomas cargados positivamente se complejan con ácidos nucleicos cargados negativamente a través de interacciones electrostáticas para formar complejos de lípido:ácido nucleico. Los complejos lípido:ácido nucleico tienen varias ventajas como vectores de transferencia de ácido nucleico. A diferencia de los vectores virales, los complejos lípido:ácido nucleico pueden usarse para transferir casetes de expresión de tamaño esencialmente ilimitado. Como los complejos carecen  
35 de proteínas, pueden provocar menor respuesta inmunogénica e inflamatoria. Además, no pueden replicarse o recombinarse para formar un agente infeccioso y tienen baja frecuencia de integración. Varias publicaciones han demostrado que los lípidos catiónicos anfífilos pueden mediar el suministro de ácido nucleico *in vivo* e *in vitro* (Felgner y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-17; Loeffler y col. (1993) Methods in Enzymology 217:599-618; Felgner y col. (1994) J. Biol. Chem 269:2550-2561).

40 Como se indicó, los ácidos nucleicos aislados (*es decir*, ARN guía de codificación y una proteína cas) pueden incorporarse en un vector de expresión (viral o no viral como se describe en el presente documento). Los vectores de expresión compatibles con diversas células huésped son bien conocidos en la técnica y contienen elementos adecuados para la transcripción y traducción de ácidos nucleicos. Típicamente, un vector de expresión contiene un  
45 casete de expresión, que incluye, en la dirección 5' a 3', un promotor, una secuencia de codificación que codifica uno o más ARN guía y/o una o más proteínas cas asociadas operativamente con el promotor y, opcionalmente, una secuencia de terminación que incluye una señal de parada para ARN polimerasa y una señal de poliadenilación para poliadenilasa. Los ácidos nucleicos que codifican uno o más ARN guía y una o más proteínas cas pueden transcribirse como moléculas independientes (*p. ej.*, a través de promotores independientes en vectores independientes o el mismo  
50 vector) o en la misma molécula, *p. ej.*, como ARNm bi o pluricistrónico separado por sitios de entrada ribosomales internos (IRES).

Las proteínas cas aisladas y/o el ARN guía, o los ácidos nucleicos o vectores que codifican dichas proteínas y/o ARN de la invención, pueden usarse o administrarse convenientemente en una composición que contiene los agentes  
55 activos en combinación con un vehículo. Dichas composiciones pueden prepararse mediante procedimientos y contienen vehículos que son bien conocidos en la técnica. Un compendio generalmente reconocido de tales procedimientos e ingredientes es Remington The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro, editor, 20th ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000. Un vehículo, vehículo farmacéuticamente aceptable o excipiente, tal como una carga, diluyente, excipiente líquidos o sólidos, o material de encapsulación de disolvente,  
60 está implicado en llevar o transportar el compuesto químico en cuestión desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente.



- La proteína, el ARN, los ácidos nucleicos o los vectores de la invención pueden administrarse por cualquier vía que incluye, pero no se limita a, oral, rectal, tópica, bucal (*p. ej.*, sublingual), vaginal, parenteral (*p. ej.*, subcutánea, intramuscular incluyendo músculo esquelético, músculo diafragma y músculo liso, intradérmica, intravenosa, 5 intraperitoneal), tópica (*es decir*, tanto en la superficie de la piel como en la mucosa, incluidas las superficies de las vías respiratorias), administración intranasal, transdérmica, intraarticular, intratecal e inhalación, administración al hígado por administración intraportal, así como inyección directa en órganos. La ruta más adecuada en cualquier caso dependerá del sujeto a tratar y de la naturaleza de la molécula particular que se esté utilizando.
- 10 Tras la administración de uno o más ARN guía y proteína cas, aislados o codificados por una o más moléculas de ácido nucleico, a una célula eucariota que alberga una secuencia de ADN de VIH-1 diana, la secuencia de ADN de VIH-1 diana se daña o se extrae del genoma de la célula y la función de dicha secuencia de ADN del VIH-1 diana se reduce o inhibe. Este direccionamiento de ADN dirigido por ARN a través de la interferencia CRISPR actúa a nivel de ADN y, por lo tanto, difiere fundamentalmente del fenómeno de ARNi observado en eucariotas y con el que se comparó 15 originalmente la actividad CRISPR (Makarova y col. (2006) Biol. Direct. 1:7).

- Las células eucariotas de interés en los procedimientos de esta invención son preferiblemente células de mamífero, especialmente células inmunes humanas VIH-1 positivas tales como células T auxiliares (específicamente células T CD4<sup>+</sup>), macrófagos y células dendríticas. Por ejemplo, se contempla que la introducción de uno o más ARN guía y 20 proteína cas en el torrente sanguíneo de un sujeto infectado con VIH-1 dará como resultado la transfección de células en el torrente sanguíneo. Si una célula no está infectada por VIH-1, no habrá daños en la célula ya que el ARN guía no se unirá. Por el contrario, si una célula está infectada con VIH-1, el ARN guía se hibridará con el ADN del VIH-1 diana a través de la secuencia espaciadora, y la proteína cas escindirá el ADN del VIH-1 diana inhibiendo así la función (*p. ej.*, producción de nuevos viriones/partículas infecciosas) del ADN del VIH-1. A este respecto, la inhibición de la 25 función del VIH-1, usando las moléculas de ARN guía y proteínas cas de esta invención es útil para tratar o prevenir la propagación de una infección por VIH-1.

- Por consiguiente, esta descripción se refiere a un procedimiento para tratar o prevenir la propagación de una infección por VIH-1 administrando, a un sujeto infectado por VIH-1, uno o más ARN guía y proteínas cas, o secuencias de ácido 30 nucleico que codifican dicho ARN guía o proteína cas, inhibiendo así la función y/o presencia del VIH-1. El uno o más ARN guía y proteína cas, o ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía o proteína cas, se pueden administrar de forma simultánea o secuencial. A este respecto, el ARN guía o las proteínas cas (o los ácidos nucleicos que codifican los mismos) se pueden administrar en una formulación única o en formulaciones separadas. Además, se contempla que pueden usarse diversas combinaciones de ARN guía y proteínas cas. Por ejemplo, una o más 35 moléculas de ARN guía aisladas pueden administrarse en combinación con ácidos nucleicos que codifican una proteína cas (*p. ej.*, en un vector). Alternativamente, una o más moléculas de ARN guía pueden administrarse en un vector en combinación con una proteína cas aislada. Además, las moléculas de ARN guía aisladas pueden administrarse en combinación con una proteína cas aislada y/o uno o más vectores que albergan ácidos nucleicos que codifican moléculas de ARN guía pueden administrarse en combinación con un vector que alberga ácidos nucleicos 40 que codifican una proteína cas.

- Los sujetos que se benefician de dicho tratamiento incluyen aquellos identificados como VIH-1 positivo, así como los sujetos en riesgo de infectarse con VIH-1 (*p. ej.* trabajadores del sector sanitario que pueden haber estado expuestos al virus del VIH por un pinchazo de aguja u otra forma de contacto con el paciente, o pacientes involucrados en 45 actividades de alto riesgo como el uso de drogas intravenosas). El uso de las composiciones y procedimientos de esta invención puede disminuir la carga viral y/ prevenir la propagación del VIH-1 en un sujeto o de un sujeto a otro.

- Para facilitar el uso de las composiciones descritas en el presente documento, esta invención también proporciona un kit. El kit contiene uno o más ARN guía según la invención, una proteína cas como se describe en el presente 50 documento o ácidos nucleicos que codifican el ARN guía o proteína cas, *p. ej.*, en uno o más vectores. En realizaciones particulares, el espaciador del ARN guía se dirige al ADN del VIH-1 seleccionado del grupo de SEQ ID NO:2, 3, 4, 6, 7 y 8. En otra realización, la proteína cas es una proteína cas9, en particular una proteína cas9 optimizada con codón humano, *p. ej.*, como se establece en la SEQ ID NO:11. El kit también puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable así como, opcionalmente, instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosificación del 55 ARN guía y proteína cas o ácidos nucleicos que los codifican. El kit de esta invención se puede usar solo o en combinación o simultáneamente con otros tratamientos convencionales contra el VIH que incluyen, entre otros, tratamientos antirretrovirales altamente activos (TARGA), *p. ej.*, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (NNRTI) tales como efavirenz, etravirina y nevirapina; inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos (INTI) tales como Abacavir y los fármacos combinados emtricitabina y tenofovir, y lamivudina y zidovudina; inhibidores de proteasa 60 (IP) tales como atazanavir, darunavir, fosamprenavir y ritonavir; inhibidores de entrada o fusión tales como enfuvirtida y maraviroc; e inhibidores de la integrasa como raltegravir.

La invención se describirá adicionalmente en el siguiente ejemplo, que no limita el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

**Ejemplo 1: Apuntando a LTR de VIH-1 *in Vivo***

5 Se genera ADN plasmídico que codifica la molécula de ARN guía que se une de manera única a una de las cinco regiones específicas ubicadas dentro de la región de repetición terminal larga de VIH-1 del ADN proviral de VIH-1 (Figura 1). Asimismo, se genera un plásmido que codifica una nucleasa cas9. Ambos plásmidos se transfieren a células humanas, donde se transcriben los loci cas9 y de ARN guía y se traduce la transcripción cas9. Posteriormente, el  
10 segmento de ARN guía se une a la nucleasa cas9 para formar un complejo híbrido. Debido a la adición de una secuencia de localización nuclear, este complejo híbrido se introduce en el núcleo donde el segmento de ARN guía se une a su secuencia complementaria en el ADN proviral del VIH-1. La nucleasa corta el ADN proviral, efectuando un corte de ADN bicatenario que generalmente no es reparable. Véase la figura 2. Con este método, el ADN proviral del VIH-1 se puede escindir del genoma de una célula infectada.

**Ejemplo 2: Uso de CRISPR/Cas para apuntar a LTR de VIH-1 integrado en células J-Lat**

Usando una línea celular J-Lat (una línea de cáncer de células T humanas), se determinó si la escisión de la región de repetición terminal larga (LTR) del VIH-1 por el complejo ARN guía:hCas9 altera la actividad transcripcional de estas células. Se usó citometría de flujo para cuantificar las células que producen proteína verde fluorescente (GFP) del promotor LTR 22 horas después de la transfección. El análisis de citometría de flujo proporciona un porcentaje de células que expresan GFP y permite la cuantificación de la intensidad de expresión dentro de la población celular mediante la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células GFP+. La citometría de flujo puede distinguir entre mutaciones en la región LTR que reducen la transcripción de aquellas que la eliminan por  
25 completo.

Para este análisis, las células J-Lat se cotransfectaron con ARN guía específicos de VIH que reconocen varias regiones diferentes dentro del provirus integrado como se describe en el presente documento, junto con el plásmido que codifica hCas9. Como se muestra en las figuras 3A y 3B, guiar ARN a las regiones U3B y U5 de la LTR fue lo más  
30 efectivo para reducir la expresión de GFP (lo que indica una interrupción en la LTR del VIH-1), mientras que guiarlos a las regiones U3A, U3C y TAR fue relativamente ineficaz. Además de demostrar la capacidad del CRISPR/Cas para apuntar a la LTR de VIH-1 en una línea celular humana, estos datos también subrayan la utilidad de esta línea celular para proporcionar una lectura rápida de la eficacia del ARN guía.

**Ejemplo 3: Método CRISPR/Cas para escindir el ADN del VIH-1 expresado por el ADN plasmídico**

Para determinar la eficacia del método CRISPR/Cas para escindirse dentro de la LTR de VIH-1 y alterar la transcripción, las células Jurkat se transfectaron con tres plásmidos diferentes. Estos plásmidos incluían varios ARN guía, el plásmido Cas9 humanizado y un tercer plásmido (indicador) donde una LTR de VIH-1 intacta y secuencias 5'  
40 promueven la expresión de GFP.

Como se muestra en la figura 4A, guiar ARN a las regiones U3A, U3B y U5 en la LTR redujo significativamente la expresión de GFP del plásmido indicador en células Jurkat transfectadas. Esto confirmó los resultados observados en las células J-Lat (Figura 3A y 3B). Curiosamente, guiar los ARN a la región no traducida 5' inmediatamente en dirección  
45 3' de la LTR (región no traducida 5' (UT) y a la región gag (antígeno de grupo) (GAG), también redujo la expresión de GFP del plásmido indicador. Las células se lisaron posteriormente para recuperar el ADN y la reacción en cadena de la polimerasa se realizó usando cebadores del plásmido indicador que amplificaría una región desde U3B a través de GAG (y por lo tanto no amplificaría la región U3A). Los datos preliminares (Figura 4B) indicaron que la integridad del plásmido indicador estaba comprometida (escindida) en las transfecciones que incluían ARN guía a U3B, U3C, GAG,  
50 y probablemente también a la región U5 y 5'UT, pero no a TAR (una región reguladora en el provirus VIH-1). Por lo tanto, este plásmido indicador también es útil en la detección rápida de ARN guía.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

55 <110> Fideicomisarios del Dartmouth College  
Howell, Alexandra L.  
Eszterhas, Susan K.

<120> Composiciones y procedimientos para escisión *in vivo* de ADN proviral de VIH-1

60 <130> DC0526WO

<150> USPatente estadounidense 61/808.437  
 <151> 04/04/2013

<160> 27

5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 82

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

15

<400> 1

uuuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugctttt tt 82

<210> 2

20

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2

tctactgct ctggtcaac tgg 23

30

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 3

gggccatgtg acgaaatgct agg 23

40

<210> 4

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 4

50

cagcagtctt tgtagtactc cgg 23

<210> 5

<211> 23

<212> ADN

55

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

60

<400> 5

actcaaggca agctttattg agg 23

<210> 6  
 <211> 23  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 6  
 taccagagtc acacaacaga cgg 23

<210> 7  
 15 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 7  
 gctgaagcgc gcacggcaag agg 23

25 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 8  
 gcgagagcgt cggattaag cgg 23

35 <210> 9  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 9  
 45 gagagcgtcg gtattaagcg ggg 23

<210> 10  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 10  
 gaacgattcg cagttaatcc tgg 23

<210> 11  
 <211> 1368  
 60 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 747 833 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 11

```

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val
 1          5          10          15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
          20          25          30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
          35          40          45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
 50          55          60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65          70          75          80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
          85          90          95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
          100          105          110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
          115          120          125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
          130          135          140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145          150          155          160

```

ES 2 747 833 T3

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro  
 165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr  
 180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala  
 195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn  
 210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn  
 225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe  
 245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp  
 260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp  
 275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp  
 290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser  
 305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys  
 325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe  
 340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser  
 355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp  
 370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg  
 385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu  
 405 410 415

ES 2 747 833 T3

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe  
 420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile  
 435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp  
 450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu  
 465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr  
 485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser  
 500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys  
 515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln  
 530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr  
 545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp  
 565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly  
 580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp  
 595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr  
 610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala  
 625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr  
 645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp

ES 2 747 833 T3

660	665	670																			
Lys	Gln	Ser	Gly	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp	Phe	Leu	Lys	Ser	Asp	Gly	Phe						
		675					680					685									
Ala	Asn	Arg	Asn	Phe	Met	Gln	Leu	Ile	His	Asp	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe						
	690					695					700										
Lys	Glu	Asp	Ile	Gln	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu						
705					710					715					720						
His	Glu	His	Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Lys	Lys	Gly						
				725					730					735							
Ile	Leu	Gln	Thr	Val	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Leu	Val	Lys	Val	Met	Gly						
			740					745					750								
Arg	His	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Val	Ile	Glu	Met	Ala	Arg	Glu	Asn	Gln						
		755					760					765									
Thr	Thr	Gln	Lys	Gly	Gln	Lys	Asn	Ser	Arg	Glu	Arg	Met	Lys	Arg	Ile						
	770					775					780										
Glu	Glu	Gly	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Lys	Glu	His	Pro						
785					790					795					800						
Val	Glu	Asn	Thr	Gln	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu						
				805					810					815							
Gln	Asn	Gly	Arg	Asp	Met	Tyr	Val	Asp	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Asn	Arg						
			820					825					830								
Leu	Ser	Asp	Tyr	Asp	Val	Asp	His	Ile	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Lys						
		835					840					845									
Asp	Asp	Ser	Ile	Asp	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Arg	Ser	Asp	Lys	Asn	Arg						
	850					855					860										
Gly	Lys	Ser	Asp	Asn	Val	Pro	Ser	Glu	Glu	Val	Val	Lys	Lys	Met	Lys						
865					870					875					880						
Asn	Tyr	Trp	Arg	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Lys	Leu	Ile	Thr	Gln	Arg	Lys						
				885					890					895							
Phe	Asp	Asn	Leu	Thr	Lys	Ala	Glu	Arg	Gly	Gly	Leu	Ser	Glu	Leu	Asp						
			900					905					910								



ES 2 747 833 T3

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr  
 915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp  
 930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser  
 945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg  
 965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val  
 980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe  
 995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala  
 1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe  
 1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala  
 1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu  
 1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val  
 1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr  
 1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys  
 1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro  
 1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val  
 1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys  
 1145 1150 1155

ES 2 747 833 T3

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser  
 1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys  
 1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu  
 1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly  
 1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val  
 1220 1225 1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser  
 1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys  
 1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys  
 1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala  
 1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn  
 1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala  
 1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser  
 1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr  
 1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
 1355 1360 1365

<210> 12

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10 <400> 12

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
 1 5

<210> 13

ES 2 747 833 T3

<211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 13

Asn Leu Ser Lys Arg Pro Ala Ala Ile Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Lys

10 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 14

Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp  
 1 5

20 <210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 15

Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe  
 1 5 10

30 <210> 16  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 16

Asn Gln Ser Ser Asn Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro  
 20 25 30  
 Arg Asn Gln Gly Gly Tyr  
 35

40 <210> 17  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 17

ES 2 747 833 T3

Arg Met Arg Lys Phe Lys Asn Lys Gly Lys Asp Thr Ala Glu Leu Arg  
1 5 10 15

Arg Arg Arg Val Glu Val Ser Val Glu Leu Arg Lys Ala Lys Lys Asp  
20 25 30

Glu Gln Ile Leu Lys Arg Arg Asn Val  
35 40

<210> 18

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10 <400> 18

Val Ser Arg Lys Arg Pro Arg Pro  
1 5

<210> 19

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20 <400> 19

Pro Pro Lys Lys Ala Arg Glu Asp  
1 5

<210> 20

<211> 8

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

30 <400> 20

Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu  
1 5

<210> 21

<211> 12

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

40 <400> 21

Ser Ala Leu Ile Lys Lys Lys Lys Lys Met Ala Pro  
1 5 10

<210> 22

<211> 5

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

50 <400> 22

ES 2 747 833 T3

Asp Arg Leu Arg Arg  
1 5

<210> 23  
<211> 7  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético  
10 <400> 23

Pro Lys Gln Lys Lys Arg Lys  
1 5

<210> 24  
<211> 10  
15 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético  
20 <400> 24

Arg Lys Leu Lys Lys Lys Ile Lys Lys Leu  
1 5 10

<210> 25  
<211> 10  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético  
30 <400> 25

Arg Glu Lys Lys Lys Phe Leu Lys Arg Arg  
1 5 10

<210> 26  
<211> 20  
35 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético  
40 <400> 26

Lys Arg Lys Gly Asp Glu Val Asp Gly Val Asp Glu Val Ala Lys Lys  
1 5 10 15

Lys Ser Lys Lys  
20

<210> 27  
<211> 17  
45 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético  
50 <400> 27

ES 2 747 833 T3

Arg Lys Cys Leu Gln Ala Gly Met Asn Leu Glu Ala Arg Lys Thr Lys  
1 5 10 15

Lys

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento in vitro para inhibir la función o presencia de una secuencia diana de ADN del virus 1 de inmunodeficiencia humana (VIH-1) en una célula eucariota que comprende poner en contacto una célula eucariota  
5 que alberga una secuencia diana de ADN del VIH-1 con
  - (a) uno o más ARN guía, o ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía, y
  - (b) una proteína (cas) asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas, o ácidos nucleicos que codifican dicha proteína cas, donde dicho uno o más ARN guía se hibridan con dicha secuencia diana de ADN del VIH-1 inhibiendo de ese modo la función o presencia de dicha secuencia diana de ADN del VIH-1, donde  
10 dicha secuencia diana de ADN del VIH-1 se selecciona del grupo constituido por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO: 8.
  
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la proteína cas es cas9, donde dicho uno o más ARN guía y dicha proteína cas9 forman un complejo dentro de la célula eucariota y donde dicho complejo corta la secuencia  
15 de ADN del VIH-1, inhibiendo así la función o presencia de dicha secuencia diana de ADN del VIH-1.
  
3. El procedimiento de la reivindicación 2, donde el uno o más ARN guía se dirigen a una secuencia LTR del VIH-1.
  
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 3, donde:
  - (a) dicha secuencia diana de LTR de VIH-1 es la SEQ ID NO:3, y donde dicho uno o más ARN guía, o ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía, comprenden la secuencia de la SEQ ID NO:3, o el complemento de la misma, o bien
  - (b) dicha secuencia diana de LTR de VIH-1 es la SEQ ID NO:6, y donde dicho uno o más ARN guía, o ácidos nucleicos  
25 que codifican dicho uno o más ARN guía, comprenden la secuencia de la SEQ ID NO:6, o el complemento de la misma.
  
5. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la proteína cas se ha optimizado con codones para la expresión en células humanas y/o comprende además una secuencia de localización nuclear.
  
- 30 6. El método de la reivindicación 1, donde dichos ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía y dichos ácidos nucleicos que codifican dicha proteína cas están contenidos en un vector viral, y donde el contacto de dicha célula eucariota comprende el contacto con dicho vector viral.
  
7. Un kit que comprende:
  - 35 (a) uno o más ARN guía, o ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía, donde dicho ARN guía se hibrida con una secuencia diana de ADN del virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1); y
  - (b) una proteína (cas) asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas, o un ácido nucleico que codifica dicha proteína, donde dicha secuencia diana de ADN del VIH-1 se selecciona del grupo constituido por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO: 8.  
40
  
8. El kit de la reivindicación 7, donde la proteína cas es cas9.
  
9. El kit de la reivindicación 8,
  - 45 (a) donde dicho kit comprende ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía,
  - (b) donde dichos ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía están contenidos en un vector seleccionado del grupo constituido por un vector de expresión y un vector viral,
  - (c) donde dicho kit comprende el ácido nucleico que codifica dicha proteína cas, y
  - (d) donde el ácido nucleico que codifica dicha proteína cas está contenido en un vector seleccionado del grupo constituido por un vector de expresión y un vector viral.  
50
  
10. El kit de la reivindicación 8,
  - (a) donde dicho kit comprende ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía y ácido nucleico que codifica dicha proteína cas, y
  - 55 (b) donde cada uno de dichos ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía y dicho ácido nucleico que codifica dicha proteína cas están contenidos en el mismo vector seleccionado del grupo constituido por un vector de expresión y un vector viral.
  
11. El kit de la reivindicación 9 o 10, donde:
  - 60 (a) dicha secuencia diana de ADN de VIH-1 es la SEQ ID NO:3, y donde dicho uno o más ARN guía, o ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía, comprenden la secuencia de la SEQ ID NO:3, o el complemento de la misma, o bien

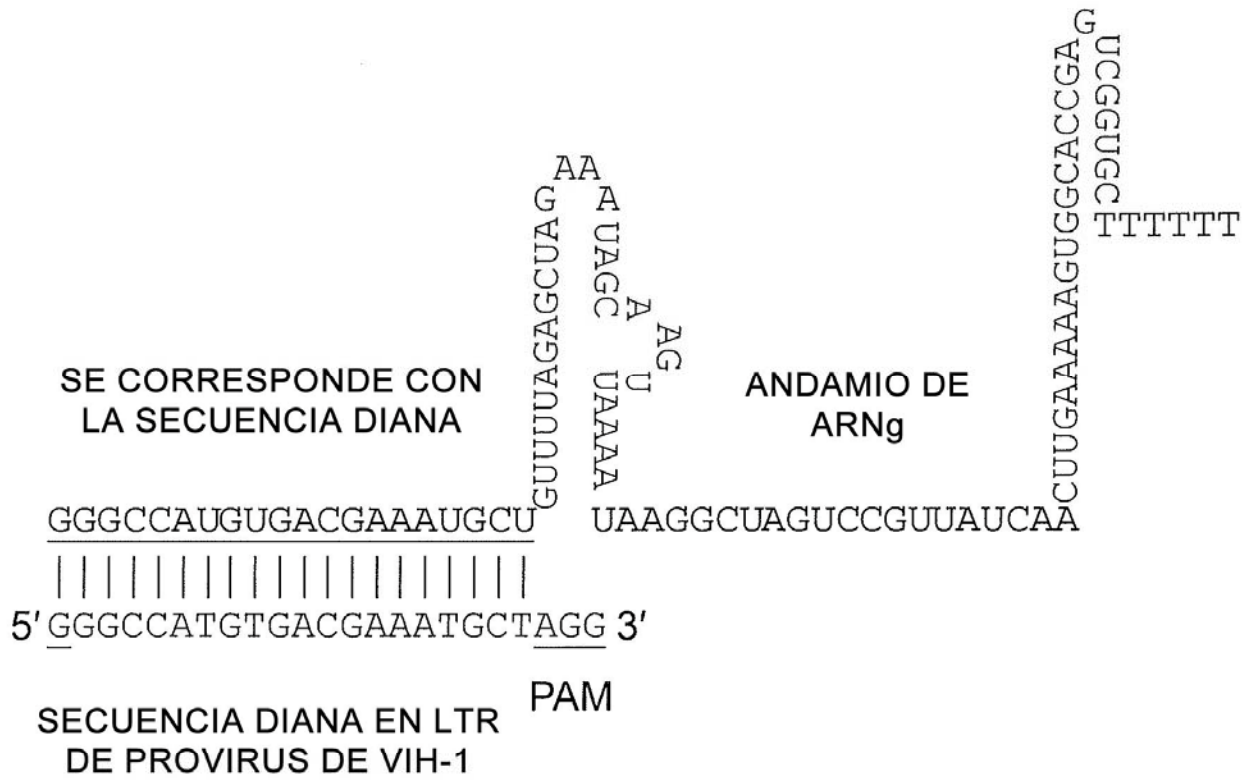
(b) dicha secuencia diana de ADN de VIH-1 es la SEQ ID NO:6, y donde dicho uno o más ARN guía, o ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más ARN guía, comprenden la secuencia de la SEQ ID NO:6, o el complemento de la misma.

12. El kit de la reivindicación 7, donde la proteína cas se ha optimizado con codones para la expresión en 5 células humanas y/o comprende además una secuencia de localización nuclear.

13. Un vector que comprende ácidos nucleicos que codifican uno o más ARN guía, donde dicho ARN guía se hibrida con una secuencia de ADN diana del virus de inmunodeficiencia humana 1 seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO: 8.

10





**FIG. 1**

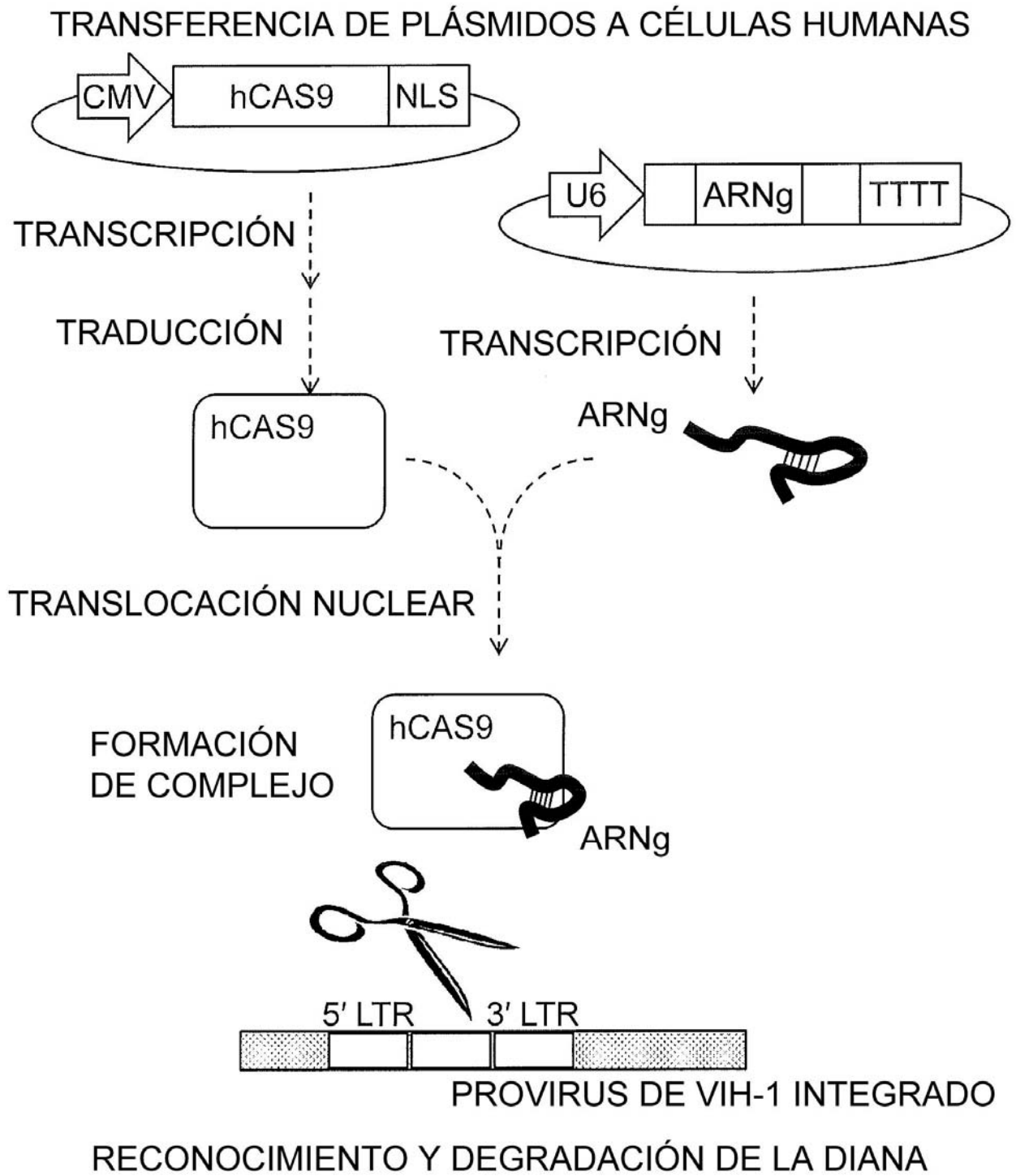
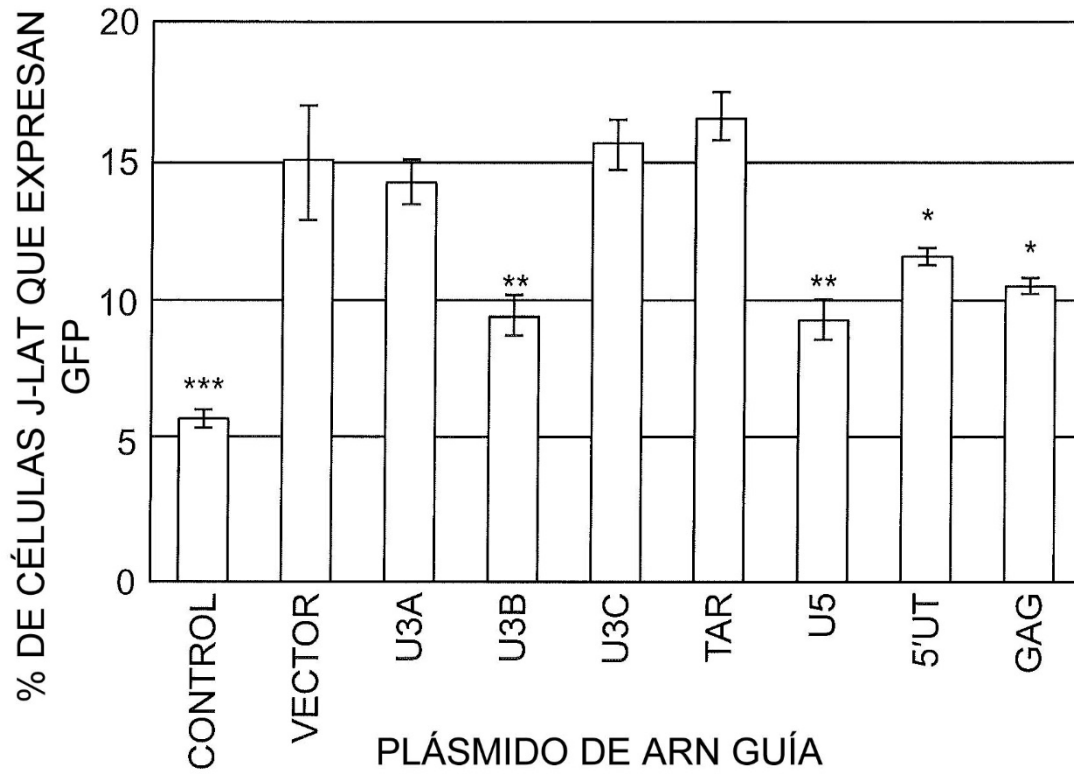
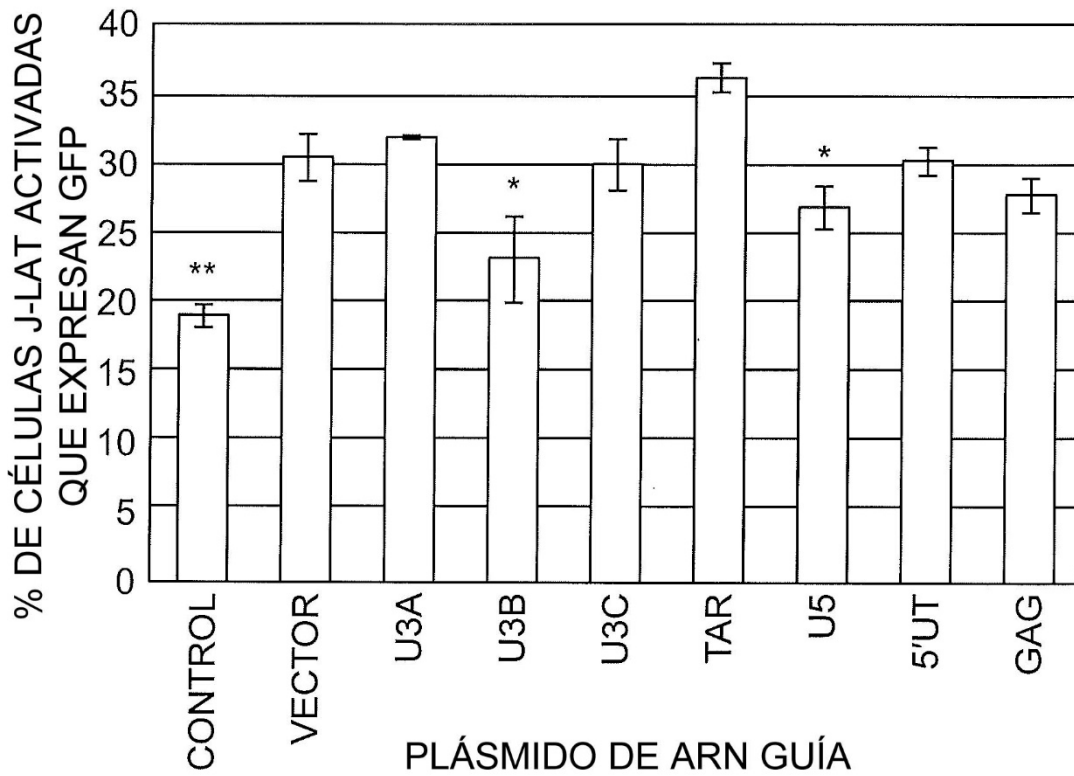


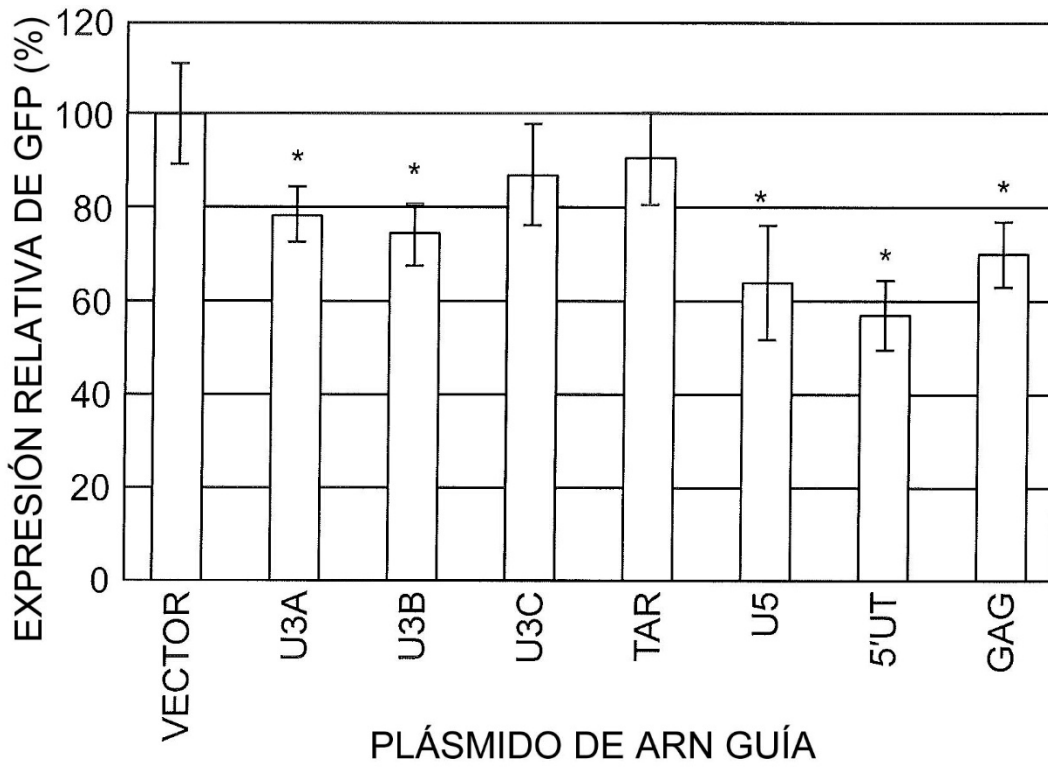
FIG. 2



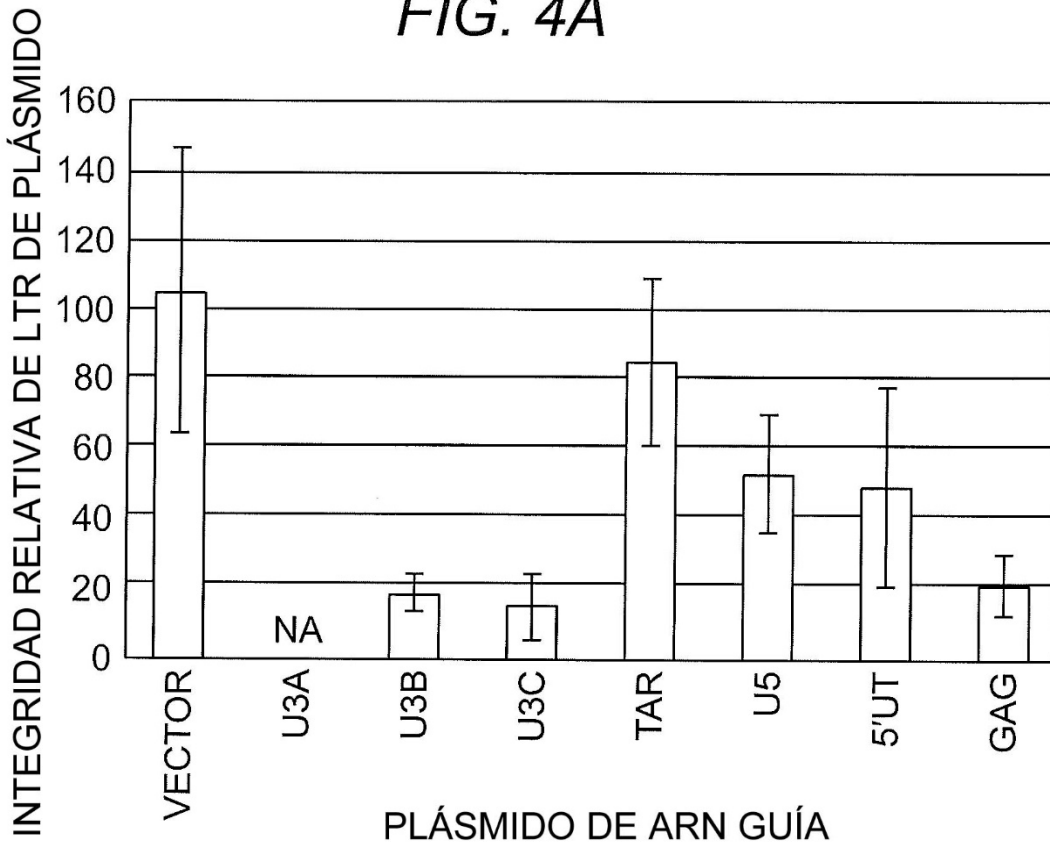
**FIG. 3A**



**FIG. 3B**



**FIG. 4A**



**FIG. 4B**