

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 233**

51 Int. Cl.:
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08807158 .4**
96 Fecha de presentación: **06.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2167656**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2010**

54 Título: **Variantes de meganucleasa que escinden una secuencia de ADN diana del locus ROSA26 de ratón y usos de las mismas**

30 Prioridad:
06.06.2007 WO PCT/IB2007/002830

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2012

73 Titular/es:
**CELLECTIS
102 AVENUE GASTON ROUSSEL
93235 ROMAINVILLE, FR**

72 Inventor/es:
GOUBLE, Agnès

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

ES 2 380 233 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

Variantes de meganucleasa que escinden una secuencia de ADN diana del locus ROSA26 de ratón y usos de las mismas

5

La invención se refiere a una variante de meganucleasa que escinde una secuencia de ADN diana del locus ROSA26 de ratón, a un vector que codifica dicha variante, a una célula, un animal o una planta modificada por dicho vector y al uso de dicha variante de meganucleasa y productos derivados para la genomanipulación del genoma de ratón (producción de proteína recombinante, construcción de ratones transgénicos y líneas recombinantes de células de ratón).

10

El locus ROSA26 de ratón fue descubierto por Friedrich y Soriano en 1991 mediante un experimento de atrapamiento de genes usando embriocitoblastos (ES) infectados con un retrovirus (Friedrich, G. y P. Soriano, *Genes & Development*, 1991, 5, 1513-1523). La línea ROSA26 de atrapamiento de genes de ratones, en la que se produce la inserción en el intrón 1 del locus ROSA26, un sitio no esencial, muestra la expresión ubicua del gen indicador durante el desarrollo embrionario, en crías (Friedrich y Soriano, 1991, citado anteriormente) y en células hematopoyéticas (Zambrowicz y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 3789-3794). El locus ROSA26, localizado en el cromosoma 6 de ratón, produce tres transcritos (Figura 1). Dos transcritos proceden de un promotor común que comparte extremos 5' idénticos (exón 1 y exón de inicio 2), pero ninguno contiene un ORF significativo. Y un tercer procedente de la cadena inversa (Zambrowicz y col., 1997, citado anteriormente). Los transgenes bajo el control del promotor ROSA26 de ratón muestran una expresión ubicua en embriones y adultos de ratón (Soriano, P., *Nature Genetics*, 1999, 21, 70-71). El direccionamiento del locus ROSA26 en células ES de ratón ha sido ampliamente usado para la construcción de modelos de ratones transgénicos (Kisseberth y col., *Developmental Biology*, 1999, 214, 128-138; Mao X. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 5037-5042; Soriano, 1999, citado anteriormente; A watramani y col., *Nature Genetics*, 2001, 29, 257-259; Mao X. y col., *Blood*, 2001, 97, 324-326; Possemato y col., *Genesis*, 2002, 32, 184-186; Mao, J. y col., *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33, e155; Yu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 8615-8620; Solicitudes PCT Internacionales WO 99/53017, WO 02/098217, WO 03/020743, WO 2004/063381 y WO 2005/116070)).

30

Sin embargo, la eficacia de la recombinación homóloga en células de ratón es muy baja (frecuencia: 10^{-6} a 10^{-9}).

Se puede aumentar esta eficacia mediante una rotura del ADN bicatenario (DSB) en el locus diana. Dichos DBS se pueden crear mediante meganucleasas, que son por definición endonucleasas específicas de secuencia que reconocen grandes secuencias (Thierry, A. y B. Dujon, *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20, 5625-5631). Estas proteínas pueden escindir sitios únicos en células vivas, mejorando por tanto el direccionamiento génico en 1000 veces o más en la proximidad del sitio de escisión (Puchta y col., *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 5034-5040; Rouet y col., *Mol. Cell. Biol.*, 1994, 14, 8096-8106; Choulika y col., *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 15, 1968-1973; Puchta y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, 93, 5055-5060; Sargent y col., *Mol. Cell. Biol.*, 1997, 17, 267-277; Cohen-Tannoudji y col., *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 1444-1448; Donoho, y col., *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 4070-4078; Elliott y col., *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 93-101).

40

Sin embargo, aunque se han identificado algunos cientos de meganucleasas naturales, denominadas también como "endonucleasas de asentamiento" (Chevalier, B.S. y B.L. Stoddard, *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, 3757-3774), el repertorio de secuencias escindibles está demasiado limitado a dirigir la complejidad de los genomas, y no existen normalmente sitios escindibles en un gen seleccionado. Teóricamente, la preparación de meganucleasas con especificaciones adaptadas está bajo intensa investigación. De este modo, se está investigando profundamente sobre la preparación de meganucleasas con especificidades a medida

45

Recientemente, la fusión de proteínas de dedo de cinc con el dominio catalítico de *FokI*, una endonucleasa de restricción de tipo IIS, se usó para preparar endonucleasas específicas de secuencia funcionales (Smith y col., *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27, 674-681; Bibikova y col., *Mol. Cell. Biol.*, 2001, 21, 289-297; Bibikova y col., *Genetics*, 2002, 161, 1169-1175; Bibikova y col., *Science*, 2003, 300, 764; Porteus, M.H. y D. Baltimore, *Science*, 2003, 300, 763-; Alwin y col., *Mol. Ther.*, 2005, 12, 610-617; Urnov y col., *Nature*, 2005, 435, 646-651; Porteus, M.H., *Mol. Ther.*, 2006, 13, 438-446; Solicitud PCT Internacional WO 2007/014275). Dichas nucleasas podrían usarse recientemente para la genomanipulación del gen ILR2G en células humanas procedentes de linaje linfóide (Urnov y col., *Nature*, 2005, 435, 646-651).

50

55

La especificidad de la unión de las proteínas de dedo de cinc de tipo Cys2-His2 (ZFP), es fácil de manipular, debido probablemente a que representan un sistema sencillo (específicamente impulsado por esencialmente cuatro restos

por dedo), y modular (Pabo y col., *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70, 313-340; Jamieson y col., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, 2, 361-368. Los estudios de los laboratorios de Pabo (Rebar, E.J. y C.O. Pabo, *Science*, 1994, 263, 671-673; Kim, J.S. y C.O. Pabo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998, 95, 2812-2817), Klug (Choo, Y. y A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 11163-11167 ; Isalan M. y A. Klug, *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 656-660) y Barbas (Choo, Y. y A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 11163-11167 ; Isalan M. y A. Klug, *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 656-660) dieron como resultado un gran repertorio de ZFP artificiales novedosas, capaz de unirse a la mayor parte de las secuencias G/ANNG/ANNG/ANN.

10 Sin embargo, las ZFP pueden tener sus limitaciones, especialmente en aplicaciones que requieren un nivel muy alto de especificidad, tal como aplicaciones terapéuticas. Se ha demostrado recientemente que la actividad de la nucleasa *FokI* en la fusión actúa con un sitio de reconocimiento cualquiera o con dos sitios separados por distancias variables mediante un bucle de ADN que incluye la presencia de algunos mutantes de *FokI* defectivos de la unión con el ADN (Catto y col., *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, 1711-1720). De esta manera, la especificidad puede degenerar mucho, tal como se ilustra por la toxicidad en células de mamíferos y *Drosophila* (Bibikova y col.,
15 *Genetics*, 2002, 161, 1169-1175; Bibikova y col., *Science*, 2003, 300, 764-).

En la naturaleza, las meganucleasas están esencialmente representadas por las endonucleasas de asentamiento. Las endonucleasas de asentamiento (HE) son una familia ampliamente distribuida de meganucleasas naturales que incluyen cientos de familias de proteínas (Chevalier, B.S. y B.L. Stoddard, *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, 3757-3774).
20 Estas proteínas están codificadas por elementos genéticos móviles que se propagan mediante un procedimiento denominado "asentamiento": la endonucleasa escinde un alelo análogo del cual está exento el elemento móvil, estimulando por tanto un episodio de recombinación homóloga que duplica el ADN móvil en el locus receptor. Dadas sus excepcionales propiedades de escisión en términos de eficacia y especificidad, podría representar un almacén ideal para derivar novedosas endonucleasas muy específicas.

25 Las HE pertenecen a cuatro familias principales. La familia LAGLIDADG, nombrada de acuerdo con un motivo peptídico conservado implicado en el centro catalítico, es el grupo más ampliamente distribuido y el mejor caracterizado. En la actualidad se dispone de siete estructuras. Mientras que la mayor parte de las proteínas de esta familia son monoméricas y muestran dos motivos LAGLIDADG, unas pocas de estas solo tienen un motivo, pero
30 dimerizan para escindir secuencias diana palindrómicas o pseudopalindrómicas.

Aunque el péptido LAGLIDADG es la única región conservada entre los miembros de la familia, estas proteínas comparten una arquitectura muy similar (Figura 2). El núcleo catalítico está flanqueado por dos dominios de unión al ADN con una simetría en dos pliegues perfecta para los homodímeros tales como I-*Crel* (Chevalier, y col., *Nat. Struct. Biol.*, 2001, 8, 312-316) e I-*Msol* (Chevalier y col., *J. Mol. Biol.*, 2003, 329, 253-269) y con una simetría para
35 los monómeros tales como I-*Scel* (Moure y col., *J. Mol. Biol.*, 2003, 334, 685-69), I-*Dmol* (Silva y col., *J. Mol. Biol.*, 1999, 286, 1123-1136) o I-*Anil* (Bolduc y col., *Genes Dev.*, 2003, 17, 2875-2888). Ambos monómeros, o ambos dominios (para las proteínas monoméricas) contribuyen al núcleo catalítico, organizado alrededor de cationes divalentes. Exactamente por encima del núcleo catalítico, los dos péptidos LAGLIDADG juegan también un papel
40 esencial en la interfase de dimerización. La unión del ADN depende de dos pliegues $\beta\beta\alpha\beta\beta$ con forma de silla de montar típica, que se asientan en la ranura mayor del ADN. Se pueden encontrar otros dominios en inteínas tales como PI-*Pful* (Ichihyanagi y col., *J. Mol. Biol.*, 2000, 300, 889-901) y PI-*Scel* (Moure y col., *Nat. Struct. Biol.*, 2002, 9, 764-770), cuyo dominio de corte y empalme con la proteína está también implicado en la unión del ADN.

45 La preparación de meganucleasas quiméricas funcionales, mediante la fusión del dominio I-*Dmol* N terminal con un monómero I-*Crel* (Chevalier y col., *Mol. Cell.*, 2002, 10, 895-905; Epinat y col., *Nucleic Acids Res*, 2003, 31, 2952-62; Solicitudes PCT Internacionales WO 03/078619 y WO 2004/031346) ha demostrado la plasticidad de las proteínas LAGLIDADG.

50 Además de esto, otros grupos han usado un enfoque racional para alterar localmente la especificidad del I-*Crel* (Seligman y col., *Genetics*, 1997, 147, 1653-1664; Sussman y col., *J. Mol. Biol.*, 2004, 342, 31-41; Solicitudes PCT Internacionales WO 2006/097784, WO 2006/097853 y WO 2007/049156; Arnould y col., *J. Mol. Biol.*, 2006, 355, 443-458; Rosen y col., *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, 4791-4800; Smith y col., *Nucleic Acids Res.*, Epub 27 de noviembre de 2006), I-*Scel* (Doyon y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 2477-2484), PI-*Scel* (Gimble y col., *J. Mol. Biol.*, 2003, 334, 993-1008) e I-*Msol* (Ashworth y col., *Nature*, 2006, 441, 656-659).
55

Además, se genomaniplaron cientos de derivados de I-*Crel* que alteraban localmente la especificidad combinando el enfoque semirracional y el Cribado de Alto Rendimiento:

- 5 - Los restos Q44, R68 y R70 o Q44, R68, D75 e I77 de *I-Crel* se sometieron a mutagénesis y se identificó una colección de variantes con especificidad alterada hacia los nucleótidos en las posiciones ± 3 a 5 del ADN diana (ADN 5NNN diana) mediante cribado (Solicitudes PCT Internacionales WO 2006/097784 y WO 2006/097853; Arnould y col., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458; Smith y col., Nucleic Acids Res., Epub 27 de noviembre de 2006).
- 10 - Los restos K28, N30 y Q38, N30, Y33 y Q38 o K28, Y33, Q38 y S40 de *I-Crel* se sometieron a mutagénesis y se identificó una colección de variantes con especificidad alterada hacia los nucleótidos en las posiciones ± 8 a 10 del ADN diana (ADN 10NNN diana) mediante cribado (Smith y col., Nucleic Acids Res., Epub 27 de noviembre de 2006; Solicitud PCT Internacional WO 2007/049156).
- 15 Se demostró que los restos 28 a 40 y 44 a 77 de *I-Crel* formaban dos subdominios funcionales separables, capaces de unir distintas partes del semisitio de una endonucleasa de asentamiento (Smith y col. Nucleic Acids Res., Epub 27 de noviembre de 2006; Solicitud PCT Internacional WO 2007/049095).
- 20 La combinación de mutaciones entre los dos subdominios de I-Crel dentro del mismo monómero permitió el diseño de moléculas quiméricas (homodímeros) novedosas capaces de escindir una secuencia de ADN diana palindrómico combinado que comprende los nucleopéptidos en las posiciones ± 3 a 5 y ± 8 a 10 que se unen por cada subdominio (Smith y col., Nucleic Acids Res., Epub 27 de noviembre de 2006; Solicitud PCT Internacional WO 2007/049156).
- 25 Se combinaron dos variantes diferentes y se ensamblaron en una endonucleasa heterodimérica funcional capaz de escindir una diana quimérica resultante de la fusión de una mitad diferente de cada secuencia de ADN diana variante (Arnould y col., citados anteriormente; Solicitud PCT Internacional WO 2006/097854). De manera interesante, las proteínas novedosas habían mantenido el plegado y la estabilidad apropiados, una elevada actividad, y una estrecha especificidad.
- 30 La combinación de las dos etapas anteriores permite un enfoque combinatorio más grande, que implica cuatro diferentes subdominios. Los diferentes subdominios se pueden modificar por separado y combinarse para obtener una variante de meganucleasa completamente rediseñada (heterodímero o molécula monocatenaria) con especificidad seleccionada, tal como se ilustra en la figura 3. En una primera etapa, acoplamientos de novedosas meganucleasas se combinan en nuevas moléculas ("semimeganucleasas") que escinden las dianas palindrómicas derivadas de la diana que quiere escindirse. A continuación, la combinación de dicha "semimeganucleasa" puede dar como resultado una especie heterodimérica que escinde la diana de interés. Se ha descrito en Smith y col. (Nucleic Acids Res., Epub 27 de noviembre de 2006) el ensamblaje de cuatro conjuntos de mutaciones en endonucleasas heterodiméricas que escinden una secuencia diana modelo o una secuencia procedente del gen RAG1 humano.
- 35 Sin embargo, las dianas ensayadas en este informe fueron idénticas a la secuencia original del sitio I-Crel palindrómico (C1221; figura 5) en las posiciones ± 2 y ± 1 . Incluso aunque los pares de bases ± 1 y ± 2 no muestran ningún contacto con la proteína, se ha demostrado que estas posiciones no están desprovistas de la información contenida (Chevalier y col., J. Mol. Biol., 2003, 329, 253-269), especialmente para el par de bases ± 1 y podría ser una fuente de especificidad adicional del sustrato (Argast y col., J. Mol. Biol., 1998, 280, 345-353; Jurica y col., Mol. Cell., 1998, 2, 469-476; Chevalier, B.S. y B.L. Stoddard, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3774). La selección *in vitro* de la diana *I-Crel* (Argast y col., citados anteriormente) sometida a mutación aleatoria, desveló la importancia de estos cuatro pares de bases sobre la unión de la proteína y la actividad de escisión. Se ha sugerido que la red de moléculas de agua ordenadas en el sitio activo era importante para el posicionamiento del ADN diana (Chevalier y col., Biochemistry, 2004, 43, 14015-14026). Además, los extensos cambios conformacionales que aparecen en esta región tras la unión de *I-Crel* sugieren que los cuatro nucleótidos centrales podrían contribuir a la especificidad del sustrato, posiblemente mediante preferencias conformacionales dependientes de la secuencia (Chevalier y col., 2003, citados anteriormente).
- 40 De esta manera, no estaba claro si los mutantes identificados en las dianas de ADN 10NNN y 5NNN como homodímeros que escinden una secuencia palindrómica siendo los cuatro nucleótidos centrales gtac, podrían permitir el diseño de nuevas endonucleasas que podrían escindir dianas que contuvieran cambios en los cuatro nucleótidos centrales.
- 45 Los inventores han identificado una serie de dianas de ADN en el locus ROSA26 de ratón que podrían escindirse por variantes de *I-Crel* (Figura 17). Se usó el enfoque combinatorio descrito en la figura 3 para rediseñar por completo el dominio de unión del ADN de la proteína *I-Crel* y genomanipular por consiguiente novedosas meganucleasas con especificidad completamente genomanipulada, para escindir un ADN diana del locus ROSA26 de ratón (rosal) que

difiere del sitio palindrómico C1221 de *I-Crel* de 22 pb en 13 nucleótidos que incluyen uno (posición + 1) de los cuatro nucleótidos centrales (Figura 5).

Incluso aunque las variantes combinadas se identificaron inicialmente hacia los nucleótidos 10NNN y 5NNN respectivamente, y se observó un fuerte impacto de los cuatro nucleótidos centrales de la diana sobre la actividad de la meganucleasa genomanipulada, se seleccionaron las meganucleasas funcionales con un profundo cambio en la especificidad. Además, se puede mejorar significativamente la actividad de la proteína genomanipulada mediante dos ciclos sucesivos de mutagénesis y cribado aleatorios, para comparar con la actividad de la proteína *I-Crel*.

10 La capacidad de generar una rotura bicatenaria en el locus ROSA26 proporciona un medio para mejorar significativamente la recombinación homóloga en el locus. De esta manera, una meganucleasa que direcciona el locus ROSA 26 permitirá inserciones eficaces en las células de ratón (Figura 4). La capacidad de insertar genes eficazmente (activación) en este locus tiene la ventaja de permitir niveles de expresión reproducibles así como líneas temporales predecibles para generar las inserciones. Las aplicaciones potenciales incluyen la producción de proteínas recombinantes en células de ratón y la genomanipulación de ratones transgénicos y de líneas recombinantes de células de ratón, que se pueden usar, por ejemplo, para la producción de proteínas, los estudios de función génica, el cribado de fármacos, o como modelo de enfermedad.

La invención se refiere a una variante de *I-Crel* en la que al menos uno de los dos monómeros de *I-Crel* tiene al menos dos sustituciones, una en cada uno de los dos subdominios del dominio del núcleo de LAGLIDADG situado respectivamente entre las posiciones 26 a 40 y 44 a 77 de *I-Crel*, y es capaz de escindir una secuencia de ADN diana del locus ROSA26 de ratón.

Se puede medir la actividad de escisión de la variante de acuerdo con la invención mediante cualquier ensayo de escisión *in vitro* o *in vivo* bien conocido, tal como los descritos en la Solicitud PCT Internacional WO 2004/067736; Epinat y col., *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31, 2952-2962; Chames y col., *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33, e178 y Arnould y col., *J. Mol. Biol.*, 2006, 355, 443-458. Se puede medir, por ejemplo, la actividad de escisión de la variante de la invención mediante un ensayo de recombinación mediante repetición directa, en células de levaduras o de mamíferos, usando un vector indicador. El vector indicador comprende dos copias no funcionales truncadas de un gen indicador (repeticiones directas) y la secuencia diana del ADN genómico en el interior de la secuencia de intervención, clonada en un vector de expresión de una levadura o de un mamífero. La expresión de la variante da como resultado una endonucleasa funcional que es capaz de escindir la secuencia diana del ADN genómico. Esta escisión induce la recombinación homóloga entre las repeticiones directas, dando como resultado un gen indicador funcional, cuya expresión se puede controlar mediante un ensayo apropiado.

Definiciones

- Aminoácido se refiere a un aminoácido natural o sintético incluyendo los enantiómeros y estereoisómeros de los aminoácidos anteriores.
 - 40 - Los restos de aminoácidos en una secuencia polipeptídica se designan en la presente memoria descriptiva de acuerdo con el código de una letra, en el que, por ejemplo, Q significa Gln o resto de Glutamina, R significa Arg o resto de Arginina y D significa Asp o resto de Ácido Aspártico.
 - Aminoácido ácido se refiere a ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E).
 - Aminoácido básico se refiere a lisina (K), arginina (R) e histidina (H).
 - 45 - Aminoácido pequeño se refiere a glicina (G) y alanina (A).
 - Aminoácido aromático se refiere a fenilalanina (F), triptófano (W) y tirosina (Y).
- Los nucleótidos se designan como sigue: se usa un código de una letra para designar la base de un nucleósido: a es adenina, t es timina, c es citosina, y g es guanina. Para los nucleótidos degenerados, r representa g o a (nucleótidos de purina), k representa g o t, s representa g o c, w representa a o t, m representa a o c, y representa t o c (nucleótidos de pirimidina), d representa g, a o t, v representa g, a o c, b representa g, t o c, h representa a, t o c, y n representa g, a, t o c.
- por "meganucleasa", se entiende una endonucleasa que tiene una secuencia de ADN diana bicatenario de 12 a 45 pb. Dicha meganucleasa es tanto una enzima dimérica, en la que cada dominio está en un monómero como una enzima monomérica que comprende los dos dominios de un único polipéptido.
 - 55 - por "dominio de la meganucleasa" se entiende la región que interactúa con una mitad del ADN diana de una meganucleasa que es capaz de asociarse con el otro dominio de la misma meganucleasa que interactúa con la otra mitad del ADN diana para formar una meganucleasa funcional capaz de escindir dicho ADN diana.
 - por "variante de la meganucleasa" o "variante" se entiende una meganucleasa obtenida por sustitución de al menos un resto en la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa natural (meganucleasa natural) con un aminoácido

diferente.

- por "variante funcional" se entiende una variante que es capaz de escindir una secuencia diana del ADN, preferiblemente dicha diana es una nueva diana que no está escindida por la meganucleasa parental. Por ejemplo, dichas variantes tienen la variación de los aminoácidos en las posiciones que ponen en contacto la secuencia diana del ADN o interactúan de manera directa o indirecta con dicho ADN diana.
- por "variante de meganucleasa con especificidad novedosa" se entiende una variante que tiene un modelo de dianas escindidas diferente del de la meganucleasa parental. Los términos "especificidad novedosa", "especificidad modificada", "especificidad de escisión novedosa", "especificidad de sustrato novedosa" que son equivalentes y se usan indistintamente, se refieren a la especificidad de la variante hacia los nucleótidos de la secuencia de ADN diana.
- por "I-Crel" se entiende el *I-Crel* natural que tiene la secuencia SWISSPROT P05725, que corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias o a la secuencia pdb con el código de acceso 1g9y que corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 33 en el listado de secuencias.
- por "dominio" o "dominio del núcleo" se entiende "el dominio del núcleo de la endonucleasa de asentamiento LAGLIDADG" que es el pliegue $\alpha_1\beta_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$ característico de las endonucleasas de asentamiento de la familia LAGLIDADG, que corresponde a aproximadamente cien restos de aminoácido. Dicho dominio comprende cuatro cadenas beta ($\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4$) plegadas en una lámina beta antiparalela que interactúa con una mitad del ADN diana. Este dominio es capaz de asociarse con otro dominio del núcleo de la endonucleasa de asentamiento LAGLIDADG que interactúa con la otra mitad del ADN diana para formar una endonucleasa funcional capaz de escindir dicho ADN diana. Por ejemplo, en el caso de la endonucleasa de asentamiento *I-Crel* (163 aminoácidos), el dominio del núcleo de la endonucleasa de asentamiento LAGLIDADG corresponde a los restos 6 a 94.
- por "meganucleasa de cadena simple" se entiende una meganucleasa que comprende dos dominios de la endonucleasa de asentamiento LAGLIDADG o dominios de núcleo unidos mediante un separador específico. La meganucleasa de cadena simple es capaz de escindir una secuencia de ADN diana quimérico que comprende una mitad diferente de cada secuencia diana de la meganucleasa parental.
- por "subdominio" se entiende la región de un dominio de núcleo de la endonucleasa de asentamiento LAGLIDADG que interactúa con una parte distinta de un semisitio del ADN diana de la endonucleasa de asentamiento. Dos subdominios diferentes se comportan de manera independiente y la mutación en un subdominio no altera las propiedades de unión y escisión del otro subdominio. Por tanto, dos subdominios unen partes distintas de un semisitio del ADN diana de una endonucleasa de asentamiento.
- por "horquilla beta" se entienden dos cadenas beta consecutivas de la lámina beta antiparalela del dominio del núcleo de la endonucleasa de asentamiento LAGLIDADG ($(\beta_1\beta_2$ o $\beta_3\beta_4)$) que están conectados por un bucle o un giro.
- por "sitio I-Crel" se entiende una secuencia de ADN bicatenario de 22 a 24 pb que se escinde por *I-Crel*. Los sitios *I-Crel* incluyen el sitio de *I-Crel* natural (natural) no palindrómico y las secuencias palindrómicas derivadas tales como la secuencia 5'-t₁₂c₁₁a₁₀a₉a₈a₇c₆g₅t₄c₃g₂t₁a₁c₂g₃a₄c₅g₆t₇t₈t₉t₁₀g₁₁a₁₂ denominada también C1221 (SEQ ID NO: 2; figura 5).
- por "ADN diana", "secuencia de ADN diana", "secuencia diana", "sitio diana", "diana", "sitio"; "sitio de interés"; "sitio de reconocimiento", "secuencia de reconocimiento", "sitio de reconocimiento de asentamiento", "sitio de asentamiento", "sitio de escisión" se entiende una secuencia de polinucleótidos palindrómica bicatenaria, parcialmente palindrómica (pseudopalindrómica) o no palindrómica de 20 a 24 pb que se reconoce y escinde por una endonucleasa de asentamiento LAGLIDADG tal como *I-Crel*, o una variante o una meganucleasa quimérica monocatenaria derivada de *I-Crel*. Estos términos se refieren a una localización distinta del ADN, preferiblemente una localización genómica, en la cual se va a inducir la rotura de la doble cadena por la meganucleasa. El ADN diana se define por la secuencia 5' a 3' de una cadena del polinucleótido bicatenario, tal como se ha indicado anteriormente para C1221. La escisión del ADN diana se produce en los nucleótidos en las posiciones +2 y -2, respectivamente, para la cadena de sentido directo y la de sentido contrario. A no ser que se indique otra cosa, la posición en la cual se produce la escisión del ADN diana por una variante de la meganucleasa *I-Crel*, corresponde al sitio de escisión en la cadena de sentido directo del ADN diana.
- por "semisitio del ADN diana", "semisitio de escisión" o "semisitio" se entiende la porción del ADN diana que está unida por cada dominio del núcleo de la endonucleasa de asentamiento LAGLIDADG.
- por "ADN diana quimérico" o "ADN diana híbrido" se entiende la fusión de una mitad diferente de dos secuencias de la meganucleasa diana parental. Además, al menos una mitad de dicha diana puede comprender la combinación de nucleótidos que se unen mediante al menos dos subdominios separados (ADN diana combinado).
- por "locus ROSA26 de ratón" se entiende el locus localizado en el cromosoma 6 de ratón y que tiene la secuencia que corresponde al número de acceso CQ880114 de la EMBL (SEQ ID NO: 3; 13139 pb). ROSA26 produce tres transcritos (Figura 1): dos transcritos que se originan de un promotor común comparten extremos 5' idénticos (exón 1 e inicio del exón 2) pero ninguno contiene un ORF significativo. Y uno tercero originado de la cadena inversa.
- por "secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón", "secuencia de ADN genómico diana", "sitio

de escisión de ADN genómico “ADN genómico diana” o “diana genómica” se entiende una secuencia de 20 a 24 pb del locus ROSA26 de ratón que se reconoce o escinde por una variante de meganucleasa.

- por “vector” se entiende una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado.

5 - por “homóloga” se entiende una secuencia con suficiente identidad entre sí con otra para conducir a una recombinación homóloga entre secuencias, teniendo más concretamente al menos un 95% de identidad, preferiblemente un 97% de identidad y más preferiblemente un 99%.

- “identidad” se refiere a la identidad de secuencias entre dos moléculas de ácido nucleico o polipéptidos. Se puede determinar la identidad comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear a objeto de comparación.

10 Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base, entonces las moléculas son idénticas en esta posición. Un grado de similitud o identidad entre las secuencias de ácido nucleico o aminoácidos es una función del número de nucleótidos idénticos o correspondientes en las posiciones compartidas por las secuencias de ácido nucleico. Se pueden usar varios algoritmos y/o programas de alineación para calcular la identidad entre dos secuencias, incluyendo FASTA, o BLAST que están disponibles como una parte del paquete de

15 análisis de secuencias GCG (University of Wisconsin, Madison, Wis.), y se pueden usar con, por ejemplo, configuraciones por defecto.

- “individual” incluye mamíferos, así como otros vertebrados (por ejemplo, aves, peces y reptiles). Los términos “mamífero” y “mamíferos”, tal como se usan en la presente memoria descriptiva, se refieren a cualquier animal vertebrado, incluyendo monotremas, marsupiales y placentarios, que dan de mamar a las crías y dan a luz crías vivas (mamíferos eutarios o placentarios) o nacen de huevos (mamíferos metarios o no placentarios). Los ejemplos de especies de mamíferos incluyen seres humanos y otros primates (por ejemplo, monos, chimpancés), roedores (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas) y otros tales como por ejemplo: vacas, cerdos y caballos.

20 - por “mutación” se entiende la sustitución, delección, inserción de uno o más nucleótidos/aminoácidos en un polinucleótido (ADNc, gen) o una secuencia polipeptídica. Dicha mutación puede afectar la secuencia de codificación de un gen o su secuencia reguladora. Esto puede afectar también la estructura de la secuencia genómica o la estructura/estabilidad del ARNm codificado.

La variante de acuerdo con la presente invención puede ser un homodímero o un heterodímero. Preferiblemente, ambos monómeros del heterodímeros están mutados en las posiciones 26 a 40 y/o 44 a 77. Más preferiblemente, 30 ambos monómeros tienen diferentes sustituciones en las posiciones 26 a 40 y 44 a 77 de I-Crel.

En una realización preferida de dicha variante, dicha(s) sustitución(es) en el subdominio situado entre las posiciones 44 a 77 de I-Crel están en las posiciones 44, 68, 70, 75 y/o 77.

35 En otra realización preferida de dicha variante, dicha(s) sustitución(es) en el subdominio situado entre las posiciones 26 a 40 de I-Crel están en las posiciones 26, 28, 30, 32, 33, 38 y/o 40.

En otra realización preferida de dicha variante, dichas sustituciones se llevan a cabo en los aminoácidos iniciales con aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en: A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T, Y, C, V, L y W.

40 En otra realización preferida de dicha variante, ésta comprende una o más mutaciones en las posiciones de otros restos de aminoácidos que entran en contacto con la secuencia del ADN diana o interactúan con el esqueleto de ADN o con las bases de nucleótidos, directamente o mediante una molécula de agua; estos restos son bien conocidos en la técnica (Jurica et al., Molecular Cell., 1998, 2, 469-476; Chevalier y col., J. Mol. Biol., 2003, 329, 45 253-269).

En particular, se pueden introducir sustituciones adicionales en las posiciones que entran en contacto con el esqueleto de fosfato, por ejemplo en el bucle C terminal final (posiciones 137 a 143, Prieto y col., Nucleic Acids Res., Epub 22 de abril de 2007). Preferiblemente dichos restos están implicados en la unión y escisión de dicho sitio de escisión del ADN. Más preferiblemente, dichos restos están en las posiciones 138, 139, 142 o 143 de I-Crel. Dos restos pueden estar mutados en una variante con la condición de que cada mutación esté en una pareja diferente de restos seleccionada entre la pareja de restos en las posiciones 138 y 139 y la pareja de restos en las posiciones 142 y 143. Las mutaciones que se introducen modifican la(s) interacción(es) de dicho(s) aminoácido(s) del bucle C terminal final con el esqueleto de fosfato del sitio I-Crel. Preferiblemente, el resto en la posición 138 o 139 está 50 sustituido por un aminoácido hidrófobo para evitar la formación de enlaces de hidrógeno con el esqueleto de fosfato del sitio de escisión del ADN. Por ejemplo, el resto en la posición 138 está sustituido por una alanina o el resto en la posición 139 está sustituido por una metionina. El resto en la posición 142 o 143 está ventajosamente sustituido por un aminoácido pequeño, por ejemplo una glicina, para disminuir el tamaño de las cadenas laterales de estos restos de aminoácidos. Más preferiblemente, dicha sustitución en el bucle C terminal final modifica la especificidad de la

variante hacia los nucleótidos en las posiciones ± 1 a 2, ± 6 a 7 y/o ± 11 a 12 del sitio I-Crel.

En otra realización preferida de dicha variante, ésta comprende una o más mutaciones adicionales que mejoran las propiedades de la unión y/o la escisión de la variante hacia la secuencia del ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón.

5

Los restos adicionales que están mutados pueden estar en la secuencia completa de I-Crel, y en particular en la mitad C terminal de I-Crel (posiciones 80 a 163). Por ejemplo, la variante comprende una o más sustituciones adicionales en las posiciones 19, 24, 79, 105, 107, 151, 153, 158. Dichas sustituciones se seleccionan ventajosamente entre el grupo que consiste en: G19S, I24V, S79G, V105A, K107R, V151A, D153G y K158E.

10

La variante de la invención se puede derivar del I-Crel natural (SEQ ID NO: 1 o 133) o de una proteína de armazón del I-Crel que tiene al menos un 85% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, más preferiblemente al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 133, tal como el armazón de la SEQ ID NO: 4 (167 aminoácidos) que tiene la inserción de una alanina en la posición 2, la sustitución D75N, y la inserción de AAD en el término C (posiciones 164 a 166) de la secuencia de I-Crel.

15

Además, las variantes de la invención pueden incluir uno o más restos insertados en el término NH₂ y/o en el término COOH de la secuencia. Por ejemplo, se introdujo una etiqueta (epítipo (etiqueta HA (YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 135) o etiqueta S (KETAAAKFERQHMDS; SEQ ID NO: 136) o secuencia de polihistidina) en el término NH₂ y/o en el término COOH; dicha etiqueta es útil para la detección y/o la purificación de dicha variante. Cuando se introduce la etiqueta en el término NH₂, la secuencia de la etiqueta puede tanto sustituir los primeros aminoácidos de la variante (al menos la primera metionina y eventualmente el segundo aminoácido de la variante, la etiqueta de inicio con una metionina) como insertarse entre el primer (metionina) y el segundo aminoácidos o el primer y el tercer aminoácidos de la variante (etiqueta sin metionina).

20

La variante puede comprender también una señal de localización nuclear (NLS); dicha NLS es útil para la importación de dicha variante en el núcleo de la célula. Un ejemplo de NLS es KKKRK (SEQ ID NO: 134). La NLS se puede insertar exactamente después de la primera metionina de la variante o exactamente después de una etiqueta N terminal.

25

La variante de acuerdo con la presente invención puede ser un homodímero que sea capaz de escindir una secuencia de ADN diana palindrómico o pseudopalindrómico.

30

Alternativamente, dicha variante es un heterodímero, resultante de la asociación del primer y el segundo monómero que tienen diferentes sustituciones en las posiciones 26 a 40 y/o 44 a 77 del I-Crel, siendo dicho heterodímero capaz de escindir una secuencia de ADN diana no palindrómico procedente del locus ROSA26 de ratón.

35

La secuencia de ADN diana que se escinde por dicha variante puede estar en un exón o en un intrón del locus ROSA26 de ratón.

40

En otra realización preferida de dicha variante, dicho ADN diana se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 5 a 30 (Figura 17) que cubren todos los locus ROSA26 de ratón.

Tabla I: secuencias diana del locus ROSA26

SEQ ID NO	Secuencia diana	Posición de la diana	* Localización de la diana
5	c g c c c c t g c g c a a c c g t g g c a g g	3 2	2 0 Intrón 1
6	c c g c a c c c t t c t c c g g a g g g g g	3 4	9 0 Intrón 1
7	t g g a c t g g c t t g a c c a t g g c a	4 7	1 7 Intrón 1
8	c c a g c c t g g t c t a c a c a t c a a g	5 5	8 4 Intrón 1
9	c t a t c t a g g a t a g c c a g g a a t a	5 6	0 8 Intrón 1
10	c a g c c t g a t t t c c a g g g t g g g g	5 9	0 6 Intrón 1
11	t a a a c c t c a t a a a a t a g t t a t g	5 9	9 2 Intrón 1
12	t c a g a t t c t t t t a t a g g g g a c a	6 4	0 9 Intrón 1
13	t t g t a t a t c t c a a a t a a t g c t g	7 3	9 4 Intrón 1
14	t g a g c c a c t g a g a a t g g t c t c a	8 0	7 0 Intrón 1
15	c a a c a t g a t g t t c a t a a t c c c a	8	3 0 4 Exón 2
16	t t a a a t g t t g c t a t g c a g t t t g	8	3 9 4 Exón 2
17	t t c c c c a a a g t t c c a a a t t a t a	8	5 8 3 Exón 2

ES 2 380 233 T3

18	t a a c a c c g t t t g t g	t t t a t a a t a	8 5 7 8	Ex ó n 2
19	t a t a c t g t c t t t a g	a g a g t t t a	8 7 4 9	Ex ó n 2
20	t q t a a t a q c t t a g a	a a a t t t a a	9 0 1 0	Ex ó n 2
21	t t t a a t c t a t t g g t	t t g t c t a g	9 2 3 0	Intr ó n 2
22	t t g t a c a t t g t t a g	a g t g t g a	9 5 5 6	Intr ó n 2
23	t g c a c t g g t a c a c a	t a a t t t c a	1 0 2 6 3	Intr ó n 2
24	t g a g a t g a t a c a a a g a a t t t a g		1 1 5 5 8	Intr ó n 2 y transcrito de sentido contrario
25	c c a t c c t a t a a a a g a a g g t c a a		1 2 3 9 1	Ex ó n 3 o transcrito de sentido contrario
26	t t t a a t c t a t t g c a a a g g t a a		1 2 4 1 4	Ex ó n 3 o transcrito de sentido contrario
27	t a g t c c a g t g t t a t a g a g t t a g		1 2 5 3 5	Ex ó n 3 o transcrito de sentido contrario
28	t t c t a c c t t t t t c c a a a t g g c a		1 2 7 9 1	Ex ó n 3 o transcrito de sentido contrario
29	t t t t c t g t g g a g a c a a a g g t a a		1 2 9 0 4	Ex ó n 3 o transcrito de sentido contrario
30	t g a g a t g g c t c a g c a a a t a a t g		1 2 9 5 4	Ex ó n 3 o transcrito de sentido contrario
* La posición indicada es la del primer nucleótido de la diana				

Más preferiblemente, los monómeros de la variante tienen al menos las siguientes sustituciones, respectivamente para el primer y el segundo monómero:

- 5 - N30H, Y33S, Q44E, R68C, R70S y D75N (primer monómero), y N30D, Y33R, Q38T, Q44K, R68E, R70S, e I77R (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 5 diana de ROSA26 que se localiza en el primer intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - S32N, Y33G, Q44K, R70E y D75N (primer monómero), y S32T, Q38W, Q44K, R68E, R70S e I77R (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 6 diana de ROSA26 que se localiza en el primer intrón (Figura 1 y 17; Tabla I),
 - Y33R, Q38N, S40Q, Q44N, R70S, D75R e I77D (primer monómero), y N30H, Y33S, Q44A, R70S, D75Q e I77E (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 7 diana de ROSA26 que se localiza en el primer intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - K28S, Q38R, S40K, Q44D, R68Y, R70S, D75S e I77R (primer monómero), e Y33C, Q38A, R68A, R70K y D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 8 diana de ROSA26 que se localiza en el primer intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - Y33C, Q44T, R70S y D75Y (primer monómero), y S32D, Q38C, Q44D, R68Y, R70S, D75S e I77R (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 9 diana de ROSA26 que se localiza en el primer intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - 20 - S32T, Y33C, R68T, R70N y D75N (primer monómero), y S32T, Q38W, Q44K, R70E y D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 10 diana de ROSA26 que se localiza en el primer intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - R70S, D75R e I77Y ((primer monómero), e Y33R, Q38A, S40Q, Q44A, R70S y D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 11 diana de ROSA26 que se localiza en el primer intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - 25 - K28S, Q38R, S40K, Q44T, R68N, R70N y D75N (primer monómero), e Y33H, Q38S, Q44K, R68Y, R70S, D75Q e I77N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 12 diana de ROSA26 que se localiza en el primer intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - K28A, Y33S, Q38R, S40K, Q44N, R68Y, R70S, D75R, I77V (primer monómero), y S32T, Y33C, Q44A, R70S y D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 13 diana de ROSA26 que se localiza en el primer intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - S32D, Y33H, Q44K, R68E, R70S e I77R (primer monómero), y S32D, Y33H, Q44D, R68N, R70S y D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 14 diana de ROSA26 que se localiza en el primer intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - N30R, S32D, R68S, R70K y D75N (primer monómero), y D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 16 diana de ROSA26 que se localiza en el segundo exón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - K28R, Y33A, Q38Y, S40Q, R68Y, R70S, D75R e I77Q (primer monómero), e Y33R, Q38A, S40Q, R70S e I77K (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 17 diana de ROSA26 que se localiza en el segundo exón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - K28R, N30D, D75E e I77R (primer monómero), y S32D, Q38C, Q44A, R70S, D75R e I77Y (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 18 diana de ROSA26 que se localiza en el segundo exón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - 40 - Y33R, Q38A; S40Q, R70S, y D75N (primer monómero), y R70S, D75Y e I77R (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 19 diana de ROSA26 que se localiza en el segundo exón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
 - Y33R, Q38A, S40Q, Q44N, R68Y, R70S, D75R e I77V (primer monómero), y N30R, S32D, Q44T, R68H, R70H y

- D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 20 diana de ROSA26 que se localiza en el segundo exón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
- Y33P, S40Q, Q44K, R68Y, R70S, D75Q e I77N (primer monómero), y S32A, Y33C, R68Y, R70S, D75R e I77Q (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 21 diana de ROSA26 que se localiza en el segundo intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
- K28A, Y33S, Q38R, S40K, R68N, R70S, D75N e I77R (primer monómero), y S32N, Y33G, Q44A, R68A, R70K y D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 22 diana de ROSA26 que se localiza en el segundo intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
- N30H, Y33S, Q44Y, R70S e I77V (primer monómero), e Y33R, S40Q, Q44A, R70S y D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 23 diana de ROSA26 que se localiza en el segundo intrón (Figuras 1 y 17; Tabla I),
- S32D, Y33H, R68T, R70N y D75N (primer monómero), y N30R, S32D, Q44T, R68N, R70N y D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 24 diana de ROSA26 que se localiza en el segundo intrón y el transcrito de sentido contrario (Figuras 1 y 17; Tabla I),
- S32R, Y33D, Q44A, R70S y D75N (primer monómero), e Y33S, Q38R, S40H, R68H, R70H y D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 25 diana de ROSA26 que se localiza en el tercer exón o el transcrito de sentido contrario (Figuras 1 y 17; Tabla I),
- Y33P, S40Q, Q44K, R68Y, R70S, D75Q e I77N (primer monómero), y K28R, Y33A, Q38Y, S40Q, Q44T, R68H, R70H y D75N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 26 diana de ROSA26 que se localiza en el tercer exón o el transcrito de sentido contrario (Figuras 1 y 17; Tabla I),
- K28Q, Q38R, S40K, Q44A, R70S, D75E e I77R (primer monómero), y N30R, S32D, Q44K, R68Y, R70S, D75Q e I77N (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 27 diana de ROSA26 que se localiza en el tercer exón o el transcrito de sentido contrario (Figuras 1 y 17; Tabla I),
- Y33T, Q38A, R68H, R70H y D75N (primer monómero), y N30H, Y33S, R70S e I77K (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 28 diana de ROSA26 que se localiza en el tercer exón o el transcrito de sentido contrario (Figuras 1 y 17; Tabla I),
- Y33T, S40T, R68A, R70K y D75N (primer monómero), y K28R, Y33A, Q38Y, S40Q, R70S e I77K (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 29 diana de ROSA26 que se localiza en el tercer exón o el transcrito de sentido contrario (Figuras 1 y 17; Tabla I), y
- S32D, Y33H, Q44N, R70S, D75R e I77D (primer monómero), y S32D, Q38C, R70S e I77K (segundo monómero); esta variante escinde la SEQ ID NO: 30 diana de ROSA26 que se localiza en el tercer exón o el transcrito de sentido contrario (Figuras 1 y 17; Tabla I).

Los ejemplos de dichas variantes que escinden los ADN diana de ROSA26 de la Tabla I (las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 5 a 14 y 16 a 30) incluyen las variantes que tienen un primer monómero de cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 82 a 106 y un segundo monómero de cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 107 a 116, 4, 117 a 130, respectivamente (Figura 17).

Adicionalmente, las siguientes variantes son capaces de escindir el ADN diana de ROSA26, denominado rosa1, que se localiza en el segundo exón (Figuras 1 y 17; Tabla I):

- las cuarenta variantes que tienen un primer monómero seleccionado entre el grupo que consiste en: I24V, Q44Y, R70S y D75N; I24V, Q44Y, R68Y, R70S, D75Y e I77R ; I24V, Q44Y, R70S, D75N e I77V ; I24V, Q44Y, R68N, R70S y D75R; I24V, Q44Y, R68S, R70S y D75R; I24V, Q44Y, R70S y D75Q ; I24V, Q44Y, R68Y, R70S, D75R e I77V ; I24V, Q44Y, R70S, D75Y e I77T, y un segundo monómero seleccionado en el grupo que consiste en: K28E, Y33R, Q38R, S40R, Q44A, R68H, R70Q y D75N; K28E, Y33R, Q38R, S40R, Q44A, R70N y D75N; K28E, Y33R, Q38R, S40K, Q44A, R68H, R70Q y D75N ; K28E, Y33R, Q38R, S40K, Q44V, R70A y D75N; K28E, Y33R, Q38R, S40K, Q44A, R70G y D75N; en la Tabla V se presentan ejemplos de estas variantes (primer monómero: m2, m6, m8, m12, m13, m14, m16 o m17 (SEQ ID NO: 39, 43, 45, 49, 50, 51, 53 y 54); segundo monómero cualquiera de la SEQ ID NO : 60, 61, 63, 65 y 66)
- la variante que tiene un primer monómero que comprende I24V, Q44Y, R70S, D75Y e I77T y K28E, Y33R, Q38R, S40R, Q44A, R68S, R70Q y D75N (segundo monómero); en la Tabla V se presenta un ejemplo de esta variante (primer monómero m17 (SEQ ID NO: 54) y segundo monómero SEQ ID NO: 62).
- las diez variantes que tienen un primer monómero seleccionado entre el grupo que consiste en I24V, Q44Y, R68N, R70S y D75R; I24V, Q44Y, R68S, R70S y D75R; I24V, Q44Y, R70S y D75Q; I24V, Q44Y, R68Y, R70S, D75R e I77V; I24V, Q44Y, R70S, D75Y e I77T, y un segundo monómero seleccionado en el grupo que consiste en: K28E, Y33R, Q38R, S40K, Q44A, R70S y D75N y K28E, Y33R, Q38R, S40K, Q44A, R68T, R70N y D75N; en la Tabla V se presentan ejemplos de estas variantes (primer monómero: m12, m13, m14, m16 o m17 (SEQ ID NO: 49, 50, 51, 53 y 54); segundo monómero cualquiera de la SEQ ID NO: 64 y 67.

- las variantes que tienen un primer monómero que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 72 (MO_1; Tablas VI y VII) o SEQ ID NO: 73 (MO_2; Tablas VI y VII) y un segundo monómero que consiste en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 74 a 77 (mO_1 a mO_4; Tabla VII); estas ocho variantes tienen sustituciones adicionales que aumentan la actividad de escisión de las variantes de la diana rosal.

5

La invención abarca las variantes de I-Crel que tienen al menos un 85% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, más preferiblemente al menos un 95% (96%, 97%, 98%, 99%) de identidad con las secuencias, tal como se ha definido anteriormente, siendo dicha variante capaz de escindir un ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón.

10

Por ejemplo, la invención abarca las variantes de I-Crel derivadas de MO_1 y mO_2 mediante la inserción de una NLS, una etiqueta o ambas, que se seleccionan entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 140 a 145.

15 La variante heterodimérica es ventajosamente una variante heterodimérica obligada que tiene al menos un par de mutaciones interesantes que corresponden a restos del primer y el segundo monómeros que realizan una interacción molecular entre los dos monómeros I-Crel, en el que la primera mutación de dicho(s) par(es) está en el primer monómero y la segunda mutación de dicho(s) par(es) está en el segundo monómero y dicho(s) par(es) de mutaciones evitan la formación de homodímeros funcionales entre cada monómero y permiten la formación de un heterodímero funcional, capaz de escindir el ADN genómico diana procedente del locus ROSA26 de ratón

20

Para formar un heterodímero obligado, los monómeros tienen ventajosamente al menos uno de los siguientes pares de mutaciones, respectivamente para el primer y el segundo monómero.

25

a) la sustitución del ácido glutámico en la posición 8 con un aminoácido básico, preferiblemente una arginina (primer monómero) y la sustitución de la lisina en la posición 7 con un aminoácido ácido, preferiblemente un ácido glutámico (segundo monómero); el primer monómero puede comprender además la sustitución de al menos uno de los restos de lisina en las posiciones 7 y 96, por una arginina.

30

b) la sustitución del ácido glutámico en la posición 61 con un aminoácido básico, preferiblemente una arginina (primer monómero) y la sustitución de la lisina en la posición 96 con un aminoácido, preferiblemente un ácido glutámico (segundo monómero); el primer monómero puede comprender además la sustitución de al menos uno de los restos de lisina en las posiciones 7 y 96, por una arginina.

35

c) la sustitución de la leucina en la posición 97 con un aminoácido aromático, preferiblemente una fenilalanina (primer monómero) y la sustitución de la fenilalanina en la posición 54 con un aminoácido pequeño, preferiblemente una glicina (segundo monómero); el primer monómero puede comprender además la sustitución de la fenilalanina en la posición 54 por un triptófano y el segundo monómero puede comprender además la sustitución de la leucina en la posición 58 o la lisina en la posición 57, por una metionina, y

40

d) la sustitución del ácido aspártico en la posición 137 con un aminoácido básico, preferiblemente una arginina (primer monómero) y la sustitución de la arginina en la posición 51 con un aminoácido ácido, preferiblemente un ácido glutámico (segundo monómero).

Por ejemplo, el primer monómero puede tener la mutación D137R y el segundo monómero, la mutación R51D. La meganucleasa del heterodímero obligado comprende ventajosamente, al menos dos pares de mutaciones tal como se define en a), b), c) o d), anteriormente; uno de los pares de mutaciones es ventajosamente tal como se define en

45

c) o d). Preferiblemente, un monómero comprende la sustitución de restos de lisina en las posiciones 7 y 96 por un aminoácido ácido (ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E)), preferiblemente un ácido aspártico (K7E y K96E) y el otro monómero comprende la sustitución de restos de ácido glutámico en las posiciones 8 y 61 por un aminoácido básico (arginina (R) o lisina (K)); por ejemplo, E8K y E61R). Más preferiblemente, la meganucleasa del heterodímero obligado, comprende tres pares de mutaciones tal como se define en a), b) y c), anteriormente. La meganucleasa del

50

heterodímero obligado consiste ventajosamente en (i) E8R, E8K o E8H, E61R, E61K o E61H y L97F, L97W o L97Y; (ii) K7R, E8R, E61R, K96R y L97F, o (iii) K7R, E8R, F54W, E61R, K96R y L97F y un segundo monómero (B) que tiene al menos las mutaciones (iv) K7E o K7D, F54G o F54A y K96D o K96E; (v) K7E, F54G, L58M y K96E, o (vi) K7E, F54G, K57M y K96E. Por ejemplo, el primer monómero puede tener las mutaciones K7R, E8R o E8K, E61R, K96R y L97F o K7R, E8R o E8K, F54W, E61R, K96R y L97F y el segundo monómero, las mutaciones K7E, F54G,

55

L58M y K96E o K7E, F54G, K57M y K96E. Un ejemplo de heterodímero es la SEQ ID NO: 147 y la SEQ ID NO: 148. El heterodímero obligado puede comprender al menos una NLS y/o una etiqueta tal como se ha definido anteriormente; dicha NLS y/o la etiqueta puede estar en el primer y/o el segundo monómero.

La materia sujeta de la presente invención es también una meganucleasa química monocatenaria (proteína de

fusión) derivada de una variante de *I-Crel* tal como se ha definido anteriormente. La meganucleasa monocatenaria puede comprender dos monómeros de *I-Crel*, dos dominios del núcleo de *I-Crel* (posiciones 6 a 94 de *I-Crel*) o una combinación de ambos. Preferiblemente, los dos monómeros / dominios del núcleo o la combinación de ambos, están conectados por un enlazante peptídico. Un ejemplo de enlazante peptídico es la SEQ ID NO: 149. Un ejemplo de meganucleasa quimérica monocatenaria es la SEQ ID NO: 146. La meganucleasa quimérica monocatenaria puede comprender además al menos una NLS y/o una etiqueta tal como se ha definido anteriormente; dicha NLS y/o la etiqueta puede estar en el primer y/o el segundo monómero.

La materia sujeto de la presente invención es también un fragmento de polinucleótido que codifica una variante o una meganucleasa quimérica monocatenaria tal como se ha definido anteriormente; dicho polinucleótido puede codificar un monómero de una variante homodimérica o heterodimérica, o dos dominios/monómeros de una meganucleasa quimérica monocatenaria.

La materia sujeto de la presente invención es también un vector recombinante para la expresión de una variante o de una meganucleasa monocatenaria de acuerdo con la invención. El vector recombinante comprende al menos un fragmento de polinucleótido que codifica una variante o una meganucleasa monocatenaria, tal como se ha definido anteriormente. En una realización preferida, dicho vector comprende dos fragmentos de polinucleótidos diferentes, codificando cada uno, uno de los monómeros de una variante heterodimérica.

Un vector que se puede usar en la presente invención incluye, pero no se limita a, un vector vírico, un plásmido, un vector de ARN o una molécula de ADN o ARN lineal o circular que puede consistir en unos ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómicos, semisintéticos o sintéticos. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma (vector episómico) y/o la expresión de los ácidos nucleicos a los que se unen (vectores de expresión). Los expertos en la materia conocen grandes cantidades de vectores adecuados y están comercialmente disponibles.

Los vectores víricos incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de cadena levógira tales como ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), rhabdovirus (por ejemplo, virus de la hidrofobia y de la estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai), virus de ARN de cadena dextrógira tales como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN bicatenario que incluyen adenovirus, virus del herpes (por ejemplo, virus del herpes simple tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus), y virus de la viruela (por ejemplo, vaccinia, virus de la viruela aviar, y virus de la viruela del canario). Otros virus incluyen el virus de Norwalk, los togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus, y virus de la hepatitis, por ejemplo. Los ejemplos de retrovirus incluyen: leucosisarcoma aviar, virus de tipo C de mamíferos, virus de tipo B, virus de tipo D, grupo HTLV-BLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, tercera Edición, B. N. Fields, y col., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

Los vectores preferidos incluyen vectores lentivíricos, y particularmente vectores lentivíricos autoinactivantes.

Los vectores pueden comprender marcadores seleccionables, por ejemplo: neomicin fosfotransferasa, histidinol, deshidrogenasa, glutamina sintetasa, e hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa para el cultivo de células eucariotas; TRP1 para *S. cerevisiae*; tetraciclina, resistencia a la rifampicina o ampicilina en *E. coli*.

Preferiblemente, dichos vectores son vectores de expresión, en los que la(s) secuencia(s) que codifica(n) la meganucleasa variante/monocatenaria de la invención se coloca(n) bajo el control de elementos de control transcripcionales y traduccionales apropiados para permitir la producción o la síntesis de dicha variante. Por tanto, dicho polinucleótido está comprendido por un casete de expresión. Más concretamente, el vector comprende un origen de la replicación, un promotor unido operativamente con dicho polinucleótido codificante, un sitio de unión al ribosoma, un sitio de corte y empalme del ARN (cuando se usa ADN genómico), un sitio de poliadenilación y un sitio de terminación de la transcripción. Puede comprender también un potenciador. La selección del promotor dependerá de la célula en la que el polipéptido se expresa. Preferiblemente, cuando dicha variante es un heterodímero, los dos polinucleótidos que codifican cada uno de los monómeros se incluyen e un vector que es capaz de impulsar la expresión de ambos polinucleótidos, simultáneamente. Los promotores incluyen promotores específicos de tejido y/o inducibles. Los ejemplos de promotores inducibles son: el promotor eucariótico de la metalotionina que está inducido por niveles crecientes de metales pesados, el promotor *lacZ* procarionta que está inducido en respuesta al isopropil- β -D-tiogalacto-piranosido (IPTG) y el promotor eucariota del choque térmico que está inducido por la temperatura creciente. Los ejemplos de promotores específicos de tejido son la creatina cinasa del músculo esquelético, el antígeno específico de próstata (PSA), la α -antitripsin proteasa, las proteínas A y B tensioactivas humanas (SP), los genes de la β -caseína y de la proteína ácida del suero de la leche.

De acuerdo con otra realización ventajosa de dicho vector, éste incluye una construcción directora que comprende secuencias que comparten homologías con la región que rodea el sitio de escisión del ADN genómico tal como se ha definido anteriormente.

5 Alternativamente el vector que codifica una meganucleasa I-Cre1 variante/monocatenaria y el vector que comprende la construcción directora son vectores diferentes.

Más preferiblemente, la construcción directora del ADN comprende:

- 10 a) Secuencias que comparten homologías con la región que rodea el sitio de escisión del ADN genómico tal como se ha definido anteriormente, y
b) Una secuencia que se va a introducir flanqueada por secuencias como en a)

Para la activación génica en el locus ROSA26 de ratón, la secuencia que se va a introducir comprende un casete
15 exógeno de expresión génica o parte del mismo y eventualmente un marcador de selección, tal como un gen HPRT.

Alternativamente, la secuencia que se va a introducir puede ser cualquier otra secuencia usada para alterar el locus ROSA26 de ratón de alguna manera específica incluyendo una secuencia usada para modificar una secuencia específica en el locus ROSA26 de ratón, para atenuar o activar el locus ROSA26 de ratón o parte del mismo, para
20 introducir una mutación en un sitio de interés del locus ROSA26 de ratón, o para inactivar o eliminar el locus ROSA26 de ratón o una parte del mismo.

Preferiblemente, se usan secuencias homólogas de al menos 50 pb, preferiblemente de más de 100 pb y más preferiblemente de más de 200 pb para reparar el sitio de escisión. De este modo, se localizan homologías
25 compartidas de ADN en regiones flanqueantes en la dirección 5' y en la dirección 3' del sitio de la rotura y la secuencia de ADN que se va a introducir debe localizarse entre los dos brazos.

Por tanto, la construcción directora es preferiblemente de 200 pb a 6000 pb, más preferiblemente de 1000 pb a 2000
30 pb.

Para la inserción de una secuencia, las homologías del ADN se localizan generalmente en regiones situadas directamente en la dirección 5' y en la dirección 3' del sitio de la rotura (secuencias inmediatamente adyacentes a la rotura; matriz de mínima reparación). Sin embargo, cuando la inserción se asocia con una delección de secuencias que flanquean el sitio de escisión, las homologías compartidas del ADN se localizan en las regiones situadas en la
35 dirección 5' y en la dirección 3' de la región de la delección.

Por ejemplo, se indican en la figura 17 los ADN dianas de ROSA26 de ratón que se escinden por las variantes tal como se ha definido anteriormente y la matriz mínima para reparar cada una de las escisiones generadas por cada variante.
40

La materia sujeto de la presente invención es también una composición caracterizada porque comprende al menos una meganucleasa tal como se ha definido anteriormente (meganucleasa variante o quimérica derivada monocatenaria) y/o al menos un vector de expresión que codifica dicha meganucleasa, tal como se ha definido anteriormente.
45

En una realización preferida de dicha composición, ésta comprende una construcción directora del ADN tal como se ha definido anteriormente.

Preferiblemente, dicha construcción directora del ADN, está incluida tanto en un vector recombinante como está
50 incluida en un vector de expresión que comprende el(los) polinucleótidos que codifican la meganucleasa de acuerdo con la invención.

La materia sujeto de la presente invención es además el uso de una meganucleasa tal como se ha definido anteriormente, uno o dos polinucleótido(s), incluidos preferentemente en el(los) vector(es) de expresión, para la
55 genomaniplación del genoma en el locus ROSA26 de ratón, para objetivos no terapéuticos.

De acuerdo con una realización ventajosa de dicho uso, es para inducir una rotura en la doble cadena en un sitio de interés del locus ROSA26 de ratón que comprende una secuencia genómica del ADN diana, induciendo por consiguiente un episodio de recombinación del ADN, una pérdida de ADN o la muerte celular.

De acuerdo con la invención, dicha rotura de la doble cadena es para: modificar una secuencia específica en el locus de ROSA26, atenuar o activar el locus ROSA26 endógeno, introducir una mutación en un sitio de interés del locus ROSA26, introducir un gen exógeno o una parte del mismo, inactivar o eliminar el locus ROSA26 endógeno o una parte del mismo, translocar un brazo cromosómico, o dejar el ADN sin reparar y degradado.

5

De acuerdo con otra realización ventajosa de dicho uso, dicha variante, polinucleótido(s), vector, se asocian con una construcción directora del ADN tal como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida del uso de la meganucleasa de acuerdo con la presente invención, ésta comprende al menos las siguientes etapas: 1) introducir una rotura en la doble cadena en un sitio de interés del locus ROSA26 de ratón que comprenda al menos un sitio de reconocimiento y escisión de dicha meganucleasa, poniendo en contacto dicho sitio de escisión con dicha meganucleasa; 2) proporcionar una construcción directora del ADN que comprenda la secuencia que se va a introducir flanqueada por secuencias que comparten homologías con el locus dirigido. Se puede proporcionar dicha meganucleasa directamente a la célula o a través de un vector de expresión que comprenda la secuencia del polinucleótido que codifica dicha meganucleasa y adecuada para su expresión en la célula usada. Se usa la estrategia para introducir una secuencia de ADN en el sitio diana, por ejemplo, para generar la activación en ratones transgénicos o en líneas recombinantes de células de ratón que se pueden usar para la producción de proteínas, estudios de la función génica, desarrollo de fármacos (cribado de fármacos) o como modelo de la enfermedad.

20

La materia sujeta de la presente invención es también un procedimiento para preparar un ratón transgénico que exprese un producto de interés, que comprende al menos la etapa de:

- 25 (a) Introducir en una célula precursora pluripotente de ratón o en un embrión de ratón, una meganucleasa, tal como se ha definido anteriormente con el fin de inducir en ella una escisión en la doble cadena en un sitio de interés del locus ROSA26 que comprende un sitio de reconocimiento y escisión de dicha meganucleasa; simultánea o consecutivamente,
- 30 (b) Introducir en la célula precursora o el embrión de ratón de la etapa (a) un ADN director, que comprende al menos una secuencia que codifica un producto de interés flanqueado por secuencias que comparten homologías con la región que rodea el sitio de escisión, con el fin de generar una célula o embrión precursores de ratón genómicamente modificado que tenga insertada la secuencia de interés mediante recombinación homóloga entre el ADN director y el ADN cromosómico,
- 35 (c) Desarrollar la célula o embrión precursores de ratón genómicamente modificado de la etapa (b) en un ratón quimérico, y
- (d) Derivar un ratón transgénico del ratón quimérico de la etapa (c).

Preferiblemente, la etapa (c) comprende la introducción de una célula precursora genómicamente modificada en la etapa (b) en el interior de blastocistos con el fin de generar ratones quiméricos.

40 De acuerdo con una realización preferida de dicho procedimiento, éste comprende una etapa adicional (e) de recuperación del producto de interés procedente del ratón transgénico, por cualquier medio.

La materia sujeta de la presente invención es también un procedimiento para preparar una célula recombinante de ratón que expresa un producto de interés, que comprende al menos la etapa de:

45

- (a) Introducir en una célula de ratón, una meganucleasa, tal como se ha definido anteriormente, con el fin de inducir una rotura de la doble cadena en un sitio de interés del locus ROSA26 que comprende un reconocimiento del ADN y un sitio de escisión para dicha meganucleasa, simultánea o consecutivamente.
- 50 (b) Introducir en la célula de la etapa (a), un ADN director, en el que dicho ADN director que comprende al menos una secuencia que codifica un producto de interés flanqueada por secuencias que comparten homologías con la región que rodea el sitio de escisión, con el fin de generar una célula recombinante de ratón que tiene insertada la secuencia de interés mediante recombinación homóloga entre el ADN director y el ADN cromosómico,
- 55 (c) aislar la célula recombinante de ratón de la etapa (b), mediante cualquier medio apropiado.

De acuerdo con una realización preferida de dicho procedimiento, éste comprende una etapa adicional (d) de recuperación del producto de interés de la célula recombinante de ratón, mediante cualquier medio.

El ADN director se introduce en la célula en las condiciones apropiadas para la introducción del ADN director en el

sitio de interés.

En una realización preferida, dicha construcción directora del ADN se inserta en un vector.

5 La célula que se modifica puede ser cualquier célula de interés. Para preparar ratones transgénicos, las células son células precursoras pluripotentes tales como citoblastos derivados de embriones (ES), que son bien conocidos en la técnica. Para preparar líneas recombinantes de células de ratón, las células pueden ser ventajosamente células NSO, SP2/0 (BALB/c de mieloma; ECACC n° 85110503 y n° 85072401), o L (ATCC n° CRL-2648). Dicha meganucleasa se puede proporcionar directamente a la célula o a través de un vector de expresión que comprenda
10 la secuencia del polinucleótido que codifica dicha meganucleasa y adecuada para su expresión en la célula usada.

Para preparar animales/líneas de células recombinantes que expresan un producto de interés, el ADN director comprende una secuencia que codifica el producto de interés (proteína o ARN), y eventualmente, un gen marcador seleccionable, flanqueado por secuencias en la dirección 5' y en la dirección 3' del sitio de la meganucleasa en el
15 locus ROSA26 de ratón, tal como se ha definido anteriormente, con el fin de generar células genómicamente modificadas (célula o embrión precursor animal/célula animal o humana) que tienen integrada la secuencia exógena de interés en el sitio de la meganucleasa en el locus ROSA26, mediante recombinación homóloga.

La secuencia de interés puede ser cualquier gen que codifique alguna proteína/péptido de interés, incluyendo, pero
20 sin limitarse a: genes indicadores, receptores, moléculas de señalización, factores de transcripción, proteínas y péptidos farmacéuticamente activos, productos y toxinas génicas que producen enfermedad. La secuencia puede codificar también una molécula de ARN de interés incluyendo por ejemplo un ARNip.

Se puede impulsar la expresión de la secuencia exógena, tanto mediante el promotor ROSA26 endógeno como
25 mediante un promotor heterólogo, preferiblemente un promotor ubicuo o específico de tejido, tanto constitutivo como inducible, tal como se ha definido anteriormente. Además, la expresión de la secuencia de interés puede ser condicional; se puede inducir la expresión mediante una recombinasa específica del sitio (Cre, FLP...).

De esta manera, la secuencia de interés se inserta en un casete apropiado que puede comprender un promotor
30 heterólogo operativamente enlazado con dicho gen de interés y una o más secuencias funcionales incluyendo, pero sin limitarse a (genes marcadores (seleccionables), sitios de reconocimiento de la recombinasa, señales de poliadenilación, secuencias aceptoras de corte y empalme, intrones, etiquetas para la detección de proteínas y potenciadores.

35 Alternativamente, el casete apropiado puede comprender un sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES) operativamente enlazado con dicho gen de interés y una o más secuencias funcionales incluyendo solamente n eventos IRES-Hygro (pCLS1675), que no se limitan a genes marcadores (seleccionables), sitios de reconocimiento de la recombinasa, señales de poliadenilación, secuencias aceptoras de corte y empalme, intrones, etiquetas para la detección de proteínas y potenciadores.
40

La meganucleasa se puede usar bien como un polipéptido o bien como una construcción de polinucleótidos que
45 codifica dicho polipéptido. Se introduce en células de ratón, mediante cualquier medio conveniente bien conocido de los expertos en la técnica, que sea apropiado para el tipo de célula concreta, sola o en asociación ya sea con al menos un vehículo o portador apropiado y/o con el ADN director.

De acuerdo con una realización ventajosa de los usos de acuerdo con la invención, la meganucleasa (polipéptido)
está asociada con:

- 50 - liposomas, polietileneimina (PEI); en tal caso, dicha asociación se administra y se introduce por tanto en células diana somáticas
- péptidos de translocación de membrana (Bonetta, *The Scientist*, 2002, 16, 38; Ford y col., *Gene Ther.*, 2001, 8, 1-4; Wadia y Dowdy, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, 13, 52-56); en tal caso, la secuencia de la meganucleasa variante/monocatenaria se fusiona con la secuencia de un péptido de translocación de membrana (proteína de fusión)

55 De acuerdo con otra realización ventajosa de los usos de acuerdo con la invención, la meganucleasa (el polinucleótido que codifica dicha meganucleasa) y/o el ADN director se insertan en un vector. Se pueden introducir vectores que comprenden el ADN director y/o el ácido nucleico que codifica una meganucleasa en una célula mediante una variedad de procedimientos (por ejemplo, inyección, captación directa, bombardeo de proyectiles,

liposomas, electroporación). Las meganucleasas se pueden expresar de manera estable o transitoria en células que usan vectores de expresión. Los expertos en la materia conocen bien las técnicas de expresión en células eucariotas. (Véase Current Protocols in Human Genetics: Capítulo 12 "Vectors For Gene Therapy" y Capítulo 13 "Delivery Systems for Gene Therapy"). Opcionalmente, puede ser preferible incorporar una señal de localización nuclear en la proteína recombinante para asegurarse que se expresa en el interior del núcleo.

Una vez en la célula, y si está presente la meganucleasa, el vector que comprende el ADN director y/o el ácido nucleico que codifica una meganucleasa se importa o transloca por la célula desde el citoplasma al sitio de acción en el núcleo.

En una realización de los usos de acuerdo con la presente invención, la meganucleasa es sustancialmente no inmunógena, es decir, engendra poca o ninguna respuesta inmunológica adversa. Se pueden usar una variedad de procedimientos para mejorar o eliminar las reacciones inmunológicas perjudiciales de este tipo, de acuerdo con la invención. En una realización preferida, la meganucleasa está sustancialmente exenta de N-formil metionina. Otra manera de evitar reacciones inmunológicas no deseadas es conjugar las meganucleasas con polietilenglicol ("PEG") o prolipropilenglicol ("PPG") (preferiblemente de 500 a 20.000 daltons de peso molecular promedio (PM). La conjugación con PEG o PPG, tal como se describe por Davis y col. (documento US 4.179.337) por ejemplo, puede proporcionar conjugados de endonucleasas solubles en agua, no inmunógenos, fisiológicamente activos. Procedimientos similares usando también un copolímero de polietileno—polipropilenglicol, se describen en Saifer y col. (documento US 5.006.333).

La invención se refiere también a una célula hospedadora procariota o eucariota que está modificada por un polinucleótido o un vector tal como se ha definido anteriormente, preferiblemente un vector de expresión.

La invención se refiere también a un animal transgénico no humano o a una planta transgénica, caracterizados porque todas o parte de sus células están modificadas por un polinucleótido o un vector tal como se ha definido anteriormente.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, una célula se refiere a una célula procariota, tal como una célula bacteriana, o una célula eucariota, tal como una célula animal, planta o levadura.

La materia sujeto de la presente invención es también el uso de al menos una variante de meganucleasa, tal como se ha definido anteriormente, como un armazón para preparar otras meganucleasas. Se puede llevar a cabo, por ejemplo, un tercer ciclo de mutagénesis y selección/cribado en dichas variantes, con el objetivo de preparar novedosas meganucleasas de tercera generación.

Los diferentes usos de la meganucleasa y los procedimientos de utilización de dicha meganucleasa de acuerdo con la presente invención incluyen el uso de la variante de I-Cre1, la meganucleasa quimérica monocatenaria derivada de dicha variante, el(los) polinucleótido(s), el vector, la célula, la planta transgénica o el mamífero transgénico no humano que codifica dicha variante o meganucleasa quimérica monocatenaria, tal como se ha definido anteriormente.

La variante de I-Cre1 de acuerdo con la invención se puede obtener mediante un procedimiento para genomanipular variantes de I-Cre1 capaces de escindir una secuencia diana de ADN genómico procedente del locus ROSA26 de ratón, que comprende al menos las etapas de:

- (a) construir una primera serie de variantes de I-Cre1 que tengan al menos una sustitución en un primer subdominio funcional del dominio del núcleo LAGLIDADG situado entre las posiciones 26 a 40 de I-Cre1,
- (b) construir una segunda serie de variantes de I-Cre1 que tenga al menos una sustitución en un segundo subdominio funcional del dominio del núcleo LAGLIDADG situado entre las posiciones 44 a 77 de I-Cre1,
- (c) seleccionar y/o cribar las variantes procedentes de la primera serie de la etapa (a) que son capaces de escindir un sitio I-Cre1 mutante en el que al menos (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones -10 a -8 del sitio I-Cre1 se ha sustituido con el triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones -10 a -8 de dicha diana genómica y (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones +8 a +10 se ha sustituido con la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones -10 a -8 de dicha diana genómica,
- (d) seleccionar y/o cribar las variantes de la segunda serie de la etapa (b) que son capaces de escindir un sitio I-Cre1 mutante en el que al menos (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones -5 a -3 del sitio I-Cre1 se ha sustituido con el triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones -5 a -3 de dicha diana

genómica y (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones +3 a +5 se ha sustituido con la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones -5 a -3 de dicha diana genómica,

- 5 (e) seleccionar y/o cribar las variantes procedentes de la primera serie de la etapa (a) que son capaces de escindir un sitio I-CreI mutante en el que al menos (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones +8 a +10 del sitio I-CreI se ha sustituido con el triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones +8 a +10 de dicha diana genómica y (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones -10 a -8 se ha sustituido con la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones +8 a +10 de dicha diana genómica,
- 10 (f) seleccionar y/o cribar las variantes procedentes de la segunda serie de la etapa (b) que son capaces de escindir un sitio I-CreI mutante en el que al menos (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones +3 a +5 del sitio I-CreI se ha sustituido con el triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones +3 a +5 de dicha diana genómica y (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones -5 a -3 se ha sustituido con la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones +3 a +5 de dicha diana genómica,
- 15 (g) combinar en una única variante, la(s) mutación(es) en las posiciones 26 a 40 y 44 a 77 de dos variantes procedentes de la etapa (c) y la etapa (d), para obtener una variante homodimérica novedosa de I-CreI que escinda una secuencia en la que (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones -10 a -8 es idéntico al triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones -10 a -8 de dicha diana genómica, (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones +8 a +10 es idéntico a la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones -10 a -8 de dicha diana genómica, (iii) el triplete de nucleótidos en las posiciones -5 a -3 es idéntico al triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones -5 a -3 de dicha diana genómica y (iv) el triplete de nucleótidos en las posiciones +3 a +5 es idéntico a la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones -5 a -3 de dicha diana genómica, y/o
- 20 (h) combinar en una única variante, la(s) mutación(es) en las posiciones 26 a 40 y 44 a 77 de dos variantes procedentes de la etapa (e) y la etapa (f), para obtener una novedosa variante homodimérica de I-CreI que escinda una secuencia en la que (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones +3 a +5 es idéntico al triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones +3 a +5 de dicha diana genómica, (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones -5 a -3 es idéntico a la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones +3 a +5 de dicha diana genómica, (iii) el triplete de nucleótidos en las posiciones +8 a +10 del sitio I-CreI se ha sustituido con el triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones +8 a +10 de dicha diana genómica y (iv) el triplete de nucleótidos en las posiciones -10 a -8 es idéntico a la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos en las posiciones +8 a +10 de dicha diana genómica,
- 25 (i) combinar las variantes obtenidas en las etapas (g) y (h) para formar heterodímeros, y
- 30 (j) seleccionar y/o cribar los heterodímeros procedentes de la etapa (i) que son capaces de escindir dicho ADN genómico diana del locus ROSA26 de ratón.
- 35

40 Se puede omitir una de las etapa(s) (c), (d), (e) o (f). Por ejemplo, si se omite la etapa (c), la etapa (d) se lleva a cabo con un sitio I-CreI mutante en el que ambos tripletes de nucleótidos en las posiciones -10 a -8 y -5 a -3 se han sustituido con los tripletes de nucleótidos que están presente en las posiciones -10 a -8 y -5 a -3, respectivamente de dicha diana genómica, y los tripletes de nucleótidos en las posiciones +3 a +5 y +8 a +10 se han sustituido con la secuencia complementaria inversa de los tripletes de nucleótidos que están presentes en las posiciones -5 a -3 y -10 a -8, respectivamente de dicha diana genómica.

45

Las etapas (a), (b), (g), (h) e (i) pueden comprender además la introducción de mutaciones adicionales en otras posiciones que entran en contacto con la secuencia de ADN diana o interactúan directa o indirectamente con dicha secuencia diana, en las posiciones que mejoran las propiedades de unión y/o escisión de los mutantes, o en las

50 posiciones que evitan la formación de homodímeros funcionales, tal como se ha definido anteriormente. Esto se puede llevar a cabo generando una biblioteca combinatoria tal como se describe en la Solicitud PCT Internacional WO 2004/067736.

El procedimiento para genomanipular variantes de I-CreI de la invención comprende ventajosamente la introducción

55 de mutaciones aleatorias en la variante completa o en una parte de la variante, en particular, la mitad C terminal de la variante (posiciones 80 a 163) para mejorar las propiedades de unión y/o escisión de los mutantes hacia el ADN diana procedente del gen de interés. Se puede llevar a cabo la mutagénesis generando bibliotecas de mutagénesis aleatorias en un combinado de variantes, de acuerdo con los procedimientos normalizados de la mutagénesis que son bien conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles. Preferiblemente, la mutagénesis se lleva a

cabo en la secuencia completa de un monómero del heterodímero formado en la etapa (i) u obtenido en la etapa (j), ventajosamente en un combinado de monómeros, preferiblemente en ambos monómeros del heterodímero de la etapa (i) o (j).

- 5 Preferiblemente, se llevan a cabo dos ciclos de selección/cribado de acuerdo con el proceso ilustrado por la figura 4 de Arnould y col., J. Mol. Biol., Epub 10 de mayo de 2007. En el primer ciclo, uno de los monómeros del heterodímero se somete a mutagénesis (monómero Y en la figura 4), se expresa simultáneamente con el otro monómero (monómero X en la figura 4) para formar heterodímeros, y los monómeros Y⁺ mejorados se seleccionan frente a la diana procedente del gen de interés. En el segundo ciclo, el otro monómero (monómero X) se somete a mutagénesis, se expresa simultáneamente con los monómeros Y⁺ mejorados para formar heterodímeros, y se selecciona frente a la diana procedente del gen de interés para obtener meganucleasas (X⁺ Y⁺) con actividad mejorada.

- 15 La combinación (intramolecular) de mutaciones en las etapas (g) y (h) se puede llevar a cabo amplificando los fragmento solapantes que comprenden cada uno de los dos subdominios, de acuerdo con las técnicas de solapamiento de la PCR bien conocidas.

- 20 La combinación (intermolecular) de las variantes en la etapa (i) se lleva a cabo expresando simultáneamente una variante procedente de la etapa (g) con una variante procedente de la etapa (h), con el fin de permitir la formación de heterodímeros. Por ejemplo, las células hospedadoras se pueden modificar mediante uno o dos vector(es) de expresión recombinantes que codifica(n) dicha(s) variante(s). A continuación se cultivan las células en condiciones que permitan la expresión de la(s) variante(s), de tal manera que se formen heterodímeros en las células hospedadoras, tal como se ha descrito anteriormente en la Solicitud PCT Internacional WO 2006/097854 y Arnould y col., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458.

- 25 Se puede llevar a cabo la selección y/o el cribado en las etapas (c), (d), (e), (f) y/o (j) usando un ensayo de escisión *in vitro* o *in vivo*, tal como se describe en la Solicitud PCT Internacional WO 2004/067736, Arnould et al., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458, Epinat y col., Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952-2962 y Chames y col., Nucleic Acids Res., 2005, 33, e178.

- 30 De acuerdo con otra realización ventajosa de dicho procedimiento, las etapas (c), (d), (e), (f) y/o (j) se llevan a cabo *in vivo*, en condiciones en las que la rotura de la doble cadena en la secuencia mutada del ADN diana que se genera por dicha variante conduce a la activación de un marcador de selección positivo o un gen indicador, o la inactivación de un marcador de selección negativo o un gen indicador, mediante reparación medida por recombinación de dicha rotura del ADN bicatenario.

- 40 La materia sujeto de la presente invención es también una variante de I-Crel que tiene mutaciones en las posiciones 26 a 40 y/o 44 a 77 del I-Crel que es útil para genomanipular las variantes capaces de escindir un ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón, de acuerdo con la presente invención. En particular, la invención abarca las variantes de I-Crel tal como se define en la etapa (c) a (f) del procedimiento para genomanipular variantes de I-Crel, tal como se ha definido anteriormente, incluyendo las variantes m1 a m18 (Tabla II, SEQ ID NO: 38 a 55), la variante que comprende Q44V, R70A y D75N (SEQ ID NO: 131; Tabla III) y la variante que comprende K28E, Y33R, Q38R, S40R y D75N (SEQ ID NO: 132; Tabla III). La invención abarca también las variantes de I-Crel tal como se definen en la etapa (g) y (h) del procedimiento para genomanipular las variantes de I-Crel, tal como se ha definido anteriormente, incluyendo las variantes de la secuencia SEQ ID NO: 60 a 67 (variantes combinadas de la Tabla III).

- 50 Las meganucleasas quiméricas monocatenarias capaces de escindir un ADN diana procedente del gen de interés se derivan de las variantes de acuerdo con la invención mediante procedimientos bien conocidos en la técnica (Epinat y col., Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952-62; Chevalier y col., Mol. Cell., 2002, 10, 895-905; Steuer y col., Chembiochem., 2004, 5, 206-13; Solicitudes PCT Internacionales WO 03/078619 y WO 2004/031346). Cualquiera de dichos procedimientos, se puede aplicar para la construcción de meganucleasas quiméricas monocatenarias derivadas de las variantes tal como se define en la presente invención.

- 55 La(s) secuencia(s) del (de los) polinucleótido(s) que codifica(n) la variante tal como se define en la presente invención se puede preparar mediante cualquier procedimiento conocido por la persona experta en la materia. Por ejemplo, se amplifican a partir de un molde de ADNc, mediante reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos. Preferiblemente, los codones de dicho ADNc se seleccionan para favorecer la expresión de dicha proteína en el sistema de expresión deseado.

El vector recombinante que comprende dichos polinucleótidos se puede obtener e introducirse en una célula hospedadora mediante técnicas de ADN recombinante e ingeniería genética bien conocidas.

La variante de I-Crel o el derivado monocatenario tal como se define en la presente invención se producen expresando el(los) polipéptido(s) tal como se ha definido anteriormente; preferiblemente, dicho(s) polipéptido(s) se expresa(n) o expresan simultáneamente (en el caso de la variante sola) en una célula hospedadora o un animal/planta transgénicos modificados para la expresión o expresión simultánea del(de los) polipéptido(s), y la variante o derivado monocatenario se recupera del cultivo de la célula hospedadora o del animal/planta transgénicos.

10 La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están comprendidas en los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. 15 AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Biblioteca del Congreso, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis y col. Patente de los Estados Unidos N° 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And 20 Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson y M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., Nueva York), específicamente, Vols.154 y 155 (Wu y col. eds.) y Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental 25 Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); and Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

Adicionalmente a las características anteriores, la invención comprende además otras características que surgirán de la descripción que sigue, que se refiere a los ejemplos que ilustran las variantes I-Crel de la meganucleasa y sus 30 usos de acuerdo con la invención, así como los dibujos adjuntos en los que:

- la figura 1 representa el locus ROSA26 de ratón (número de acceso EMBL CQ880114; SEQ ID NO: 3). Los exones se secuencian (Exón 1. Posiciones 2490 a 2599, el Exón 2 a partir del transcrito 1: posiciones 8228 a 9248; el Exón 3 a partir del transcrito 2 comienza en la posición 11845, y solapamientos en gran parte con el transcrito de sentido contrario, que finaliza en la posición 11505. Se indican los tres transcritos 35 identificados hasta el momento así como la secuencia y la posición de la diana rosa1 (SEQ ID NO: 15).
- la figura 2 representa la estructura tridimensional de la endonucleasa de asentamiento I-Crel unida a su ADN diana. El núcleo catalítico está rodeado por dos pliegues $\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$ que forman una interfase de interacción con forma de silla de montar por encima de la ranura mayor del ADN.
- la figura 3 ilustra una solución en dos etapas para genomanipular la especificidad de I-Crel y otras 40 endonucleasas de asentamiento LAGLIDADG. Se generó una gran colección de derivados de I-Crel mediante mutagénesis semirracional de un armazón inicial y cribado de variantes funcionales con especificidad localmente alterada. A continuación, se usó una solución combinatoria para ensamblar estos mutantes en meganucleasas con especificidad completamente rediseñada. Se crearon proteínas homodiméricas ("semimeganucleasas" mediante combinaciones de dos conjuntos de mutaciones dentro de 45 un mismo pliegue $\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$, y la expresión simultánea de dos de dichas 'semimeganucleasas' puede dar como resultado especies heterodiméricas ("meganucleasa hecha a medida" que escinden la diana de interés.
- la figura 4 representa una estrategia para el uso de una meganucleasa que escinde el locus ROSA26 de ratón. La inserción génica usando la recombinación homóloga inducida por meganucleasa activará un gen 50 de interés en el locus ROSA26 de ratón. Se pueden usar secuencias de intrones y exones como regiones homólogas.
- la figura 5 representa la secuencia de rosa1 diana y los derivados. 10GGG_P, 5GAT_P y 5TAT_P son derivados que se encuentran cerca que se van a escindir mediante mutantes I-Crel obtenidos anteriormente. Difieren de C1221 (secuencia palindrómica escindida por la proteína de armazón de I-Crel) 55 en los motivos secuenciados. Se describieron en primer lugar C1221, 10GGG_P, 5GAT_P and 5TAT_P como secuencias de 24 pb, pero los datos estructurales sugieren que solo los 22 pb son relevantes para la interacción de la proteína/ADN. Sin embargo, se indican las posiciones ± 12 entre paréntesis. rosa 1 es la secuencia de ADN localizada en el locus ROSA26 de ratón en la posición 8304. En la diana rosa1.2, la secuencia GTTC en la parte media de la diana está sustituida con GTAC, las bases se encuentran en

C1221. rosa 1.3 es la secuencia palindrómica derivada de la parte izquierda de rosa 1.2 y rosa 1.4 es la secuencia palindrómica derivada de la parte derecha de rosa 1.2. tal como se muestra en la figura, los motivos secuenciados procedentes de 10GGG_P, 5GAT_P and 5TAT_P se encuentran en la serie rosa1 de dianas.

- 5 - la figura 6 representa la cartografía del vector pCLS1055.
 - la figura 7 representa la cartografía del vector pCLS0542.
 - la figura 8 ilustra la escisión del ADN diana rosa 1.3 por mutantes de I-CreI. Los 63 positivos encontrados en el cribado primario se volvieron a disponer en una placa de 96 pocillos y se validaron mediante un cribado secundario (en un formato cuadruplicado). Los 22 mutantes seleccionados en el ejemplo 2 están rodeados por un círculo.
- 10 - la figura 9 ilustra la escisión de la diana rosa1.4 por mutantes combinatorias de I-CreI. Los 69 positivos encontrado en el cribado primario se volvieron a disponer en una placa de 96 pocillos y se validaron mediante un cribado secundario (en un formato cuadruplicado). Los 15 mutantes seleccionados en el ejemplo 3 están rodeados por un círculo.
- 15 - la figura 10 representa la cartografía del vector pCLS 1107
 - la figura 11 ilustra la escisión de las dianas rosa1.2 y rosa1 por mutantes combinatorios de I-CreI heterodiméricos. A. Ejemplo de cribado de combinaciones de mutantes de I-CreI con la diana rosa1.2. B. Cribado de las mismas combinaciones de mutantes de I-CreI con la diana rosa1. B5, B6, D5, D6, F5, F6, H5 y H6: cepas de levaduras que expresan rosa1.3 que cortan mutantes de I-CreI transformados con ADN plásmido de PCLS1107 vacío.
- 20 - la figura 12 ilustra la escisión de la diana rosa1. Una serie de mutantes de I-CreI que cortaban rosa 1.4 se sometieron a mutagénesis aleatoria y se expresaron simultáneamente con un mutante que cortaba rosa 1.3. Se ensayó la escisión con la diana rosa1. En cada cuatro grupos de manchas, las dos manchas en el lado derecho corresponden a uno de los heterodímeros originales que escinden rosa1 por duplicado mientras que las dos manchas en el lado izquierdo corresponden al mismo escisor rosa1.4 mutado expresado simultáneamente con un escisor rosa1.3 no mutado (mutante m13, descrito en las Tablas IV y V). Los dos mutantes optimizados que muestran escisión mejorada de rosa1 y están rodeados por un círculo, y corresponden a la expresión simultánea de mutantes m13 y MO_1 (C10) o de m13 y MO_2 (E2). MO_1 y MO_2 se describen adicionalmente en la Tabla VI.
- 25 - la figura 13 ilustra la escisión de la diana rosa1. Una serie de mutantes de I-CreI que cortaban rosa1.3 se sometieron a mutagénesis aleatoria y se expresaron simultáneamente con un mutante refinado que cortaba rosa 1.4. Se ensayo la escisión con la diana rosa1. Los mutantes que muestran una escisión eficaz de rosa1 están rodeados por un círculo. En el filtro:
 - B11 corresponde al heterodímero S 19, V24, Y44, R68, S70, N75, V77 + E28, R33, R38, K40, A44, H68, Q70, A105, R107, A151, G153, E158;
 - C9 corresponde al heterodímero S19, V24, Y44, R68, S70, Q75, 77 + E28, R33, R38, K40, A44, H68, Q70, A105, R107, A151, G153, E158;
 - C11 y E8 corresponden al heterodímero V24, Y44, S68, S70, R75, 177, A105 + E28, R33, R38, K40, A44, H68, Q70, A105, R107, A151, G153, E58; y
 - E6 corresponde al heterodímero V24, Y44, S68, S70, R75, 177, G79 + E28, R33, R38, K40, A44, H68, Q70, A105, R107, A151, G153, E158.
 - H10 es un control negativo, H11 y H12 son controles positivos de diferente intensidad.
- 30 Para comparar la actividad de los heterodímeros frente a la diana rosa1 antes y después de la mejora de los mutantes que cortan la diana rosa1.3: en cada grupo, los dos puntos a la derecha son uno de los heterodímeros descritos en el ejemplo 5 y los dos puntos a la izquierda son heterodímeros con mutantes descritos en el ejemplo 6.
- 35 - la figura 14 representa la cartografía del vector pCLS 1.058.
 - la figura 15 representa la cartografía del vector pCLS1069.
 - la figura 16 ilustra la escisión de la diana rosa1 por los mutantes de I-CreI refinados. En un modelo extracromosómico en células CHO. Se muestran valores que proceden de dos experimentos de transfección. La escisión de las dianas I-CreI e I-Scel por I-CreI N75 e I-Scel en los mismos experimentos se muestran como controles positivos.
- 40 - la figura 17 representa las secuencias de la meganucleasa diana que se encuentran en el ROSA26 de ratón y la variante de I-CreI correspondiente que es capaz de escindir cada una de dichas dianas de ADN. La secuencia del ADN diana se presenta (columna 1), con su posición (columna 2). La matriz mínima de reparación para reparar la escisión en el sitio diana se indica por su primer nucleótido (inicio, columna 5) y el último nucleótido (final, columna 6). La secuencia de cada variante se define por los restos en las posiciones indicadas. Por ejemplo, la primera variante heterodimérica de la figura 17 consiste en un primer monómero que tiene K, H, S, S, Q, S, E, C, S, N e I en las posiciones 28, 30, 32, 33, 38, 40, 44, 68, 70, 75 y
- 45
50
55

77, respectivamente y un segundo monómero que tiene K, D, S, R, T, S, K, E, S, D, R en las posiciones 28, 30, 32, 33, 38, 40, 44, 68, 70, 75 y 77, respectivamente. Las posiciones se indican por referencia a la secuencia SWISSPROT P05725 (SEQ ID NO: 1); de I-Crel; I-Crel tiene K, N, S, Y, Q, S, Q, R, R, D e I, en las posiciones 28, 30, 32, 33, 38, 40, 44, 68, 70, 75 y 77 respectivamente.

- 5 - la figura 18 representa la cartografía del vector pCLS1675.
 - la figura 19 representa la cartografía del vector pCLS1761.
 - la figura 20 representa la cartografía del vector pCLS1762.
 - la figura 21 ilustra el análisis de la PCR de los eventos de activación (KI) con la matriz IRES-Hygro (pCLS1675). Eventos con la matriz IRES-Hygro (pCLS1675): los clones naturales para el locus ROSA26 y los clones que tienen una inserción aleatoria de la higromicina CDS son negativos en la PCR. Los clones que tienen un evento KI en el locus ROSA26 son positivos en la PCR. Los clones que tienen un evento KI y la inserción aleatoria son también positivos en la PCR.

Ejemplo 1: Estrategia para genomanipular meganucleasas novedosas que escinden el locus ROSA26 de ratón

La solución combinatoria descrita en Smith y col., *Nucleic Acids Res.*, 2006 e ilustrada en la figura 3, se usó para genomanipular el dominio de unión al ADN de I-Crel, y escindir una secuencia de 22 pb (no palindrómica) denominada rosa1 (Figura 5) y localizada en la posición 8304, en el exón 2 del locus ROSA26 de ratón (número de acceso CQ880114; SEQ ID NO: 3). Las meganucleasa que escinden la secuencia rosa1 podrían usarse para activar los genes en el locus ROSA26 de ratón (Figura 4). Las aplicaciones son en los siguientes campos: producción de proteínas recombinantes en células de ratón, genomanipulación de líneas de células recombinantes, por ejemplo, a objeto de cribado de fármacos, y genomanipulación de ratones transgénicos, por ejemplo, para uso como modelos animales.

La secuencia de rosa1 es parcialmente un mosaico de las dianas 10GGG_P, 5GAT_P y 5STAT_P (Figura 5) que se escinden por las meganucleasas anteriormente identificadas, obtenidas tal como se describe en las Solicitudes PCT Internacionales WO 2006/097784, WO 2006/097853 y WO 2007/049156; Arnould y col., *J. Mol. Biol.*, 2006, 355, 443-458 y Smith y col., *Nucleic Acids Res.*, Epub 27 de noviembre de 2006. De esta manera, rosa1 podría escindirse por meganucleasas que combinan las mutaciones que se encuentran en los derivados de I-Crel que escinden estas tres dianas.

Las secuencias 10GGG_P, 5GAT_P y 5STAT_P son derivados de 24 pb de C1221, una secuencia palindrómica escindida por I-Crel (Solicitudes PCT Internacionales WO 2006/097784, WO 2006/097853 y WO 2007/049156; Arnould y col., *J. Mol. Biol.*, 2006, 355, 443-458 y Smith y col., *Nucleic Acids Res.*, Epub 27 de noviembre de 2006). Sin embargo, la estructura de I-Crel unida a su ADN diana sugiere que dos pares de bases externas de estas dianas (posiciones -12 y 12) no tienen impacto sobre la unión y la escisión (Chevalier y col., *Nat. Struct. Biol.*, 2001, 8, 312-316; Chevalier B.S. y Stoddard B.L., *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, 3757-3754; Chevalier y col., *J. Mol. Biol.*, 2003, 329, 253-269), y en este estudio, solo se consideraron las posiciones -11 a 11. Consecuentemente, se definió la serie rosa1 de dianas como secuencias de 22 pb en vez de 24 pb.

Rosa 1 difiere de C1221 en un par de bases de la región central de 4 pb. De acuerdo con la estructura de la proteína I-Crel unida a su diana, no existe contacto entre los 4 pares de bases centrales (posiciones -2 a 2) y la proteína I-Crel (Chevalier y col., *Nat. Struct. Biol.*, 2001, 8, 312-316; Chevalier B.S. y Stoddard B.L., *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, 3757-3754; Chevalier y col., *J. Mol. Biol.*, 2003, 329, 253-269). De esta manera, las bases en estas posiciones no se supone que afectan la eficacia de unión. Sin embargo, podrían afectar la escisión, que es el resultado de dos muescas en el borde de esta región. De esta manera, la secuencia GTTC en -2 a 2 se sustituyó en primer lugar con la secuencia GTAC de C1221, dando como resultado una rosa1.2 diana (Figura 5).

A continuación, dos dianas palindrómicas, rosa1.3 y rosa1.4, se derivaron de rosa1.2 (Figura 5). Ya que rosa1.3 y rosa 1.4 son palindrómicas, deben escindirse mediante proteínas homodiméricas.

De esta manera, se diseñaron en primer lugar las proteínas capaces de escindir las secuencias rosa1.3 y rosa1.4, como homodímeros (ejemplos 2 y 3), y a continuación se expresaron simultáneamente para obtener los heterodímeros que escindían rosa1 (ejemplo 4). Se podrían identificar los heterodímeros que escindían las dianas rosa1.2 y rosa1. Con el fin de mejorar la actividad de escisión de la diana rosa1, los inventores han seleccionado una serie de mutantes escogidos que escindían rosa1.3 y rosa1.4 y a continuación los refinaron; los mutantes seleccionados se sometieron a mutagénesis aleatoria para formar novedosos heterodímeros que se cribaron frente a la diana rosa1 (ejemplos 5 y 6). Finalmente, se podrían identificar los heterodímeros que escindían la diana rosa1,

que muestra una elevada actividad de escisión en células de levaduras y CHO.

Ejemplo 2: Preparación de las meganucleasas que escinden rosa1.3

5 Este ejemplo muestra que los mutantes I-Crel puede cortar la secuencia de ADN diana de rosa1.3 derivada de la parte izquierda de la diana rosa1 en una forma palindrómica (figura 5).

Las secuencias diana descritas en este ejemplo son secuencias palindrómicas de 22 pb. Por tanto, se describirán solo mediante los primeros 11 nucleótidos, seguidos por el sufijo _P. Por ejemplo, rosa1.3 diana se señalará también
10 caacatgatgt_P; SEQ ID NO: 35)).

La diana rosa1.3 es similar a 5GAT_P en las posiciones ±1, ±2, ±3, ±4, ±5, ±7, ±9, ±10 y ±11, difiriendo las dos secuencias solo en las posiciones ±6 y ±8. Se teorizó que las posiciones ±6 tendrían poco efecto sobre la actividad de unión y escisión. Se obtuvieron previamente mutantes capaces de escindir 5GAT_P (caaaaacgatgt_P; SEQ ID NO:
15 32) mediante mutagénesis en I-Crel N75 en las posiciones 24, 44, 68, 70, 75 y 77, tal como se describe en Arnould y col., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458 y en las Solicitudes PCT Internacionales WO 2006/097784 y WO 2006/097853. En este ejemplo, se comprobó si los mutantes que escindían la diana 5GAT_P podrían escindir también la diana rosa1.3.

20 **1) Material y procedimientos**

El procedimiento para producir variantes de meganucleasas y los ensayos basados en la recombinación inducida por la escisión en células de mamífero o levaduras, que se usaron para cribar variantes con la especificidad alterada se describen en la Solicitud PCT Internacional WO 2004/067736; Epinat y col., Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952-
25 2962; Chames y col., Nucleic Acids Res., 2005, 33, e178, y Arnould y col., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458. Estos ensayos dieron como Resultado un gen indicador LacZ funcional que se controló mediante procedimientos normalizados.

a) Construcción del vector diana

30 La diana se clonó como sigue: el oligonucleótido que correspondía a la secuencia diana flanqueada por la secuencia de clonación Gateway se ordenó a partir de PROLIGO: 5' 5' tggcatacaagtttcaacatgatgtacatcatgttgacaatcgtctgtca 3' (SEQ ID NO: 37). El ADN diana bicatenario, generado mediante la amplificación de la PCR del oligonucleótido monocatenario, se clonó usando el protocolo del sistema Gateway (INVITROGEN) en el vector indicador de levadura
35 (pCLS1055, Figura 6). El vector indicador de levadura se transformó en la cepa FYBL2-7B de *S. cerevisiae* (*MAT a*, *ura3Δ851*, *trp1Δ63*, *leu2Δ1*, *lys2Δ202*).

b) Mutantes de I-Crel

40 Se identificaron los mutantes de I-Crel que escindían 5GAT_P en una biblioteca en la que se mutaron las posiciones 24, 44, 68, 70, 75 y 77 de I-Crel, tal como se ha descrito anteriormente en Arnould y col., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458 y Solicitudes PCT Internacionales WO 2006/097784 y WO 2006/097853. Se clonaron en el vector de ADN (pCLS0542, Figura 7) y se expresaron en la cepa FYC2-6A de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*MAT a*, *trp1Δ63*, *leu2Δ1*, *his3Δ200*).

45

c) Correspondencia de los clones que expresan la meganucleasa y cribado en levaduras:

Se llevó a cabo el cribado tal como se ha descrito anteriormente (Arnould y col., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458). Se llevó a cabo la correspondencia usando una placa de colonias (QpixII, Genetix). Se plaquearon los mutantes en
50 filtros de nylon que cubrían las placas YPD, usando una densidad de placa baja (aproximadamente 4 puntos/cm²). Se llevó a cabo un segundo procedimiento de plaqueado sobre los mismos filtros para puntear una segunda capa que consistían en diferentes cepas de levadura que contenían indicadores de cada diana. Se colocaron las membranas en medio rico en agar YPD, y se incubaron a 30°C durante una noche, para permitir la correspondencia. A continuación, se transfirieron los filtros a un medio sintético, que carecía de leucina y triptófano, con galactosa
55 (2%) como fuente de carbono, y se incubaron durante cinco días a 37°C, para seleccionar los diploides que transportaban la expresión y los vectores diana. Después de 5 día, se colocaron los filtros en medio sólido de agarosa con 0,02% de X-gal en tampón fosfato de sodio 0,5 M, pH 7,0, SDS al 0,1%, dimetil formamida al 6% (DMF), β-mercaptoetanol 7 mM, agarosa al 1%, y se incubó a 37°C, para controlar la actividad de la β-galactosidasa. Se analizaron los resultados mediante barrido y se llevó a cabo la cuantificación usando el software apropiado.

d) Secuenciación de los mutantes

Para recuperar los plásmidos que expresan los mutantes, se extrajo el ADN de levadura usando protocolos normalizados y se usó para transformar E. coli. A continuación se llevó a cabo la secuencia del ORF mutante en los plásmidos mediante MILLEGEN SA. Alternativamente se amplificaron los ORF del ADN de levadura mediante la PCR (Akada y col., Biotechniques, 2000, 28, 668-670), y se llevó a cabo la secuencia directamente en el producto de la PCR mediante MILLEGEN SA.

2) **Resultados**

Los mutantes I-Crel que escindían la diana 5GAT_P, previamente identificada en una biblioteca en la que se mutaron las posiciones 24, 44, 68, 70, 75 y 77 de I-Crel, se cribaron para la escisión frente al ADN diana de rosa1.3 (caacatgatgt_P; SEQ ID NO: 35). Se encontraron un total de 63 clones positivos, se volvieron a disponer en una placa de 96 pocillos y se validaron mediante cribado secundario (Figura 8). Entre aquellos clones positivos, se seleccionaron 22 (rodeados por un círculo en la Figura 8). Aquellos 22 clones positivos se secuenciaron. Resultaron corresponder con 18 novedosas endonucleasas diferentes que escindían la diana rosa1.3 (denominada ml a m18: SEQ ID NO: 38 a 55; Tabla II).

Tabla II: mutantes de I-Crel capaces de escindir el ADN diana de rosa1.3

Posición en la figura 8	Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:	Aminoácidos en las posiciones 24, 44, 68, 70, 75 y 77 (ex: VYRSYI significa V24, Y44, R68, S70, Y75 e I77)
A 1 y F	3 m	1 3 8	V	Y R S Y I
A 3 m	2 3	9	V Y	R S N I
A 5 y B	1 m	3 4 0	V	Y D S R R
A 9 m	4 4	1	I T	Y S Y R
A 1 1 m	5 5	4 2	V Y	R S Y Q
B 3 , D 5 y	E 6	m 6	4 3	V Y Y S Y R
B 8 m	7 4	4	V Y	Y S R A
B 9 m	8 4	5	V Y	R S N V
B 1 0 m	9 4	6	V N	Y S Y R
B 1 1 m 1 0	4 7		V N Y S Y	R + 8 2 T *
C 3 m 1	1 1	4 8	V Y	S S R V
C 8 m 1	2 1	4 9	V Y	N S R I
C 1 1 m	1 3	5 0	V	Y S S R I
D 6 m 1	4 4	5 1	V Y	R S Q I
D 9 m 1	5 5	5 2	I Y	R S N I
D 1 2 m	1 6	5 3	V	Y Y S R V
E 1 m 1	7 7	5 4	V Y	R S Y T
E 1 1 m	1 8	5 5	V	N S S R V

* 82T en m 10 es una mutación inesperada que puede ser debida a un error introducido por la reacción de la PCR antes de la secuenciación del ADN de levadura

Ejemplo 3: Preparación de meganucleasas que escinden rosa1.4

Este ejemplo muestra que los mutantes de I-Crel pueden cortar la secuencia del ADN diana de rosa1.4 derivada de la parte derecha de la diana de rosa1 en una forma palindrómica (Figura 5) todas las secuencias dianas descritas en este ejemplo son secuencias palindrómicas de 22 pb. Por tanto se describirán solo por los primeros 11 nucleótidos, seguidos por el sufijo _P. por ejemplo, rosa1.4 se denominará **tgggattatgt_P** (SEQ ID NO: 36).

La diana rosa1.4 es similar a las posiciones ±1, ±2, ±3, ±4, ±5 y ±7 de 5TAT_Pat y a 10GGG_P en las posiciones ±1, ±2, ±7, ±8, ±9 y ±10. Se teorizó que las posiciones ±6 y ±11 tendrían poco efecto sobre la actividad de unión y escisión. Se obtuvieron previamente mutantes capaces de escindir 5TAT_P mediante mutagénesis en I-Crel N75 en las posiciones 44, 68, 70, tal como se describe en Arnould y col., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458 y en las Solicitudes PCT Internacionales WO 2006/097784 y WO 2006/097853. Se obtuvieron mutantes capaces de escindir la diana 10GGG_P mediante mutagénesis en I-Crel N75 en las posiciones 28, 30, 33, 38, 40 y 70, tal como se describe en Smith y col., Nucleic Acids Res., Epub 27 de noviembre de 2006 y la Solicitud PCT Internacional WO 2007/049156.

Ambos conjuntos de proteínas se mutaron en la posición 70. Sin embargo, se teorizó que existían dos subdominios funcionales separables. Esto implica que esta posición tiene un pequeño impacto sobre la especificidad hacia las bases ± 8 a 10 de la diana

- 5 Por lo tanto, para comprobar si mutantes combinados podrían escindir la diana rosa1.4, se combinaron mutaciones en las posiciones 44, 68 y 70 de las proteínas que escindían 5TAT_P (caaaactatgt_P; SEQ ID NO: 33) con mutaciones en las posiciones 28, 30, 33, 38 y 40 de las proteínas que escindían 10GGG_P (cgggacgtcgt_P; SEQ ID NO: 31).

10 1) Material y procedimientos

Los procedimientos experimentales son como se describe en el ejemplo 2 y como sigue:

Construcción de mutantes combinatorios

- 15 Se identificaron mutantes de I-Crel que escindían 10GGG_P o 5TAT_P en Smith y col, Nucleic Acids Res. Epub 27 de noviembre de 2006; Solicitud PCT Internacional WO 2007/049156, y Arnould y col., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458; Solicitudes PCT Internacionales WO 2006/097784 y WO 2006/097853, respectivamente para las dianas 10GGG_P o 5TAT_P. con el fin de generar la secuencia de codificación derivada de I-Crel que contiene mutaciones
20 de ambas series, se llevaron a cabo reacciones de la PCR mediante solapamiento separado que amplifican el extremo 5' (posiciones de aa 1-43) o el extremo 3' (posiciones 39-167) de la secuencia de codificación de I-Crel. Para ambos extremos, 5' y 3', se llevó a cabo la reacción de amplificación usando los cebadores Gal10F 5'-gcaactttagtctgacacatacagg-3' (SEQ ID NO: 56) o Ga110R 5'-acaaccttgattggagacttgacc-3' (SEQ ID NO: 57), específicos del vector (pCLS0542, Figura 7) y los cebadores assF 5'-ctannnttgacctt-3' (SEQ ID NO: 58) o assR 5'-
25 aaaggtcaannntag-3' (SEQ ID NO: 59) en el que el código nnn es para el resto 40, específico de la secuencia de codificación de I-Crel para los aminoácido 39-43. Se combinaron los fragmentos de la PCR resultantes de la reacción de amplificación realizada con los mismos cebadores y con la misma secuencia de codificación para el resto 40. A continuación, cada combinado de fragmentos de la PCR resultante de la reacción con los cebadores Gal10F y assR o assF y Gal10R se mezcló en una relación equimolar. Finalmente, aproximadamente 25 ng de cada
30 combinado final de los dos fragmentos de la PCR solapantes y 75 ng de ADN de vector (pCLS0542) se linealizaron mediante digestión con *NcoI* y se usó *EagI* para transformar la cepa FYC2-6A de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (MAT α , trp1 Δ 63, leu Δ 1, his3 Δ 200) usando un protocolo de transformación LiAc de alta eficacia (Gietz y Woods, Methods Enzymol., 2002, 350, 87-96). Se generó una secuencia de codificación intacta que contenía ambos grupos de mutaciones mediante recombinación homóloga in vivo en levadura.

35 2) Resultados

- Se construyeron mutantes combinatorios de I-Crel asociando mutaciones en las posiciones 44, 68 y 70 con las mutaciones en 28, 30, 33, 38 y 40 en el armazón de I-Crel N75, dando como resultado una biblioteca de complejidad
40 2208. En la Tabla 3 se muestran ejemplos de mutantes combinatorios. Esta biblioteca se transformó en levadura y se cribaron 3456 clones (1,5 veces la diversidad) para la escisión frente al ADN diana de rosa1.4 (tgggattatgt_P; SEQ ID NO: 36). Se encontraron un total de 69 clones positivos y se volvieron a disponer en una placa de 96 pocillos y se validaron mediante cribado secundario (Figura 9). Entre aquellos positivos, se seleccionaron 15 clones (rodeados por un círculo en la Figura 9). Tras la secuenciación, estos 15 clones resultaron corresponder a 8
45 diferentes endonucleasas novedosas que escindían el ADN diana de rosa1.4 (SEQ ID NO: 60 a 67, Tabla III).

Tabla III: Escisión de la diana rosa1.4 por las variantes combinatorias

		Aminoácidos en las posiciones 28, 30, 33,38 y 40 (ex: ENRRR significa para E28, N30, R33, R38 y R40)							
		ENRRR	ENRRK	KNHAS	KNHSS	KNHQS	KNRAT	RNRDR	
Aminoácidos en las posiciones 44, 68 y 70 (ex: AHQ significa para A44, H68 y Q70)	A	H	Q	+	+				
	A	R	N	+					
	A	R	S		+				
	V	R	A		+				
	A	R	G		+				
	A	S	Q	+					
	A	T	N		+				
	R	A	G						
	A	N	N						
	A	Q	H						
	A	R	H						
	A	R	L						
	A	R	T						
	N	R	N						

Solo se muestran 105 de las 2208 combinaciones

+ indica que se encontró un mutante combinatorio funcional entre los positivos secuenciados

Ejemplo 4: Preparación de meganucleasas que escinden rosa1

5

Se identificaron los mutantes de I-CreI capaces de escindir cada una de las dianas palindrómicas derivadas de rosa1 (rosa1.3 y rosa1.4) en los ejemplos 2 y 3. Parejas de dichos mutantes (una que cortaba rosa1.3 y una que cortaba rosa1.4) se expresaron simultáneamente en levaduras. Tras la expresión simultánea, deben existir tres especies moleculares activas, dos homodímeros, y un heterodímero. Se ensayó si los heterodímeros que debían formarse cortaban los ADN dianas no palindrómicos de rosa1 y rosa1.2

10

1) Material y procedimientos

a) Clonación de mutantes en un vector resistente a la kanamicina

15

Para expresar simultáneamente dos mutantes de I-CreI en levaduras, se subclonaron los mutantes que cortaban la secuencia de rosa1.4 en un vector de expresión en levadura marcado con un gen de resistencia a la kanamicina (pCLS1107, Figura 10). Se amplificaron los mutantes mediante la reacción de la PCR usando cebadores comunes para pCLS0542 y pCLS1107: Gal10F 5'-gcaacttttagtgctgacacatacagg-3' (SEQ ID NO: 56) y Gal10R 5'-acaacctgattggagactgacc-3' (SEQ ID NO: 57). Aproximadamente 25 ng de un fragmento de la PCR y 25 ng de un ADN de vector (pCLS1107) linealizados mediante digestión con *DraIII* y *NgoMIV* se usaron para transformar la cepa FYC2-6A de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*MAT α* , *trp1 Δ 63*, *leu2 Δ 1*, *his3 Δ 200*) usando un protocolo de transformación LiAc de alta eficacia. Se generó una secuencia de codificación intacta para el mutante de I-CreI mediante recombinación homóloga *in vivo* en levadura. Cada cepa de levadura que contenía un mutante que cortaba la diana rosa1.4 se subclonó en el vector pCLS1107 que se correspondió con la levadura que expresaba la diana rosa1.4 para validar ésta. Para recuperar el mutante que expresaba los plásmidos, se extrajo el AD de levadura usando protocolos normalizados y se usó para transformar *E. coli* y preparar el ADN de *E. coli*.

20

25

b) Expresión simultánea de mutantes

30

La cepa de levadura que expresaba un mutante que cortaba la diana rosa1.3 en el vector de expresión pCLS0542 se transformó con ADN que codificaba un mutante que cortaba la diana rosa1.4 en el vector de expresión pCLS 1107. Se seleccionaron los transformantes en medio -L Glu + G418.

35

c) Correspondencia de meganucleasas que expresan simultáneamente clones y cribado en levaduras

Se llevó a cabo la correspondencia usando una placa de colonias (QpixII, Genetix). Se plaquearon los mutantes en filtros de nylon que cubrían placas de YPD, usando una densidad de plaqueo baja (aproximadamente 4 puntos/cm²).

Se llevó a cabo un segundo procedimiento de plaqueo sobre los mismos filtros para puntear una segunda capa que consistía en diferentes cepas de levaduras que contenían el indicador para cada diana. Se colocaron las membranas sobre medio rico en agar sólido YPD, y se incubaron a 30°C durante una noche, para permitir la correspondencia. A continuación, se transfirieron los filtros a medio sintético, que carecía de leucina y triptófano, añadiendo G418, con galactosa (1%) como fuente de carbono, y se incubaron durante cinco días a 37°C, para seleccionar los diploides que transportaban la expresión y los vectores diana. Después de 5 días, se colocaron los filtros sobre medio sólido de agarosa con 0,02% de X-Gal en tampón fosfato de sodio 0,5 M, pH 7,0, SDS al 0,1%, dimetil formamida al 6% (DMF), β-mercaptoetanol 7 mM, agarosa al 1%, y se incubaron a 37°C, para controlar la actividad de la β-galactosidasa. Se analizaron los resultados mediante cribado y se llevó a cabo la cuantificación usando el software apropiado.

Resultados

La expresión simultánea de los mutantes que escindían la diana rosa1.3 (ml a m18 descrita en la Tabla II) y de los ocho mutantes que escindían la diana rosa 1.4 (descrita en la Tabla III) dio como resultado una expresión eficaz de la diana rosa1.2 en todos los casos (se muestran los ejemplos de criba en la Figura 11A). En la Tabla IV se resumen todas las combinaciones. La mayor parte de esta combinaciones son también capaces de cortar la diana rosa1 natural que difiere de la de la secuencia rosa1.2 exactamente en 1 pb en la posición +1 (Figura 5). Tal como se muestra en la Figura 11b, la señal observada en la diana rosa1 natural es débil en comparación con la observada en la diana rosa1.2. En la Tabla V se presentan las combinaciones que escinden el ADN diana de rosa1.

Tabla IV: Combinaciones que dan como resultado una escisión de la diana rosa 1.2

			Mutantes que cortan los aminoácidos de rosa1.4 en las posiciones 28, 30, 33, 38, 40 / 44, 68 y 70 (ex: ENRRR / AHQ significa para E28, N30, R33, R38, R40 / A44, H68 y Q70)									
			ENRRR / AHQ	ENRRR / ARN	ENRRR / ASQ	ENRRK / AHQ	ENRRK / ARS	ENRRK / VRA	ENRRK / ARG	ENRRK / ATN		
Mutantes que cortan los aminoácidos de rosa1.3 en las posiciones 24, 68, 70, 75 y 77 (ex: VYRCYI significa para V24, Y44, R68, S70, Y75 e I77)	m 1	V Y R S	Y I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 2	V Y R S	N I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 3	V Y D S	R R	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 4	i T Y S	Y R	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 5	V Y R S	Y Q	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 6	V Y Y S	Y R	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 7	V Y Y S	R A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 8	V Y R S	N V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 9	V N Y S	Y R	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m10	VNYSYR + 82T		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 1 1	V Y S	R V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 1 2	V Y N	R I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 1 3	V Y S	R I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 1 4	V Y R	S Q I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 1 5	I Y R	S N I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 1 6	V Y Y	S R V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 1 7	V Y R	S Y T	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	m 1 8	V N S	S R V	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ indica que el mutante heterodimérico escinde la diana rosa1.2

Tabla V: Combinaciones que dan como resultado la escisión de la diana rosa1

			Mutantes que cortan los aminoácidos de rosa1.4 en las posiciones 28, 30, 33, 38, 40 / 44, 68 y 70 (ex: ENRRR / AHQ significa para E28, N30, R33, R38, R40 / A44, H68 y Q70)							
			ENRRR / AHQ	ENRRR / ARN	ENRRR / ASQ	ENRRK / AHQ	ENRRK / ARS	ENRRK / VRA	ENRRK / ARG	ENRRK / ATN
Mutantes que cortan los aminoácidos de rosa1.3 en las posiciones 24, 68, 70, 75 y 77 (ex: VYRSYI significa para V24, Y44, R68, S70, Y75 e I77)	m	1	V Y	R S	Y I					
	m	2	V Y R	S N I		+	+	+	+	+
	m	3	V Y	D S	R R					
	m	4	V T	Y S	Y R					
	m	5	V Y	R S	Y Q					
	m	6	V Y Y	S Y R		+	+	+	+	+
	m	7	V Y	Y S	R A					
	m	8	V Y R	S N V		+	+	+	+	+
	m	9	V N	Y S	Y R					
	m	10	VNYSYR + 82T							
	m	1 1	V Y S	S R V		+	+	+	+	+
	m	1 2	V Y N	S R I		+	+	+	+	+
	m	1 3	V Y S	S R I		+	+	+	+	+
	m	1 4	V Y R	S Q I		+	+	+	+	+
	m	1 5	V I Y	R S N I						
m	1 6	V Y Y	S R V		+	+	+	+	+	
m	1 7	V Y R	S Y T		+	+	+	+	+	
m	1 8	V N	S S R	V						

+ indica que el mutante heterodimérico escinde la diana rosa1.2

5 Ejemplo 5: Refinamiento de las meganucleasas que escinden rosa1 mediante mutagénesis aleatoria de las proteínas que escinden rosa1.4 y un ensamblaje con las proteínas que escinden rosa1.3

Se identificaron mutantes de I-Crel capaces de escindir las dianas rosa1.2 y rosa1 no palindrómicas mediante el ensamblaje de mutantes que escindían las dianas rosa1.3 y rosa1.4 palindrómicas Sin embargo, las combinaciones fueron capaces de escindir eficazmente rosa1.2 pero de escindir débilmente rosa1, que difiere de rosa1.2 solo en 1 pb en la posición 1. La señal observada en rosa1 no es suficiente.

Por tanto, se sometieron a mutagénesis las combinaciones de proteínas que escindían rosa1, y se cribaron los mutantes que escindían eficazmente rosa1. De acuerdo con la estructura de la proteína I-Crel unida a su diana, no existe contacto entre los 4 pares de bases centrales (posiciones -2 a 2) y la proteína I-Crel (Chevalier y col., Nat. Struct. Biol., 2001, 8, 312-316; Chevalier B.S. y Stoddard B.L., Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3754; Chevalier y col., J. Mol. Biol., 2003, 329, 253-269). De esta manera, es difícil seleccionar racionalmente un conjunto de posiciones para someter a mutagénesis, y se llevó a cabo la mutagénesis en la parte C terminal de la proteína (83 últimos aminoácidos) o en la proteína completa. La mutagénesis aleatoria da como resultado bibliotecas de elevada complejidad, y la complejidad de las bibliotecas variante que se van a ensayar se limitaron sometiendo a mutagénesis solo uno de los dos componentes de los heterodímeros que escindían rosa1.

De esta manera, se sometieron a mutagénesis las proteínas que escindían rosa1.4, y se ensayó si estas podrían escindir eficazmente rosa1 cuando se expresaban simultáneamente con proteínas que escindían rosa1.3.

1) Material y procedimientos

a) Mutagénesis aleatoria:

Se crearon bibliotecas por mutagénesis aleatoria sobre combinados de mutantes seleccionados, mediante la PCR usando Mn²⁺ o derivados de dNTP como 8-oxo-dGTP y dPTP en un procedimiento de PCR en dos etapas tal como se describe en el protocolo de JENA BIOSCIENCE GmbH en el kit de mutagénesis de dNTP de JBS. Para la mutagénesis aleatoria sobre la proteína completa, se usaron los cebadores: preATGCreFor (5'-gcataaactactactctatagacacgcaaacacaatacacagggcctgccacc-3'; SEQ ID NO: 68) e ICrelpostRev (5'-

ggctcgaggagctcgtctagaggatcgctcgagttatcagtcggccgc -3'; SEQ ID NO: 69). Para la mutagénesis aleatoria sobre la parte C terminal de la proteína, se usaron los cebadores: AA78a83For (5'-ttaagcgaaatcaagccg-3'; SEQ ID NO: 70) e ICrelpostRev con derivados de dNTP; el resto de la proteína se amplificó con una polimerasa taq de alta fidelidad y sin derivados de dNTP usando los cebadores preATGCreFor y AA78a83Rev (5'-cggcttgatttcgcttaa-3'; SEQ ID NO: 5 71).

Se amplificaron combinados de mutantes mediante la reacción de la PCR usando estos cebadores comunes para pCLS0542 (Figura 7) y pCLS1107 (Figura 10). Aproximadamente 75 ng de un fragmento de la PCR y 75 ng de ADN de vector (pCLS1107) linealizados mediante digestión con *DrallI* y *NgoMIV* se usaron para transformar la cepa FYC2-6A de *Saccharomyces cerevisiae* (MAT α , *trp1* Δ 63, *leu2* Δ 1, *his3* Δ 200) usando un protocolo de transformación LiAc de alta eficacia. Se generó una biblioteca de secuencias de codificación intactas para el mutante I-Crel mediante recombinación homóloga *in vivo* en levadura. Se verificaron los clones positivos resultantes mediante secuenciación tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

15 b) Clonación de mutantes en vector de expresión de leucina en la cepa de levadura que contiene la diana rosa1:

La cepa FYBL2-7B de levadura (MAT a, *ura3* Δ 851, *trp1* Δ 63, *leu2* Δ 1, *lys2* Δ 202) que contenía la diana rosa1 en el vector indicador de levadura (pCLS1055, Figura 6) se transformó con mutantes que cortaban la diana rosa1.3, en el vector pCLS0542, marcado con el gen *LEU2*, usando un protocolo de transformación LiAc de alta eficacia. Las cepas de levadura resultantes se usaron como dianas para los ensayos de correspondencia tal como se describe en el ejemplo 4.

2) **Resultados**

25 Cuatro mutantes que escindían rosa1.4 (ERRR / AHQ, ERRR / ARN, ERRK / AHQ and ERRK / VRA de acuerdo con la Tabla V) se combinaron, se sometieron a mutagénesis aleatoria sobre todas las proteínas o sobre la parte C terminal de las proteínas y se transformaron en levaduras. A continuación se hicieron corresponder 4464 clones transformados con una cepa de levadura que (i) contiene la diana rosa1 en un plásmido indicador (ii) expresa una variante que escinde la diana rosa1.3, seleccionada entre las descritas en el ejemplo 2. Se usaron tres de dichas cepas, que expresaban el mutante V24 Y44 S68 S70 R75 I77 de I-Crel (o VYSSRI), el mutante V24 Y44 R68 S70 Q75 I77 de I-Crel (o VYRSQI) o el mutante V24 Y44 R68 S70 Y75 T77 de I-Crel (o VYRSYT) (véase la Tabla II). Se encontró que dos clones estimulaban una mejor escisión de la diana rosa1 cuando se hacían corresponder con dicha cepa de levadura en comparación con los mutantes antes de la mutagénesis con la misma cepa de levadura. En conclusión, se identificaron dos proteínas capaces de escindir eficazmente rosa1 cuando formaban heterodímeros con VYSSRI, VYRSQI o VYRSYT (Tabla VI) (Figura 12).

Tabla VI: Combinaciones de mutantes funcionales que muestran una fuerte actividad de escisión para el ADN diana de rosa1

		Mutante de rosa1.4 optimizado* (SEQ ID NO: 72, 73)
Mutante que cortan los aminoácidos de rosa1.3 en las posiciones 24, 44, 68, 70, 75 y 77 (ex: VYRSYI significa para V24, Y44, R68, S70, Y75 e I77)	VYSSRI (m13)	MO_1: E28 R33 R38 R40 A44 H68 Q70 N75 A105 R107 MO_2: E28 R33 R38 K40 A44 H68 Q70 N75 A105 R107 A151 G153 E158
	VYRSQI (m14)	MO_1: E28 R33 R38 R40 A44 H68 Q70 N75 A105 R107 MO_2: E28 R33 R38 K40 A44 H68 Q70 N75 A105 R107 A151 G153 E158
	VYRSYT (m17)	MO_1: E28 R33 R38 R40 A44 H68 Q70 N75 A105 R107 MO_2: E28 R33 R38 K40 A44 H68 Q70 N75 A105 R107 A151 G153 E158

* Las mutaciones resultantes de la mutagénesis aleatoria están en negrita

40

Ejemplo 6: Refinamiento de las meganucleasas que escinden rosa1 mediante mutagénesis aleatoria de las proteínas que escinden rosa1.3 y ensamblaje con las proteínas refinadas que escinden rosa1.4

Se identificaron los mutantes de I-Crel capaces de escindir la diana rosa1 mediante ensamblaje de los mutantes que escindía rosa1.3 y de los mutantes refinados que escindían rosa1.4. Para aumentar la actividad de las meganucleasas, se sometió a mutagénesis el segundo componente de los heterodímeros que escindían rosa1. En

45

este ejemplo, los mutantes que escindían rosa1.3 se sometieron a mutagénesis, seguido por el cribado de las variantes más eficaces que escindían rosa1 en combinación con los mutantes refinados que escindían rosa1.4 identificados en el ejemplo 5.

5 1) Material y procedimientos

a) Mutagénesis aleatoria:

- Se crearon bibliotecas por mutagénesis aleatoria sobre combinados de mutantes seleccionados, mediante la PCR usando Mn^{2+} o derivados de dNTP como 8-oxo-dGTP y dPTP en un procedimiento de PCR en dos etapas tal como se describe en el protocolo de JENA BIOSCIENCE GmbH en el kit de mutagénesis de dNTP de JBS. Para la mutagénesis aleatoria sobre la proteína completa, se usaron los cebadores: preATGCreFor (5'-gcataaattactatacttctatagacagcgaacacaaatacacagcgcccttgccacc-3'; SEQ ID NO: 68) e ICrelpostRev (5'-ggctcgaggagctcgtctagaggatcgctcgagttatcagtcggccgc -3'; SEQ ID NO: 69). Para la mutagénesis aleatoria sobre la parte C terminal de la proteína, se usaron los cebadores: AA78a83For (5'-ttaagcgaaatcaagccg-3'; SEQ ID NO: 70) e ICrelpostRev con derivados de dNTP; el resto de la proteína se amplificó con una polimerasa taq de alta fidelidad y sin derivados de dNTP usando los cebadores preATGCreFor y AA78a83Rev (5'-cggcttgatttcgcttaa-3'; SEQ ID NO: 71).
- Se amplificaron combinados de mutantes mediante la reacción de la PCR usando estos cebadores comunes para pCLS0542 (Figura 7) y pCLS1107 (Figura 10). Aproximadamente 75 ng de un fragmento de la PCR y 75 ng de ADN de vector (pCLS0542) linealizados mediante digestión con *NcoI* y *EagI* se usaron para transformar la cepa FYC2-6A de *Saccharomyces cerevisiae* (MAT α , *trp1* Δ 63, *leu2* Δ 1, *his3* Δ 200) usando un protocolo de transformación LiAc de alta eficacia. Se generó una biblioteca de secuencias de codificación intactas para el mutante I-Crel mediante recombinación homóloga *in vivo* en levadura. Se verificaron los clones positivos resultantes mediante secuenciación tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

b) Clonación de mutantes en vector de expresión de kanamicina en la cepa de levadura que contiene la diana rosa1

- La cepa de levadura FYBL2-7B (MAT α , *ursa3* Δ 851, *trp1* Δ 63, *leu2* Δ 1, *lys2* Δ 202) que contiene la diana rosa1 en el vector indicador de levadura (pCLS1055, Figura 6) se transformó con los mutantes refinados MO_1 y MO_2, que cortaban la diana rosa1.4, en el vector pCLS1107, usando un protocolo de transformación LiAc de alta eficacia. Se usaron levaduras dirigidas por mutantes como dianas para los ensayos de correspondencia tal como se describe en el ejemplo 4.

2) Resultados

- Dos combinados de cuatro mutantes que escindían rosa1.3 (combinado 1: VYRSNI, VYYSYR, VYRSNV y VYNSRI y combinado 2: VYYSYR, VYSSRI, VYRSQI y VYRSYT de acuerdo con la Tabla V) se sometieron a mutagénesis aleatoria sobre todas las proteínas en la parte C terminal de las proteínas y se transformaron en levaduras. A continuación se hicieron corresponder 8928 clones transformados con una cepa de levadura que (i) contiene la diana rosa1 en un plásmido indicador (ii) expresa una variante que escinde la diana rosa1.4. Dos de dichas cepas se usaron para expresar tanto el mutante E28 R33 R38 R40 A44 H68 Q70 N75 A105 R107 de I-Crel (o MO_1), como el mutante E28 R33 R38 K40 A44 H68 Q70 N75 A105 R107 A151 G153 E158 de I-Crel (o MO_2). Se encontró que cinco clones estimulaban una mejor escisión de la diana rosa1 cuando se hacían corresponder con dicha cepa de levadura en comparación con los mutantes antes de la mutagénesis con la misma cepa de levadura (Figura 13). Tras la secuenciación, resultan corresponder con cuatro proteínas. En conclusión, se identificaron cuatro proteínas capaces de escindir eficazmente rosa1 cuando forman heterodímeros con MO_1 o MO_2, (Tabla VII)

Tabla VII: Combinaciones de mutantes funcionales que muestran una fuerte actividad de escisión para el ADN diana de rosa 1.

		Mutante rosa1.3 optimizado (SEQ ID NO: 74 a 77)
Mutante de rosa1.4 optimizado	MO_1 E28 R33 R38 R40 A44 H68 Q70 N75 A105 R107	mO_1: S19 V24 Y44 R68 S70 N75 V77 mO_2: S19 V24 Y44 R68 S70 Q75 I77 mO_3: V24 Y44 S68 S70 R75 I77 A105 mO_4: V24 Y44 S68 S70 R75 I77 G79
	MO_2 E28 R33 R38 K40 A44 H68 Q70 N75 A105 R107 A151 G153 E158	mO_1: S19 V24 Y44 R68 S70 N75 V77 mO_2: S19 V24 Y44 R68 S70 Q75 I77 mO_3: V24 Y44 S68 S70 R75 I77 A105 mO_4: V24 Y44 S68 S70 R75 I77 G79

* las mutaciones resultantes de la mutagénesis aleatoria están en negrita

5

Ejemplo 7: Validación de la escisión de la diana rosa1 en el modelo extracromosómico en células CHO

En el ejemplo 6, se identificaron los mutantes refinados de I-Cre1 capaces de escindir eficazmente la diana rosa1 en levaduras. En este ejemplo, la capacidad de dos combinaciones de mutantes de cortar la diana rosa1 en células CHO se ensayó usando un ensayo extracromosómico en células de mamíferos.

10

1) Materiales y procedimientos

a) Clonación de la diana rosa1 en un vector para la criba de CHO

15

La diana se clonó como sigue: el oligonucleótido que correspondía a la secuencia diana flanqueada por la secuencia de clonación Gateway se ordenó a partir de Proligo: 5' tggcatacaagtttcaacatgatgtacatcatgttgacaatcgctctgtca 3' (SEQ ID NO: 37). El ADN diana bicatenario, generado mediante la amplificación de la PCR del oligonucleótido monocatenario, se clonó usando el protocolo del sistema Gateway (INVITROGEN) en el vector indicador de CHO (pCLS1058, Figura 14).

20

b) Reclonación de las meganucleasas

Se amplificaron los ORF de los mutantes I-Cre1 N75, I-Sce1 y I-Cre1 identificado en el ejemplo 6 mediante la PCR y se secuenciaron (MILLEGEN). A continuación, se volvieron a clonar los ORF usando el protocolo del sistema Gateway (INVITROGEN). Se amplificaron los ORF mediante la PCR del ADN de levadura usando los cebadores B1F: 5' ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcgaaggagatagaacatggccaatacaaaatacaaaagagttcc 3' (SEQ ID NO: 78) and B2R: 5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggttagtcggccgcccggggaggatttcttctctcgc 3' (SEQ ID NO: 79) de Proligo. Los productos de la PCR se clonaron en el vector de expresión pcDNA6.2 gateway de CHO de Invitrogen (pCLS1069, Figura 15). Se verificaron los clones resultantes mediante la secuenciación tal como se describe en el ejemplo 2.

30

c) Ensayo extracromosómico en células de mamíferos

Se transfectaron células CHO con reactivo de transfección Polyfect de acuerdo con el protocolo del suministrados (QIAGEN). 72 horas después de la transfección, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 150 µl de tampón de lisis/revelado para el ensayo de la β-galactosidasa líquida (normalmente 1 litro de tampón contiene 100 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X100 al 0,1 %, 0,1 mg/ml de BSA, inhibidores de la proteasa), 10 ml de tampón Mg 100X (MgCl₂ 100 mM, β-mercaptoetanol al 35 %), 110 ml de una disolución de 8 mg/ml de ONPG y 780 ml de fosfato de sodio 0,1 M pH 7,5) Tras la incubación a 37°C, se midió la densidad óptica a 420 nm. El proceso completo se llevó a cabo en una plataforma BioCel® automatizada (VELOCITY11).

35

2) Resultados

Los resultados de los dos experimentos presentados en la figura 16, muestran que las dos combinaciones de mutantes de I-Cre1 (mO_2 / MO_1 y mO_2 / MO_2) son capaces de cortar la diana rosa1 en células CHO con una actividad similar a la actividad de I-Cre1 N75 frente al I-Cre1 diana (tcaaaacgtcgtgagacagttgg, SEQ ID NO: 80) o el I-

45

Scel frente al I-Scel diana (tagggataacagggtaat, SEQ ID NO: 81).

Ejemplo 8: Genomanipulación del genoma en el locus ROSA26 en células de ratón

5 Se han identificado mutantes refinados de I-Crel capaces de escindir eficazmente la diana rosa1 en levadura y en un ensayo extracromosómico en células de mamíferos (células CHO K1) en los ejemplo 6 y 7. Se ensayó en este ejemplo la capacidad de una combinación de dos mutantes refinados de I-Crel para inducir la recombinación homóloga en el locus ROSA26 en células L de ratón.

10 1) Materiales y procedimientos

a) Matrices activadas (KI)

Se construyeron dos matrices activadas que comprendían la secuencia d codificación del gen de resistencia a la higromicina (CDS) clonadas entre dos brazos de homología de ROSA26 de ratón, HG ROSA26 de 6283 a 8317 y HD ROSA26 de 8313 a 10319 en la secuencia CQ880114 (que corresponde a la SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias) Los plásmidos resultantes son pCLS1679 y pCLS1675 (cartografía del plásmido en la figura 18). En pCLS1679, la secuencia de codificación del gen de resistencia a la higromicina (*hygro* CDS) operativamente enlazada con SV40 polyA se clonó en el vector pBR322 (PROMEGA) entre HG ROSA26 y HD ROSA26. pCLS 1675 difiere de pCLS1679 por la inserción de un sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES; SEQ ID NO: 139) exactamente en la dirección 5' del *hygro* CDS.

b) Clonación de meganucleasas

25 Los ORF de los mutantes refinados de I-Crel mO_2 y MO_1 se describen en el ejemplo 6 (Tabla VII). Se llevó a cabo la expresión de los mutantes en dos vectores de expresión con el control del promotor del factor 1 alfa de alargamiento humano (EF1α) o del promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) (pCLS1069, figura 15). Se clonaron los mutantes en pCLS1069 con el control del promotor CMV tal como se describe en el ejemplo 7. Se verificaron los plásmidos resultantes mediante secuenciación (MILLEGEN). En pCLS1761 (figura 19) y pCLS1762 (figura 20), los mutantes mO_2 y MO_1 de I-Crel, respectivamente, están bajo el control del promotor EF1α.

c) Experimento de activación en células L de ratón

35 Se cultivaron células L de ratón (ATCC nº CRL-2648) en medio DMEM completo (DMEM Glutamax, GIBCO) suplementado con suero de ternera fetal al 10%, penicilina, estreptomycin y fungizona. Se transfectaron las células usando reactivo de lipofectamina (INVITROGEN) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante. Dos días después de la transfección, se llevó a cabo la selección usando higromicina a 0,6 mg/ml en medio completo. Tras dos semanas de selección, se repicaron los clones resistentes usando un robot ClonePix (GENETIX). Se amplificaron los clones una semana en placas de 96 pocillo en medio completo suplementado con higromicina a 40 0,6 mg/ml. Se extrajo el ADN genómico de los clones resistentes cultivados en placas de 96 pocillo usando el kit ZR96 (ZYMO RESEARCH).

c) Análisis mediante la PCR de eventos activados

45 Se detectaron eventos activados mediante el análisis de la PCR en ADN genómico usando el par de cebadores KI_GHG_S5 (5' tagtatacagaaactgtgcatcgc 3'; SEQ ID NO: 137) y HygSeqRev (5'cgctctgctgctccatacaag 3'; SEQ ID NO: 138), localizados respectivamente en la secuencia de ROSA26 de ratón en la dirección 5' del brazo de homología HG ROSA26 y en la higromicina CDS, para obtener una amplificación mediante la PCR específica de KI (Figura 21).

50

2) Resultados

Las meganucleasas de ROSA26 usadas en este ejemplo son mO_2 y MO_1 descritas en el ejemplo 6 (Tabla VII) y se clonaron en dos vectores de expresión, bajo el control del promotor del factor 1 alfa de alargamiento humano (EF1α) (pCLS1761 y pCLS1762) o del promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) (pCLS1069, figura 55 15). Se transfectaron simultáneamente las células L de ratón con tres vectores: dos plásmidos que expresaban las meganucleasas mO_2 and MO_1 de ROSA26 y la matriz KI. Se clonaron las meganucleasas en pCLS1761 and pCLS1762, el promotor EF1α respectivamente y la matriz KI fue pCLS1675.

Se transfectaron simultáneamente un total de 2600000 células L de ratón con 2 µg del vector de matriz KI y 5 µg o 10 µg de cada vector de expresión de la meganucleasa. Como control de la frecuencia KI espontánea, se transfectó el mismo número de células con 2 µg del vector de matriz KI solo se determinó la eficacia de la transfección (40%) mediante el análisis FACS usando un marcador fluorescente que expresaba el plásmido. Se determinó la frecuencia de los clones resistentes contando el número total de clones resistentes a higromicina y se corrigió mediante la eficacia de la transfección. Se obtuvieron 2605, 1197 y 1902 clones resistentes a la higromicina, respectivamente (Tabla VIII). Se repicaron 92 0 184 clones por condición y se analizaron mediante la PCR tal como se describe en materiales y procedimientos. En la Tabla VIII se presentan los resultados.

10 **Tabla VIII:** Resultado de la PCR y frecuencia de los eventos KI en el locus ROSA26 en células L de ratón

Vectores transfectados	Número total de clones Hygro ^R	Frecuencia corregida de Hygro ^R	Número de clones positivos / Hygro ^R repicados mediante la PCR	Frecuencia de eventos KI
2 µg de pCLS1675 5 µg de pCLS1761 5 µg de pCLS1762	2 6 0 5 2	5×10^{-3}	18/92	$4,9 \times 10^{-4}$
2 µg de pCLS1675 10 µg de pCLS1761 10 µg de pCLS1762	1197	1.1×10^{-3}	28/92	3.5×10^{-4}
2 µg de pCLS1675	1902	$1,8 \times 10^{-3}$	0 / 1 8	4 0

Transfección simultánea de meganucleasas de ROSA26 y la recombinación homóloga inducida por la matriz KI en el locus ROSA26 de ratón en células L a una frecuencia máxima de $4,9 \times 10^{-4}$. No se observó recombinación homóloga espontánea con la transfección de la matriz KI solo. Este ejemplo ilustra la capacidad de las meganucleasas de ROSA26 de inducir la recombinación homóloga en el locus ROSA26 de ratón en células L de ratón.

Ejemplo 9: Meganucleasas derivadas de mO_2 y MO_1

Se genomanipularon construcciones de meganucleasas a partir de mO_2 (SEQ ID NO: 75) y MO_1 (SEQ ID NO: 72) usando técnicas convencionales de biología molecular y ADN recombinante, que se explican completamente en Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Biblioteca del Congreso, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, (Sambrook y col, 2001, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

25 Se insertó una NLS (KKKRK; SEQ ID NO: 134) entre el primer (M₁) y el segundo aminoácidos de MO_1 y mO_2; las variantes resultantes son SEQ ID NO: 140 y 141, respectivamente.

Se insertó una etiqueta (TagHA; YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 135) entre el primer (M₁) y el tercer aminoácido (N₃) de mO_2; la variante resultante es SEQ ID NO: 142.

30 Se insertaron una etiqueta (STag; KETAAAKFERQHMDs; SEQ ID NO: 136) entre el primer (M₁) y el segundo (A₂) aminoácidos de MO_1; la variante resultante es SEQ ID NO: 143

Se insertaron una etiqueta (TagHA; YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 135) y una NLS (KKKRK; SEQ ID NO: 134) entre el primer (M₁) y el segundo aminoácido (A₂) de mO_2; la variante resultante es SEQ ID NO: 144.

Se insertaron una etiqueta (STag; KETAAAKFERQHMDs; SEQ ID NO: 136) y una NLS (KKKRK; SEQ ID NO: 134) entre el primer (M₁) y el segundo (A₂) aminoácidos de MO_1; la variante resultante es SEQ ID NO: 145.

40 Se construyó una meganucleasa monocatenaria que comprendía un monómero MO_1 (posiciones 1 a 166 de la SEQ ID NO: 72) separado de un monómero mO_2 (posiciones 3 a 164 de SEQ ID NO: 75) por un enlazante (GGSDKYNQALSKYNQALSKYNQALSGGGGS; SEQ ID NO: 149); la meganucleasa monocatenaria resultante es SEQ ID NO: 146.

45 Se genomanipuló un heterodímero obligado derivado de mO_2/MO_1 introduciendo las mutaciones E8K y E61 R en un monómero mO_2 y las mutaciones K7E y K96E en un monómero MO_1; el heterodímero resultante consiste en la SEQ ID NO: 147 y la SEQ ID NO: 148.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CELLECTIS

GOUBLE, Agnès

5 <120> Variantes de meganucleasa que escinden una secuencia de ADN diana del locus ROSA26 de ratón y usos de las mismas

<130> 1546PCT17

<160> 149

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1

<211> 163

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 1

15

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1           5           10
Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20           25           30
Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Ala Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35           40           45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50           55           60
Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65           70           75
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85           90           95
Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Trp Arg Leu
100          105          110
Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115          120          125
Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130          135          140
Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145          150          155          160

Ser Ser Pro
    
```

<210> 1

<211> 24

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

ES 2 380 233 T3

<220>

<223> ADN diana de C1221

<400> 2

tcaaaaacgtc gtacgacggt ttga

24

5

<210> 3

<211> 13139

<212> ADN

<213> Mus musculus

10

<400> 3

```

aagcttctca cgtagcaacc agagctccag agccagcagc tgctgccgcc ttgtatactc      60
actcctgtga tccaacacag gagcaacctt ttctttacc cccccctact tcttaacaca      120
cttttttttg gggggggggg ggaacaagt gctccatgct ggaaggattg gaactatgct      180
tttagaaagg aacaatccta aggtcacttt taaattgagg tctttgattt gaaaatcaac      240
aaataccaaa ttccaaatat tcgttttaat taaaccagca atgtggatat aagcattaag      300
ttttagtttt aaaaggtca attttccaaa cattcagcaa tcatatttaa atttacagct      360
aggaacaaga gccttgggtc atgtcctacc aaagaacata actcaatatt ctacacatga      420
caatctgaat aaccttaag cctctaatac cataacaggc cacaattttt ggacagagaa      480
ctaatgatcc tcctgagaaa actggaagaa atccagggaa aagaaattcc tgtgtcctcc      540
aaactcagaa atctctaatt atgtcagtat tctctgcttt agtcctaggt cagattgcac      600
acatctaaaa taacctctta aagttttcct cctagcgacc taaaccatta ttaatataca      660
attaaccatc aaaacacttt cctctcaata tgctgcacac aaacctcctc ctggaacctc      720
ctccatctgg atcctcccca atcaaaagta taggtattta acatataagc aaggaagtaa      780
tgtaaacatg accttgggtc caaatatgtc atctaaaaac aatttagtca aggtatggag      840
gaaattcgag aacctgaatc tttttaagta ttttgagcac aggaacaatt ggcaaaagga      900
atccagggat agacaaaacc cagagcccag agctctgggc gaaaaatgag ttgctggtga      960
agacgttaca caagtaacat gagaaagcag aaaatgcagg tcatccacgc acccctgacc     1020
caggccagca gggcgggctg cagcatcagt acacaggaga aagatcctta ttcctaagaa     1080
tgagaaaggc aaaggcgccc gatagaataa attagcatag aaggggcttt cccaggagtt     1140
aaaactttcc ttctgagcga ttacctacta aaaccagggc ttttgccac taccatttac     1200
ctaggatcct ggcttgacag gattcatagg ggcataatccc tccccctctt ctttagagtc     1260
gttcttaaaa gatcgctctc cacgccttag gcagggaaaa cgacaaaatc tggctcaatt     1320
ccaggctaga accctacaaa ttcaacaggg atatcgcaag gatactgggg catacgccac     1380
agggagtcca agaattgtgag gtgggggtgg cgaaggtaat gtctttggtg tgggaaaagc     1440
agcagccatc tgagatagga actggaaaac cagaggagag gcgttcagga agattatgga     1500
ggggaggact gggccccac gagcgaccag agttgtcaca aggccgcaag aacaggggag     1560
gtggggggct cagggacaga aaaaaagta tgtgtatttt gagagcaggg ttgggaggcc     1620

```

tctcctgaaa aggggtataaa cgtggagtag gcaataccca ggcaaaaagg ggagaccaga 1680
gtagggggag ggggaagagtc ctgacccagg gaagacatta aaaaggtagt ggggtcgact 1740
agatgaagga gagcctttct ctctgggcaa gagcggtgca atggtgtgta aaggtagctg 1800
agaagacgaa aagggcaagc atcttcctgc taccaggctg gggaggcca ggcccacgac 1860
cccgaggaga gggaacgcag ggagactgag gtgacccttc tttcccccg ggcccggctg 1920
tgtggttcgg tgtctctttt ctgttggacc cttacctga cccaggcgt gccggggcct 1980
gggcccgggc tgcgggcac ggcactccc ggaggcagcg agactcgagt taggccaac 2040
gcggcgccac ggcgtttcct ggccgggaat ggcccgtacc cgtgaggtagt ggggtggggg 2100
cagaaaaggc ggagcgagcc cgagcgggga gggggagggc cagggcgga gggggccggc 2160
actactgtgt tggcggactg gcgggactag ggctgcgtga gtctctgagc gcaggcgggc 2220
ggcggccgcc cctcccccg cggcggcagc ggcgccagcg gcggcagctc actcagcccg 2280
ctgcccgagc ggaaacgcca ctgaccgcac ggggattccc agtgccggcg ccaggggcac 2340
gcgggacacg cccctcccg ccgcgccatt ggctctccg cccaccgcc cacacttatt 2400
ggccggtgcg ccgccaatca gcggaggctg ccggggccgc ctaaagaaga ggctgtgctt 2460
tggggctccg gctcctcaga gagcctcggc taggtagggg atcgggactc tggcgggagg 2520
gcggcttggg gcgtttgcgg ggatgggcgg ccgcggcagg ccctccgagc gtggtggagc 2580
cgttctgtga gacagccggg tacgagtcgt gacgctggaa ggggcaagcg ggtggtgggc 2640
aggaatgcgg tccgccctgc agcaaccgga gggggaggga gaaggagcg gaaaagtctc 2700
caccggacgc ggcatggct cggggggggg ggggcagcgg aggagcgtt ccggccgacg 2760
tctcgtcgt gattggcttc tttcctccc gccgtgtgtg aaaacacaaa tggcgtgttt 2820
tggttggcgt aaggcgcctg tcagttaacg gcagccggag tgcgcagccg ccggcagcct 2880
cgctctgccc actgggtggg gcgggaggta ggtggggtga ggcgagctgg acgtgcgggc 2940
gcggtcggcc tctggcgggg cgggggaggg gagggagggt cagcgaagt agctcgcgcg 3000
cgagcggccg cccaccctcc ccttcctctg ggggagtcgt tttaccgcc gccggccggg 3060
cctcgtcgtc tgattggctc tcggggccca gaaaactggc cttgccatt ggctcgtgtt 3120
cgtgcaagtt gagtccatcc gccggccagc gggggcggcg aggaggcgt cccaggttcc 3180
ggcctcccc tcggccccgc gccgcagagt ctggccgcgc gccctgcgc aacgtggcag 3240
gaagcgcgcg ctggggcggg ggacgggcag tagggctgag cggctgcggg gcgggtgcaa 3300
gcacgtttcc gacttgagtt gcctcaagag gggcgtgctg agccagacct ccatcgcgca 3360
ctccggggag tggagggaaag gagcgagggc tcagttgggc tgttttgag gcaggaagca 3420
ctgctctcc caaagtcgct ctgagttggt atcagtaagg gagctgcagt ggagtaggcg 3480
gggagaaggc cgcacccttc tccggagggg ggaggggagt gttgcaatac ctttctggga 3540
gttctctgct gcctcctggc ttctgaggac cgccctgggc ctgggagaat cccttcccc 3600
tcttccctcg tgatctgcaa ctccagtctt tctagaagat gggcgggagt cttctgggca 3660

ggcttaaagg ctaacctggt gtgtgggcgt tgtcctgcag ggaattgaa cagggtgaaa 3720
 attggagggga caagacttcc cacagatfff cggttttgtc ggaagtttt ttaatagggg 3780
 caaataagga aaatgggagg ataggtagtc atctgggggt ttatgcagca aaactacagg 3840
 ttattattgc ttgtgatccg cctcggagta ttttccatcg aggtagatta aagacatgct 3900
 cacccgagtt ttatactctc ctgcttgaga tccttactac agtatgaaat tacagtgtcg 3960
 cgagttagac tatgtaagca gaattttaat cttttttaa gagcccagta cttcatatcc 4020
 atttctcccg ctccttctgc agccttatca aaaggatttt tagaacactc attttagccc 4080
 ctttttcatt tattatactg gcttatccaa cccctagaca gagcattggc attttccctt 4140
 tcctgatctt agaagtctga tgactcatga aaccagacag attagttaca tacaccacaa 4200
 atcgaggctg tagctggggc ctcaacactg cagttctttt ataactcctt agtacacttt 4260
 ttgttgatcc tttgccttga tccttaattt tcagtgtcta tcacctctcc cgtcagtgg 4320
 gttccacatt tgggcctatt ctcagtcag ggagttttac aacaatagat gtattgagaa 4380
 tccaacctaa agcttaactt tccactcca tgaatgcctc tctcctttt ctccatttat 4440
 aaactgagct attaaccatt aatggttcca ggtggatgtc tctccccat attacctgat 4500
 gtatcttaca tattgccagg ctgatatttt aagacattaa aaggtatatt tcattattga 4560
 gccacatggt attgattact gcttactaaa attttgtcat tgtacacatc tgtaaaagg 4620
 ggttcctttt ggaatgcaaa gttcaggtgt ttgttgtctt tcctgacctt aggtcttctg 4680
 agcttgtatt ttttctattt aagcagtgtc ttctcttggg ctggcttgac tcatggcatt 4740
 ctacacgtta ttgctggctc aaatgtgatt ttgccaagct tcttcaggac ctataatttt 4800
 gcttgacttg tagccaaaca caagtaaaat gattaagcaa caaatgtatt tgtgaagctt 4860
 ggttttttagg ttgttgtgtt gtgtgtgctt gtgctctata ataatactat ccaggggctg 4920
 gagaggtggc tcggagtcca agagcacaga ctgctcttcc agaagtcctg agttcaattc 4980
 ccagcaacca catgggtggc cacaaccatc tgtaatggga tctgatgcc tcttctgggtg 5040
 tgtctgaaga ccacaagtgt attcacatta aataaataaa tctccttct tcttctttt 5100
 ttttttttta aagagaatac tgtctccagt agaatttact gaagtaatga aatactttgt 5160
 gtttgttcca atatggtagc caataatcaa attactctt aagcactgga aatgttacca 5220
 aggaactaat ttttatttga agtgtaactg tggacagagg agccataact gcagacttgt 5280
 gggatacaga agaccaatgc agactttaat gtcttttctc ttactactaag caataaagaa 5340
 ataaaaattg aacttctagt atcctatttg tttaaactgc tagctttact taacttttgt 5400
 gcttcatcta tacaagctg aaagctaagt ctgcagccat tactaaacat gaaagcaagt 5460
 aatgataatt ttggatttca aaaatgtagg gccagagttt agccagccag tgggtgtgct 5520
 tgcctttatg cctttaatcc cagcactctg gaggcagaga caggcagatc tctgagttg 5580
 agcccagcct ggtctacaca tcaagttcta tctaggatag ccaggaatac acacagaaac 5640
 cctgttgggg aggggggctc tgagatttca taaaattata attgaagcat tccctaatga 5700

gccactatgg atgtggctaa atccgtctac ctttctgatg agatttgggt attatTTTTT 5760
 ctgtctctgc tgttggttgg gtcttttgac actgtgggct ttctttaaag cctccttccct 5820
 gccatgtgggt ctcttgtttg ctactaactt cccatggcctt aaatggcatg gctttttgcc 5880
 ttctaagggc agctgctgag atttgcagcc tgatttccag ggtggggttg ggaaatcttt 5940
 caaacactaa aattgtcctt taatTTTTTT tttaaaaaat gggttatata ataaacctca 6000
 taaaatagtt atgaggagtg aggtggacta atattaaatg agtccctccc ctataaaaga 6060
 gctattaagg ctttttgtct tatacttaac ttttttttta aatgtggtat ctttagaacc 6120
 aagggtctta gagtttttagt atacagaaac tgttgcatcg cttaatcaga ttttctagtt 6180
 tcaaatccag agaatccaaa ttcttcacag ccaaagtcaa attaagaatt tctgactttt 6240
 aatgttaatt tgcttactgt gaatataaaa atgatagcctt ttcttgaggc agggctctcac 6300
 tatgtatctc tgccctgatct gcaacaagat atgtagacta aagtcttgcc tgcttttgtc 6360
 tcctgaatac taagggtaaa atgtagtaat acttttggaa cttgcaggtc agattctttt 6420
 ataggggaca cactaagga gcttgggtga tagttggtaa aatgtgtttc aagtgatgaa 6480
 aacttgaatt attatcaccg caacctactt tttaaaaaaa aaagccaggc ctgttagagc 6540
 atgcttaagg gatccctagg acttgctgag cacacaagag tagttacttg gcaggctcct 6600
 ggtgagagca tatttcaaaa aacaaggcag acaaccaaga aactacagtt aaggttacct 6660
 gtctttaaac catctgcata tacacagga tattaataa ttcaaataa tatttcattc 6720
 aagttttccc ccatcaaatt gggacatgga tttctccggt gaataggcag agttggaaac 6780
 taaacaaatg ttggttttgt gatttgtgaa attgttttca agtgatagtt aaagcccatg 6840
 agatacagaa caaagctgct atttcgaggt ctcttggttt aactcagaa gcacttcttt 6900
 gggtttccct gcactatcct gatcatgtgc taggcctacc ttaggctgat tgttgttcaa 6960
 ataaacttaa gtttctgtc aggtgatgtc atatgatttc atatatcaag gcaaaacatg 7020
 ttatatatgt taaacatttg tacttaatgt gaaagttagg tctttgtggg tttgatTTTT 7080
 aatTTTcaa acctgagcta aataagtcat ttttacatgt cttacatttg gtggaattgt 7140
 ataattgtgg tttgcaggca agactctctg acctagtaac cctacctata gagcactttg 7200
 ctgggtcaca agtctaggag tcaagcattt caccttgaag ttgagacggt ttgttagtgt 7260
 aactagttt atatgttggg ggacatgttt atccagaaga tattcaggac tatttttgac 7320
 tgggctaagg aattgattct gattagcact gttagtgagc attgagtggc ctttaggctt 7380
 gaattggagt cacttgata tctcaaataa tgctggcctt ttttaaaaag cccttgttct 7440
 ttatcacctt gttttctaca taatTTTTGT tcaaagaaat acttgtttgg atctcctttt 7500
 gacaacaata gcatgttttc aagccatatt tttttcctt ttttttttt tttttggttt 7560
 ttcgagacag ggtttctctg tatagccctg gctgtcctgg aactcacttt gtagaccagg 7620
 ctggcctcga actcagaaat ccgcctgcct ctgcctcctg agtgccggga ttaaaggcgt 7680
 gcaccaccac gcctggctaa gttggatatt ttgttatata actataacca atactaactc 7740

cactgggtgg atttttaatt cagtcagtag tcttaagtgg tctttattgg cccttcatta 7800
 aaatctactg ttcactctaa cagaggctgt tggtagtagt ggcacttaag caacttccta 7860
 cggatatact agcagattaa gggtcagggg tagaaactag tctagcgttt tgtataccta 7920
 ccagctttat actaccttgt tctgatagaa atatttcagg acatctagag tgtactataa 7980
 ggttgatggt aagcttataa ggaacttgaa agtggagtaa ctactccatt tctctgaggg 8040
 gagaattaaa atttttgacc aagtgttgtt gagccactga gaatggcttc agaacataac 8100
 ttcttaagga accttcccag attgccctca aactgacacc acatttggtc ctgcttgaac 8160
 attgccatgg ctcttaaagt ctttaattaag aatattaatt gtgtaattat tgtttttcct 8220
 ccttttagatc attccttgag gacaggacag tgcttgttta aggctatatt tctgctgtct 8280
 gagcagcaac aggtcttcga gatcaacatg atgttcataa tccaagatg ttgccattta 8340
 tgttctcaga agcaagcaga ggcatgatgg tcagtgcag taatgtcact gtgttaaagt 8400
 ttgctatgca gtttggattt ttctaatagt gtgtaggtag aacatatgtg ttctgtatga 8460
 attaaactct taagttacac cttgtataat ccatgcaatg tgttatgcaa ttaccatttt 8520
 aagtattgta gctttctttg tatgtgagga taaaggtgtt tgcataaaa tgttttgaac 8580
 atttcccaa agttccaaat tataaaacca caacgttaga acttatttat gaacaatggt 8640
 tgtagtttca tgcttttaaa atgcttaatt attcaattaa caccgtttgt gttataatat 8700
 atataaaact gacatgtaga agtgtttgtc cagaacattt cttaaatgta tactgtcttt 8760
 agagagttta atatagcatg tcttttgcaa catactaact tttgtgttgg tgcgagcaat 8820
 attgtgtagt cattttgaaa ggagtcattt caatgagtgt cagattgttt tgaatgttat 8880
 tgaacatttt aaatgcagac ttgttcgtgt tttagaaagc aaaactgtca gaagctttga 8940
 actagaaatt aaaaagctga agtatttcag aagggaaata agctacttgc tgtattagtt 9000
 gaaggaaagt gtaatagctt agaaaattta aaacatata gttgtcattg ctgaatatct 9060
 ggcagatgaa aagaaatact cagtggttct tttgagcaat ataacagctt gttatattaa 9120
 aaattttccc cacagatata aactctaata tataactcat aaatgttaca aatggatgaa 9180
 gcttacaat gtggcttgac ttgtcactgt gcttgtttta gttatgtgaa agtttggcaa 9240
 taaacctatg tcctaaatag tcaaactgtg gaatgacttt ttaatctatt ggtttgtcta 9300
 gaacagttat gttgccattt gccctaattg tgaagaaaa agtggggagt gccttggcac 9360
 tgttcatttg tgggtggaac caaagagggg ggcagcact tacacttcaa acatcctttt 9420
 gaaagactga caagtttggg tcttcacagt tgggaattggg catccctttt gtcagggagg 9480
 gagggagggg gggaggctgg cttgttatgc tgacaagtgt gattaaattc aaactttgag 9540
 gtaagttgga ggaacttgta cattgttagg agtgtgacaa tttggactct taatgatttg 9600
 gtcatacaaa atgaacctag accaacttct ggaagatgta tataataact ccatgttaca 9660
 ttgatttcac ctgactaata cttatccctt atcaattaa tacagaagat gccagccatc 9720
 tgggcctttt aaccagaaa tttagtttca aactcctagg ttagtgttct cactgagcta 9780

ES 2 380 233 T3

catcctgatc tagtcctgaa aataggacca ccatcacccc caaaaaaatc tcaaataaga 9840
tttatgctag tgtttcaaaa ttttaggaat aggtaagatt agaaagtttt aaattttgag 9900
aaatggcttc tctagaaaga tgtacatagt gaacactgaa tggctcctaa agagcctaga 9960
aaactggtac tgagcacaca ggactgagag gtctttcttg aaaagcatgt attgctttac 10020
gtgggtcaca gaaggcaggc aggaagaact tgggctgaaa ctgggtgtctt aagtggctaa 10080
catcttcaca actgatgagc aagaacttta tcctgatgca aaaaccatcc aaacaaacta 10140
agtgaaaggt ggcaatggat cccaggctgc tctagaggag gacttgactt ctcatccat 10200
cacccacacc agatagctca tagactgcca attaacacca gcttctagcc tccacaggca 10260
cctgcactgg tacacataat ttcacacaaa cacagtaaga agccttcac ctggcatggt 10320
attgcttacc tttagttccc aacacttggg aggcagaggc cagccagggc tatgtgacaa 10380
aaaccttgtc tagaggagaa acttcatagc ttatttccta ttcacgtaac caggttagca 10440
aaatttacca gccagagatg aagctaacag tgtccactat atttgtagtg ttttaagtca 10500
atTTTTTaaa tatacttaat agaattaaag ctatggtgaa ccaagtacaa acctggtgta 10560
ttaacttgag aacttagcat aaaaagtagt tcatttgttc agtaaatatt aaatgcttac 10620
tggcaaagat tatgtcagga acttggtaaa tgggtgatgaa acaatcatag ttgtacatct 10680
tggttctgtg atcaccttgg tttgaggtaa aagtggttcc tttgatcaag gatggaattt 10740
taagtttata ttcaatcaat aatgtattat tttgtgattg caaaattgcc tatctaggg 10800
ataaaacctt taaaaatttc ataataccag ttcattctcc agttactaat tccaaaaagc 10860
cactgactat ggtgccaatg tggattctgt tctcaaagga aggattgtct gtgcccttta 10920
ttctaataga aacatcacac tgaaaatcta agctgaaaga agccagactt tcctaaataa 10980
ataactttcc ataaagctca aacaaggatt acttttagga ggcaactgta aggaactgat 11040
aagtaatgag gttacttata taatgatagt cccacaagac tatctgagga aaaatcagta 11100
caactcgaaa acagaacaac cagctaggca ggaataacag ggctcccaag tcaggaggtc 11160
tatccaacac ctttttctgt tgagggccc agacctacat attgtataca aacaggagg 11220
tgggtgattt taactctcct gaggtacctt ggtaaatctt tgcctgagt aagcagtaca 11280
gtgtacagtt tacatTTTca tttaaagata cattagctcc ctctacccc taagactgac 11340
aggcactttg ggggtgggga gggcttggga aaataacgct tccatacact aaaagagaaa 11400
tttctttaat taggcttgtt ggttcacata atctactggt gtttctacta cttagtaata 11460
ttataatagt cacacaagca tctttgctct gtttaggttg tatatttatt ttaaggcaga 11520
tgataaaact gtagatctta agggatgctt ctgcttctga gatgatacaa agaatttaga 11580
ccataaaaca gtaggttgca caagcaatag aatatggcct aaagtgttct gacacttaga 11640
agccaagcag tgtaggcttc ttaagaaata ccattacaat caccttgcta gaaatcaagc 11700
attctggagt ggtcaagcag tgtaacctgt actgtaagtt acttttctgc tatttttctc 11760
ccaaagcaag ttctttatgc tgatatttcc agtgtttagga actacaata ttaataagtt 11820

gtcttcactc ttttctttac caaggagggt ctcttccttc atcttgatct gaaggatgaa 11880
 caaaggcttg agcagtgcg tttagaagat aaactgcagc atgaaggccc ccgatgttca 11940
 cccagactac atggaccttt cgccacacat gtcccattcc agataaggcc tggcacacac 12000
 aaaaaacata agtcattagg ctaccagtct gattctaaaa caacctaaaa tcttcccact 12060
 taaatgctat ggggtggtggg ttggaaagtt gactcagaaa atcacttgct gtttttagag 12120
 aggatctggg ttcagtttct gatacattgt ggcttacaac tataactcca gttctagggg 12180
 gtccatccaa catcctcttc tgttgagggc accaaataaa tgtattgtgt acaaacaggg 12240
 aggtgagtga tttactctc gtgtatagta ccttggtaaa acatttcttg tcctgagtaa 12300
 gcagtacagc tctgcctgtc cctggctctac agacacggct catttcccga aggcaagctg 12360
 gatagagatt ccaatttctc ttcttgatc ccatcctata aaagaaggtc aagtttaatc 12420
 tattgcaaaa ggtaaatagg tagtttctta catgagacaa gaacaaatct taggtgtgaa 12480
 gcagtcactt ttacaggcc agagcctcta ttctatgcca atgaaggaaa ctgttagtcc 12540
 agtgttatag agttagtcca gtgtatagtt ttctatcaga acactttttt tttaaacaac 12600
 tgcaacttag cttattgaag acaaaccacg agtagaaatc tgtccaagaa gcaagtgctt 12660
 ctcagcctac aatgtggaat aggaccatgt aatggtacag tgagtgaat gaattatggc 12720
 atgttttctt gactgagaag acagtacaat aaaaggtaaa ctcatggtat ttatttaaaa 12780
 agaatccaat ttctaccttt ttccaaatgg catatctggt acaataatat ccacagaagc 12840
 agttctcagt gggaggttgc agatatcca ctgaacagca tcaatgggca aaccccaggt 12900
 tgttttctg tggagacaaa ggtaagatat ttcaatatat tttccaagc taatgagatg 12960
 gctcagcaaa taatggtact ggccattaag tctcatgacc tgagcttgat cctcagggac 13020
 catgtggtac aaggagagac ctaaactctt cagttggact tcaatcttct accctcatgt 13080
 ccacacacaa ataatacaaa taaaaacat tctgcagctg aatttctaaa agggcgaat 13139

<210> 4

<211> 167

5 <212> PTR

<213> secuencia artificial

<220>

<223> proteína de armazón n75 de I-Crel

<400>

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

ES 2 380 233 T3

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

5 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 10 <223> ADN diana de ROSA26
 <400> 5
 cgcccctgcg caacgtggca gg 22
 <210> 6
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de ROSA26
 20 <400> 6
 cgcaccctt ctccgaggg gg 22
 <210> 7
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de ROSA 26
 <400> 7
 30 tggactggct tgactcatgg ca 22
 <210> 8

<211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 5 <223> ADN diana de ROSA26
 <400> 8
 ccagcctggt ctacacatca ag 22

<210> 9
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de ROSA26
 15 <400> 9
 ctatctagga tagccaggaa ta 22

<210> 10
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de ROSA26
 <400> 10
 25 cagcctgatt tccaggtgg gg 22

<210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de ROSA26
 <400> 11
 taaacctcat aaaatagta tg 22

35 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40 <220>
 <223> ADN diana de ROSA26 DNA
 <400> 12
 tcagattctt ttatagggga ca 22

45 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 50 <223> ADN diana de ROSA26
 <400> 13
 ttgtatatct caaataatgc tg 22

<210> 14
 55 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de ROSA

	<400> 14	
	tgagccactg agaatggtct ca	22
	<210> 15	
5	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN diana de ROSA26	
10	<400> 15	
	caacatgatg ttcataatcc ca	22
	<210> 16	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN diana de ROSA26	
20	<400> 16	
	ttaaagtgtg ctatgcagtt tg	22
	<210> 17	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> ADN diana de ROSA26	
	<400> 17	
	ttcccaaag ttccaaatta ta	22
30	<210> 18	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> ADN diana de ROSA26 DNA	
	<400> 18	
	taacaccgtt tgtgtataa ta	22
	<210> 19	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN diana de ROSA26	
45	<400> 19	
	tatactgtct ttagagagtt ta	22
	<210> 20	
	<211> 22	
50	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN diana de ROSA	
	<400> 20	
55	tgtaatagct tagaaaattt aa	22
	<210> 21	
	<211> 22	
	<212> ADN	

	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN diana de ROSA26	
	<400> 21	
5	tttaatctat tggttgtct ag	22
	<210> 22	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN diana de ROSA26	
	<400> 22	
	ttgtacattg ttaggagtgt ga	22
15		
	<210> 23	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> ADN diana de ROSA26	
	<400> 23	
	tgactgga cacataatt ca	22
25		
	<210> 24	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> ADN diana de ROSA26	
	<400> 24	
	tgagatgata caaagaatt ag	22
35		
	<210> 25	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN diana de ROSA26 DNA	
40	<400> 25	
	ccatctata aaagaaggtc aa	22
45		
	<210> 26	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN diana de ROSA26	
	<400> 26	
50	tttaatctat tgcaaaggt aa	22
55		
	<210> 27	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN diana de ROSA26	
	<400> 27	
	tagtccagtg ttatagatt ag	22

<210> 28
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de ROSA26
 <400> 28
 tagtccagtg ttatagagtt ag 22
 10
 <210> 29
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 15 <220>
 <223> ROSA26 DNA target
 <400> 29
 ttttctgtgg agacaaaggt aa 22
 20 <210> 30
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 25 <223> ADN diana de ROSA26
 <400> 30
 tgagatggct cagcaaataa tg 22
 <210> 31
 30 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de 10GGG_P
 35 <400> 31
 tcgggacgtc gtacgacgtc ccga 24
 <210> 32
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de 5GAT_P
 <400> 32
 45 tcaaaacgat gtacatcggt ttga 24
 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 50 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de 5TAT_P
 <400> 33
 tcaaaactat gtacatagtt ttga 24
 55
 <210> 34
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> ADN diana de rosa1.2 DNA
 <400> 34
 caacatgatg tacataatcc ca 22
 5
 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 10 <220>
 <223> ADN diana de rosa1.3
 <400> 35
 caacatgatg tacatcatgt tg 22
 15 <210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 20 <223> ADN diana de rosa1.4
 <400> 36
 tgggattatg tacataatcc ca 22
 <210> 37
 25 <211> 50
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleotide diana
 30 <400> 37
 tggcatacaa gttcaacat gatgtacatc atgttgacaa tcgtctgtca 50
 <210> 38
 <211> 167
 35 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante m1
 <400> 38
 40

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 39
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante m2
- <400> 39

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 40

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante m3

<400> 40

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Asp Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 41
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante m4
 <400> 41

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Thr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 42
- 5 <211> 167
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante m5
- 10 <400> 42

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Gln Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 43
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante m6
- <400> 43

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 44
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante m7
 <400> 44

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Ala Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 45
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante m8
 <400> 45

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Val Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 46
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante m9
 <400> 46

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 47
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante m10
- <400> 47

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Thr Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 48
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante m11
- <400> 48

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Ser Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Val Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 49
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante m12
- <400> 49

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Asn Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 50
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante m13
 <400> 50

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Ser Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 51
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante m14
 <400> 51

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

ES 2 380 233 T3

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Ile Leu Ser
65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
165

<210> 52

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante m15

<400> 52

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 53
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante m16
- <400> 53

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Val Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 54
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante m17
 <400> 54

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 55
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante m18
 <400> 55

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Ser Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Val Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 56
 <211> 26
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 56
 10 gcaactttag tgctgacaca tacagg 26
 <210> 57
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 57
 acaaccttga ttggagactt gacc 24
 20
 <210> 58
 <211> 15
 <212> ADN

<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (4)..(6)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 58
 ctannnttga ccttt 15
 10
 <210> 59
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(12)
 20 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 59
 aaaggtcaan nntag 15

 <210> 60
 25 <211> 167
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 30 <400> 60

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val His Asp Gln Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 61
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 61

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val His Asp Gln Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 62
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 62

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Asn Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 63
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 63

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 64
 <211> 166
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 64

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Thr Phe Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Ala Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 65

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 65

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Gly Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 66

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 66

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Ser Asp Gln Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 67
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 67

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Thr Asp Asn Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 68

<211> 59

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 68

10 gcataaatta ctatacttct atagacacgc aaacacaaat acacagcggc cttgccacc

59

<210> 69

<211> 48

<212> ADN

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 69

ggctcgagga gctcgtctag aggatcgcctc gagttatcag tcggccgc

48

20

ES 2 380 233 T3

<210> 70
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 70
 ttaagcgaaa tcaagccg 18

 10 <210> 71
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 71
 ttaagcgaaa tcaagccg 18

 <210> 72
 20 <211> 167
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 25 <400> 72

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

 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30

 Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45

 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

 Val Gly Tyr Val His Asp Gln Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

ES 2 380 233 T3

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Ala Leu Arg Ile Ile Glu Gln
100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
165

<210> 73

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 73

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val His Asp Gln Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Ala Leu Arg Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Gly Ser Leu Ser Glu Glu Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 74
- 5 <211> 167
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- 10 <400> 74

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Val Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 75
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 75

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 76
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 76

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Ser Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Ala Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 77
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 77

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Ser Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Ile Leu Gly
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 78

<211> 77

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 78

10

ggggacaagt ttgtacaaa aagcaggctt cgaaggagat agaaccatgg ccaataccaa 60

atataacaaa gagttcc 77

<210> 79

<211> 64

15 <212> ADN

ES 2 380 233 T3

<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 79

5 **ggggaccact ttgtacaaga aagctggggtt tagtcggccg ccggggagga tttcttcttc** 60
tcgc 64

<210> 80
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de I-Crel DNA
 <400> 80

15 tcaaaacgtc gtgagacagt ttgg 24

<210> 81
 <211> 18
 <212> ADN

20 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN diana de I-SCe
 <400> 81

25 tagggataac aggtaat 18

<210> 82
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 82

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro His Gln
 20 25 30

Ser Ser Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Glu Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Cys Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 83
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 83

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Asn Gly Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Glu Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 84
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 84

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Arg Lys Phe Lys His Asn Leu Gln Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Asp Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 85

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 85

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Ser Pro Asn Gln
20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Thr Phe Asp Val Thr Gln
35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
50 55 60

Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Ser Tyr Arg Leu Ser
65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
165

<210> 86

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 86

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Cys Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Thr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 87

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 87

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Thr Cys Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Thr Asp Asn Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 88
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 88

10

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

ES 2 380 233 T3

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Tyr Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 89
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 89

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Ser Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Thr Phe Thr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Asn Asp Asn Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 90
- 5 <211> 167
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- 10 <400> 90

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Ala Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Ser Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Val Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 91

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 91

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Asp His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Glu Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 92
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 92

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Arg Gln
 20 25 30
 Asp Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Ser Asp Lys Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 93
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 93

10

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

ES 2 380 233 T3

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Arg Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Ala Lys Phe Lys His Tyr Leu Gln Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Gln Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 94

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 94

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Arg Pro Asp Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 95

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 95

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Arg Lys Phe Lys His Ala Leu Gln Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 96
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 96

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Arg Lys Phe Lys His Ala Leu Gln Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Val Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 97

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 97

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Pro Lys Phe Lys His Gln Leu Gln Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Asn Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 98
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 98

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Ala Pro Asn Gln
 20 25 30

ES 2 380 233 T3

Ser Ser Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Asn Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 99
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 99

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro His Gln
 20 25 30

Ser Ser Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Val Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 100

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 100

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Asp His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Thr Asp Asn Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 101
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 101

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Arg Asp Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 102
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 102

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Pro Lys Phe Lys His Gln Leu Gln Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Asn Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 103
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 103

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Gln Pro Asn Gln
 20 25 30

ES 2 380 233 T3

Ser Tyr Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser
65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
165

<210> 104
<211> 167
5 <212> PRT
<213> secuencia artificial
<220>
<223> variante de I-Crel
<400> 104

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Thr Lys Phe Lys His Ala Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val His Asp His Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 105

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 105

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Thr Lys Phe Lys His Gln Leu Thr Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Ala Asp Lys Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 106
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 106

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Asp His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Asp Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 107
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 107

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asp Gln
 20 25 30
 Ser Arg Lys Phe Lys His Thr Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Glu Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 108
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 108

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Thr Tyr Lys Phe Lys His Trp Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln
 35 40 45

ES 2 380 233 T3

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Glu Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 109
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 109

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro His Gln
 20 25 30

Ser Ser Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Glu Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

ES 2 380 233 T3

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
165

<210> 110

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 110

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Cys Lys Phe Lys His Ala Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Ala Asp Lys Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 111
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 111

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Asp Tyr Lys Phe Lys His Cys Leu Ser Leu Thr Phe Asp Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Ser Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 112
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 112

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Thr Tyr Lys Phe Lys His Trp Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Glu Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 113
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 113

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Arg Lys Phe Lys His Ala Leu Gln Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 114
- 5 <211> 167
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- 10 <400> 114

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser His Lys Phe Lys His Ser Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Asn Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 115
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 115

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Thr Cys Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 116
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 116

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Asp His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Asp Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Asn Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 117
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 117

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Arg Lys Phe Lys His Ala Leu Gln Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Lys Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 118
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 118

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Asp Tyr Lys Phe Lys His Cys Leu Ser Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Tyr Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 119
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 119

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 120
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 120

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Arg Gln
 20 25 30
 Asp Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Thr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val His Asp His Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 121
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 121

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ala Cys Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Gln Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 122
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 122

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Asn Gly Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Ala Asp Lys Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 123

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 123

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Arg Lys Phe Lys His Gln Leu Gln Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 124
- 5 <211> 167
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- 10 <400> 124

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Arg Gln
20 25 30

Asp Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Thr Val Thr Gln
35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
50 55 60

Val Gly Tyr Val Asn Asp Asn Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
165

- <210> 125
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 125

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Ser Lys Phe Lys His Arg Leu His Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val His Asp His Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 126
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 126

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Arg Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Ala Lys Phe Lys His Tyr Leu Gln Leu Thr Phe Thr Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val His Asp His Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 127
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 127

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Arg Gln
 20 25 30
 Asp Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Asn Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 128

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 128

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro His Gln
 20 25 30

Ser Ser Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Lys Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 129

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de I-Crel

<400> 129

10

ES 2 380 233 T3

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Arg Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Ala Lys Phe Lys His Tyr Leu Gln Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Lys Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 130
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 130

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Asp Tyr Lys Phe Lys His Cys Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Lys Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 131
- <211> 167
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> variante de I-Crel
- <400> 131

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Val Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val Arg Asp Ala Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

<210> 132
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de I-Crel
 <400> 132

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30

ES 2 380 233 T3

Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165

- <210> 133
- <211> 163
- 5 <212> PRT
- <213> Chlamydomonas reinhardtii
- <400> 133

ES 2 380 233 T3

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

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

- <210> 134
- 5 <211> 5
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> NLS
- 10 <400> 134

Lys Lys Lys Arg Lys
 1 5

- <210> 135
- 15 <211> 9
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> HA-tag
- 20 <400> 135

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 136
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> s-tag
 <400> 136

10
 Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
 1 5 10 15

<210> 137
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 137

20 tagtatacag aaactgttc atcgc 25

<210> 138
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 138
 cgtctgctgc tccatacaag 20

30
 <210> 139
 <211> 585
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> IRES
 <400> 139

ES 2 380 233 T3

```

gccccctctcc ctcccccccc cctaacgtta ctggccgaag ccgcttgga taaggccggt      60
gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc ttttggcaat gtgagggccc      120
ggaaacctg9 ccctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg tctttcccct ctcgccaaag      180
gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac      240
aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcgggaaccc cccacctggc gacaggtgcc      300
tctgcgcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa ggcggcacia ccccagtgcc      360
acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag tcaaattggct ctcctcaagc gtattcaaca      420
aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggg      480
gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg      540
gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccaca                          585

```

<210> 140

<400> 140

5 000

<210> 141

<211> 172

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> MO_1 NLS

<400> 141

ES 2 380 233 T3

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

Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln
 20 25 30

Ile Glu Pro Asn Gln Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Thr
 35 40 45

Phe Ala Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu
 50 55 60

Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val His Asp Gln Gly Ser Val Ser
 65 70 75 80

Asn Tyr Ile Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln
 85 90 95

Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Ala Leu
 100 105 110

Arg Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe
 115 120 125

Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser
 130 135 140

Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser
 145 150 155 160

Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165 170

<210> 142
 <211> 175
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> mO_2 TagHA
 <400> 142

10

ES 2 380 233 T3

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

Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln
 20 25 30

Ile Glu Pro Asn Gln Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Thr
 35 40 45

Phe Ala Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu
 50 55 60

Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val His Asp Gln Gly Ser Val Ser
 65 70 75 80

Asn Tyr Ile Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln
 85 90 95

Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Ala Leu
 100 105 110

Arg Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe
 115 120 125

Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser
 130 135 140

Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser
 145 150 155 160

Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 165 170

<210> 143
 <211> 182
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> MO_1 STag
 <400> 143

10

ES 2 380 233 T3

Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
 1 5 10 15

Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 20 25 30

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln Ser
 35 40 45

Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln Lys
 50 55 60

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 65 70 75 80

Gly Tyr Val His Asp Gln Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser Glu
 85 90 95

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 100 105 110

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Ala Leu Arg Ile Ile Glu Gln Leu
 115 120 125

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 130 135 140

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 145 150 155 160

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 165 170 175

Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 180

<210> 144
 <211> 181
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> mO_2 NLS+TagHA
 <400> 144

10

Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Lys Lys Lys Arg Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 20 25 30
 Asp Ser Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser Tyr
 35 40 45
 Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln Lys Thr
 50 55 60
 Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 65 70 75 80
 Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Ile Leu Ser Glu Ile
 85 90 95
 Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 100 105 110
 Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 115 120 125
 Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 130 135 140
 Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 145 150 155 160
 Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 165 170 175
 Ser Pro Ala Ala Asp
 180

- <210> 145
- <211> 187
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> MO_1NLS+STag
- <400> 145

10

ES 2 380 233 T3

Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
 1 5 10 15

Lys Lys Lys Arg Lys Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu
 20 25 30

Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile
 35 40 45

Glu Pro Asn Gln Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Thr Phe
 50 55 60

Ala Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val
 65 70 75 80

Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val His Asp Gln Gly Ser Val Ser Asn
 85 90 95

Tyr Ile Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu
 100 105 110

Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Ala Leu Arg
 115 120 125

Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu
 130 135 140

Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys
 145 150 155 160

Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu
 165 170 175

Ser Glu Lys Lys Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
 180 185

<210> 146

<211> 354

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> MO_1/mO_2 monocatenario

<400> 146

10

ES 2 380 233 T3

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
 20 25 30
 Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
 35 40 45
 Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
 50 55 60
 Val Gly Tyr Val His Asp Gln Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95
 Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Ala Leu Arg Ile Ile Glu Gln
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
 115 120 125
 Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
 130 135 140
 Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Pro Ala Ala Gly Gly Ser Asp Lys Tyr Asn Gln Ala Leu
 165 170 175
 Ser Lys Tyr Asn Gln Ala Leu Ser Lys Tyr Asn Gln Ala Leu Ser Gly
 180 185 190
 Gly Gly Gly Ser Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205
 Asp Ser Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser Tyr
 210 215 220
 Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln Lys Thr
 225 230 235 240
 Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Ile Leu Ser Glu Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 147
 <211> 167
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> mO_2 E8K+E61R
 <400> 147

10

Met Ala Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15

Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Val Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln
 20 25 30

Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln
 35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Arg Ile Gly
 50 55 60

Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
 85 90 95

Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln
 100 105 110

ES 2 380 233 T3

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
165

<210> 148

<211> 167

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> MO_1 K7E+K96E

<400> 148

10

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

Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Glu Pro Asn Gln
20 25 30

Ser Arg Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln
35 40 45

Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly
50 55 60

Val Gly Tyr Val His Asp Gln Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser
65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu
85 90 95

Glu Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Ala Leu Arg Ile Ile Glu Gln
100 105 110

Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr
115 120 125

Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr
130 135 140

Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys
145 150 155 160

Lys Ser Ser Pro Ala Ala Asp
165

<210> 149

<211> 30

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> enlazante de meganucleasa monocatenaria

<400> 149

10

Gly Gly Ser Asp Lys Tyr Asn Gln Ala Leu Ser Lys Tyr Asn Gln Ala
1 5 10 15

Leu Ser Lys Tyr Asn Gln Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Una variante de I-Crel, caracterizada porque uno de los dos monómeros de I-Crel tiene al menos dos sustituciones, una en cada uno de los dos subdominios funcionales del dominio del núcleo de LAGLIDADG situado respectivamente entre las posiciones 26 a 40 y 44 a 77 de I-Crel, siendo dicha variante capaz de escindir una secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón, y que es obtenible mediante un procedimiento que comprende al menos las etapas de:
- (a) construir una primera serie de variantes de I-Crel que tengan al menos una sustitución en el primer subdominio funcional del dominio del núcleo de LAGLIDADG situado entre las posiciones 26 a 40 de I-Crel,
- 10 (b) construir una segunda serie de variantes de I-Crel que tengan al menos una sustitución en un segundo subdominio funcional del dominio del núcleo de LAGLIDADG situado entre las posiciones 44 a 77 de I-Crel,
- (c) seleccionar y/o cribar las variantes de la primera serie de la etapa (a) que son capaces de escindir un sitio I-Crel mutante en el que al menos (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones -10 a -8 del sitio I-Crel se ha sustituido con el triplete de nucleótidos que está presente en la posición -10 a -8 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón y (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones +8 a +10 se ha sustituido con la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en la posición -10 a -8 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón,
- 15 (d) seleccionar y/o cribar las variantes procedentes de la segunda serie de la etapa (b) que son capaces de escindir un sitio I-Crel mutante en el que al menos (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones -5 a -3 del sitio I-Crel se ha sustituido con el triplete de nucleótidos que está presente en la posición -5 a -3 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón y (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones +3 a +5 se ha sustituido con la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en la posición -5 a -3 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón,
- 20 (e) seleccionar y/o cribar las variantes procedentes de la primera serie de la etapa (a) que son capaces de escindir un sitio I-Crel mutante en el que al menos (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones +8 a +10 del sitio I-Crel se ha sustituido con el triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones +8 a +10 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón y (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones -10 a -8 se ha sustituido con la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en la posición +8 a +10 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón,
- 25 (f) seleccionar y/o cribar las variantes procedentes de la segunda serie de la etapa (b) que son capaces de escindir un sitio I-Crel mutante en el que al menos (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones +3 a +5 del sitio I-Crel se ha sustituido con el triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones +3 a +5 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón y (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones -5 a -3 se ha sustituido con la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en la posición +3 a +5 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón,
- 30 (g) combinar en una única variante, la(s) mutación(es) en las posiciones 26 a 40 y 44 a 77 de las dos variantes de la etapa (c) y la etapa (d), para obtener una novedosa variante de I-Crel homodimérico que escinda una secuencia en la que (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones -10 a -8 es idéntico al triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones -10 a -8 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón, (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones +8 a +10 es idéntico a la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones -10 a -8 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón, (iii) el triplete de nucleótidos en las posiciones -5 a -3 es idéntico al triplete de nucleótido que está presente en las posiciones -5 a -3 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón y (iv) el triplete de nucleótidos en las posiciones +3 a +5 es idéntico a la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones -5 a -3 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón, y/o
- 35 (h) combinar en una única variante, la(s) mutación(es) en las posiciones 26 a 40 y 44 a 77 de las dos variantes procedentes de la etapa (e) y etapa (f), para obtener una novedosa variante de I-Crel heterodimérico que escinda una secuencia en la que (i) el triplete de nucleótidos en las posiciones +3 a +5 es idéntico al triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones +3 a +5 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón, (ii) el triplete de nucleótidos en las posiciones -5 a -3 es idéntico a la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótido que está presente en las posiciones +3 a +5 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón, (iii) el triplete de nucleótidos en las posiciones +8 a +10 del sitio I-Crel se ha sustituido con el triplete de nucleótidos que está presente en las posiciones +8 a +10 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón y (iv) el triplete de nucleótidos en las posiciones -10 a -8 es idéntico a la secuencia complementaria inversa del triplete de nucleótidos en las posiciones +8 a +10 de dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón,
- 40 (i) combinar las variantes obtenidas en las etapas (g) y/o (h) para formar heterodímeros, y
- 45
- 50
- 55

(j) seleccionar y/o cribar los heterodímeros de la etapa (i) que son capaces de escindir dicha secuencia de ADN diana procedente del locus ROSA26 de ratón.

2. La variante de la reivindicación 1, en la que dicha(s) sustitución(es) en el subdominio situado entre las 5 posiciones 44 a 77 de I-Crel son en las posiciones 44, 68, 70, 75 y/o 77 y en la que dicha(s) sustitución(es) en el subdominio situado entre las posiciones 26 a 40 de I-Crel son en las posiciones 26,28, 30, 32, 33, 38 y/o 40.
3. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende una o más sustituciones en las posiciones 137 a 143 del I-Crel que modifica la especificidad de la variante hacia el nucleótido en las 10 posiciones ± 1 a 2, ± 6 a 7 y/o ± 11 a 12 del sitio I-Crel.
4. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una o más sustituciones de la secuencia completa de I-Crel que mejora las propiedades de unión y/o escisión de la variante hacia dicha 15 sustituciones entre el grupo que consiste en G19S, I24V, S79G, V105A, K107R, V151A, D153G y K158E.
5. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dichas sustituciones son sustituciones de los aminoácidos iniciales con aminoácidos seleccionados en el grupo que consiste en A, D, E, G, H, 20 K, N, P, Q, R, S, T, Y, C, W, L y V.
6. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es un heterodímero, resultante de la asociación de un primer y un segundo monómero que tienen diferentes mutaciones en las posiciones 26 a 40 y/o 44 a 77 de I-Crel, siendo dicho heterodímero capaz de escindir una secuencia de ADN diana no palindrómico 25 procedente del locus ROSA26 de ratón.
7. La variante de la reivindicación 6, en la que dicho ADN diana se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 5 a 14 y 16 a 30, dicho primer y segundo monómeros, respectivamente, comprendiendo preferiblemente al menos las siguientes sustituciones:
- 30 - N30H, Y33S, Q44E, R68C, R70S, D75N and N30D, Y33R, Q38T, Q44K, R68E, R70S, I77R,
 - S32N, Y33G, Q44K, R70E, D75N and S32T, Q38W, Q44K, R68E, R70S, I77R,
 - Y33R, Q38N, S40Q, Q44N, R70S, D75R, I77D and N30H, Y33S, Q44A, R70S, D75Q, I77E,
 - K28S, Q38R, S40K, Q44D, R68Y, R70S, D75S, I77R and Y33C, Q38A, R68A, R70K, D75N,
 - Y33C, Q44T, R70S, D75Y and S32D, Q38C, Q44D, R68Y, R70S, D75S, I77R,
 35 - S32T, Y33C, R68T, R70N, D75N and S32T, Q38W, Q44K, R70E, D75N,
 - R70S, D75R, I77Y and Y33R, Q38A, S40Q, Q44A, R70S, D75N,
 - K28S, Q38R, S40K, Q44T, R68N, R70N, D75N and Y33H, Q38S, Q44K, R68Y, R70S, D75Q, I77N,
 - K28A, Y33S, Q38R, S40K, Q44N, R68Y, R70S, D75R, I77V and S32T, Y33C, Q44A, R70S, D75N,
 - S32D, Y33H, Q44K, R68E, R70S, I77R and S32D, Y33H, Q44D, R68N, R70S, D75N,
 40 - N30R, S32D, R68S, R70K, D75N and D75N,
 - K28R, Y33A, Q38Y, S40Q, R68Y, R70S, D75R, I77Q and Y33R, Q38A, S40Q, R70S, I77K,
 - K28R, N30D, D75E, I77R and S32D, Q38C, Q44A, R70S, D75R, I77Y,
 - Y33R, Q38A, S40Q, R70S, D75N and R70S, D75Y, I77R,
 - Y33R, Q38A, S40Q, Q44N, R68Y, R70S, D75R, I77V and N30R, S32D, Q44T, R68H, R70H, D75N,
 45 - Y33P, S40Q, Q44K, R68Y, R70S, D75Q, I77N and S32A, Y33C, R68Y, R70S, D75R, I77Q,
 - K28A, Y33S, Q38R, S40K, R68N, R70S, D75N, I77R and S32N, Y33G, Q44A, R68A, R70K, D75N,
 - N30H, Y33S, Q44Y, R70S, I77V and Y33R, S40Q, Q44A, R70S, D75N,
 - S32D, Y33H, R68T, R70N, D75N and N30R, S32D, Q44T, R68N, R70N, D75N,
 - S32R, Y33D, Q44A, R70S, D75N and Y33S, Q38R, S40H, R68H, R70H, D75N,
 50 - Y33P, S40Q, Q44K, R68Y, R70S, D75Q, I77N and K28R, Y33A, Q38Y, S40Q, Q44T, R68H, R70H, D75N,
 - K28Q, Q38R, S40K, Q44A, R70S, D75E, I77R and N30R, S32D, Q44K, R68Y, R70S, D75Q, I77N,
 - Y33T, Q38A, R68H, R70H, D75N and N30H, Y33S, R70S, I77K,
 - Y33T, S40T, R68A, R70K, D75N and K28R, Y33A, Q38Y, S40Q, R70S, and
 - S32D, Y33H, Q44N, R70S, D75R, I77D and S32D, Q38C, R70S, I77K.
 55
8. La variante de la reivindicación 7, en la que el primer monómero es de cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 82 a 106 y el segundo monómero es de cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 107 a 116, 4, 117 a 130, respectivamente.

9. La variante de la reivindicación 6, en la que dicho ADN diana es la SEQ ID NO: 15 y en la que el primer monómero se selecciona entre el grupo que consiste en: I24V, Q44Y, R70S y D75N ; I24V, Q44Y, R68Y, R70S, D75Y e I77R ; I24V, Q44Y, R70S, D75N e I77V ; I24V, Q44Y, R68N, R70S y D75R; I24V, Q44Y, R68S, R70S y D75R; I24V, Q44Y, R70S y D75Q ; I24V, Q44Y, R68Y, R70S, D75R e I77V ; I24V, Q44Y, R70S, D75Y e I77T, y el segundo monómero se selecciona en el grupo que consiste en K28E, Y33R, Q38R, S40R, Q44A, R68H, R70Q y D75N; K28E, Y33R, Q38R, S40R, Q44A, R70N y D75N; K28E, Y33R, Q38R, S40K, Q44A, R68H, R70Q y D75N ; K28E, Y33R, Q38R, S40K, Q44V, R70A y D75N; K28E, Y33R, Q38R, S40K, Q44A, R70G y D75N, preferiblemente el primer monómero se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO : 39, 43, 45, 49, 50, 51, 53 y 54, y el segundo monómero se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 60, 61, 63, 65 y 66.
10. La variante de la reivindicación 6 en la que dicho ADN diana es la SEQ ID NO: 15 y en el que el primer y el segundo monómero, respectivamente, comprende al menos las siguientes sustituciones: I24V, Q44Y, R70S, D75Y, I77T y K28E, Y33R, Q38R, S40R, Q44A, R68S, R70Q, D75N, preferiblemente en la que el primer y el segundo monómeros son la SEQ ID NO: 54 y la SEQ ID NO: 62, respectivamente.
11. La variante de la reivindicación 6 en la que dicho ADN diana es la SEQ ID NO: 15 y en la que el primer monómero se selecciona entre el grupo que consiste en I24V, Q44Y, R68N, R70S y D75R; I24V, Q44Y, R68S, R70S y D75R; I24V, Q44Y, R70S y D75Q; I24V, Q44Y, R68Y, R70S, D75R e I77V; I24V, Q44Y, R70S, D75Y e I77T, y el segundo monómero se selecciona en el grupo que consiste en: K28E, Y33R, Q38R, S40K, Q44A, R70S, D75N y K28E, Y33R, Q38R, S40K, Q44A, R68T, R70N, D75N, preferiblemente en la que el primer monómero se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 49, 50, 51, 53 y 54, y el segundo monómero se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 64 y 67.
12. La variante de la reivindicación 6 en la que dicho ADN diana es la SEQ ID NO: 15 y en la que el primer monómero se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 72 y 73 y el segundo monómero se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 74 a 77.
13. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende una señal de localización nuclear y/o una etiqueta.
14. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que tiene al menos un 95% de identidad de la secuencia con las secuencias 82-106, 107-116, 4, 117-130; 39, 43, 45, 49, 50, 51, 53 y 54; 60, 61, 63, 65 y 66; 54, 62; 64, 67; 72-73; 74-77.
15. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, que es un heterodímero obligado, en la que el primer monómero comprende la mutación D137R y el segundo monómero comprende además la mutación R51D o en la que el primer monómero comprende además las mutaciones E8R o E8K y E61 R y el segundo monómero comprende además las mutaciones K7E y K96E.
16. Una meganucleasa quimérica monocatenaria que comprende dos monómeros o dominios de núcleo de una variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o una combinación de ambas, que comprende preferiblemente el primer y el segundo monómero tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7, 8 y 9 a 15, junto con un enlazante peptídico.
17. Un fragmento de polinucleótido que codifica la variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o la meganucleasa quimérica monocatenaria de la reivindicación 16.
18. Un vector de expresión que comprende al menos un fragmento de polinucleótido que codifica al menos una variante monomérica de I-CreI de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o la meganucleasa quimérica monocatenaria de la reivindicación 16, preferiblemente, dicho vector de expresión comprende dos fragmentos diferentes de polinucleótidos, codificando cada uno, uno de los monómeros de una variante heterodimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15.
19. Un vector, que incluye una construcción directora que comprende una secuencia que se va a introducir en el locus ROSA26 de ratón, flanqueada por secuencias que comparten homologías con las regiones que rodean el sitio de escisión del ADN genómico presente en el locus ROSA26 de ratón, tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6, 7 y 9 y en el que preferiblemente dicha secuencia que comparte homologías con las regiones que rodean el sitio de escisión del ADN genómico presente en el locus ROSA26 de ratón es un

- fragmento del locus ROSA26 de ratón que comprende la secuencia seleccionada entre las posiciones 3131 a 3330, 3401 a 3600, 4628 a 4827, 5495 a 5694, 5519 a 5718, 5817 a 6016, 5903 a 6102, 6320 a 6519, 7305 a 7504, 7981 a 8180, 8215 a 8414, 8305 a 8504, 8494 a 8693, 8589 a 8788, 8660 a 8859, 8921 a 9120, 9191 a 9390, 9467 a 9666, 10174 a 10373, 11469 a 11668, 12302 a 12501, 12325 a 12524, 12446 a 12465, 12702 a 12901, 12815 a 13014 y 12865 a 13064 de la SEQ ID NO: 3 o dicha secuencia que comparte homologías con las regiones que rodean el sitio de escisión del ADN genómico presente en el locus ROSA26 de ratón es un fragmento del locus ROSA26 de ratón que comprende secuencias en la dirección 5' y en la dirección 3' del sitio de escisión, con el fin de permitir la delección de las secuencias de codificación que flanquean inmediatamente el sitio de escisión.
- 10 20. Una composición que comprende al menos una variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, una meganucleasa quimérica monocatenaria de la reivindicación 16, y/o al menos un vector de expresión de las reivindicaciones 18 o 19, preferiblemente dicha composición comprende una construcción de ADN director que comprende una secuencia que se va a introducir en el locus ROSA26 de ratón, flanqueada por secuencias que comparten homologías con la región que rodea el sitio de escisión del ADN genómico de dicha variante, tal como se define en la reivindicación 19.
- 15 21. Una célula hospedadora que está modificada por un polinucleótido de la reivindicación 17 o un vector de las reivindicaciones 18 o 19.
- 20 22. Un animal transgénico no humano que comprende uno o dos fragmentos de polinucleótidos tal como se define en la reivindicación 17 o en la reivindicación 18.
23. Una planta transgénica que comprende uno o dos fragmentos de polinucleótidos tal como se define en la reivindicación 17 o en la reivindicación 18.
- 25 24. Uso de al menos una variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, una meganucleasa quimérica monocatenaria de la reivindicación 16, un vector de acuerdo con las reivindicaciones 18 o 19, para genomanipular el genoma de ratón, para objetivos no terapéuticos, en el que preferiblemente dicha variante, meganucleasa quimérica monocatenaria, o vector está asociada con una construcción de ADN director tal como se define en la reivindicación 19 y más preferiblemente, dicha construcción de ADN director comprende un casete que comprende una secuencia de ADN que codifica un producto de interés, y eventualmente un gen marcador, flanqueado por secuencias que comparten homologías con las regiones que rodean el sitio de escisión del ADN genómico presente en el locus ROSA26 de ratón, tal como se define en la reivindicación 19.
- 30

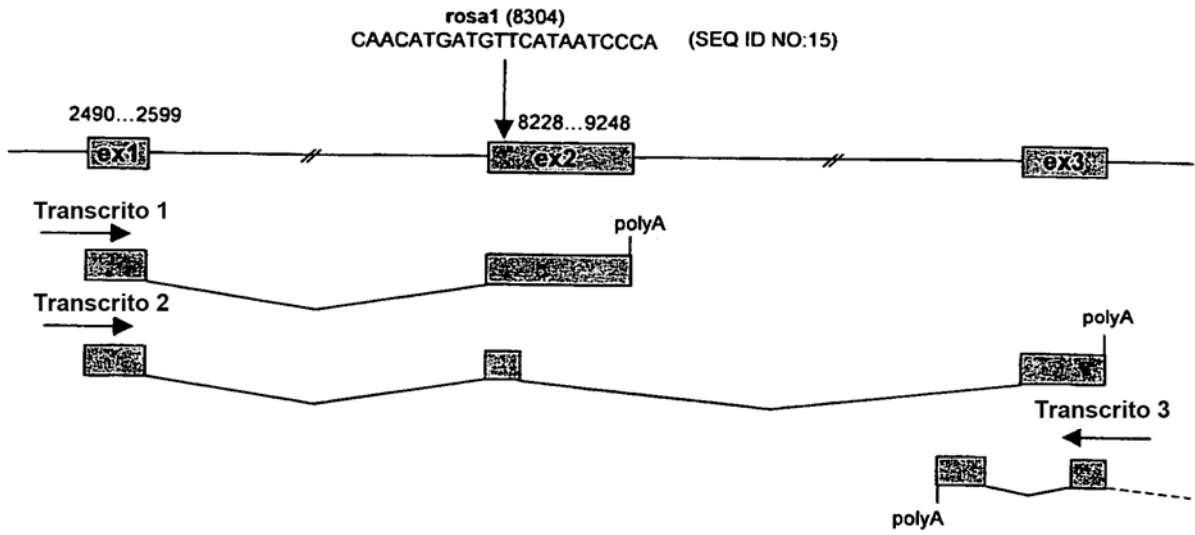


FIGURA 1

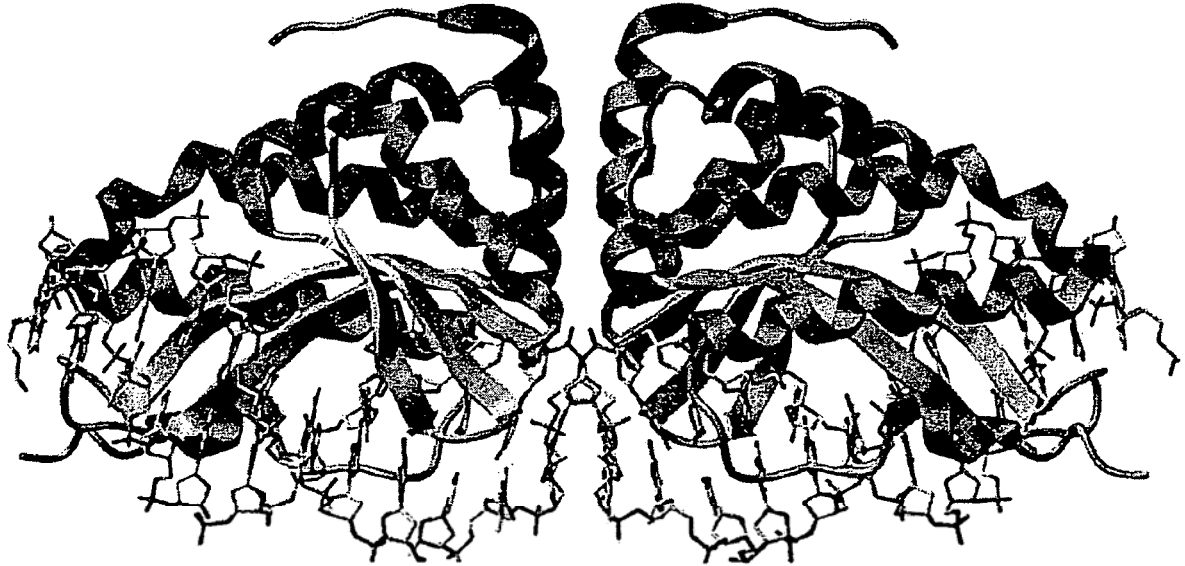


FIGURA 2

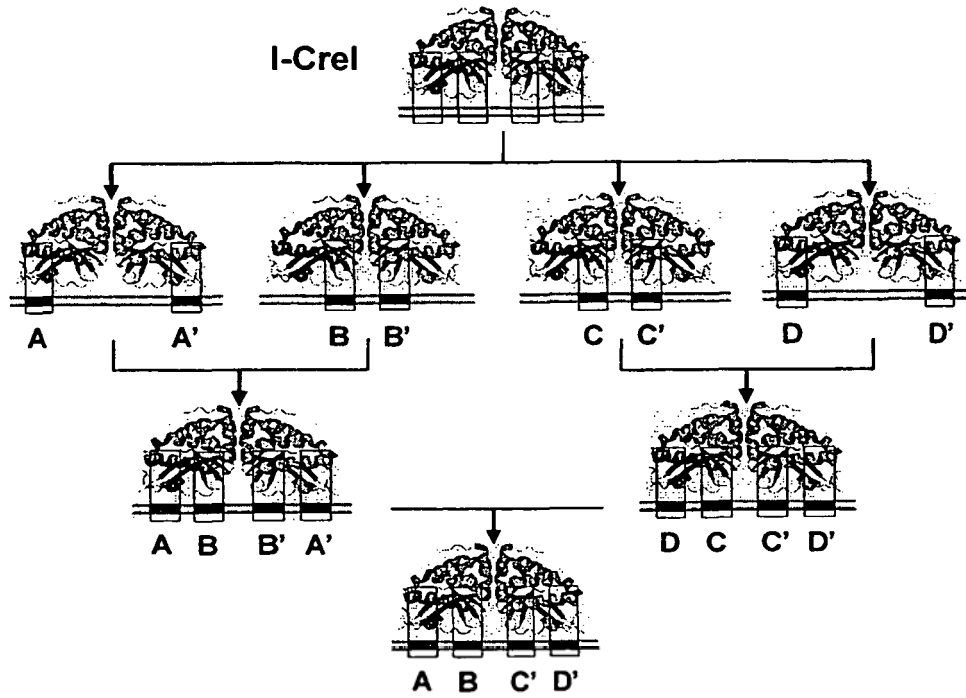


FIGURA 3

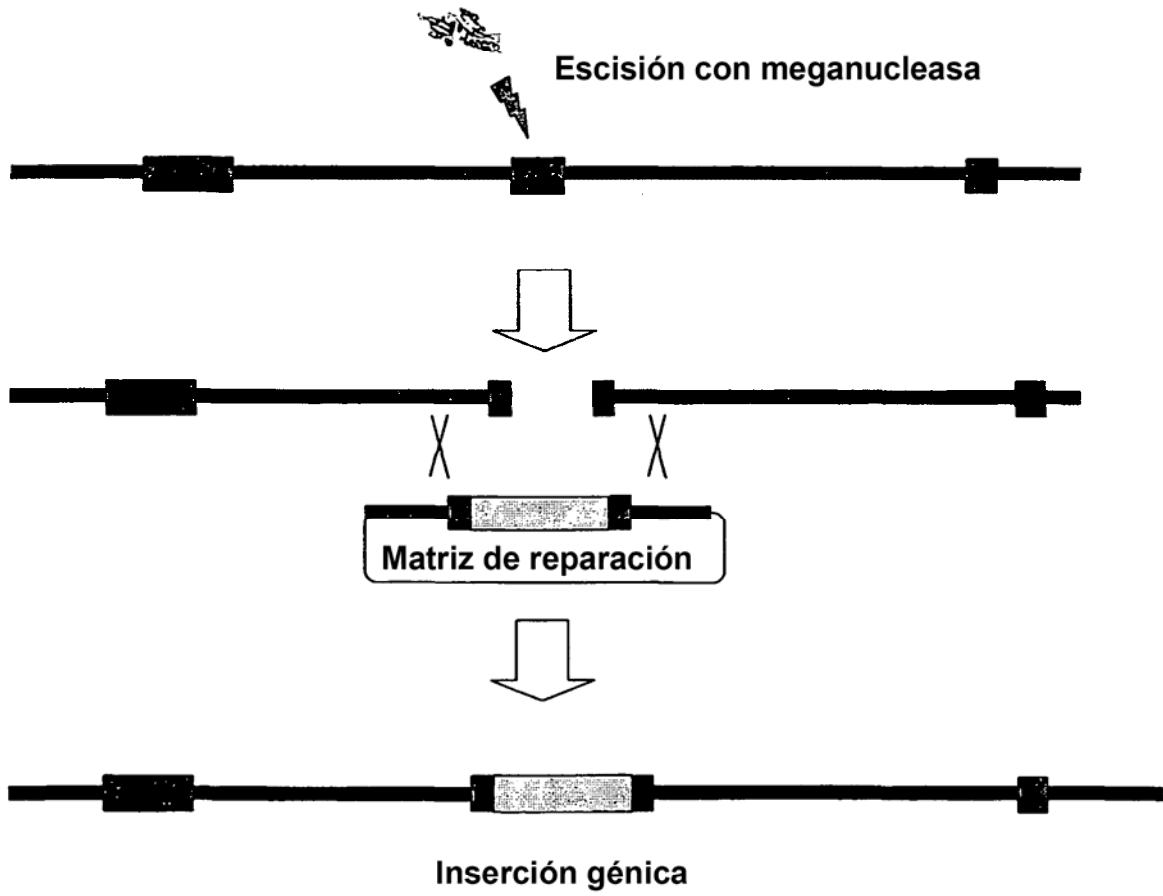


FIGURA 4

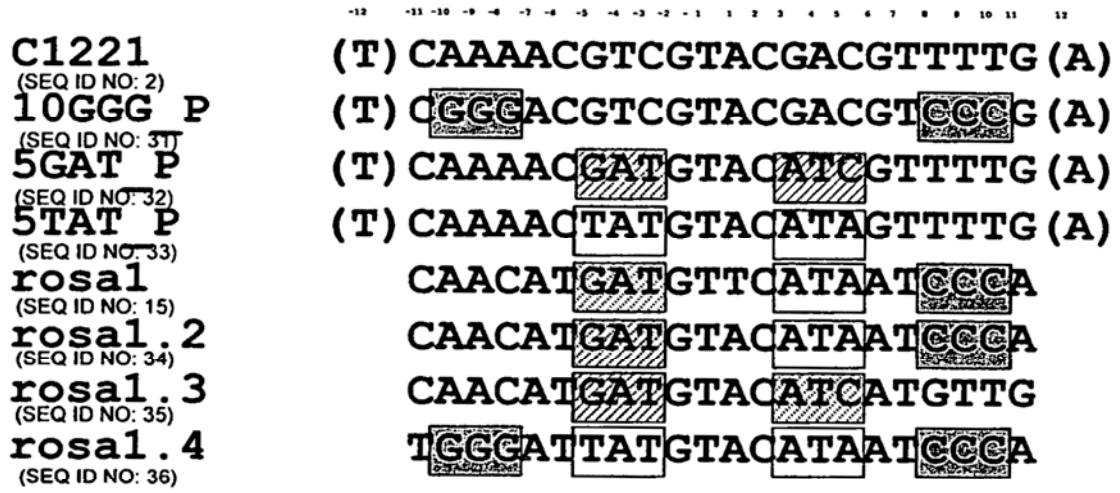


FIGURA 5

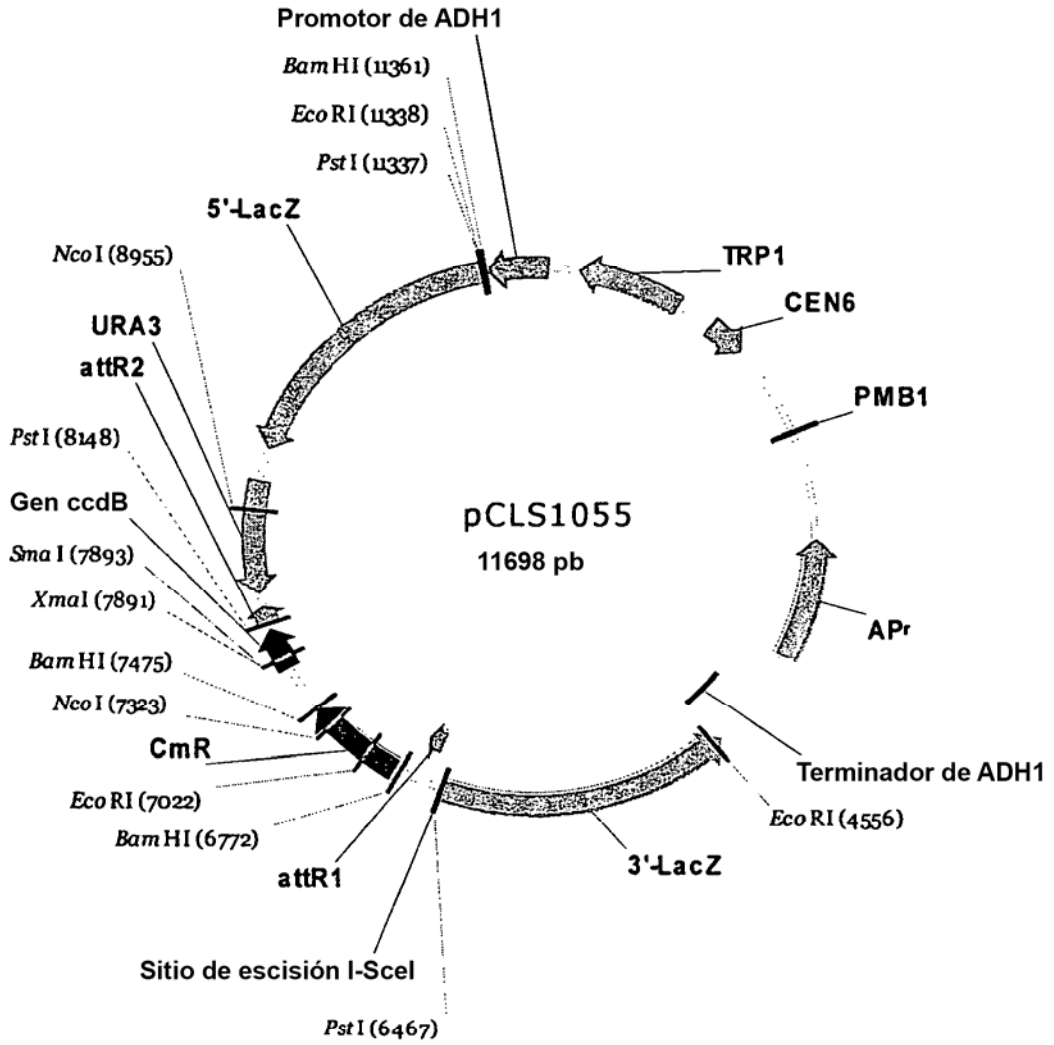


FIGURA 6

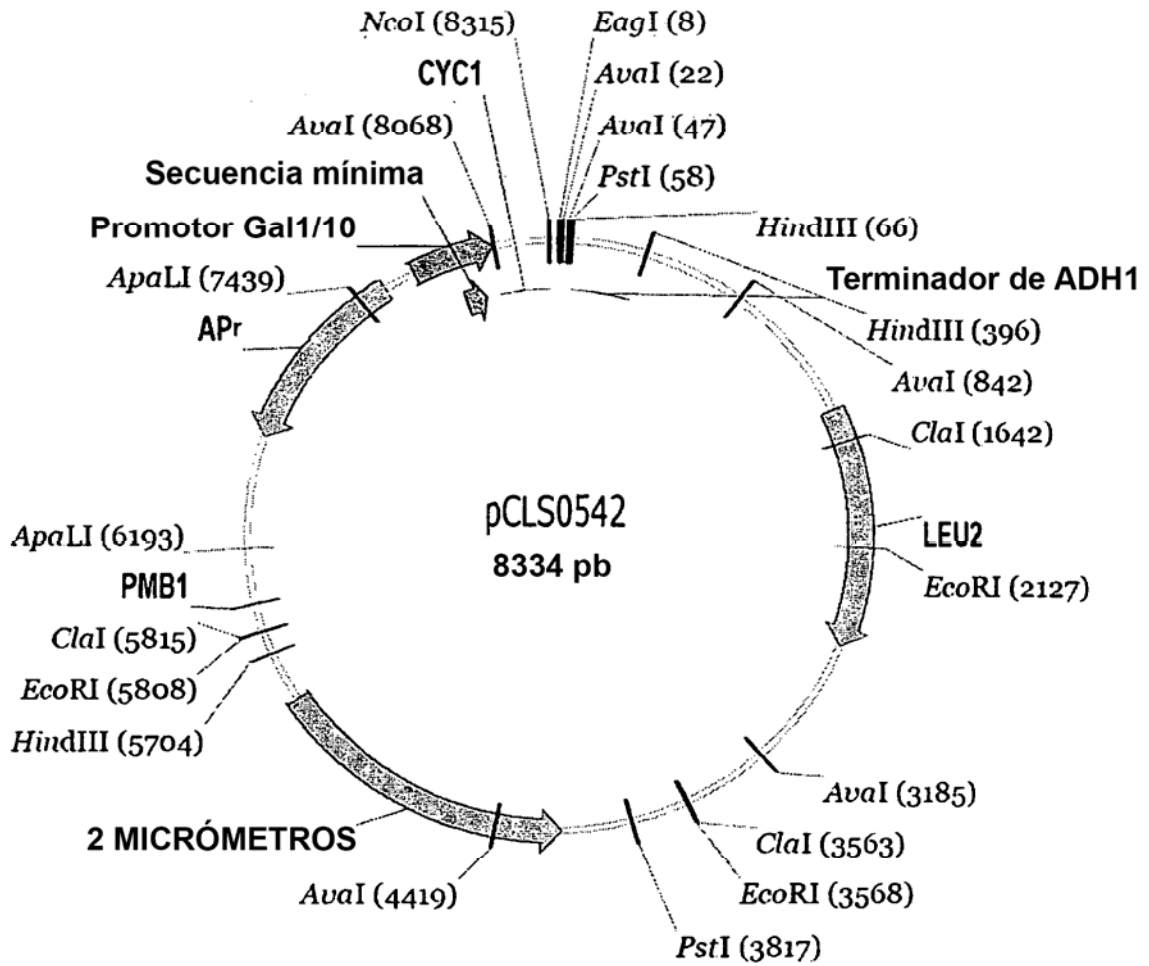


FIGURA 7

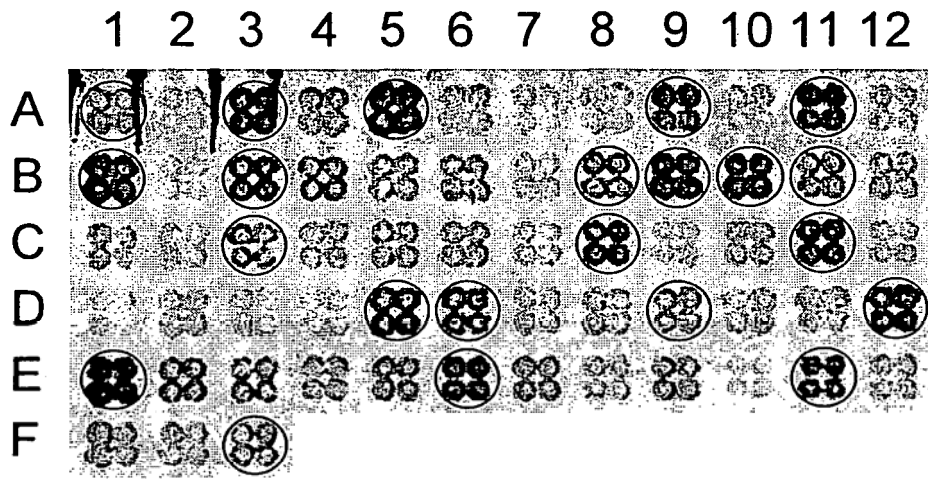


FIGURA 8

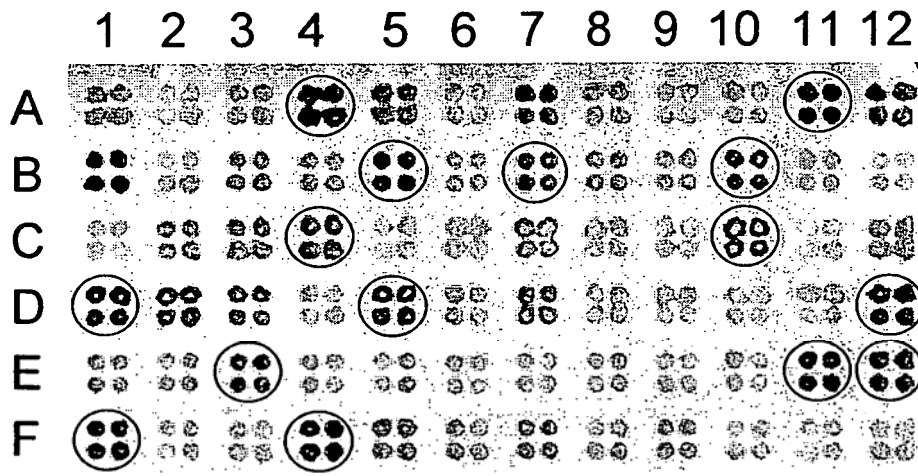


FIGURA 9

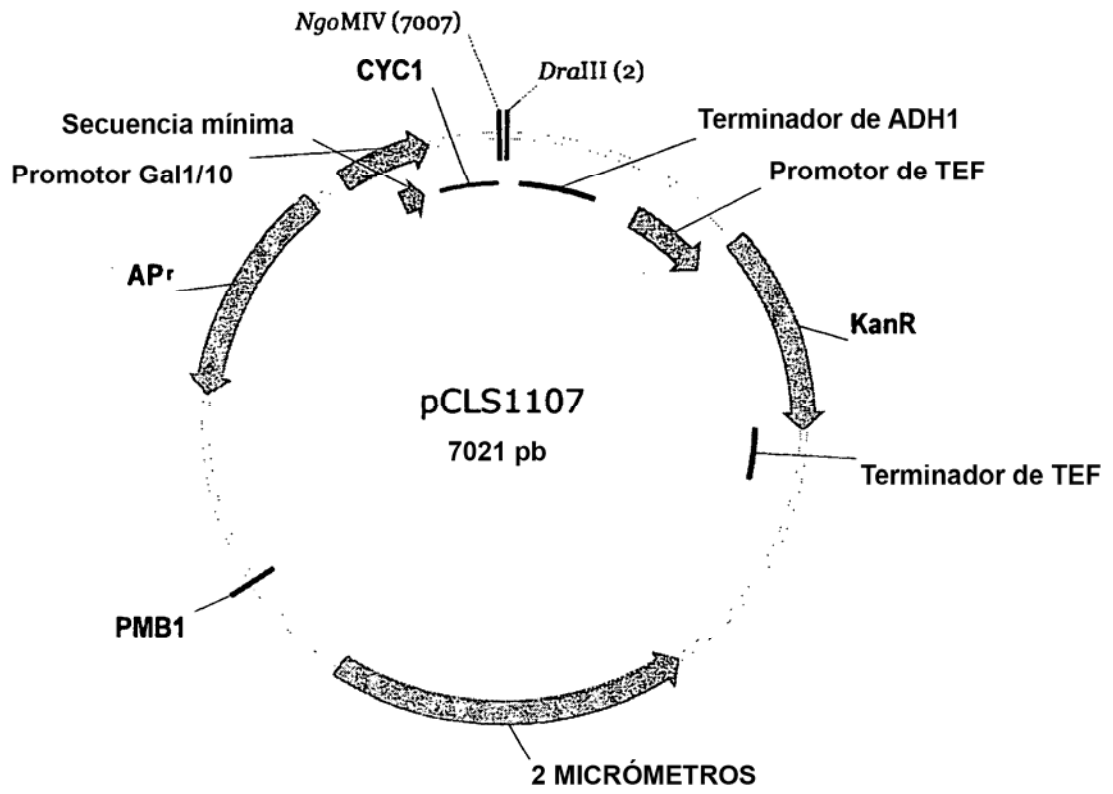


FIGURA 10

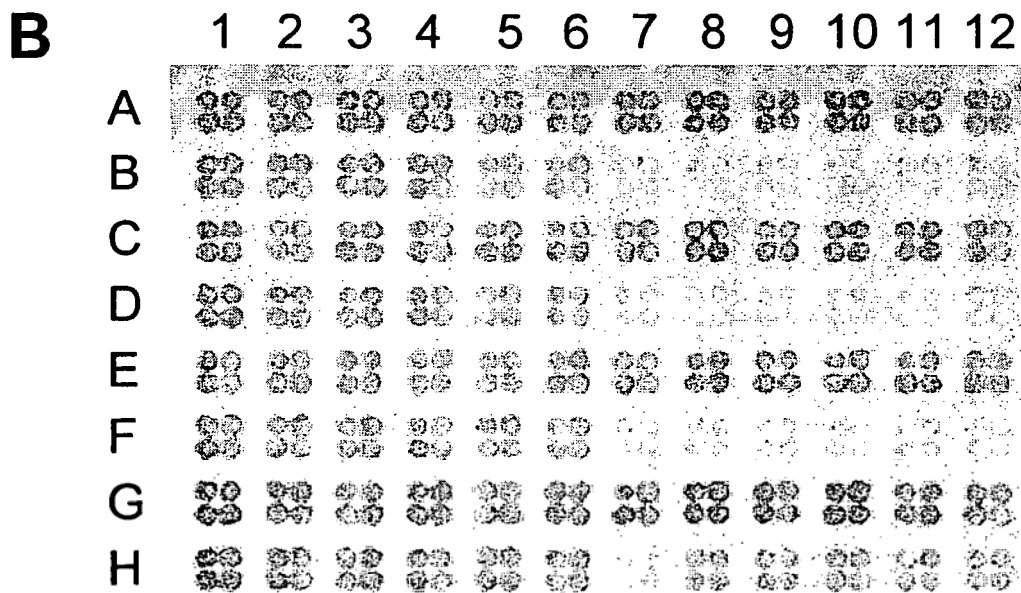
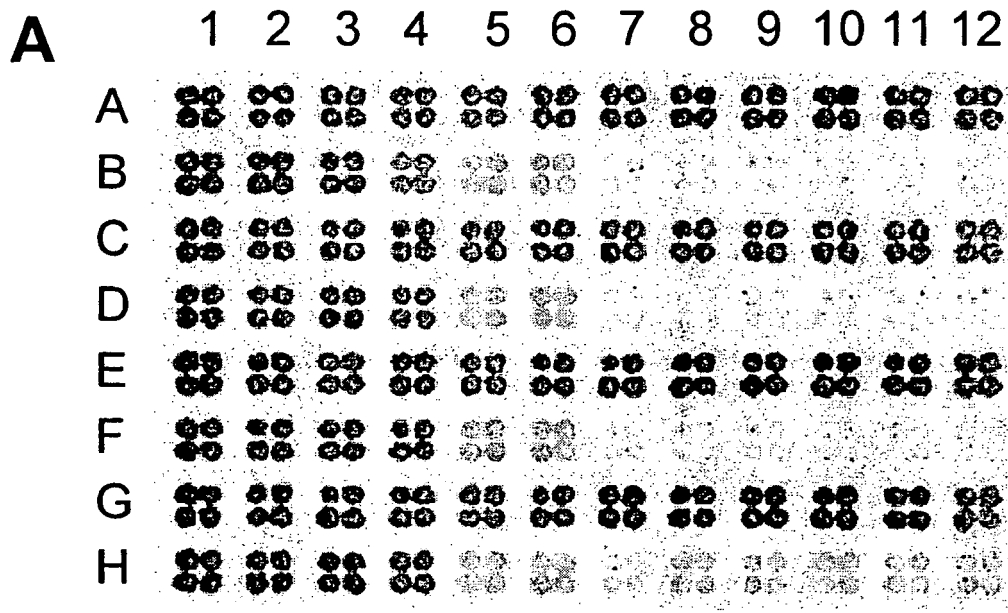


FIGURA 11

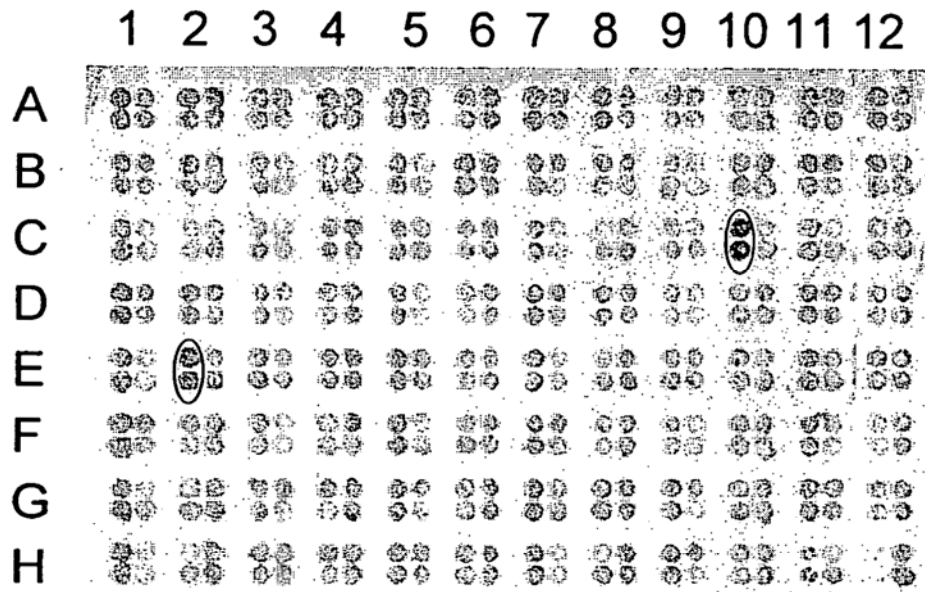


FIGURA 12

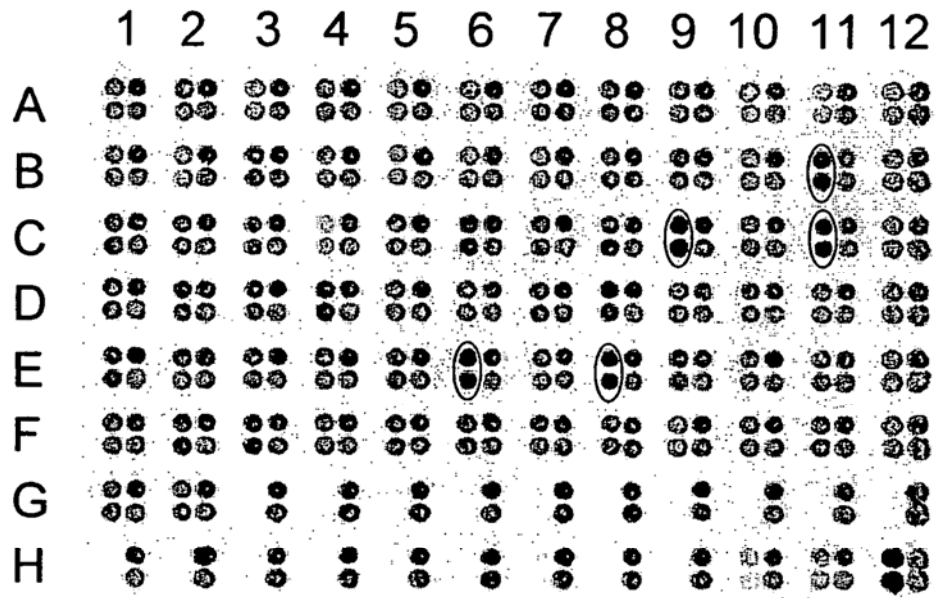


FIGURA 13

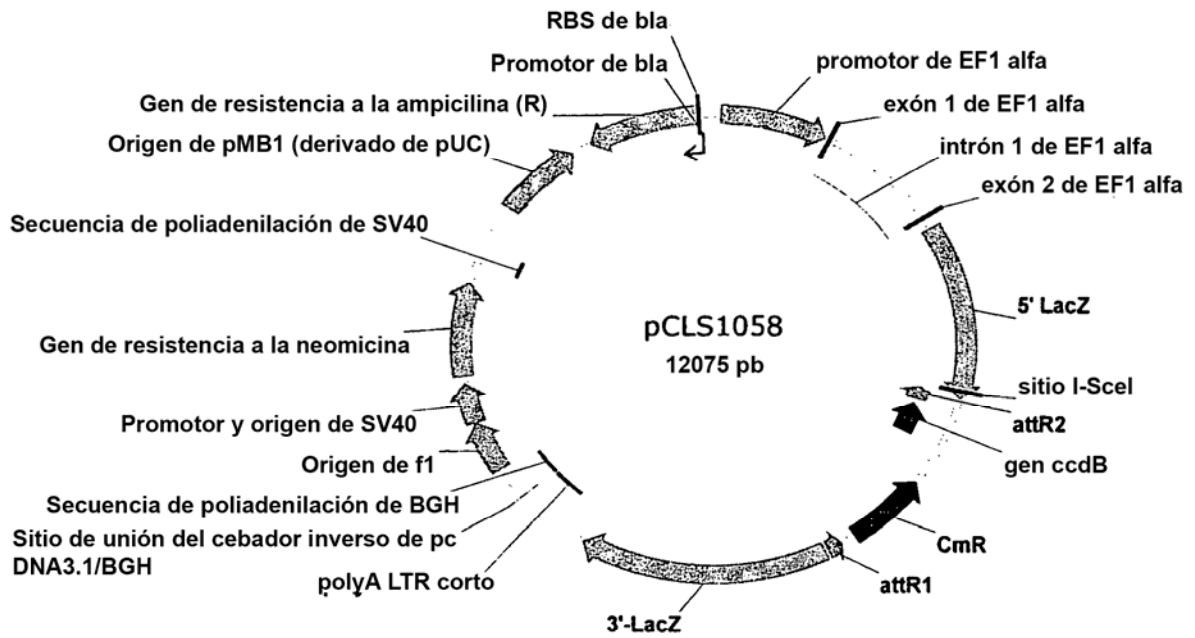


FIGURA 14

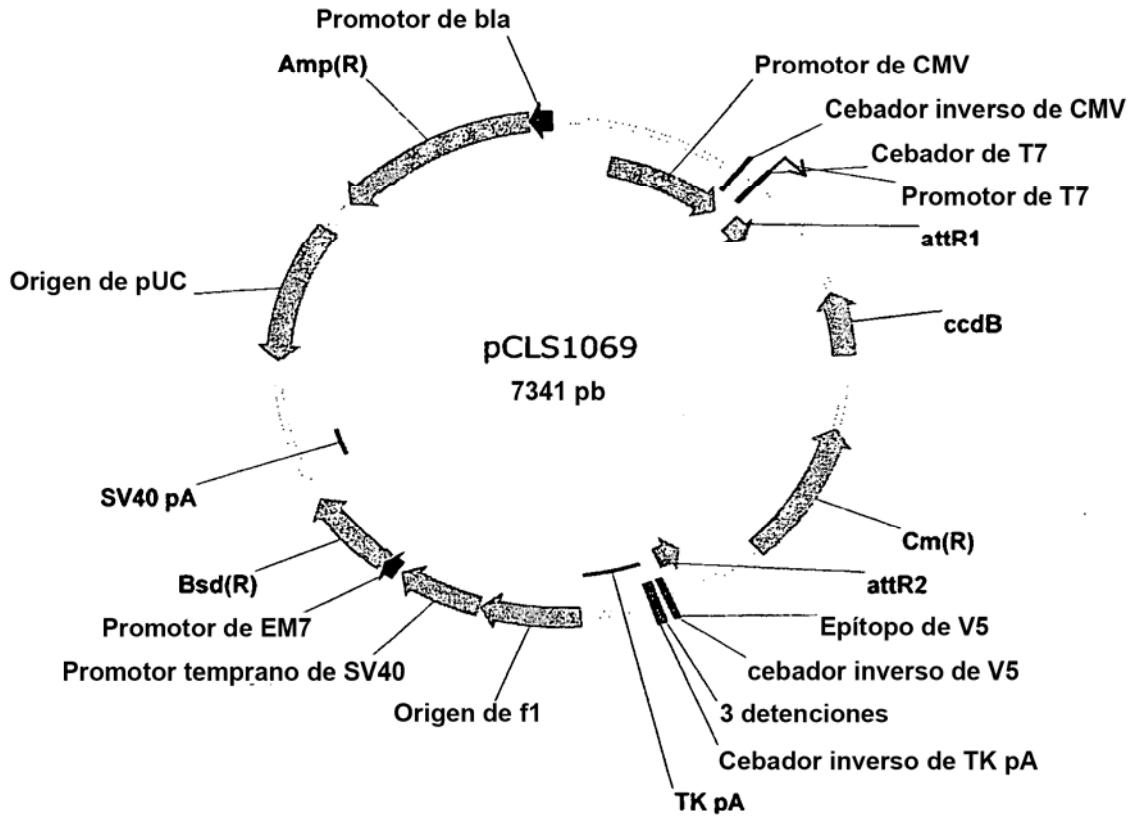


FIGURA 15

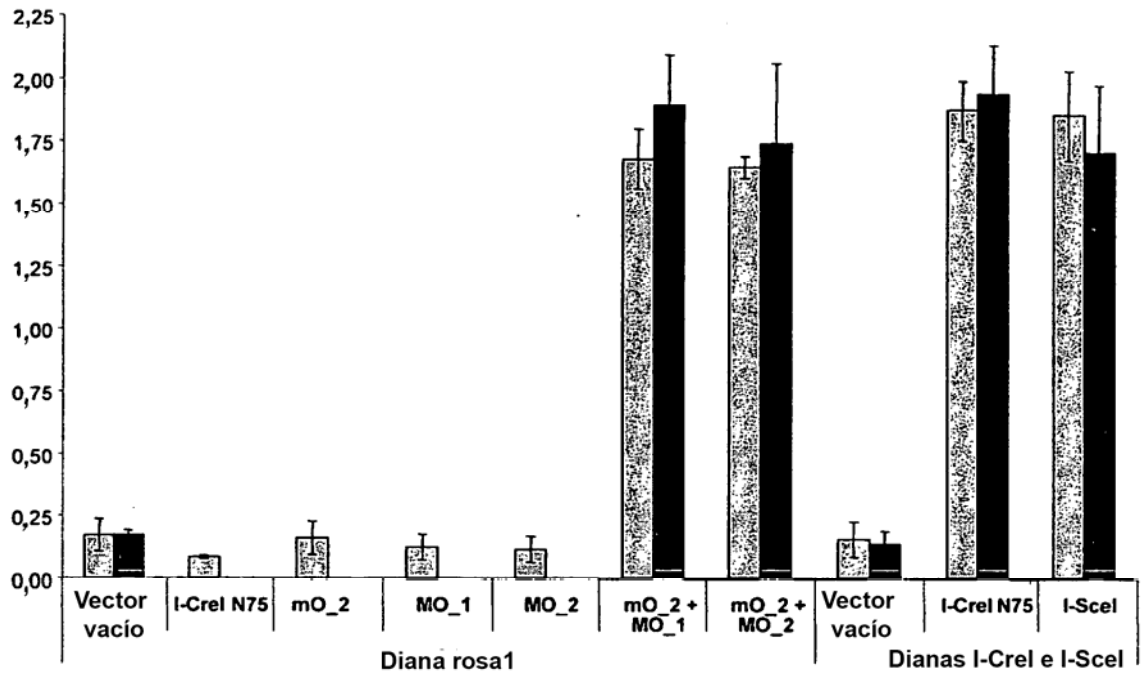


FIGURA 16

Secuencia diana (SEQ ID No. 5 a 30)	Posición de la diana	Variante del primer I-Crel (SEQ ID NO: 82 a 91, 51 y 92 a 106)	Variante del segundo I-Crel (SEQ ID NO: 107 a 116, 60, 4, 117 a 130)	Matriz mínima de reparación	
				Inicio	Fin
cgccccgccaacgaggcagg	3220	28K30H32S33S38Q40S44E68C70S75N77I	28K30D32S33R38T40S44K68E70S75D77R	3131	3330
ccgaccctctccggaggggg	3490	28K30N32N33G38Q40S44K68R70E75N77I	28K30N32T33Y38W40S44K68E70S75D77R	3401	3600
tgagcggcttgaccatggca	4717	28K30N32S33R38N40Q44N68R70S75R77D	28K30H32S33S38Q40S44A68R70S75Q77E	4628	4827
ccagccggctcacacatcaag	5584	28S30N32S33Y38R40K44D68Y70S75S77R	28K30N32S33C38A40S44Q68A70K75N77I	5495	5694
clactagatagccaggaata	5608	28K30N32S33C38Q40S44T68R70S75Y77I	28K30N32D33Y38C40S44D68Y70S75S77R	5519	5718
cagccctgattccaggggggg	5906	28K30N32T33C38Q40S44Q68T70N75N77I	28K30N32T33Y38W40S44K68R70E75N77I	5817	6016
taaacccataaaaatagtag	5992	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75R77Y	28K30N32S33R38A40Q44A68R70S75N77I	5903	6102
tcagattcttaaatagggaca	6409	28S30N32S33Y38R40K44T68N70N75N77I	28K30N32S33H38S40S44K68Y70S75Q77N	6320	6519
ttgatatacacaatagctg	7394	28A30N32S33S38R40K44N68Y70S75R77V	28K30N32T33C38Q40S44A68R70S75N77I	7305	7504
tgagccacgagaaatggctcca	8070	28K30N32D33H38Q40S44K68E70S75D77R	28K30N32D33H38Q40S44D68N70S75N77I	7981	8180
caacatgaltcataatoccca	8304	24V28K30N32S33Y38Q40S44Y68R70S75Q77I	28E30N32S33R38R40R44A68H70Q75N77I	8215	8414
ttaaatgltgctalgcaqtltg	8394	28K30R32D33Y38Q40S44Q68S70K75N77I	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70R75N77I	8305	8504
ttcccacaagttccaaataata	8583	28R30N32S33A38Y40Q44Q68Y70S75R77Q	28K30N32S33R38A40Q44Q68R70S75D77K	8494	8693
taacaccglttgittataata	8678	28R30D32S33Y38Q40S44Q68R70R75E77R	28K30N32D33Y38C40S44A68R70S75R77Y	8589	8788
tatacgtcttaagagattta	8749	28K30N32S33R38A40Q44Q68R70S75N77I	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75Y77R	8660	8859
tgtaatagcttaaaaaatlaa	9010	28K30N32S33R38A40Q44N68Y70S75R77V	28K30R32D33Y38Q40S44T68H70H75N77I	8921	9120
ttaaactatggtttgctctag	9280	28K30N32S33P38Q40Q44K68Y70S75Q77N	28K30N32A33C38Q40S44Q68Y70S75R77Q	9191	9390
ttgtacattgttaggagtlgga	9556	28A30N32S33S38R40K44Q68N70S75N77R	28K30N32N33G38Q40S44A68A70K75N77I	9467	9666
ttccactggctacacaattcca	10263	28K30H32S33S38Q40S44Y68R70S75D77V	28K30N32S33R38Q40Q44A68R70S75N77I	10174	10373
tcagatgatalacaaaagaatttag	11558	28K30N32D33H38Q40S44Q68T70N75N77I	28K30R32D33Y38Q40S44T68N70N75N77I	11469	11668
ccatccctataaaaagaaggtcaaa	12391	28K30N32R33D38Q40S44A68R70S75N77I	28K30N32S33S38R40H44Q68H70H75N77I	12302	12501
tttaactatlgcaaaaaggttaa	12414	28K30N32S33P38Q40Q44K68Y70S75Q77N	28R30N32S33A38Y40Q44T68H70H75N77I	12325	12524
tggtccaggttatagagtttag	12535	28Q30N32S33Y38R40K44A68R70S75E77R	28K30R32D33Y38Q40S44K68Y70S75Q77N	12446	12645
tttciacccttttccaaaatggcca	12791	28K30N32S33T38A40S44Q68H70H75N77I	28K30H32S33S38Q40S44Q68R70S75D77K	12702	12901
ttttctgtggagacaaaaggttaa	12904	28K30N32S33T38Q40T44Q68A70K75N77I	28R30N32S33A38Y40Q44Q68R70S75D77K	12815	13014
tgagatggcttcagcaataatag	12954	28K30N32D33H38Q40S44N68R70S75R77D	28K30N32D33Y38C40S44Q68R70S75D77K	12865	13064

FIGURA 17

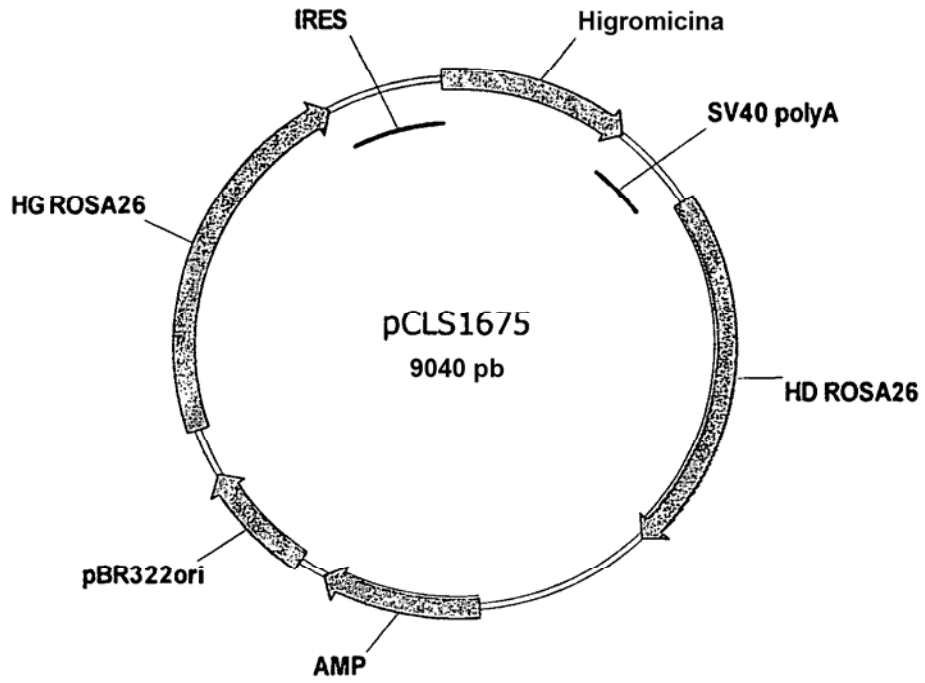


FIGURA 18

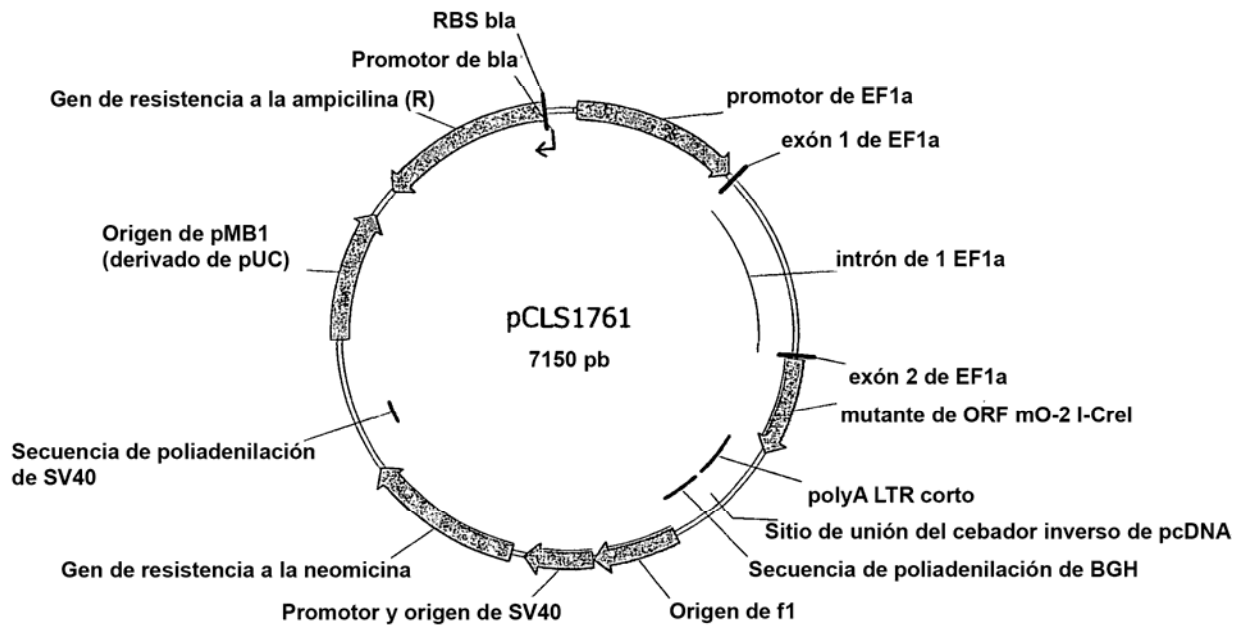


FIGURA 19

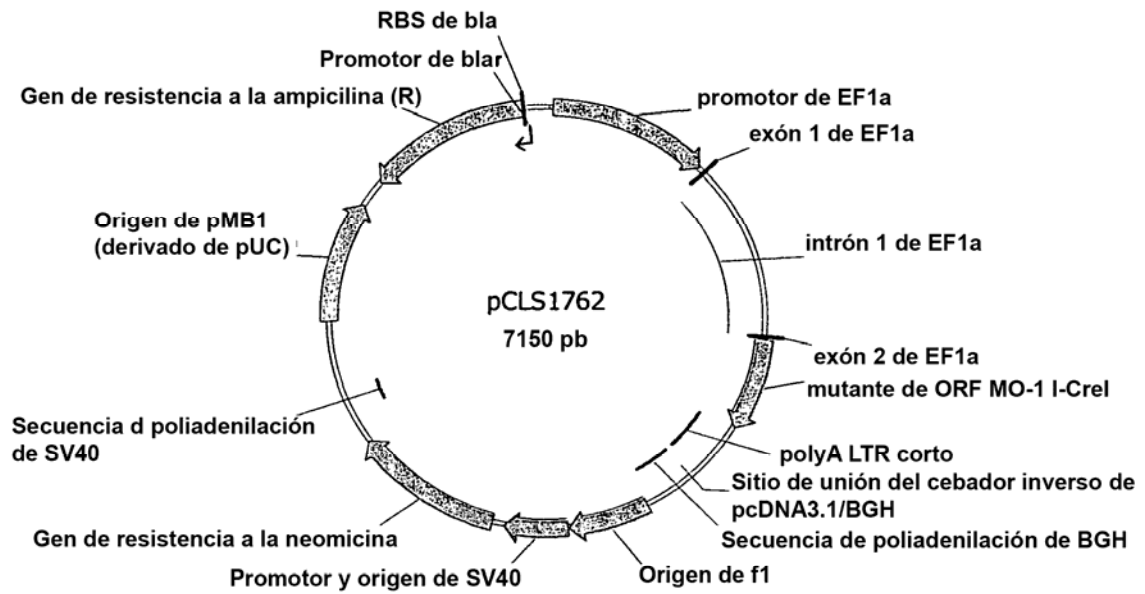


FIGURA 20

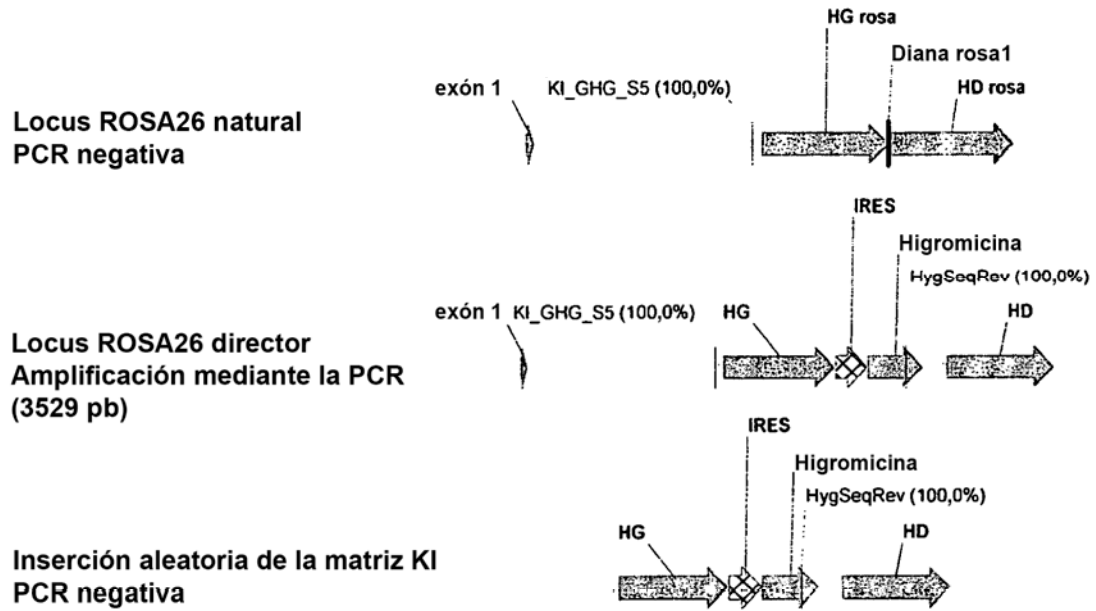


FIGURA 21