(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 465 996**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2007** **E 11164969 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014** **EP 2447279**

(54) Título: **Métodos y composiciones para la inactivación genética**

(30) Prioridad:

25.05.2006 US 808501 P
26.09.2006 US 847269 P
30.04.2007 US 926911 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2014

(73) Titular/es:

SANGAMO BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
Point Richmond Tech. Center II 501 Canal Boulevard, Suite A100
Richmond, CA 94804, US

(72) Inventor/es:

ANDO, DALE;
HOLMES, MICHAEL CHRISTOPHER y
LEE, GARY KA LEONG

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 465 996 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

Métodos y composiciones para la inactivación genética

CAMPO TÉCNICO

La presente descripción pertenece a los campos de ingeniería genómica y de polipéptidos y recombinación homóloga.

ANTECEDENTES

Se han descrito diversos métodos y composiciones para la escisión dirigida de ADN genómico. Tales sucesos de escisión dirigida se pueden usar, por ejemplo, para inducir la mutagénesis dirigida, inducir deleciones dirigidas de secuencias de ADN celular, y facilitar la recombinación dirigida a un locus cromosómico predeterminado. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº 20030232410; Nº 20050208489; Nº 20050026157; Nº 20050064474; Nº 20060188987; y la Publicación de Patente Internacional WO 07/014275.

El CCR5, un receptor de quimioquina con 7 dominios transmembrana, es el co-receptor principal para la entrada del VIH-1 en las células T CD4 (Samson et al. (1996) Nature 382:722-725; Deng et al. (1996) Nature 381:661-666; Alkhatib (1996) Science 272:1955-1958). Desde el descubrimiento de que la deleción Δ32 homocigota del gen CCR5 se asocia a resistencia al VIH-1, el CCR5 se ha estudiado intensivamente como una diana principal para la terapia de VIH. Aunque se ha mostrado que las moléculas pequeñas inducen la interiorización de receptores o bloquean la interacción CCR5-VIH (Fatkenheuer et al. (2005) Nat. Med. 11:1170-1172), estas estrategias de moléculas pequeñas han dado como resultado el desarrollo de resistencia a través de la selección de mutantes de escape que de forma interesante continúan usando el CCR5 para entrada viral (Kuhmann et al. (2004) J. Virol. 78:2790-2807). De forma análoga, hasta la fecha las estrategias basadas en anticuerpos intracelulares, ARNi y antisentido, solo han bloqueado parcialmente la expresión de CCR5.

Por lo tanto, aún existe una necesidad de composiciones que supriman completamente el CCR5 para la penetración fenotípica y la resistencia a largo plazo a la infección con VIH.

Feng Y. et al. informan que ribozimas en horquilla son capaces de reducir el mARN de CCR5 celular y la proteína CCR5 de la superficie celular.

Benkirane M. et al. informan que A37 de CCR5 mutante se une al CCR5, reteniendo de este modo al CCR5 en el retículo endoplasmático y dando como resultado una expresión reducida de la superficie celular.

En el estudio de Yang A-G et al. ellos imitan la resistencia natural de los individuos con CCR5 defectuoso mediante el diseño de una estrategia para suprimir fenotípicamente el CCR5.

Arnould S. et al. describen una estrategia en la que derivan cientos de nuevas proteínas a partir de I-Cre1, una endonucleasa de alojamiento de la familia LAGLIDADG.

SUMARIO

La presente invención se define mediante el presente conjunto de reivindicaciones.

En la presente memoria se describen composiciones y métodos para la inactivación parcial o completa de un gen diana. También se describen métodos para preparar y usar estas composiciones (reactivos), por ejemplo para inactivar un gen en una célula con fines terapéuticos y/o para producir líneas celulares en las que está inactivado un gen diana.

En un aspecto, en la presente memoria se proporcionan nucleasas de dedos de cinc (ZFN) que tienen sitios diana en el gen CCR-5 humano. En algunas realizaciones, la escisión dentro del gen CCR-5 con estas nucleasas da como resultado una disrrupción permanente (por ejemplo, mutación) del gen CCR5. En determinadas realizaciones, el dominio o dominios de dedos de cinc se somete o se someten a ingeniería genética para unirse a un sitio diana corriente arriba de la mutación Δ32 del CCR5 de origen natural. Las proteínas de dedos de cinc pueden incluir 1, 2, 3,4, 5, 6 o más dedos de cinc, teniendo cada dedo de cinc una hélice de reconocimiento que se une a un subsitio diana en el gen diana. En determinadas realizaciones, el gen diana es CCR-5 y las proteínas de dedos de cinc comprenden 4 dedos (denominados F1, F2, F3 y F4 y ordenados de F1 a F4 desde el extremo N al extremo C) y comprenden la secuencia de aminoácidos de las regiones de reconocimiento que se muestran en la reivindicación 1.

Por lo tanto, en determinados aspectos, en la presente memoria se proporciona una proteína que comprende un dominio de unión a ADN de proteína de dedos de cinc modificado por ingeniería genética, en el que el dominio de unión a ADN comprende cuatro regiones de reconocimiento de dedos de cinc ordenadas de F1 a F4 desde el extremo N al extremo C, y en la que F1, F2, F3, y F4 comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos: F1: RSDNLSV (SEC ID Nº: 10); F2: QKINLQV (SEC ID Nº:17); F3: RSDVLSE (SEC ID Nº:12); y F4: QRNHRTT (SEC ID Nº:13).

Cualquiera de las proteínas que se describen en la presente memoria puede comprender adicionalmente un dominio de escisión y/o un semidominio de escisión (por ejemplo, un semidominio de escisión FokI de tipo salvaje o modificado

por ingeniería genética). Por lo tanto, en cualquiera de las ZFN que se describen en la presente memoria, el dominio de nucleasa puede comprender un dominio de nucleasa de tipo salvaje o semidominio de nucleasa (por ejemplo, un semidominio de escisión de FokI). En otras realizaciones, las ZFN comprenden dominios o semidominios de nucleasa sometidos a ingeniería genética, por ejemplo semidominios de escisión de FokI sometidos a ingeniería genética, que forman heterodímeros forzados. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº 60/808.486, presentada el 25 de mayo de 2006.

En otro aspecto, la descripción proporciona un polinucleótido que codifica cualquiera de las proteínas que se describen en la presente memoria. Cualquiera de los polinucleótidos que se describen en la presente memoria también pueden comprender secuencias (secuencias dadoras o parches) para la inserción dirigida en el gen diana (por ejemplo, CCR-5).

En otro aspecto más, se proporciona un vector de administración del gen que comprende cualquiera de los polinucleótidos que se describen en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el vector es un vector de adenovirus (por ejemplo, un vector Ad5/35). Por lo tanto, en la presente memoria también se proporcionan vectores de adenovirus (Ad) que comprenden una secuencia que codifica al menos una nucleasa de dedos de cinc (ZFN) y/o una secuencia dadora para la integración dirigida en un gen diana. En determinadas realizaciones, el vector Ad es un vector Ad quimérico, por ejemplo un vector Ad5/35. En realizaciones adicionales, el gen diana es el gen CCR-5 humano. Los vectores que se describen en la presente memoria pueden comprender secuencias dadoras. En determinadas realizaciones, un solo vector comprende secuencias que codifican una o más ZFN y la secuencia o secuencias dadoras. En otras realizaciones, la secuencia o secuencias dadoras están contenidas en un primer vector y las secuencias codifican ZFN están presentes en un segundo vector.

Las secuencias de ZFN de los vectores (por ejemplo, vectores de Ad) que se describen en la presente memoria por lo general codifican una fusión de una proteína de dedos de cinc (ZFP) y un dominio de escisión o un semidominio de escisión (es decir, un dominio de nucleasa). La porción de proteína de dedos de cinc de la ZFN se somete a ingeniería genética para que se una a un sitio diana en el gen diana. Las proteínas de dedos de cinc pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dedos de cinc, teniendo cada dedo de cinc una hélice de reconocimiento que se une a un subsitio diana en el gen diana. En determinadas realizaciones, el gen diana es CCR-5 y las proteínas de dedos de cinc comprenden 4 dedos (denominados F1, F2, F3 y F4) y comprenden la secuencia de aminoácidos de las regiones de reconocimiento que se muestran en la Tabla 1.

En cualquiera de los polinucleótidos o proteínas que se describen en la presente memoria, el dominio de escisión puede comprender al menos un dominio de escisión o al menos un semidominio de escisión. En determinadas realizaciones, el dominio de escisión o semidominio de escisión es un dominio de escisión de tipo salvaje (por ejemplo, un semidominio de escisión FokI de tipo salvaje). En otras realizaciones, el dominio de escisión o semidominio de escisión está modificado por ingeniaría genética.

En otro aspecto más, la descripción proporciona una célula aislada que comprende cualquiera de las proteínas, polinucleótidos y/o vectores que se describen en la presente memoria. En determinadas realizaciones, la célula se selecciona entre el grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula T (por ejemplo, célula T $CD4^+$), un macrófago, una célula dendrítica y una célula que presenta antígenos. En otro aspecto, también se describen células que comprenden uno o más vectores de Ad como los que se describen en la presente memoria (vectores de Ad-ZFN, Ad-ZFN-dador y/o Ad-dador). Las células incluyen, por ejemplo, Células Mononucleares de Sangre periférica (PBMC), macrófagos, células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas (por ejemplo, células $CD34^+$), células T (por ejemplo, células $CD4^+$), células dendríticas o células que presentan antígenos; o una línea celular tal como K562 (leucemia mielógena crónica), HEK293 (riñón embrionario), PM-1 ($CD4^+$ células T), THP-1 (leucemia monocítica) o GHOST (osteosarcoma).

En otro aspecto, en la presente memoria se describen métodos para inactivar un gen diana en una célula mediante la introducción de una o más proteínas, polinucleótidos y/o vectores en la célula tal como se describe en la presente memoria. En cualquiera de los métodos que se describen en la presente memoria, las ZFN pueden inducir mutagénesis dirigida, deleciones dirigidas de secuencias de ADN celular, y/o facilitar la recombinación dirigida a un locus cromosómico predeterminado. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, las ZFN suprimen uno o más nucleótidos del gen diana. En otras realizaciones, una secuencia genómica en el gen diana se reemplaza, por ejemplo, usando un Ad-ZFN tal como se describe en la presente memoria y una secuencia "dadora" que se inserta en el gen después de la escisión dirigida con la ZFN. La secuencia dadora puede estar presente en el vector Ad-ZFN, presente en un vector Ad separado o, como alternativa, se puede introducir en la célula usando un mecanismo de administración de ácidos nucleicos diferente. En determinadas realizaciones, el gen diana un gen CCR-5.

En otro aspecto, se proporcionan métodos de uso de las proteínas de dedos de cinc y fusiones de las mismas para mutar el gen CCR-5 y/o inactivar el funcionamiento de CCR-5 en una célula o línea celular. Por lo tanto, se proporciona un método para inactivar un gen CCR-5 en una célula humana, método que comprende administrar a la célula cualquiera de las proteínas o polinucleótidos que se describen en la presente memoria.

En otro aspecto más, la descripción proporciona un método para tratar o prevenir la infección con VIH en un sujeto, método que comprende: (a) introducir, en una célula, un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en el

que el primer polipéptido comprende: (i) un dominio de unión a ADN de dedos de cinc que está modificado por ingeniría genética para unirse a un primer sitio diana en el gen CCR5; y (ii) un dominio de escisión; en condiciones de modo que el polipéptido se exprese en la célula, mediante el cual el polipéptido se une al sitio diana y escinde el gen CCR5; y (b) introducir la célula en el sujeto. En determinadas realizaciones, la célula se selecciona entre el grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula T, un macrófago, una célula dendrítica y una célula que presenta antígenos. El ácido nucleico puede comprender cualquiera de los polinucleótidos que se describen en la presente memoria. En cualquiera de los métodos, el primer ácido nucleico puede codificar adicionalmente un segundo polipéptido, en el que el segundo polipéptido comprende: (i) un dominio de unión a ADN de dedos de cinc que está modificado por ingeniería genética para unirse a un segundo sitio diana en el gen CCR5; y (ii) un dominio de escisión; de modo que el segundo polipéptido se exprese en la célula, mediante el cual el primer y segundo polipéptidos se unen a sus respectivos sitios diana y escinden el gen CCR5. De forma análoga, cualquiera de estos métodos puede comprender adicionalmente la etapa de introducir en la célula un segundo ácido nucleico, en el que el segundo ácido nucleico contiene dos regiones de homología con el gen CCR-5, flanqueando una secuencia que no es homóloga con el gen CCR-5.

En cualquiera de los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria, la célula puede ser, por ejemplo, una célula madre hematopoyética (por ejemplo, una célula $CD34^+$), una célula T (por ejemplo, una célula $CD4^+$), un macrófago, una célula dendrítica o una célula que presenta antígenos; o una línea celular tal como K562 (leucemia mielógena crónica), HEK293 (riñón embrionario), PM-1 (célula T $CD4^+$), THP-1 (leucemia monocítica) o GHOST(osteosarcoma).

Además, cualquiera de los métodos que se describen en la presente memoria se puede poner en práctica in vitro, in vivo y/o ex vivo. En determinadas realizaciones, los métodos se ponen en práctica ex vivo, por ejemplo para modificar las PBMC, por ejemplo, linfocitos T, para hacerlas resistentes a la infección con VIH mediante la disrrupción de CCR-5.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra diagramas esquemáticos de los vectores Ad5/35 en los que se suprimen las secuencias que codifican E1 y se reemplazan con un casete de expresión del transgén (por ejemplo, que codifica GFP, las ZFN y/o secuencias dadoras).

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos del semidominio de escisión FokI de tipo salvaje (SEC ID Nº: 33). Las posiciones en las que la secuencia se puede alterar (486, 490, 499 y 538) para formar semidominios de escisión modificados por ingeniería genética están en negrita y subrayados.

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de un semidominio de escisión modificado por ingeniería genética a modo de ejemplo (SEC ID Nº: 34) que forma un heterodímero con el semidominio de escisión modificado por ingeniería genética que se muestra en la Figura 4. Las posiciones en las que la secuencia se alteró en comparación con el tipo salvaje (que corresponden con los restos de aminoácidos 486 y 499) están subrayadas.

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de otro semidominio de escisión modificado por ingeniería genética a modo de ejemplo (SEC ID Nº: 35) que se puede usar en las ZFN que se describen en la presente memoria. Las posiciones en las que la secuencia se alteró en comparación con el tipo salvaje (que corresponden con los restos de aminoácidos 490 y 538) están subrayadas.

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos de una porción de un gen CCR-5 (SEC ID Nº: 36) usada para preparar una secuencia dadora (parche) que tiene brazos de homología de CCR-5. Véase también el Ejemplo 1.

La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia "parche" de 47 pb (SEC ID Nº: 37) usada para inserción en el gen CCR-5. Véase también el Ejemplo 1.

La Figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos de la secuencia dadora (SEC ID Nº: 38) usada para inserción dirigida del gen CCR-5. El brazo de homología con CCR-5 en la posición 5' corresponde a los nucleótidos 1-471; la secuencia "parche" para inserción dirigida en CCR-5 está subrayada y corresponde a los nucleótidos 472-518; y el brazo de homología con CCR-5 en la posición 3' corresponde a los nucleótidos 519-1928. Véase también el Ejemplo 1.

La Figura 8 representa secuencias de una porción del gen CCR-5 en células transducidas con Ad5/35-ZFN. El tipo celular se muestra en la Columna 3. Las bases que faltan en comparación con la secuencia de CCR-5 de tipo salvaje se indican con un punto.

La Figura 9 representa el análisis de secuencias de una porción del gen CCR-5 en células transducidas con un Ad5/35-ZFN. El tipo celular se indica en la Columna 3. Los genomas modificados que se muestran en esta figura tenían diversas inserciones pequeñas (bases subrayadas) en el gen CCR-5 y, en un caso, una deleción, indicada con un punto.

La Figura 10 representa el análisis de secuencias de una porción del gen CCR-5 en células transducidas con un Ad5/35-ZFN. Los genomas modificados que se muestran en esta figura tenían diversas inserciones más largas (bases subrayadas) en el gen CCR-5.

La Figura 11, paneles A y B, representan la evolución en el tiempo del porcentaje de celulas T de CCR-5 modificadas en celulas T transducidas con Ad5/35 ZFN215 (Panel A) y con Ad5/35 ZFN 224 (Panel B), después de la estimulación con VIH de tipo salvaje o una infección simulada.

La Figura 12 es un esquema que representa los sitios diana en el gen CCR5 para los pares CCR5-ZFN 215 y 224.

La Figura 13 muestra niveles de disrrupción del gen diana en células GHOST-CCR5 transducidas con un vector Ad5/35 que codifica las ZFN indicadas que se dirigen a CCR5 o HL2-R□. Véase el Ejemplo 14. Los productos que migran más abajo (indicados con flechas) son una medida directa de la disrrupción del gen mediada por ZFN. "NTD" indica células no transducidas.

La Figura 14, paneles A y B, son gráficos que representan medidas de citometría de flujo de expresión de CCR5 en la superficie (Figura 14A) o de expresión de GFP (Figura 14B) de células GHOST-CCR5 transducidas con un vector Ad5/35 que codifica ZFN 215 o ZFN 224. La Figura 14A representa la expresión disminuida de CCR5 en la superficie tal como se mide con citometría de flujo en células GHOST-CCR5 transducidas con el vector indicado. NTD se refiere a no transducidas; IL2R se refiere a células que contienen ZFN dirigidas a IL2R□; 215 y 224 se refiere a las células que contienen los pares de ZFN 215 o 224, respectivamente. "MFI" indica intensidad de fluorescencia media. La Figura 14B muestra la protección desde la estimulación con VIH-1_{BAL} tal como se mide con citometría de flujo 48 horas después de la estimulación con VIH de células modificadas CCR5-ZFN215 y CCCR-ZFN224 en comparación con IL-2r□ ZFN y células GHOST-CCR de control. La fluorescencia de GFP indica entrada de VIH y se representa como un porcentaje medio infectado con respecto a un control positivo. Los gráficos de barras representan promedios de triplicados.

La Figura 15 muestra el nivel de alelos de CCR interrumpidos con ZFN, determinado con el ensayo de Cel-1, los días 3, 10, 21,31, 42 y 52 después de la estimulación con VIH-1 con VIH-1_{BAL} con tropismo de R5 o después de infección simulada con VIH. Las células con alelos de CCR5 interrumpidos permanecieron a niveles estables en cultivos infectados de forma simulada, pero se enriquecieron en presencia de VIH-1.

La Figura 16 muestra secuencias de alelos de CCR5 en células PM1 tratadas con ZFN el día 52 después de la estimulación con VIH.

La Figura 17 muestra niveles de alelos de CCR5 interrumpidos con ZFN en linfocitos T CD4 primarios de un donante sano anónimo transducido con un vector Ad5/35 que expresa CCR5-ZFN215, CCR5-ZFN224, o GFP; a unas MDI de 30 o 100, tal como se determina con el ensayo de nucleasa Surveyor™. Las bandas que corresponden a los alelos de CCR5 interrumpidos indican con flechas. El porcentaje de alelos de CCR5 interrumpidos se indica debajo de cada línea.

La Figura 18 representa la velocidad de duplicación de la población de células T CD4 transducidas con vectores Ad5/35 cuyos genomas codificaban CCR5-ZFN o GFP (células de control). Las células se transdujeron con los vectores Ad5/35 el día 0. La línea que conecta puntos mostrados mediante triángulos representa velocidades de duplicación de células no transducidas; la línea que conecta puntos mostrados mediante cuadrados representa velocidades de duplicación de células traslúcidas con ZFN 224 de CCR5 en Ad5/35; y la línea que conecta puntos mostrados mediante diamantes representa las velocidades de duplicación de células transducidas con Ad5/35 en GFP.

La Figura 19 representa el enriquecimiento de alelos de CCR5 interrumpidos con ZFN en células T $CD4^+$ transducidas con ZFN 215en el tiempo después de estimulación in vitro con VIH-1_{USI} con tropismo de CCR5, en comparación con cultivos infectados de forma simulada. La disrrupción de CCR5 se midió usando el ensayo de nucleasa Surveyor® (Cel-1). La línea que une los cuadrados representa células infectadas con VIH y la línea que une los triángulos representa células infectadas de forma simulada. Se obtuvo un nivel de partida de un ~10% de alelos de CCR5 interrumpidos con ZFN mezclando células T CD4 transducidas con Ad5/35 con células T CD4 sin modificar (1:3).

La Figura 20 es un gráfico que representa focos intranucleares medios de inmunotinción de P53BP1 en Linfocitos $CD4^+$ primarios, determinados 24 horas después de la transducción con los vectores Ad5/35 que expresan los pares de ZFN de CCR5 215 o 224. Los focos intranucleares se contaron a partir de un mínimo de 100 núcleos por condición usando el software Volocity™. Además se muestran los resultados obtenidos a partir de células de control positivo tratadas con etopósido y células de control negativo (no transducidas).

La Figura 21 es un gráfico que representa las frecuencias de disrrupción de CCR5 in vivo, medidas usando el ensayo de nucleasa Surveyor® (Cel-1), en células CD4 aisladas el día 40 de los bazos de control (infección simulada) o de ratones infectados por VIH. Los resultados para cada grupo se promediaron y se analizaron usando un ensayo T para muestras no relacionadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente memoria se describen nucleasas de dedos de cinc (ZFN) que se dirigen al gen CCR5 humano (CCR5-ZFN). Estas ZFN generan eficazmente una ruptura bicatenaria (DSB), por ejemplo en un sitio predeterminado en la región codificante de CCR5. El sitio puede estar, por ejemplo, corriente arriba de la mutación Δ32 de CCR5. La

expresión transitoria de las ZFN que se describen en la presente memoria promueve la disrrupción altamente eficaz y permanente del gen CCR5 en células humanas, incluyendo linfocitos T CD4 humanos primarios, confiere una protección robusta frente a la infección con VIH-1 y proporciona una ventaja selectiva potente para estas células tanto in vitro como in vivo.

En particular, la administración transitoria de los CCR5-ZFN da como resultado la disrrupción permanente del gen CCR5 humano con eficacias que superan un 50% en células T CD4 humanas primarias. La acción de CCR5-ZFN es altamente específica y bien tolerada, tal como se desvela con (i) examen de las características de estabilidad, crecimiento e injerto de subpoblaciones modificadas con ZFN incluso en ausencia de selección, (ii) tinción directa de focos 53BP1 inducidos por DSB intranucleares, y (iii) ensayos de escisión en los supuestos sitios genómicos que no son diana con la mayor similitud. Además, en presencia de una presión selectiva en forma de una infección activa por VIH-1, la modificación por ZFN confiere una ventaja profunda de supervivencia durante los ensayos de estimulación con VIH-1 con tropismo CCR5 (pero no con tropismo CXCR4) in vitro a niveles comparables con los obtenidos con células CCR5Δ32 homocigóticas.

La modificación del genoma mediada por CCR5-ZFN tal como se describe en la presente memoria se puede usar para generar un genotipo sin CCR5 en células humanas primarias. Además, como cabría espera para cualquier rasgo determinado genéticamente, las células modificadas por ZFN mostraron una resistencia estable y heredable a la infección con VIH-1 tanto in vitro como in vivo.

Las estrategias basadas en moléculas pequeñas, anticuerpos intracelulares, y ARNi o antisentido o para el tratamiento del VIH a través de la disrrupción de CCR5 reprimen o bloquean de forma incompleta el CCR5 a nivel del ARNm o de la proteína. Véase, Levine et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:17372-17377; Trkola et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:395-400). Por lo tanto, a diferencia de otros enfoques, las CCR5-ZFN que se describen en la presente memoria generan una verdadera célula sin CCR5, que, al igual que la Δ32 de CCR5 seleccionada de forma natural, es permanentemente y completamente negativa para CCR5, sobrevive preferiblemente a la infección con VIH-1, y da lugar a células hija que son igualmente resistentes a la infección con VIH-1. La modificación génica permanente mediante CCR5-ZFN bloquea la entrada del virus sin que se requiera la integración de ningún ADN extraño en el genoma, ya que la administración y la expresión genética transitorias del gen de ZFN son suficientes para eliminar la expresión de CCR5.

Además, en la presente memoria se describen vectores de adenovirus (Ad) que comprenden las ZFN y/o secuencias dadoras y células que comprenden a estos vectores Ad. Estos vectores Ad son útiles en métodos de escisión dirigida de cromatina celular y para la alteración dirigida de una secuencia de nucleótidos celulares, por ejemplo, mediante escisión dirigida seguida por la unión de extremos no homólogos o mediante escisión dirigida seguida por la recombinación homóloga entre un polinucleótido exógeno (que comprende una o más regiones de homología con la secuencia de nucleótidos celulares) y una secuencia genómica.

General

La práctica de los métodos, así como la preparación y uso de las composiciones que se describen en la presente memoria usan, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular, bioquímica, estructura y análisis de la cromatina, química computacional, cultivo celular, ADN recombinante y campos relacionados que se encuentran dentro de la experiencia en la materia. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 y Tercera edición, 2001; Ausubel y col, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; la serie METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Tercera edición, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman y A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; y METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

Definiciones

Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido", y "oligonucleótido" se usan indistintamente y hacen referencia a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido, en conformación lineal o circular, y en forma mono- o bicatenaria. Para los fines de la presente descripción, estos términos no se deben interpretar como limitantes con respecto a la longitud de un polímero. Los términos pueden incluir análogos conocidos de nucleótidos naturales, así como nucleótidos están modificados en los restos de base, azúcar y/o fosfato (por ejemplo, cadenas principales de fosforotioato). En general, un análogo de un nucleótido en particular tiene la misma especificidad de formación de pares de bases; es decir, un análogo de A formará pares de bases con T.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente para hacer referencia a un polímero de restos de aminoácidos. El término también se aplica a polímeros de aminoácidos en los que uno o más aminoácidos son análogos químicos o derivados modificados de un aminoácido correspondiente de origen natural.

"Unión" se refiere a una interacción no covalente, específica de secuencias entre macromoléculas (por ejemplo, entre una proteína y un ácido nucleico). No todos los componentes de una interacción de unión necesitan ser específicos de

secuencias (por ejemplo, contactos con restos de fosfato en una cadena principal de DNA), siempre y cuando la interacción en conjunto sea específica de secuencias. Dichas interacciones se caracterizan generalmente por una constante de disociación (K_d) de 10^{-6} M^{-1} o inferior. "Afinidad" se refiere a la fuerza de unión: una afinidad de unión mayor se correlaciona con una K_d menor.

Una "proteína de unión" es una proteína que es capaz de unirse de forma no covalente a otra molécula. Una proteína de unión se puede unir, por ejemplo, a una molécula de ADN (una proteína de unión a ADN), una molécula de ARN (una proteína de unión a ARN) y/o una molécula de proteína (una proteína de unión a proteínas). En el caso de una proteína de unión a proteínas, se puede unir a sí misma (para formar homodímeros, homotrímeros, etc.) y/o se puede unir a una o más moléculas de una proteína o proteínas diferentes. Una proteína de unión puede tener más de un tipo de actividad de unión. Por ejemplo, proteínas de dedos de cinc tienen actividad de unión a ADN, unión a ARN y unión a proteínas.

Una "proteína de unión a ADN de dedos de cinc" (o dominio de unión) es una proteína, o un dominio dentro de una proteína más grande, que se une al ADN de una manera específica de secuencias a través de uno o más dedos de cinc, que son regiones de secuencias de aminoácidos dentro del dominio de unión cuya estructura se estabiliza a través de coordinación de un ión de cinc. A menudo, la expresión proteína de unión a ADN de dedos de cinc se abrevia como proteína de dedos de cinc o ZFP.

Los dominios de unión de tipo dedos de cinc se pueden "modificar por ingeniería genética" para unirse a una secuencia de nucleótidos predeterminada. Ejemplos no limitantes de métodos para modificar por ingeniería genética proteínas de dedos de cinc son diseño y selección. Una proteína de dedos de cinc diseñada es una proteína que no se produce en la naturaleza cuyo diseño/composición resulta principalmente de criterios racionales. Criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computerizados para procesar la información en una base de datos que almacena información de los diseños de ZFP y los datos de unión existentes. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 6.140.081; Nº 6.453.242; y Nº 6.534.261; véanse también los documentos WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496.

Una proteína de dedos de cinc "seleccionada" es una proteína que no se encuentra en la naturaleza cuya producción resulta principalmente de un proceso empírico tal como presentación de fagos, trampa de interacción o selección híbrida. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.789.538; Nº 5.925.523; Nº 6.007.988; Nº 6.013.453; Nº 6.200.759; los documentos WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970, documento WO 01/88197 y WO 02/099084.

El término "secuencia" se refiere a una secuencia de nucleótidos de cualquier longitud, que puede ser ADN o ARN; puede ser lineal, circular o ramificada y puede ser monocatenaria o bicatenaria. La expresión "secuencia dadora" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se inserta en un genoma. A secuencia dadora puede ser de cualquier longitud, por ejemplo entre 2 y 10.000 nucleótidos de longitud (o cualquier valor entero entre los mismos o por encima de los mismos), preferiblemente entre aproximadamente 100 y 1.000 nucleótidos de longitud (o cualquier número entero entre los mismos), más preferiblemente entre aproximadamente 200 y 500 nucleótidos de longitud.

Una "secuencia no idéntica, homóloga" se refiere a una primera secuencia que comparte un primer grado de identidad de secuencia con una segunda secuencia, pero cuya secuencia no es idéntica a la de la segunda secuencia. Por ejemplo, un polinucleótido que comprende la secuencia de tipo salvaje de un gen mutante es homóloga y no idéntica con la secuencia del gen mutante. En determinadas realizaciones, el grado de homología entre las dos secuencias es suficiente para permitir la recombinación homóloga entre los mismos, usando mecanismos celulares normales. Dos secuencias no idénticas homólogas pueden ser de cualquier longitud y su grado de no homología puede ser tan pequeño como un solo nucleótido (por ejemplo, para la corrección de una mutación puntual en el genoma por recombinación homologar dirigida) o tan grande como 10 o más kilobases (por ejemplo, para la inserción de un gen en un sitio ectópico predeterminado en un cromosoma). No es necesario que dos polinucleótidos que comprenden las secuencias no idénticas homólogas tengan la misma longitud. Por ejemplo, se puede usar un polinucleótido exógeno (es decir, polinucleótido dador) de entre 20 y 10.000 nucleótidos o pares de nucleótidos.

En la técnica se conocen técnicas para determinar la identidad de secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos. Por lo general, dichas técnicas incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del mARN para un gen y/o determinar la secuencia de aminoácidos codificada por los mismos, y comparar estas secuencias con una segunda secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Las secuencias genómicas también se pueden determinar y comparar de este modo. En general, identidad se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. Dos o más secuencias (polinucleótido o aminoácido) se pueden comparar determinando su porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad de dos secuencias, tanto si son secuencias de ácidos nucleicos como de aminoácidos, es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de las secuencias más cortas y multiplicado por 100. Con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981) se proporciona Una alineación aproximada para las secuencias de ácidos nucleicos. Este algoritmo se puede aplicar a secuencias de aminoácidos usando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure. M.O. Dayhoff ed., 5 supl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., EE.UU, y normalizada por Gribskov. Nucl. Acids Res. 14 (6):6745-6763 (1986). En el Genetics Computer Group (Madison, WI)

en la aplicación "BestFit" del paquete de programas se proporciona una aplicación a modo de ejemplo de este algoritmo para determinar el porcentaje de identidad de una secuencia. Los parámetros por defecto para este método se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Versión 8 (1995) (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI). Un método preferente para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente descripción es usar el paquete MPSRCH de programas con derechos de autor registrados por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de este conjunto de paquetes, se puede usar el algoritmo de Smith-Waterman en el que se usan los parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización de 12 por abrir un hueco, penalización de uno por extensión del hueco, y un hueco de seis). A partir de los datos generados, el valor de "Coincidencia" refleja la identidad de secuencia. Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o la similitud en secuencias se conoce generalmente en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineación es BLAST, usado con parámetros por defecto. Por ejemplo, BLASTN y BLASTP se pueden usar usando los siguientes por defecto: código genético = estándar; filtro = ninguno; hebra = ambos; punto de corte = 60; esperado =10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificado por = PUNTUACIÓN MÁS ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de CDS de GenBank + Swiss prot + Spupdate + PIR. Detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de internet: http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST. Con respecto a secuencias que se describen en la presente memoria, el intervalo de grados de identidad de secuencias deseados es de aproximadamente un 80% a un 100% de cualquier valor entero entre los mismos. Por lo general, los porcentajes de entidad entre las secuencias son de al menos un 70-75%, preferiblemente un 80-82%, más preferiblemente un 85-90%, incluso más preferiblemente un 92%, aún más preferiblemente un 95%, y lo más preferiblemente un 98% de identidad de secuencias.

Como alternativa, el grado de similitud de secuencias entre polinucleótidos se puede determinar por hibridación de polinucleótidos en condiciones que permitan la formación de dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa o nucleasas específicas monocatenarias, y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Dos ácidos nucleicos, o dos secuencias de polipéptidos son básicamente homólogas entre sí cuando las secuencias presentan una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 70%-75%, preferiblemente un 80%-82%, más preferiblemente un 85%-90%, incluso más preferiblemente un 92%, aún más preferiblemente un 95%, y lo más preferiblemente un 98% sobre una longitud definida de las moléculas, tal como se determina usando los métodos mencionados anteriormente. Tal como se usa en la presente memoria, básicamente homólogo también se refiere a secuencias que muestran una identidad completa con una secuencia específica de ADN o de polipéptido. Las secuencias de ADN que son básicamente homólogas se pueden identificar en un experimento de hibridación de tipo Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas, tal como se definen para ese sistema en particular. La definición de condiciones apropiadas de hibridación se encuentra dentro de la experiencia en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., supra; Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, editores B.D. Hames y SJ. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press).

La hibridación selectiva de dos fragmentos de ácido nucleico se puede determinar como sigue a continuación. El grado de identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico afecta a la eficacia la fuerza de los sucesos de hibridación entre dichas moléculas. Una secuencia de ácidos nucleicos parcialmente idénticos inhibirá al menos parcialmente la hibridación de una secuencia completamente idéntica a una molécula diana. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente idéntica se puede evaluar usando ensayos de hibridación que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, transferencia de Southern (ADN), transferencia de Northern (ARN), hibridación en disolución, o similares, véase Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Dichos ensayos se pueden realizar usando grados variables de selectividad, por ejemplo, usando condiciones que varían de un rigor bajo a uno alto. Si se usan condiciones poco rigurosas, la ausencia de unión no específica se puede evaluar usando una sonda secundaria que carece incluso de un grado parcial de identidad de secuencia (por ejemplo, una sonda que tiene una identidad de secuencia menor que aproximadamente un 30% con la molecular diana), de modo que, en ausencia de sucesos de unión no específica, la sonda secundaria no se hibridará con la diana.

Cuando se usa un sistema de detección basado en hibridación, se elige una sonda de ácido nucleico que es complementaria con una secuencia de ácido nucleico de referencia, y que a continuación por selección de condiciones apropiadas la sonda y la secuencia de referencia se hibridan selectivamente, o se unen, entre sí para formar una molécula bicatenaria. Una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridarse selectivamente con una secuencia de referencia en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas por lo general se híbrida en condiciones que permiten la detección de una secuencia de ácido nucleico diana de al menos aproximadamente 10-14 nucleótidos de longitud que tienen al menos aproximadamente una identidad de secuencia de un 70% con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación rigurosas permiten por lo general la detección de secuencias de ácidos nucleicos diana con una longitud de al menos aproximadamente 10-14 nucleótidos que tienen una identidad de secuencia mayor que aproximadamente un 90-95% con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación útiles para la hibridación de secuencias sonda/referencia útiles, en las que la secuencia de la sonda y de referencia tienen un grado específico de identidad de la secuencia, se pueden determinar tal como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, editores B.D. Hames y S.J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press).

Las condiciones de hibridación son bien conocidas por los expertos en la materia. El rigor en la hibridación se refiere al

grado en el que las condiciones de hibridación desfavorecen la formación de híbridos que contienen nucleótidos con falta de coincidencias, con un rigor más elevado correlacionado con una menor tolerancia para híbridos con falta de coincidencias. Los factores que afectan a la rigurosidad de la hibridación son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, temperatura, pH, fuerza iónica, y concentración de disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, formamida y sulfóxido de dimetilo. Tal como conocen los expertos en la materia, la rigurosidad en la hibridación aumenta con temperaturas más elevadas, menor fuerza iónica y concentraciones más bajas de disolvente.

Con respecto a las condiciones rigurosas para hibridación, en la técnica se sabe bien que se pueden usar numerosas condiciones equivalentes para establecer un rigor en particular variando, por ejemplo, los factores siguientes: la longitud y la naturaleza de las secuencias, la composición de bases de las diversas secuencias, las concentraciones de las sales y de otros componentes de la solución de hibridación, la presencia o la ausencia de agentes bloqueantes en las soluciones de hibridación (por ejemplo, sulfato de dextrano y polietilenglicol), parámetros de temperatura de la reacción de hibridación y de tiempo, así como diferentes condiciones de lavado. La selección de un conjunto en particular de condiciones de hibridación se realiza siguiendo los métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.).

"Recombinación" se refiere a un procedimiento de intercambio de información genética entre dos polinucleótidos. Para los fines de la presente descripción, "recombinación homóloga (HR)" se refiere a la forma especializada de dicho intercambio que se produce, por ejemplo, durante la reparación de rupturas bicatenarias en las células. Este proceso requiere homología entre las secuencias de nucleótidos, usa una molécula "dadora" para reparar el molde de una molécula "diana" (es decir, la que experimentó la ruptura bicatenaria), y se conoce con diversos nombres tales como "conversión génica sin retrocruzamiento" o "conversión génica de un segmento corto", porque conduce a la transferencia de la información genética desde el donante a la diana. Sin desear quedar ligado a teoría alguna en particular, dicha transferencia puede implicar corrección de falta de coincidencia del ADN heterodúplex que se forma entre la diana rota y el donante, y/o "hibridación de hebras dependiente de síntesis", en la que el donante se usa para volver a sintetizar información genética que se convertirá en parte de la diana, y/o procesos relacionados. Dicha HR especializada a menudo da como resultado una alteración de la secuencia de la molécula diana de modo que parte o toda la secuencia del polinucleótido dador se incorpora en el polinucleótido diana.

"Escisión" se refiere a la ruptura de la cadena principal covalente de una molécula de ADN. La escisión se puede iniciar mediante una diversidad de métodos que incluyen, pero no se limitan a, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Tanto la escisión monocatenaria como la escisión bicatenaria son posibles, y la escisión bicatenaria se puede producir como resultado de dos sucesos de escisión monocatenarios distintos. La escisión del ADN puede dar como resultado la producción de extremos romos o extremos escalonados. En determinadas realizaciones, se usan polipéptidos de fusión para la escisión de ADN bicatenario dirigido.

Un "semidominio de escisión" es una secuencia de polipéptidos que, junto con un segundo polipéptido (idéntico o diferente) forma un complejo que tiene actividad de escisión (preferiblemente actividad de escisión bicatenaria). Las expresiones "semidominios de primera y segunda escisión"; "semidominios de escisión + y -" y "semidominios de escisión derecha e izquierda" se usan indistintamente para hacer referencia a pares de semidominios de escisión que se dimerizan.

Un "semidominio de escisión modificado por ingeniería genética" es un semidominio de escisión que se ha modificado para formar heterodímeros forzados con otro semidominio de escisión (por ejemplo, otro semidominio de escisión modificado por ingeniería genética). Véanse, además, las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº 20050064474 y Nº 20060188987 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/808.486 (presentada el 25 de mayo del 2006).

La "cromatina" es la estructura nucleoproteica que comprende el genoma celular. La cromatina celular comprende ácido nucleico, principalmente ADN, y proteínas, que incluyen proteínas cromosómicas histonas y no histonas. La mayor parte de la cromatina celular eucariota existe en forma de nucleosomas, en la que un núcleo del nucleosoma comprende aproximadamente 150 pares de bases del ADN asociadas con un octámero que comprende dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 and H4; y ADN conector (de longitud variable dependiendo del organismo) que se extiende entre núcleos del nucleosoma. Una molécula de histona H1 por lo general se asocia con el ADN conector. Para los fines de la presente descripción, el término "cromatina" pretende incluir todos los tipos de nucleoproteína celular, tanto procariota como eucariota. La cromatina celular incluye cromatina tanto cromosómica como episómica.

Un "cromosoma", es un complejo de cromatina que comprende toda o una porción del genoma de una célula. El genoma de una célula a menudo se caracteriza por su cariotipo, que es el conjunto de todos los cromosomas que comprenden el genoma de la célula. El genoma de una célula puede comprender uno o más cromosomas.

Un "episoma" es un ácido nucleico, complejo nucleoproteico u otra estructura de replicación que comprende un ácido nucleico que no es parte del cariotipo cromosómico de una célula. Ejemplos de episomas incluyen plásmidos y determinados genomas víricos.

Una "región accesible" es un sitio en la cromatina celular en el que un sitio diana presente en el ácido nucleico puede estar unido mediante una molécula exógena que reconoce un sitio diana. Sin desear quedar ligado a teoría alguna en particular, se cree que una región accesible es una que no está empaquetada en una estructura nucleosómica. La estructura distinta de una región accesible a menudo se puede detectar por su sensibilidad a sondas químicas y enzimáticas, por ejemplo, nucleasas.

Un "sitio diana" o "secuencia diana" es una secuencia de ácidos nucleicos que define una porción de un ácido nucleico al que se unirá una molécula de unión, siempre y cuando se existan condiciones suficientes para la unión. Por ejemplo, la secuencia 5'-GAATTC-3' es un sitio diana para la endonucleasa de restricción Eco RI.

Una molécula "exógena" es una molécula que normalmente no está presente en una célula, pero que se puede introducir en una célula mediante uno o más métodos genéticos, bioquímicos u otros. La "presencia normal en la célula" se determina con respecto a la etapa de desarrollo en particular y a las condiciones del entorno de la célula. Por lo tanto, por ejemplo, una molécula que está presente solamente durante el desarrollo embrionario del músculo es una molécula exógena con respecto a unas células de músculo adulto. De forma análoga, una molécula inducida por choque térmico es una molécula exógena con respecto a una célula sin someter a choque térmico. Una molécula exógena puede comprender, por ejemplo, una versión de funcionamiento de una molécula endógena con funcionamiento anómalo o una versión de funcionamiento anómalo de una molécula endógena que funciona normalmente.

Una molécula exógena puede ser, entre otras cosas, una molécula pequeña, que se genera mediante un procedimiento de química combinatoria, o una macromolécula tal como una proteína, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido, glicoproteína, lipoproteína, polisacárido, cualquier derivado modificado de las moléculas anteriores, o cualquier complejo que comprende una o más de las moléculas anteriores. Los ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN, pueden ser mono- o bicatenarios; pueden ser lineales, ramificados o circulares; y pueden ser de cualquier longitud. Los ácidos nucleicos incluyen los que son capaces de formar estructuras bicatenarias, así como ácidos nucleicos que forman estructuras tricatenarias. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.176.996 y Nº 5.422.251. Las proteínas incluyen, pero no se limitan a, proteínas de unión a ADN, factores de transcripción, factores de remodelación de la cromatina, proteínas de unión al ADN metilado, polimerasas, metilasas, desmetilasas, acetilasas, desacetilasas, quinasas, fosfatasas, integrasas, recombinasas, ligasas, topoisomerasas, girasas y helicasas.

Una molécula exógena puede ser el mismo tipo de molécula que una molécula endógena, por ejemplo, una proteína exógena o ácido nucleico. Por ejemplo, un ácido nucleico exógeno puede comprender un genoma vírico infectante, un plásmido o episoma introducido en una célula, o un cromosoma que normalmente no está presente la célula. Los métodos para la introducción de moléculas exógenas en células son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, transferencia mediada por lípidos (es decir, liposomas, que incluyen lípidos neutros y catiónicos), electroporación, inyección directa, fusión celular, bombardeo de partículas, coprecipitación con fosfato cálcico, transferencia mediada con DEAE-dextrano y transferencia mediada con vectores víricos.

Por el contrario, una molécula "endógena" es una que normalmente está presente en una célula en particular en una etapa particular del desarrollo en condiciones medioambientales concretas. Por ejemplo, un ácido nucleico endógeno puede comprender un cromosoma, el genoma de una mitocondria, cloroplasto u otro orgánulo, o un ácido nucleico episómico de origen natural. Otras moléculas endógenas pueden incluir proteínas, por ejemplo, factores de transcripción y enzimas.

Una molécula de "fusión" es una molécula en la que dos o más subunidades moleculares están conectadas, preferiblemente mediante enlace covalente. Las moléculas de las subunidades pueden ser del mismo tipo químico de molécula, o pueden ser de diferentes tipos químicos de moléculas. Ejemplos del primer tipo de molécula de fusión incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (por ejemplo, una fusión entre un dominio de unión al ADN de ZFP y un dominio de escisión) y ácidos nucleicos de fusión (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión que se ha descrito anteriormente). Ejemplos del segundo tipo de molécula de fusión incluyen, pero no se limitan a, una fusión entre un ácido nucleico que forma una estructura triple y un polipéptido, y una fusión entre un ligante del surco menor y un ácido nucleico.

La expresión de una proteína de fusión en una célula puede resultar de la provisión de la proteína de fusión en la célula o mediante la provisión de un polinucleótido que codifica la proteína de fusión a una célula, en la que se transcribe el polinucleótido, y el tránscrito se traduce, para generar la proteína de fusión. El corte y empalme transversal, la escisión de polipéptidos y la ligadura de polipéptidos también pueden estar implicados en la expresión de una proteína en una célula. Los métodos para la provisión del polinucleótido y del polipéptido en las células se presentan en cualquier parte de la presente descripción.

Un "gen", para los fines de la presente descripción, incluye una región del ADN que codifica un producto génico (véase a continuación) así como todas las regiones del ADN que regulan la producción del producto génico, tanto si dichas secuencias reguladoras están adyacentes a secuencias de codificación y/o transcritas, como si no lo están. En consecuencia, un gen incluye, pero no se limita necesariamente a, secuencias promotoras, terminadores, secuencias reguladoras de la traducción tales como sitios de unión a ribosomas y sitios internos de entrada a ribosomas, potenciadores, silenciadores, aisladores, elementos delimitadores, orígenes de replicación, sitios de adhesión a la

matriz y regiones de control del locus.

"Expresión génica " se refiere a la conversión de la información, contenida en un gen, en un producto génico. Un producto génico puede ser el producto transcripcional directo de un gen (por ejemplo, mARN, tARN, rARN, ARN antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína producida por la traducción de un mARN. Los productos génicos también incluyen ARN que se modifican, mediante procesos tales como formación de protección, poliadenilación, metilación y edición, y proteínas modificadas, por ejemplo, mediante metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, miristoilación y glicosilación.

La "modulación" de la expresión génica se refiere a un cambio en la actividad de un gen. La modulación de la expresión puede incluir, pero no se limita a, la activación génica y la represión genética.

Las células "eucariotas" incluyen, pero no se limitan a, células de hongos (tales como levadura), células vegetales, células animales, células de mamíferos y células humanas (por ejemplo, células T).

Una "región de interés" es cualquier región de cromatina celular, tal como, por ejemplo, un gen o una secuencia no codificante dentro de un gen o adyacente a él, en la que es deseable que se una a una molécula exógena. La unión puede ser para los fines de escisión dirigida del ADN y/o recombinación dirigida. Una región de interés puede estar presente en un cromosoma, un episoma, un genoma organular (por ejemplo, mitocondrial, cloroplástico) o un genoma vírico infectante, por ejemplo. Una región de interés puede estar dentro de la región codificante de un gen, dentro de las regiones no codificantes transcritas tales como, por ejemplo, secuencias líderes, secuencias de remolque o intrones, o dentro de regiones no transcritas, tanto secuencia arriba como secuencia abajo de la región no codificante. Una región de interés puede ser tan pequeña como un único par de nucleótidos o de hasta 2.000 pares de nucleótidos de longitud, o cualquier valor entero de pares de nucleótidos.

Las expresiones "unión operativa" y "unido operativamente" (o "unido de forma operativa") se usan indistintamente con referencia a una yuxtaposición de dos o más componentes (tales como elementos de secuencia), en la que los componentes se ordenan de tal forma que ambos componentes funcionan con normalidad y permiten la posibilidad de que al menos uno de los componentes pueda intervenir en una función que se ejerce sobre al menos uno de los otros componentes. A modo de ilustración, una secuencia reguladora transcripcional, tal como un promotor, está unida operativamente a una secuencia codificante si la secuencia reguladora de la transcripción controla el nivel de transcripción de la secuencia codificante en respuesta a la presencia o ausencia de uno o más factores de regulación transcripcional. Una secuencia de regulación transcripcional está generalmente unida operativamente en cis a una secuencia codificante, pero no necesita estar directamente adyacente a ella. Por ejemplo, un potenciador es una secuencia reguladora de la transcripción que está unida operativamente a una secuencia codificante, incluso aunque no sean contiguas.

Con respecto a los polipéptidos de fusión, la expresión "unido operativamente" puede hacer referencia al hecho de que cada uno de los componentes desempeña la misma función en la unión al otro componente como lo haría si no estuviesen unidos de ese modo. Por ejemplo, con respecto a un polipéptido de fusión en el que el dominio de unión al ADN de ZFP está fusionado con un dominio de escisión, el dominio de unión al ADN de ZFP y el dominio de escisión se encuentran en unión operativa si, en el polipéptido de fusión, la porción del dominio de unión al ADN de ZFP es capaz de unirse a su sitio diana y/o su sitio de unión, a la vez que el dominio de escisión es capaz de escindir el ADN en la vecindad del sitio diana.

Un "fragmento funcional" de una proteína, polipéptido o ácido nucleico es una proteína, polipéptido o ácido nucleico cuya secuencia no es idéntica a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa, aunque conserva la misma función que la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa. Un fragmento funcional puede poseer más, menos, o el mismo número de restos que la correspondiente molécula nativa, y/o puede contener una o más sustituciones de aminoácidos o nucleótidos. Los métodos para determinar la función de un ácido nucleico (por ejemplo., función codificante, capacidad para hibridarse a otro ácido nucleico) se conocen bien en la técnica. De igual forma, se conocen bien los métodos para determinar la función de la proteína. Por ejemplo, la función de unión al ADN de un polipéptido se puede determinar, por ejemplo, mediante unión a filtro, cambio de la movilidad electroforética, o ensayos de inmunoprecipitación. La escisión del ADN se puede someter a ensayo mediante electroforesis en gel. Véase Ausubel et al., mencionado anteriormente. La capacidad de una proteína para interactuar con otra proteína se puede determinar, por ejemplo, mediante coinmunoprecipitación, ensayos de dos híbridos o de complementación, tanto genéticos como bioquímicos. Véase, por ejemplo, Fields et al. (1989) Nature 340:245-246; Patente de Estados Unidos Nº 5.585.245 y documento PCT WO 98/44350.

Nucleasas de Dedos de Cinc

En la presente memoria se describen nucleasas de dedos de cinc (ZFN) que se pueden usar para inactivación génica, por ejemplo inactivación del gen CCR5. Las ZFN comprenden una proteína de dedos de cinc (ZFP) y un dominio de nucleasa (escisión).

A. Proteínas de Dedos de Cinc

Los dominios de unión de dedos de cinc se pueden modificar por ingeniería genética para que se unan a una

secuencia de elección. Véase, por ejemplo, Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416. Un dominio de unión de dedos de cinc modificado por ingeniería genética puede tener una nueva especificidad de unión, en comparación con una proteína de dedos de cinc de origen natural. Los métodos de modificación por ingeniería genética incluyen, pero no se limitan a, diseño racional y diversos tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, el uso de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos de tripletes (o cuadrupletes) y secuencias de aminoácidos de dedos de cinc individuales, en las que cada secuencia de nucleótidos de tripletes o cuadrupletes está asociada con una o más secuencias de aminoácidos de dedos de cinc que se unen a la secuencia de tripletes o de cuadrupletes en particular. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 6.453.242 y Nº 6.534.261 del mismo propietario que la presente.

Los métodos de selección a modo de ejemplo, que incluyen sistemas de presentación de fagos y de dos híbridos, se describen en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.789.538; Nº 5.925.523; Nº 6.007.988; Nº 6.013.453; Nº 6.410.248; Nº 6.140.466; Nº 6.200.759; y Nº 6.242.568; así como en los documentos WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 y GB 2.338.237.

La mejora de la especificidad de unión para dominios de unión de dedos de cinc se ha descrito, por ejemplo, en el documento WO 02/077227, del mismo propietario que la presente.

La selección de sitios diana; las ZFP y métodos para el diseño y la construcción de proteínas de fusión (y polinucleótidos las codifican) son conocidos por los expertos la materia y se describen con detalle en relación con las Publicaciones de Estados Unidos Nº 20030232410; Nº 20050208489; Nº 2005064474; Nº 20050026157; Nº 20060188987; la Publicación Internacional WO 07/014275; las solicitudes de patente de Estados Unidos Nº 10/587.723 (presentada el 27 de julio de 2006); Nº 11/493.423 (presentada el 26 de julio de 2006).

En determinadas realizaciones, las nucleasas de dedos de cinc de los vectores Ad-ZFN que se describen en la presente memoria se unen en un gen CCR-5. La Tabla 1 describe un número de dominios de unión de dedos de cinc que se han modificado por ingeniería genética para unirse a secuencias de nucleótidos en el gen CCR-5 humano. Cada fila describe un dominio de unión a ADN de dedos de cinc separado. La secuencia diana del ADN para cada dominio se muestra en la primera columna (los sitios diana del ADN están indicados en letras mayúsculas; los nucleótidos no contactados están indicados en minúsculas), y desde la segunda hasta la quinta columnas muestran la secuencia de aminoácidos de la región de reconocimiento (aminoácidos -1 a +6, con respecto al comienzo de la hélice) de cada uno de los dedos de cinc (F1 a F4) en la proteína. Además, en la primera columna se proporciona un número de identificación para cada proteína.

Solamente el dominio de unión a ADN de proteínas de dedos de cinc que comprende cuatro hélices de reconocimiento de dedos de cinc F1, F2, F3 y F4 (SEC ID Nº: 10, SEC ID Nº: 17, SEC ID Nº: 12 y SEC ID Nº: 13) tal como se especifica la reivindicación 1 representa una realización de la invención. Todos los demás ejemplos se muestran solamente con fines comparativos.

Tabla 1: Nucleasas de dedos de cinc dirigidas al gen CCR-5 humano

diseños r162

Secuencia diana	F1	F2	F3	F4
GATGAGGATGAC (SEC ID Nº: 1) 7296	DRSNLSR (SEC ID Nº: 2)	TSANLSR (SEC ID Nº: 3)	RSDNLAR(SEC ID Nº: 4)	TSANLSR (SEC ID Nº: 3)
GATGAGGATGAC (SEC ID Nº: 1) 8181	DRSNLSR (SEC ID Nº: 2)	ISSNLNS (SEC ID Nº: 5)	RSDNLAR (SEC ID Nº: 4)	TSANLSR (SEC ID Nº: 3)
GATGAGGATGAC (SEC ID Nº: 1) 8182	DRSNLSR (SEC ID Nº: 2)	VSSNLTS (SEC ID Nº: 6)	RSDNLAR(SEC ID Nº: 4)	TSANLSR (SEC ID Nº: 3)
GATGAGGATGAC (SEC ID Nº: 1) 8262	DRSNLSR (SEC ID Nº: 2)	ISSNLNS (SEC ID Nº: 5)	RSDNLAR (SEC ID Nº: 4)	NRDNLSR (SEC ID Nº: 7)
GATGAGGATGAC (SEC ID Nº: 1) 8266	DRSNLSR (SEC ID Nº: 2)	ISSNLNS (SEC ID Nº: 5)	RSDNLAR (SEC ID Nº: 4)	TSGNLTR (SEC ID Nº: 8)
GATGAGGATGAC (SEC ID Nº: 1) 8267	DRSNLSR (SEC ID Nº: 2)	VSSNLTS (SEC ID Nº: 6)	RSDNLAR (SEC ID Nº: 4)	TSGNLTR (SEC ID Nº: 8)
GATGAGGATGAC (SEC ID Nº: 1) 7741	DRSNLSR (SEC ID Nº: 2)	TSGNLTR (SEC ID Nº:8)	RSDNLAR (SEC ID Nº:4)	TSGNLTR (SEC ID Nº: 8)

diseños 168

Secuencia diana	F1	F2	F3	F4
AAACTGCAAAAG (SEC ID Nº: 9) 7745	RSDNLSV(SEC ID Nº: 10)	QNANRIT (SEC ID Nº: 11)	RSDVLSE (SEC ID Nº: 12)	QRNHRTT (SEC ID Nº: 13)
AAACTGCAAAAG (SEC ID Nº: 9) 8165	RSDNLSN(SEC ID Nº: 14)	QNANRIT (SEC ID Nº: 11)	RSDVLSE (SEC ID Nº: 12)	QRNHRTT (SEC ID Nº: 13)
AAACTGCAAAAG (SEC ID Nº: 9) 8191	RSDNLSV (SEC ID Nº: 10)	QRVNLIV (SEC ID Nº: 15)	RSDVLSE (SEC ID Nº:12)	QRNHRTT (SEC ID Nº: 13)
AAACTGCAAAAG (SEC ID Nº: 9) 8196	RSDNLGV (SEC ID Nº: 16)	QKINLQV (SEC ID Nº: 17)	RSDVLSE (SEC ID Nº: 12)	QRNHRTT (SEC ID Nº: 13)
AAACTGCAAAAG (SEC ID Nº:9) 8196z	RSDNLSV (SEC ID Nº: 10)	QKINLQV (SEC ID Nº: 17)	RSDVLSE (SEC ID Nº: 12)	QRNHRTT (SEC ID Nº: 13)
AAACTGCAAAAG (SEC ID Nº: 9) 8196zg	RSDNLGV (SEC ID Nº: 16)	QKINLQV (SEC ID Nº: 17)	RSDVLSE (SEC ID Nº: 12)	QRNHRTT (SEC ID Nº: 13)
AAACTGCAAAAG (SEC ID Nº: 9) 7568	RSDHLSE (SEC ID Nº: 18)	QNANRIT (SEC ID Nº: 11)	RSDVLSE (SEC ID Nº: 12)	QRNHRTT (SEC ID Nº: 13)

diseños r627

Secuencia diana	F1	F2	F3	F4
GACAAGCAGCGG (SEC ID Nº: 19) 7524	RSAHLSE (SEC ID Nº: 20)	RSANLSE (SEC ID Nº: 21)	RSANLSV (SEC ID Nº: 22)	DRANLSR (SEC ID Nº: 23)

diseños 633

Secuencia diana	F1	F2	F3	F4
CATCTGcTACTCG (SEC ID Nº: 24) 8040	RSDSLSK (SEC ID Nº: 25)	DNSNRIK(SEC ID Nº: 26)	RSAVLSE (SEC ID Nº: 27)	TNSNRIT(SEC ID Nº: 28)

Tal como se describe a continuación, un dominio de unión de cuatro dedos tal como se muestra en la Tabla 1 está condensado con un semidominio de escisión, tal como, por ejemplo, el dominio de escisión una endonucleasa de restricción de Tipo IIs tal como FokI. Un par de dichas fusiones de semidominio de dedos de cinc/nucleasa se usan para escisión dirigida, tal como se desvela, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 20050064474 (Solicitud con Nº de Serie 10/912.932). Por ejemplo, ZFN-215 representa el par de proteínas de fusión que contiene los dominios de unión de dedos de cinc denominados 8267 (que reconoce la secuencia diana que se muestra en la SEC ID Nº: 1 y que comprende las 4 hélices de reconocimiento que se representan en las SEC ID Nº^{s}: 2, 6, 4 y 8) y 8196z (que reconoce la secuencia diana que se muestra en la SEC ID Nº: 9 y que comprende las 4 hélices de reconocimiento que se representan SEC ID Nº^{s}: 10, 17, 12 y 13). ZFN-201 representa el par de proteínas de fusión que contiene los dominios de unión de dedos de cinc denominados 8266 (que reconoce la secuencia diana que se muestra en SEC ID Nº: 1 y que comprende las 4 hélices de reconocimiento que se representan SEC ID Nº^{s}: 2, 2, 4 y 8) and 8196z (que reconoce la secuencia diana que se muestra en SEC ID Nº: 9 y que comprende las 4 hélices de reconocimiento que se representan SEC ID Nº^{s}: 10, 17,12 y 13).

Para la escisión dirigida, los extremos cercanos a los sitios de unión pueden estar separados por 5 o más pares de nucleótidos, y cada una de las proteínas de fusión se puede unir a una hebra opuesta del ADN diana. Por consiguiente, una cualquiera de las proteínas identificadas como un "diseño de r162" en la Tabla 1 (lo que indica que se une a la hebra inversa y que el extremo secuencia abajo de su sitio de unión está en el nucleótido 162) se puede emparejar con cualquiera de las proteínas identificadas como un "diseño de 168" (lo que indica que se une a la hebra opuesta a la que se unen los diseños de r162 y que el extremo secuencia arriba de su sitio de unión se encuentra en el nucleótido 168). Por ejemplo, la proteína 8267 se puede emparejar con la proteína 8196 o con la proteína 8196z o con cualquier otro de los diseños de 168; y la proteína 8266 se puede emparejar con cualquiera de las proteínas 8196 o 8196z o con cualquier otro de los diseños de 168. Todas las combinaciones de dos en dos de los diseños de r162 y de 168 se

pueden usar para escisión dirigida y mutagénesis de un gen CCR-5. De igual forma, la proteína 7524 (o cualquier otro diseño de r627) se puede usar junto con la proteína 8040 (o cualquier otro diseño de 633) para obtener la escisión dirigida y la mutagénesis de un gen CCR-5.

Las CCR5-ZFN que se describen en la presente memoria se pueden dirigir a partir secuencias en el genoma de CCR5. Por ejemplo, las secuencias genómicas de CCR5 (incluyendo variantes alélicas tales como CCR5-Δ32) son bien conocidas en la técnica y los individuos homocigotos para el CCR5-Δ32 (véase, por ejemplo, Liu et al. (1996) Cell 367-377), son resistentes a infección con VIH-1.

B. Dominios de Escisión

Las ZFN también comprenden una nucleasa (dominio de escisión, semidominio de escisión). La porción del dominio de escisión de las proteínas de fusión que se describen en la presente memoria se puede obtener a partir de cualquier endonucleasa o exonucleasa. Las endonucleasas a modo de ejemplo a partir de las que puede proceder un dominio de escisión incluyen, pero no se limitan a, endonucleasas de restricción y endonucleasas de alojamiento. Véase, por ejemplo, 2002-2003 Catalogue, New England Biolabs, Beverly, MA; y Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388. Se conocen enzimas adicionales que escinden el ADN (por ejemplo, Nucleasa S1; nucleasa de la soja verde; ADNasa I pancreática; nucleasa micrococica; endonucleasa HO de levadura; véase también Linn et al. (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Una o más de estas enzimas (o fragmentos funcionales de las mismas) se pueden usar como una fuente de dominios de escisión y semidominios de escisión.

De forma análoga, un semidominio de escisión un semidominio de escisión puede proceder de cualquier nucleasa o porción de la misma, tal como se ha mencionado anteriormente, que requiere dimerización para la actividad de escisión. En general, se requieren dos proteínas de fusión para la escisión si las proteínas de fusión comprenden semidominios de escisión. Como alternativa, se puede usar una sola proteína que comprende dos semidominios de escisión. Los dos semidominios de escisión pueden proceder de la misma endonucleasa (o de fragmentos funcionales de la misma), o cada semidominio de escisión puede proceder de una endonucleasa diferente (o fragmentos funcionales de la misma). Además, los sitios diana para las dos proteínas de fusión están dispuestos preferiblemente, uno con respecto al otro, de tal forma que la unión de las dos proteínas de fusión a sus respectivos sitios diana coloca los semidominios de escisión en una orientación espacial de uno respecto al otro que permite que los semidominios de escisión formen un dominio de escisión funcional, por ejemplo, mediante dimerización. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, los extremos cercanos de los sitios diana están separados por 5-8 nucleótidos o por 15-18 nucleótidos. Sin embargo, cualquier número entero de nucleótidos o pares de nucleótidos se puede intercalar entre dos sitios diana (por ejemplo, de 2 a 50 pares de nucleótidos o más). En general, el sitio de escisión se localiza entre los sitios diana.

Las endonucleasas de restricción (enzimas de restricción) están presentes en muchas especies y son capaces de unirse a secuencias específicas del ADN (en un sitio de reconocimiento), y escindir el ADN en el sitio de unión o cerca de él. Determinadas enzimas de restricción (por ejemplo, de tipo IIS) escinden el ADN en los sitios retirados del sitio de reconocimiento y tienen dominios de unión y de escisión separables. Por ejemplo, la enzima de tipo IIS Fok I cataliza la escisión bicatenaria del ADN, a 9 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en una hebra y a 13 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en la otra. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.356.802; Nº 5.436.150 y Nº 5.487.994; así como Li y col (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887; Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31.978-31.982. Por lo tanto, en una realización, las proteínas de fusión comprenden el dominio de escisión (o semidominio de escisión) de al menos una enzima de restricción de Tipo IIS y uno o más dominios de unión de tipo dedos de cinc, que pueden o no estar modificados por ingeniaría genética.

Una enzima de restricción de Tipo IIS a modo de ejemplo, cuyo dominio de escisión es separable del dominio de unión, es Fok I. Esta enzima en particular es activa en forma de dímero. Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10.570-10.575. Por consiguiente, para los fines de la presente descripción, la porción de la enzima Fok I usada en las proteínas de fusión descritas se considera un semidominio de escisión. Por lo tanto, para la escisión bicatenaria dirigida y/o el reemplazo dirigido de secuencias celulares mediante fusiones de dedos de cinc-Fok I, se pueden usar dos proteínas de fusión, comprendiendo cada una un semidominio de escisión de FokI, para reconstruir un dominio de escisión catalíticamente activo. Como alternativa, también se puede usar una sola molécula polipeptídica que contiene un dominio de unión de tipo dedos de cinc y dos semidominios de escisión de Fok I. En cualquier parte de la presente descripción se dan a conocer parámetros para la escisión dirigida y la alteración dirigida de secuencias usando fusiones de dedos de cinc-Fok I.

Un dominio de escisión o semidominio de escisión puede ser cualquier porción de una proteína que conserva actividad de escisión, o que conserva la capacidad de multimerizarse (por ejemplo, dimerizarse) para formar un dominio de escisión funcional.

Las enzimas de restricción de Tipo IIS a modo de ejemplo se describen en la Publicación Internacional WO 07/014275. Las enzimas de restricción adicionales también contienen dominios de unión y de escisión separables, y éstos se contemplan en la presente descripción. Véase, por ejemplo, Roberts et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420.

En determinadas realizaciones, el dominio de escisión comprende uno o más semidominios de escisión modificados por ingeniería genética (también denominados mutantes del dominio de dimerización) que minimiza o evita la homodimerización, tal como se describe, por ejemplo, en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº 20050064474 y Nº 20060188987 (Solicitudes con Nº de Serie 10/912.932 y Nº 11/304.981, respectivamente) y en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 60/808.486 (presentada el 25 de mayo de 2006). Todos los restos de aminoácidos en las posiciones 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537, y 538 de Fok I son dianas para influir en la dimerización de los semidominios de escisión de Fok I.

Los semidominios de escisión modificados por ingeniería genética a modo de ejemplo de Fok I que forman heterodímeros forzados incluyen un par en el que un primer semidominio de escisión incluye mutaciones en restos de aminoácidos en las posiciones 490 y 538 de Fok I y un segundo semidominio de escisión incluye mutaciones en los restos de aminoácidos 486 y 499. Véanse las Figuras 2, 3 y 4.

Por lo tanto, en una realización, tal como se muestra en las Figuras 3 y 4, la mutación en 490 reemplaza Glu (E) con Lys (K); la mutación en 538 reemplaza Iso (I) con Lys (K); la mutación en 486 reemplaza Gln (Q) con Glu (E); y la mutación en la posición 499 reemplaza Iso (I) con Lys (K). Específicamente, los semidominios de escisión modificados por ingeniería genética que se describen en la presente memoria se prepararon por mutación de las posiciones 490 (E → K) y 538 (I → K) en un semidominio de escisión para producir un semidominio de escisión modificado por ingeniería genética denominado "E490K:I538K" y por mutación de las posiciones 486 (Q → E) y 499 (I → L) en otro semidominio de escisión para producir un semidominio de escisión modificado por ingeniería genética denominado "Q486E:I499L". Los semidominios de escisión modificados por ingeniería genética que se describen en la presente memoria son mutantes de heterodímeros estrictos en los que la escisión anómala se minimiza o se elimina. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/808.486 (presentada el 25 de mayo de 2006).

Los semidominios de escisión modificados por ingeniería genétia que se describen en la presente memoria se pueden preparar usando cualquier método adecuado, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio de semidominios de escisión de tipo salvaje (Fok I) tal como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 20050064474 (Nº de Serie 10/912.932, Ejemplo 5) y Solicitud Provisional de Patente de Estados Unidos con Nº de Serie 60/721.054 (Ejemplo 38).

C. Métodos Adicionales para la Escisión Dirigida en CCR5

En los métodos que se describen en la presente memoria se puede usar cualquier nucleasa que tenga un sitio diana en un gen CCR5. Por ejemplo, las endonucleasas y meganucleasas de alojamiento tienen secuencias de reconocimiento muy largas, algunas de las cuales probablemente van a estar presentes, en una base estadística, una vez en un genoma de tamaño humano. Se puede usar cualquiera de dichas nucleasas que tienen un solo sitio diana en un gen CCR5 en lugar de, o además de, una nucleasa de dedos de cinc, para escisión dirigida en un gen CCR5.

Endonucleasas de alojamiento a modo de ejemplo incluyen I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII y I-TevIII. Se conocen sus secuencias de reconocimiento. Véase también la Patente de Estados Unidos Nº 5.420.032; Patente de Estados Unidos Nº 6.833.252; Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Dujon et al. (1989) Gene 82:115-118; Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180; Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353 y el catálogo de New England Biolabs.

Aunque la especificidad de escisión de la mayor parte de las endonucleasas de alojamiento no es absoluta con respecto a sus sitios de reconocimiento, los sitios tienen una longitud suficiente de modo que se puede obtener un solo suceso de escisión por genoma de tamaño de mamífero por expresión de una endonucleasa y alojamiento en una célula que contiene una sola copia de su sitio de reconocimiento. También se ha informado de que la especificidad de endonucleasas y meganucleasas de alojamiento se puede modificar por ingeniería genética para unirse a sitios diana no naturales. Véase, por ejemplo, Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962; Ashworth et al. (2006) Nature 441:656-659; Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66.

Administración

Las ZFN que se describen en la presente memoria se pueden administrar una célula diana mediante cualquier medio adecuado. Métodos de administración de proteínas que comprenden dedos de cinc se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.453.242; Nº 6.503.717; Nº 6.534.261; Nº 6.599.692; Nº 6.607.882; Nº 6.689.558; Nº 6.824.978; Nº 6.933.113; Nº 6.979.539; Nº 7.013.219; y Nº 7.163.824.

Las ZFN tal como se describen en la presente memoria también se pueden administrar usando vectores que contienen secuencias que codifican una o más ZFN. Cualquier sistema de vectores se puede usar que incluyen, pero no se limitan a, vectores plásmidos, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovíricos, vectores de virus de la viruela; vectores del virus del herpes y vectores de virus adenoasociados, etc. Véanse, también, las Patentes de Estados Unidos Nº 6.534.261; Nº 6.607.882; Nº 6.824.978; Nº 6.933.113; Nº 6.979.539; Nº 7.013.219; y Nº 7.163.824.

En determinadas realizaciones, el vector es un vector de adenovirus. Por lo tanto, en la presente memoria se describen vectores de adenovirus (Ad) para introducir secuencias heterólogas (por ejemplo, nucleasas de dedos de cinc (ZFN))

en células.

Ejemplos no limitantes de vectores Ad que se pueden usar en la presente solicitud incluyen vectores Ad recombinantes (tal como E1-delecionado), capaces de replicación condicionalmente (tal como oncolíticos) y/o capaces de replicación procedentes de serotipos humano o no humano (por ejemplo, Ad5, Ad11, Ad35, o adenovirus-3 porcino); y/o vectores Ad quiméricos(tal como Ad5/35) o vectores de Ad con tropismo alterado con proteínas de fibra modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, botón o eje) (tal como inserciones peptídicas dentro del bucle HI de la proteína de botón). Además son útiles vectores Ad "cobardes", por ejemplo, un vector Ad en el que se han retirado todos los genes de adenovirus, para reducir la inmunogenicidad y para aumentar el tamaño de la carga del ADN. Esto permite, por ejemplo, la administración simultánea de secuencias que codifican las ZFN y una secuencia dadora. Dichos vectores cobardes son especialmente útiles cuando las secuencias dadoras incluyen transgenes grandes se tiene que integrar a través de integración dirigida.

Los vectores adenovíricos (Ad) recombinantes con replicación deficiente se pueden producir con una titulación elevada, e infectan fácilmente un número de diferentes tipos celulares. La mayoría de los vectores de adenovirus están modificados por ingeniería genética de modo que un transgén reemplaza los genes E1a, E1b, y/o E3 del Ad; posteriormente, el vector de replicación defectuosa se propaga en células que proporcionan una o más las funciones génicas delecionadas en trans. Por ejemplo, las células 293 humanas proporcionan la función de E1. Los vectores Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos in vivo, incluyendo células diferenciadas, que no se dividen, tales como las que se encuentran en el hígado, riñón y músculo. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad de transporte. Un ejemplo del uso de un vector Ad en un ensayo clínico implicó terapia con polinucleótidos para inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-1089 (1998)).

Ejemplos adicionales del el uso de vectores de adenovirus a la transferencia génica en ensayos clínicos incluyen Rosenecker et al., Infección 24:1 5-10 (1996); Welsh et al., Hum. Gene Ther. 2:205-18 (1995); Alvarez et al., Hum. Gene Ther. 5:597-613 (1997); Topf et al., Gene Ther. 5:507-513 (1998).

En determinadas realizaciones, el vector Ad es un vector de adenovirus quimérico, que contiene secuencias de dos o más genomas de adenovirus diferentes. Por ejemplo, el vector de Ad puede ser un vector Ad5/35. Ad5/35 se crea mediante reemplazo de uno o más de los genes de la proteína de fibra (botón, eje, cola, pentón) de Ad5 con el correspondiente gen de proteína de fibra a partir de un adenovirus del grupo B tal como, por ejemplo, Ad35. El vector Ad5/35 y características de este vector se describen, por ejemplo, en Ni et al. (2005) "Evaluation of biodistribution and safety of adenovirus vectors containing group B fibers after intravenous injection in baboons", Hum Gene Ther 16:664-677; Nilsson et al. (2004) "Functionally distinct subpopulations of cord blood CD34+ cells are transduced by adenoviral vectors with serotype 5 or 35 tropism", Mol Ther 9:377-388; Nilsson et al. (2004) "Development of an adenoviral vector system with adenovirus serotype 35 tropism; efficient transient gene transfer en primary malignant hematopoietic cells", J Gene Med 6:631-641; Schroers et al. (2004) "Gene transfer in human T lymphocytes and natural killer cells by Ad5/F35 chimeric adenoviral vectors", Exp Hematol 32:536-546; Seshidhar et al. (2003) "Development of adenovirus serotype 35 as a gene transfer vector", Virology 311:384-393; Shayakhmetov et al. (2000) "Efficient gene transfer in human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector", J Virol 74:2567-2583; y Sova et al. (2004), "A tumor-targeted and conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL for treatment of liver metastases", Mol Ther 9:496-509,

Tal como se ha indicado anteriormente, las ZFN y polinucleótidos que codifican estas ZFN se pueden administrar a cualquier célula diana. Generalmente, para inactivar un gen CCR-5, la célula es una célula inmune, por ejemplo, un linfocito (células B, células T tales como células T cooperadoras (T_H) y células T citotóxicas (T_C), células nulas tales como células citolíticas naturales (NK)); una célula mononuclear (monocitos, macrófagos); una célula granulocítica (granulocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos); un mastocito; y/o una célula dendrítica (células de Langerhans, células dendríticas intersticiales, células dendríticas de interdigitalización, células dendríticas de circulación). Los macrófagos, linfocitos B y células dendríticas son células a modo de ejemplo que presentan antígenos implicados en la activación de los linfocitos T_H. En determinadas realizaciones, la célula diana es una célula T_H, caracterizada por la expresión de CD4 en la superficie. La célula diana también puede ser una célula madre hematopoyética, que puede dar lugar a cualquier célula inmune.

Aplicaciones

Los métodos y composiciones que se describen se pueden usar para escindir el ADN en una región de interés en la cromatina celular (por ejemplo, en un sitio deseado o predeterminado en un genoma, por ejemplo, en un gen, mutante o de tipo salvaje); para reemplazar una secuencia genómica (por ejemplo, una región de interés en la cromatina celular, véase, también, el Ejemplo 5 que sigue a continuación) con una secuencia no idéntica homóloga (es decir, recombinación dirigida); para suprimir una secuencia genómica por escisión del ADN en uno o más sitios en el genoma, cuyos sitios de escisión se unen a continuación mediante la unión del extremo no homólogo (NHEJ); para identificar sistemáticamente factores celulares que facilitan la recombinación homóloga; para reemplazar una secuencia de tipo salvaje con una secuencia mutante; y/o para convertir un alelo en un alelo diferente. Dichos métodos también permiten la generación y/o modificación de líneas celulares (para usos terapéuticos y no terapéuticos), el tratamiento de infecciones (víricas o bacterianas) en un huésped (por ejemplo, por bloqueo de la expresión de receptores víricos o bacterianos, evitando de este modo la infección y/o la propagación en un organismo huésped);

para tratar enfermedades genéticas.

Por lo tanto, las composiciones y métodos que se describen en la presente memoria se pueden usar para modificación génica, corrección génica, y disrupción génica. Ejemplos no limitantes de fijación génica incluyen la integración dirigida basada en la reparación dirigida por homología (HDR); la corrección génica basada en HDR; la modificación génica basada en HDR; la disrrupción génica basada en HDR; disrrupción génica basada en NHEJ y/o combinaciones de HDR, NHEJ, y/o hibridación monocatenaria (SSA). La Hibridación Monocatenaria (SSA) se refiere a la reparación de una ruptura bicatenaria entre dos secuencias repetidas que se produce en la misma orientación por retirada de la DSB mediante exonucleasas en sentido 5'-3' para exponer las 2 regiones complementarias. Las hebras monocatenarias que codifican las 2 repeticiones directas se hibridan a continuación entre sí, y el producto intermedio hibridado se puede procesar de modo que se digieren las colas monocatenarias (la porción del ADN monocatenarios que no se hibrida con ninguna secuencia), los huecos se rellenan mediante la ADN Polimerasa, y los extremos del ADN se vuelven a unir. Esto da como resultado la supresión de secuencias localizadas entre las repeticiones directas.

Las composiciones (por ejemplo, vectores de Ad-ZFN) y métodos que se describen en la presente memoria también se pueden usar en el tratamiento de diversas enfermedades genéticas y/o enfermedades infecciosas.

Las composiciones y métodos también se puedan aplicar a terapias a base de células madre, que incluyen, pero no se limitan a:

(a) Corrección de mutaciones de células somáticas mediante conversión genética en parches cortos o integración dirigida para terapia genética monogénica.

(b) Disrrupción de alelos negativos dominantes.

(c) Disrrupción de genes necesarios para la entrada o infección productiva de patógenos en las células

(d) Modificación por ingeniería genética mejorada, por ejemplo, mediante:

(i) Modificación de la actividad genética para promover la diferenciación o la formación de tejidos funcionales; y/o

(ii) Disrupción de la actividad génica para promover la diferenciación o la formación de tejidos funcionales

(e) Bloqueo o inducción de diferenciación, por ejemplo, mediante:

(i) Disrrupción de genes que bloquean la diferenciación para promover que las células madre se diferencien hacia una ruta de linaje específico

(ii) Inserción dirigida de un casete de expresión de un siARN o de un gen que puede estimular la diferenciación de células madre.

(iii) Inserción dirigida de un casete de expresión de siARN o de un gen que puede bloquear la diferenciación de células madre y permitir una mejor expansión y mantenimiento de la pluripotencia.

(iv) Inserción dirigida de un gen indicador en marco con un gen endógeno que es un marcador de pluripotencia o de estado de diferenciación que permitiría un marcado fácil para puntuar el estado de diferenciación de células madre y como alteran este estado cambios en medios, citoquinas, condiciones de crecimiento, expresión de genes, expresión de moléculas de siARN, exposición de anticuerpos a marcadores de superficie celular, o fármacos.

(f) Transferencia de núcleos de células somáticas, por ejemplo, se pueden aislar células somáticas del propio paciente, modificar el gen diana deseado de una manera apropiada, generar clones celulares (y controlar la calidad para asegurar la seguridad del genoma), y aislar los núcleos de estas células y transferirlos a óvulos sin fertilizar para generar células hES específicas del paciente que se podrían inyectar directamente o que se podrían diferenciar antes de injertarlas en el paciente, reduciendo o eliminando de este modo el rechazo del tejido.

(g) Células madre universales mediante genosupresión de receptores del MHC – Esta estrategia se usaría para generar células de identidad inmunológica disminuida o suprimida totalmente. Los tipos celulares para este procedimiento incluyen, pero no se limitan a, células T, células B, células madre hematopoyéticas y células madre embrionarias no humanas. Por lo tanto, estas células madre o sus derivados (tipos celulares o tejidos diferenciados) se podrían injertar potencialmente en cualquier persona con independencia de su origen o histocompatibilidad.

Las composiciones también se pueden usar para la terapia de células somáticas (por ejemplo, terapia con células autólogas y/o células T universales por genosupresión de receptores del MHC, véase la sección (g) mencionada anteriormente), permitiendo de este modo la producción de reservas de células T que se han modificado para mejorar sus propiedades biológicas. Dichas células se pueden infundir en una variedad de pacientes independientemente de la fuente donante de las células T y de su histocompatibilidad con el receptor.

Además, el uso de vectores Ad tal como se describen en la presente memoria para administrar las ZFN aumenta las velocidades de NHEJ. Sin desear quedar ligado a una teoría, parece que este efecto se debe al efecto inhibidor que las

proteínas E4 (E4 ORF6 (E4 34k), E4 ORF3) pueden tener en la reparación de la DSB.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción de Vectores

A. Construcción de Vectores Ad5/35-GFP y Ad5/35-ZFN

Se construyeron vectores Ad5/35 quiméricos (Nilsson et al. (2004) Mol Ther 9:377-388; Nilsson et al. (2004) J Gene Med 6:631-641) tal como se muestra esquemáticamente en la Figura 1. En resumen, una secuencia que codifica un casete de expresión para GFP (línea superior), un casete de expresión para un par de ZFN modificadas por ingeniería genética (ZFN1 y ZFN2) que se dirigen al locus de CCR5 endógeno (línea central), o una secuencia dadora homóloga para dirigir una secuencia parche de 47 pb en el locus de CCR5 (línea inferior) se insertó en lugar de los genes E1 usando el sistema de recombinación bacteriana AdEasy (Stratagene).

Cada uno de los constructos en los vectores Ad-215 y Ad-201 comprende secuencias que codifican las dos ZFN que escinden el gen CCR5 endógeno en secuencias que codifican Leu55. Ambas ZFN se expresan bajo el control de un solo promotor a través de una fusión con 2A. Tal como se ha mostrado en la Tabla 1 anterior, el par ZFN215 codificado por el constructo Ad-215 comprende los dominios de unión de dedos de cinc 8267 y 8196z a partir de los diseños rl62 y 168, respectivamente; mientras que el par ZFN201 codificado por el vector Ad-201 comprende los dominios de unión de dedos de cinc 8266 y 8196z a partir de los diseños rl62 y 168, respectivamente. Las ZFN codificadas por los vectores Ad-215 y Ad-201 se condensan con un semidominio de escisión FokI de tipo salvaje. Véase la Figura 2.

El par ZFN224 codificado por el constructo Ad-224 comprende los dominios de unión de dedos de cinc 8267 y 8196z a partir de los diseños r162 y 168, respectivamente. Por lo tanto, el constructo Ad-224 tiene las mismas proteínas de dedos de cinc que Ad-215. Sin embargo, las ZFN codificadas por el constructo Ad-224 contienen el semidominio de escisión de FokI mutante tal como se describe en la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/808.486 (presentada el 25 de mayo de 2006). En particular, el dominio de dedos de cinc 8267 está condensado con un semidominio de escisión de FokI que contiene las mutaciones Q486E e I499L (Figura 3), y el dominio de dedos de cinc 8196z está condensado con un semidominio de escisión de FokI que contiene las mutaciones E490K e I538K (Figura 4).

B. Vector Dador para Inserción Dirigida

Para preparar un vector dador (Ad5/35 P ori, línea inferior de la Figura 1), un fragmento de 1881 pb del genoma humano que corresponde al locus de CCR5 se amplificó por PCR y se clonó en el vector PCR4-TOPO (Invitrogen). La secuencia del fragmento se muestra en la Figura 5 (SEC ID Nº: 36).

Para generar un sitio de clonación en el que insertar una secuencia "parche", 2 nucleótidos de la secuencia que se muestra en la Figura 5 se cambiaron para generar un sitio de reconocimiento XbaI. Específicamente, la secuencia de nucleótidos "atcctgataa" (SEC ID Nº: 39) (nucleótidos 470-479 en el fragmento dador) se cambió por "atct<u>a</u>gataa" (SEC ID Nº: 40) (las 2 bases cambiadas están subrayadas) mediante el kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuickChange (Stratagene).

La secuencia de ADN resultante se digirió a continuación con XbaI, y una secuencia "parche" de 47 pb, que se muestra en la Figura 6 (SEC ID Nº: 37), se insertaron en el sitio de XbaI.

La secuencia resultante, que se muestra en la Figura, 7 (SEC ID Nº: 38), se insertan el vector Ad5/35 tal como se ha descrito anteriormente para los casetes de expresión de GFP y ZFN. Con respecto a la secuencia que se muestra en la Figura 7, el brazo de homología en la posición 5' corresponde a los 1-471; la secuencia "parche" para la inserción dirigida a CCR-5 está subrayada y corresponde a los nucleótidos 472-518; y el brazo de homología en la posición 3' corresponde a los nucleótidos 519-1928.

Ejemplo 2 (ejemplo comparativo): Transducción de Células hES con vectores Ad5/35-GFP

Los vectores Ad5/35-GFP quiméricos tal como se describen en el Ejemplo 1 se introdujeron en células madre embrionarias humanas (hES) cells tal como sigue a continuación.

Se realizaron infecciones de células hES en volúmenes de 500 µl usando 400.000 células y 25 µl, 5 µl o 0,5 µl del vector Ad5/35-GFP (MDI de 8200, 1640 y 164 respectivamente). Después de 4 horas, las células se lavaron y se sembraron en células de alimentación de fibroblastos embrionarios de murino (MEF). La microscopía de fluorescencia células vivas, obtenidas aproximadamente 20 horas después de la infección, mostró fluorescencia en las colonias de células madre que se habían infectado con 5 y 25 µl de virus, y ninguna fluorescencia en las células de alimentación. El análisis de FACS para la fluorescencia de GFP se realizó □22 horas después de la infección. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

Infección	% de células T fluorescentes
Infección simulada	0,74%
0,5 µl de Ad5/35-GFP	39,4%
5 µl de Ad5/35-GFP	91%
25 µl de Ad5/35-GFP	95%

Estos resultados indican que los vectores Ad5/35 son capaces de infectar las células madre embrionarias humanas con una eficacia elevada.

Ejemplo 3: Modificación del Gen CCR-5 usando los Ad5/35-ZFN

Linfocitos T $CD4^+$ y las PBMC se obtuvieron a partir de AllCells. Las células se cultivaron en RPMI + FBS al 10% + L-Glutamina al 1% (30 mg/ml) + IL-2 (1 ng/ml, Sigma) y se activaron con perlas anti CD3-CD28 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dynal). Las células se sembraron a 3E5 células/ml en un volumen de 1 ml en una placa de 24 pocillos.

Se añadieron vectores adenovíricos tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 (Ad5/35 GFP, Ad5/35 215 o Ad5/35 224) dos días después a una MDI de 10, 30, o 100 (MDI calculada en base al título infeccioso).

Las células se cosecharon 2 días después de la exposición al virus y la eficacia de la modificación génica se determinó usando un ensayo Cel-1, realizado tal como se describe en la Publicación de Patente Internacional WO 07/014275. Véase, también, , Oleykowski et al. (1998) Nucleic Acids res. 26:4597-4602; Qui et al. (2004) BioTechniques 36:702-707; Yeung et al. (2005) BioTechniques 38:749-758.

Los resultados se muestran la Tabla 3.

Tabla 3

	% de Alelos de CCR-5 Modificados	
	PBMC	Células T CD4+
Control	no detectable	no detectable
Ad5/35-ZFN215 a MDI 10	6,1	6,7
Ad5/35-ZFN215 a MDI 30	14,0	16,5
AdS/35-ZFN215 a MDI 100	31,2	32,3
Ad5/35-ZFN224 a MDI 10	3,6	1,8
Ad5/35-ZFN224 a MDI 30	7,4	9,0
Ad5/35-ZFN224 a MDI 100	15,0	14,9
Ad5/35-GFP a MDI 10	no detectable	no detectable
Ad5/35-GFP a MDI 30	no detectable	no detectable

Estos resultados indican que la modificación génica se observó después de la infección de las células con vectores Ad5/35 que codifican tanto el par de nucleasa ZFN215 (que comprende semidominios de escisión de FokI de tipo salvaje) como el par de nucleasa ZFN 224 (que comprende los semidominios de escisión de FokI mutante que se describen en el Ejemplo 1A). Además, los resultados muestran que los niveles de modificación génicas aumentaron de una manera dependiente de la dosis.

Para determinar la permanencia de la modificación génica inducida por ZFN, las células infectadas se mantuvieron en cultivo durante otros 8 días (mismo medio de cultivo que anteriormente). Se hizo recuento de células y se diluyó con medio recién preparado cada 2 días. A continuación, las células se cosecharon (10 días después de la transducción vírica) y se repitió el ensayo de Cel-1. Además, una fracción de la población de células T $CD4^+$ se volvió a activar con perlas anti CD3/CD28 (Dynal) en el día 7. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

	% de Células Infectadas	
	CD4 Reactivadas	CD4 No activadas
Control	no detectable	no detectable
Ad5/35-ZFN215 a MDI 30	10,1	10,9
Ad5/35-ZFN215 a MDI 100	29,0	28,2
Ad5/35-ZFN224 a MDI 30	6,7	6,4
AdS/35-ZFN224 a MDI 100	16,1	16,6
Ad5/35-GFP a MDI 100	no detectable	no detectable

Estos resultados muestran que el grado de modificación génica se mantuvo a medida que las células T $CD4^+$ proliferaban. Además, la reactivación no tenía efecto aparente en el crecimiento de las células modificadas en comparación con las células sin modificar.

Ejemplo 4: Modificación del Gen CCR-5 usando Ad5/35-ZFN en Células CD34+

Los linfocitos T $CD4^+$ y las células $CD34^+$ se obtuvieron de AllCells. El día 0, se cultivaron células T $CD4^+$ en RPMI + FBS al 10% + L-Glutamina al 1% (30 mg/ml) + IL-2 (1 ng/ml, Sigma) y se activaron con perlas anti CD3-CD28 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dynal). Las células $CD34^+$ se cultivaron en medio sin suero (Stemspan H3000, Stem Cell Technologies) y se complementaron con citoquinas (Stemspan CC100, Stem Cell Technologies). Las células se sembraron a 6E5 células/ml en un volumen de 1 ml en placas de 24 pocillos. Se añadieron vectores adenovíricos (Ad5/35 GFP o Ad5/35 224) al día siguiente (día 1) a diferentes MDI (MDI calculada en base al título infeccioso).

Las células se cosecharon el día 4 y las eficacias de la modificación génica se determinaron usando un ensayo Cel-1.

Para las células T $CD4^+$, Ad5/35 224 indujo la modificación del gen CCR-5 con una eficacia de un 18,0%, un 34,5% y un 48,4% a las MDI de 25, 50 y 100, respectivamente.

De forma análoga, para las células $CD34^+$, Ad5/35 224 indujo la modificación del gen CCR5 a eficacias de un 10,9% y un 11,1%, a las MDI de 10 y 50, respectivamente.

Ejemplo 5: Inserción Dirigida de una Secuencia Exógena en el Gen CCR-5 Usando Ad5/35-ZFN

El día 0, las células T $CD4^+$ se cultivaron en RPMI + FBS al 10% + L-Glutamina al 1% (30 mg/ml) + EL-2 (1 ng/ml, Sigma) y se activaron con perlas anti CD3-CD28 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dynal). Las células se sembraron a 3E5 células/ml en un volumen de 1 ml en placas de 24 pocillos. Dos días más tarde (día 2), las células se co-transdujeron con diferentes combinaciones de Ad5/35 224 y Ad5/35 P ori dador (Figuras 1 y 7). Ad5/35 224 se añadió a las MDI de 0, 25, 50, y 100, y se añadió Ad5/35 P ori dador a las MDI de 0, 100, y 300 (MDI calculada en base al título infeccioso). Las células se cosecharon 2 días después de la infección (día 4) y la eficacia de integración dirigida se determinó mediante ensayo de RFLP, tal como sigue a continuación.

El ADN genómico se aisló a partir de células transducidas y se amplificó por PCR con cebadores fuera de la región de homología del dador. El fragmento amplificado se incubó a continuación con la enzima de restricción BglI, cuyo sitio de reconocimiento está contenido dentro de la secuencia dadora de P ori (Parche). La frecuencia de integración dirigida de la secuencia Parche se calculó determinando la relación de productos escindidos a no escindidos. La frecuencia de integración dirigida de la secuencia Parche fue de un 3,1% cuando las células se co-transdujeron con Ad5/35 224 a una MDI de 50 y Ad5/35 P ori a una MDI de 300.

Ejemplo 6: Unión de Extremos No Homólogos Inducida Usando Ad5/35-ZFP

Para determinar los tipos de mutaciones mediadas por ZFN generadas por escisión dirigida seguido de unión de extremos no homólogos (NHEJ), se secuenció y se analizó la secuencia genómica de CCR-5 de células modificadas. En resumen, se cosecharon las PBMC y las células T $CD4^+$, transducidas con Ad5/35 ZFN 215 de la misma manera que se describe en el Ejemplo 3, y el ADN genómico se extrajo de estas células. El locus de CCR5 se anticipó a continuación por PCR, se clonó con Topo en el vector PCR4-TOPO (Invitrogen), y se analizó la secuencia de los clones bacterianos y se comparó con el locus de CCR5 de tipo salvaje.

Las mutaciones inducidas por escisión de ZFN dirigida incluían tanto deleciones como inserciones, y el tamaño de dichos cambios varió a lo largo de un amplio margen. Se observaron tanto deleciones como inserciones tan cortas como un solo un par de nucleótidos, al igual que se observaron inserciones de hasta casi 100 pares de nucleótidos.

Las secuencias de algunas mutaciones a modo de ejemplo inducidas por escisión mediada por ZFN, dirigida, se muestran en las Figuras 8-10.

La Figura 8 muestra las secuencias de un número de deleciones identificadas durante el análisis. Los pares de bases que faltan se indican con puntos.

Se produjo una inserción de 5 pares de bases con una frecuencia elevada en células tratadas con ZFN. Esta inserción de 5 pares de bases es una duplicación de la secuencia de 5 pares de bases entre los sitios de unión a ZFN, lo que convierte a la secuencia GTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAG (SEC ID Nº: 41) en GTCATCCTCATCCTGAT<u>CTGAT</u>AAACTGCAAAAG (SEC ID Nº: 42), con la secuencia que se ha insertado subrayada.

Otra mutación observada frecuentemente fue una inserción de cuatro pares de bases entre los dos sitios de unión a ZFN, lo que convierte a la secuencia

GTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAG (SEC ID Nº: 41) en

GTCATCCTCATCCT<u>TCTA</u>GATAAACTGCAAAAG (SEC ID Nº: 43), con la secuencia que se ha insertado subrayada.

La Figura 9 muestra las secuencias de nucleótidos de mutaciones adicionales. En un caso, se observó una combinación de una deleción de un nucleótido y una inserción de cinco nucleótidos.

La Figura 10 muestra las secuencias de un número de inserciones más largas que resultan de la escisión de ZFN dirigida.

Un resumen de las modificaciones de secuencia en el locus CCR-5 se muestra a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5

TIPO DE MUTACIÓN		NÚMERO EN CADA TIPO DE CÉLULA		TOTALES
		PBMC	Células T CD4+	
Supresión		10	8	18
Inserciones	5 pb	11	14	25
	4 pb	8	2	10
	Otras	3	3	6
	larga	1	3	4
Tipo salvaje		10	14	24
Totales		43	44	87

Ejemplo 7: Viabilidad Celular Después de la Transducción de Ad5/35-ZFN

También se evaluó la viabilidad celular después de la transducción con constructos de Ad5/35-ZFN. En resumen, las células T $CD4^+$ y las PBMC se obtuvieron de AllCells. El día 0, las células se cultivaron en RPMI + FBS al 10% + L-Glutamina al 1% (30 mg/ml) + IL-2 (1 ng/ml, Sigma) y se activaron con perlas anti CD3-CD28 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dynal). Las células se sembraron a 3E5 células/ml en un volumen de 1 ml en placas de 24 pocillos. Se añadieron vectores adenovíricos (Ad5/35 GFP, Ad5/35 215 o Ad5/35 224) dos días más tarde (día 2) a MDI de 10, 30, y 100 (MDI calculada en base al título infeccioso). Los recuentos celulares y la viabilidad celular se midieron los días 4, 6, 8, 10 y 12 usando el protocolo VIACOUNT proporcionado con el citómetro de flujo analítico GUAVA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Guava Technologies).

Las Ad5/35 ZFN generalmente se toleraron bien, con al menos un 75% de las células (hasta un 90% en la MDI más baja) siendo viables en todos los puntos temporales. Por lo tanto, se observó una toxicidad mínima.

Ejemplo 8: Crecimiento Celular Después de la Transducción de Ad5/35-ZFN

Además, se evaluó el crecimiento celular (duplicación) después de la transducción con constructos de Ad5/35-ZFN.

El día 0, se cultivaron células T CD4+ y PBMC en RPMI + FBS al 10% + L-Glutamina al 1% (30 mg/ml) + IL-2 (1 ng/ml, Sigma). Las células activaron los días 0 y 6 con perlas anti CD3-CD28 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dynal). Las células se sembraron inicialmente a 3E5 células/ml en un volumen de 1 ml en placas de 24 pocillos. Se añadieron vectores adenovíricos (Ad5/35 GFP, Ad5/35 215 o Ad5/35 224) se añadieron en el día 2 a las MDI de 10, 30, o 100 (MDI calculada en base al título infeccioso). Los recuentos celulares y la viabilidad celular se midieron usando el

protocolo VIACOUNT proporcionado con el citómetro de flujo analítico GUAVA tal como se ha descrito en el Ejemplo 7.

El crecimiento o la duplicación celular se dio mínimamente afectada por el adenovirus (excepto para Ad5/35 215 a una MDI de 100). En general, al menos 8 duplicaciones (es decir, expansión > 100 veces) se consiguió sobre un período de 14 días tanto en las células T $CD4^+$ como en las PBMC.

Ejemplo 9: Medida de la Permanencia del Genoma del Adenovirus en células T $CD4^+$

Las células T CD4+ se cultivaron en RPMI + FBS al 10% + L-Glutamina al 1% (30 mg/ml) + IL-2 (1 ng/ml, Sigma) y se activaron con perlas anti CD3-CD28 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dynal). Las células se sembraron a 6E5 células/ml en un volumen de 1 ml en placas de 24 pocillos. Los vectores adenovíricos (Ad5/35 215 o Ad5/35 224) se añadieron al día siguiente a MDI de 10, 30 y 100 (MDI calculada en base al título infeccioso). Las células se cosecharon los días 4 y 14, el ADN se extrajo con un kit Masterpure (Epicenter Biotechnologies). La permanencia de los genomas adenovíricos se cuantificó mediante la presencia del ADN genómico de Ad tal como se mide por PCR con TaqMan® (Applied Biosystem). Se diseñaron cebadores/sondas para dirigirse a y detectar la región E4 del genoma adenovírico. El límite de detección del protocolo de PCR con TaqMan® es de ~10^{-4} genomas adenovíricos por célula.

En conjunto, entre 2 días y 12 días después de la transducción, el nivel de genomas adenovíricos disminuyó en 100-1000 veces. Se detectó menos de 10^{-2} genomas por célula a la MDI más elevada (100) el día 12 después de la transducción.

Ejemplo 10: Medida de la Permanencia de la Expresión de Proteínas en células T $CD4^+$

El día 0, las células T CD4+ se cultivaron y se activaron tal como se describe en el Ejemplo 9. Se añadieron vectores adenovíricos (Ad5/35 GFP) el día después de la activación (día 1) a las MDI de 50,100, 250 y 500 (MDI calculada en base al título infeccioso).El porcentaje de células positivas para GFP y la intensidad de fluorescencia media (IFM) se determinó mediante citometría de flujo analítico GUAVA cada 2-3 días.

Se observó expresión significativa de GFP inicialmente (día 3) a todas las MDI. La fluorescencia de GFP permaneció a través del día 13, de un 80-100% de células positivas para GFP en el día 3 a un 30-60% de células positivas para GFP en el día 13. Sin embargo, MFI disminuyó significativamente durante el mismo periodo de tiempo (en casi 100 veces), lo que sugiere que aunque las células en el día 13 se puntuaron como positivas para GFP con el citómetro de flujo, éstas contenían una cantidad significativamente menor de proteína GFP. Además, es bien conocido que GFP tiene una vida media relativamente larga (> 24 horas).

Ejemplo 11: Medida del mARN de ZFN en células T $CD4^+$ Transducidas con vectores Ad5/35-ZFN

El día 0, se cultivaron células T CD4+ y se activaron tal como se describe en el Ejemplo 9. Se añadieron vectores adenovíricos (Ad5/35 215 o Ad5/35 224) al día siguiente (día 1) a las MDI de 30 y 100 (MDI calculada en base al título infeccioso). Las células se cosecharon los días 3 y 9 (es decir, 2 y 8 días después de la transducción), y el ARN se extrajo con un kit de aislamiento de ARN High Pure® (Roche). El mARN de ZFN se cuantificó por PCR con RT-TaqMan® (Applied Biosystems). El conjunto cebador/sonda se diseño y se optimizó para hibridarse las secuencias que codifican el semidominio de escisión Fok I.

Se detectaron cantidades significativas de mARN de ZFN ($1x10^5$-$1x10^6$ copias por célula dependiendo de la MDI) 2 días después de la transducción. Sin embargo, a los 8 días después de la transducción, los niveles de mARN de ZFN en todas excepto en una muestra (Ad5/35 215 a una MDI de l00) estaban por debajo del límite de detección del ensayo. Se detectaron aproximadamente 100 copias/célula en la muestra de Ad5/35 215 a MDI 100; lo que representa una disminución de mil veces en los niveles del mARN entre 2 y 8 días después de la transduccción.

Ejemplo 12: Disrrupción del Gen CCR-5 en Células T $CD4^+$ Humanas Primarias Usando vectores Ad5/35-ZFN

Las células T $CD4^+$ humanas primarias (obtenidas de donantes en la Univ. de Pensilvania) se transdujeron de forma simulada o se transdujeron con el Ad5/35 GFP, Ad5/35 215 o Ad5/35 224.

El día 1, las células T se sedimentaron y se volvieron a suspender con una concentración de $1x10^6$/ml en Xvivo 15 (BioWhittaker, Walkersville, MD) complementado con suero de bovino fetal al 10% y L-Glutamina al 1%. Un ml de células se expuso a perlas anti CD3/CD28 (preparadas tal como se describe en Levine et al. (1997) J. Immunol. 159:5921-5930). Al día siguiente (día 2) $1x10^6$ céluas se transdujeron con los vectores Ad5/35 GFP, Ad5/35 215 o Ad5/35 224 a una MDI de 30 o 100. Al día siguiente, el volumen del medio se duplicó con Xvivo l5 que contenía suero bovino fetal al 10%, L-Glutamina al 1%, N-acetilcisteína al 0,9%, y 300 IU/ml de IL-2 recombinante humana. Para cada condición, se hizo recuento de células cada 2 días en un Contador, una muestra de ensayos se sedimentó para el análisis, y el cultivo restante se pipeteó y se alimentó a $1x10^6$ células/ml. El día 6, se retiraron perlas usando un imán, y las células se cultivaron con el medio Xvivol5/FCS/L-Glut/NAC/IL2 que se ha descrito anteriormente. El día 8, una fracción de células a partir de cada muestra se sedimentó para el análisis con Cel-1 y las células restantes en cada muestra (a una concentración de $1x10^6$ células/ml) se infectaron con la cepa US1 del VIH-1 trópica de CCR5 a una MDI de 0,1 (véase el Ejemplo 13).

Cada dos días, las células se contaron, se sedimentaron, se recogió una pequeña cantidad para el análisis con Cel-1, y las células restantes se sembraron y se alimentaron con el mismo medio que contenía Xvivo 15/FCS/L-glut/NAC/ IL2.

El Día 13, la reestimulación de cultivos de células T $CD4^+$ se realizó con una mezcla de PBMC alógenas irradiadas (3000 rad) y células K562 irradiadas (10.000 rad) que expresan CD32 más OKT3 (anti-CD3) y anti-CD28.

El ADN genómico se cosechó 13 días después de la transducción y la eficacia de la disrrupción del CCR5 se midió con el ensayo Cel-1. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

MDI	Control	GFP		Ad/ZFN 215		Ad/ZFN 224	
		30	100	30	100	30	100
Porcentaje de alelos modificados	0	0	0	54	44	44	30

Ejemplo 13: Estimulación de VIH

Además, las células T $CD4^+$ humanas primarias transducidas con vectores Ad5/35 tal como se ha descrito en el Ejemplo 12 se diluyeron a 1:3 con células sin transducir e infectadas de forma simulada o infectadas (MDI de 0,1) con una cepa del VIH capaz de replicación, US1. A continuación, se hicieron pases de estas células para permitir múltiples rondas de infección y replicación del VIH. Se aisló una pequeña cantidad de células cada uno de los días 0, 5, 11, y 17 después la infección a partir de cultivos infectados tanto de forma simulada como con VIH para controlar el porcentaje de células que contenían genes CCR5 con disrrupción. El ADN genómico se aisló a partir de cada muestra celular y se determinó la presencia de alelos de CCR5 mutante usando un ensayo Cel-1.

Los resultados se muestran en los paneles A (células transducidas Ad5/35 215) y B (células transducidas Ad5/35 224) de la Figura 11 e indican que, en células que se habían transfectado con vectores Ad ZFN, el número de células que contenía alteraciones en la secuencia en su gen CCR-5 aumentaba después de la infección con VIH (ZFN VIH) pero no aumentaba en células que no se habían infectado con VIH (ZFN simulada).

Ejemplo 14: Disrrupción de ZFN de CCR5 en células GHOST-CCR5

A. Determinación de mutaciones inducidas por ZFN en células GHOST-CCR5

Las células GHOST-CCR5, una línea celular indicadora de infección con VIH-1 que contienen múltiples (□4) copias de un casete de expresión de CCR5 autólogo y un gen marcador de GFP inducible bajo el control de la LTR del VIH-2 (Morner et al. (1999) J. Virol. 73:2343-2349), se obtuvieron del AIDS Research and Reference Reagent Program del NIH y se transdujeron con un vector Adenovírico (Ad5/35) (Schroers et al. (2004) Experimental Hematology 32:536-546) que codifica los pares 215 (véase anteriormente el texto relacionado con la Tabla 1) y 224 (que contiene las ZFN indicadas en la Tabla 1 como 8196z y 8266) de CCR5-ZFN. Los sitios de unión para ambos de estos pares de ZFN son los mismos y se muestran en la Figura 12.

La inducción de mutaciones mediadas por ZFN en el sitio diana se determinó usando un ensayo en base a la nucleasa Surveyor™ (Transgenomic), también conocida como Cel-1, una enzima sensible a la falta de emparejamientos que escinde el ADN en el sitio de mutaciones inducidas por ZFN. En resumen, el ADN genómico se extrajo de células modificadas y de control usando el kit de purificación de ADN MasturePure™ (Epicentre Biotechnologies) y se complementó con 5 uCi de □-P^{32} dATP y 5 uCi de □-P^{32} dCTP para PCR radiactiva.

Se realizó PCR radiactiva (reacciones de 50 µl) se (kit para PCR de AccuPrime™ (Invitrogen)) en 100 ng del ADN genómico extraído de células modificadas y de control. En resumen, un fragmento de 292 pb del locus de CCR5 que incluye el sitio diana de CCR5-ZFN se amplificó durante 30 ciclos (95 ºC-30 s, 60ºC -30 s, y 68ºC–30 s.) usando los cebadores C5_Cel_160_F1: AAGATGGATTATCAAGTGTCAAGTCC (SEC ID Nº: 29); y C5_Cel_160_R1: CAAAGTCCCACTGGGCG (SEC ID Nº: 30).

El producto de PCR se centrifugó a través de una columna G-50 (GE Healthcare) y 1 µl del producto purificado se mezcló con 1 µl de tampón de hibridación 10X (tampón de hibridación 1X - Tris 10 mM, NaCl 100 mM) y agua hasta un volumen final de 10 µl. El ADN se desnaturalizó y se volvió a hibridar en un bloque de PCR usando un programa que permite formar heterodúplex (95ºC-10 min; de 95ºC a 85ºC a -2ºC/s; y de 85ºC a 25ºC a -0,1ºC/s). Después de volver a hibridar, 1 µl de la nucleasa Surveyor™ (Transgenomics), 1 µl de tampón II de PCR 10X de AccuPrime™, y agua se añadieron hasta un volumen total de 20 µl. La reacción se incubó a 42 ºC durante 20 min para digerir los heterodúplex, y los productos escindidos se resolvieron en un gel de poliacrilamida de al 10% no desnaturalizante (Bio-Rad). El gel se secó y se analizó usando un Phosphorimager®. Se determinó el nivel de disrrupción de gen diana inducido por ZFN mediante la obtención de la relación del fragmento parental sin escindir a los dos productos escindidos de migración más rápida. La proporción de alelos de CCR5 con disrrupción con ZFN en la muestra original se calculó usando la fórmula: (l-√(Fracción parental)) x100. El ensayo es sensible a cambios de un solo nucleótido y tiene un límite de detección de □1% de alelos modificados con ZFN.

Los resultados, mostrados en la Figura 13, demostraron que las CCR5-ZFN tal como se describen en la presente memoria son muy eficaces (50-80%) en la mutación de CCR5 en células GHOST-CCR5 (calles 3 y 4). Las células de control sin transducir (calle 1) y las células transducidas con un vector Ad5/35 que codifica las ZFN específicas de IL-2R□ (Urnov et al. (2005) Nature 435:646-651; calle 2) no presentaron ninguna modificación detectable de CCR5, lo que indica que los resultados fueron específicos de CCR-5-ZFN.

B. Estimulación con VIH

Además, las poblaciones de células transducidas se mantuvieron en cultivo y una semana más tarde se infectaron con VIH-1_{BAL}, un prototipo de aislado de VIH-1 con tropismo de CCR5. Los virus de estimulación se obtuvieron del AIDS Research and Reference Reagent Program del NIH y se propagaron en PBMC empobrecidas en CD8 para generar reservas de trabajo.

Inmediatamente antes de la infección con VIH-1, se analizó la expresión de la superficie de CCR5 y mostró que estaba reducida en > 10 veces en las agrupaciones de células transducidas con CCR5-ZFN en comparación con las células de control tratadas con IL2R□-ZFN (Figura 14A).

Los resultados de la estimulación del VIH-1_{BAL} demostraron una disminución considerable en la infección con VIH-1 en muestras tratadas con CCR5-ZFN después de una semana, tal como se mide con la pérdida de inducción de GFP dirigida por LTR del VIH 48 horas después de la infección (Figura 14B). Se confirmó la modificación genética en el sitio diana pretendido dentro de CCR5 a través de la secuenciación del ADN genómica a partir de las células GHOST-CCR5 tratadas con CCR5-ZFN.

Además, se propagaron durante un periodo de varias semanas los clones individuales derivados de células aislados a partir de las células GHOST-CCR5 transducidas con CCR5-ZFN. Se obtuvo el genotipo del transgén de CCR5 y s ensayó un clon que poseía solamente alelos de CCR5 con disrrupción y se mostró que eran resistentes a la infección con VIH con VIH-1BAL. La introducción de un transgén de CCR-5 en estas células restauro la capacidad de infección con VIH, lo que demuestra que la resistencia a la infección con VIH-1 estaba mediada exclusivamente por un defecto en la entrada viral mediante la disrrupción de CCR5 mediada por ZFN.

Estos resultados muestran que las CCR5-ZFN escinden de forma eficaz su sitio diana del ADN en el gen CCR5, y confirman que una alta proporción de mutaciones inducidas por ZFN evitan la expresión de la superficie celular de CCR5, dando como resultado una resistencia completa a la infección con VIH-1 con tropismo de CCR5.

Ejemplo 15: La modificación de CCR5-ZFN confiere una ventaja de supervivencia

Los siguientes experimentos se realizaron para evaluar si la disrrupción mediada por ZFN de CCR5 confería la resistencia a largo plazo al VIH-1 excretada a partir de un cambio genético permanente.

A. Disrrupción de CCR-5 después de Cultivo a Largo Plazo

Las células PM1, una línea de células T $CD4^+$ con niveles de expresión de CCR5 similares a las células T $CD4^+$, se sometieron a electroporación con un plásmido de expresión de CCR5-ZFN que codifica el par ZFN201 para producir un nivel de disrupción de CCR5 endógeno de un 2,4% de los alelos.

Esta población de células tratadas con ZFN se infectó a continuación VIH-1_{BAL} o se infectó de forma simulada en el día 7, las células se propagaron en cultivo continuo durante 70 días, y la proporción de alelos modificados con ZFN se midió por análisis de ADN antes de la infección y en los días 3, 10, 21, 31, 42 y 52 después de la infección.

Tal como se muestra en la Figura 15, el día 52 de la infección, el cultivo de PM1 infectado con VIH-1 experimentó un enriquecimiento de □30 veces para los alelos de CCR5 modificados con ZFN (□73%). Por el contrario, la población infectada de forma simulada mostró permanencia estable de los alelos de CCR5 con disrrupción con ZFN (□2,3%), lo que indica que no hay consecuencias adversas en las velocidades de crecimiento para las células portadoras de un alelo modificado con ZFN en ausencia de presión selectiva. Las células PM1 que se sometieron a electroporación con plásmidos de expresión de ZFN de control (no dirigidos a CCR5) eran susceptibles a la infección con VIH-1 y no mostraron evidencia de disrrupción de CCR5.

Estos resultados demuestran que la infección con VIH-1 proporciona una ventaja selectiva potente para células modificadas con CCR5-ZFN y que la ventaja selectiva se mantiene a largo plazo en cultivo.

B. Mutaciones mediadas por ZFN

La identidad molecular de las mutaciones mediadas por ZFN en el gen CCR5 en las células PM1 también se determinó por amplificación de PCR y secuenciación de la región diana de CCR5 el día 52 después de la infección.

Se observaron numerosas deleciones e inserciones cortas molecularmente distintas en un 78% de lecturas de secuencias (63 de 81 secuencias) (Figura 16), lo que indica que la permanencia de alelos de CCR5 modificados en presencia de VIH no resultaron de un solo suceso infrecuente.

Todas las mutaciones se asignaron en o cerca de los sitios de reconocimiento de ZFN, lo que sugiere que las modificaciones permanentes de la secuencia génica de CCR5 resultaron de la escisión de ZFN y la posterior reparación mediante NHEJ. Aunque se observó una amplia gama de diferentes mutaciones por deleción e inserción, una inserción específica de 5 pb (una duplicación de la secuencia entre los sitios de unión a ZFN que da como resultado la introducción de dos codones de terminación inmediatamente secuenciada bajo del codón de isoleucina en la posición 56) representó > 30% de todas las secuencias modificadas (Figura 16).

C. Superinfección

Además, se realizaron experimentos de superinfección para confirmar que células PM1 modificadas con CCR5-ZFN permanecían susceptibles a VIH-1 con tropismo CXCR4 y mantenían una ventaja selectiva cuando se volvían a infectar con virus con tropismo de CCR5.

En resumen, las células PM1 se transfectaron de forma simulada, o se transfectaron con plásmidos que codifican el par CCR5-ZFN 201 o un par de ZFN de control (GR) tal como se ha descrito anteriormente. Estas poblaciones de células se estimularon con VIH-1_{BAL} y el día 59 después de la infección, una porción de cada muestra se mezcló con células PM1 sin transfectar, parentales y se volvió a infectar con VIH-1_{BK132} con tropismo de CXCR4 o VIH-1_{BAL} con tropismo de CCR5. Estos cultivos reinfectados se siguieron el tiempo y se analizaron para la frecuencia de disrupción génica el día 21 después de la reinfección (día 80 después de la infección inicial). Las células infectadas con VIH-1_{BAL} se volvieron a enriquecer para células modificadas con ZFN (64%) después de dilución con las células PM1, mientras que en poblaciones celulares que se infectaron de forma simulada o que se infectaron con VIH-1_{BK132} con tropismo de CXCR4, se observó poca o ninguna ventaja selectiva para células con disrupción en CCR5.

Las células GHOST-CXCR4 también se estimularon con sobrenadantes (5 µl) a partir de cultivos de células PM1 transfectadas con CCR5-ZFN expuestas al VIH-1 en los puntos temporales temprano (día 3) y tardío (día 56). Estos cultivos no mostraron infección dependiente de CXCR4. Los mismos sobrenadantes aplicados a células GHOST-CCR5 permanecieron infecciosos, aunque a un grado menor, con la excepción de la muestra transfectada con CCR5-ZFN, lo que sugiere que el enriquecimiento > 30 veces para células PM1 sin CCR5 había dado como resultado una capacidad de infección vírica muy reducida hacia el día 56 del cultivo. Por lo tanto, la evolución vírica hacia el uso del co-receptor CXCR4 no se detectó en sobrenadantes recogidos en: temporales temprano y tardío a partir de cultivos tratados con CCR5-ZFN e infectados con VIH-1.

Además, se obtuvieron secuencias en bucle V3 a partir de sobrenadantes de células PM-1 expuestas a VIH-1 transfectadas con plásmidos que expresan CCR5-ZFN o un control de GFP para determinar los efectos del enriquecimiento de células sin CCR5 generadas con ZFN sobre el tropismo vírico en el tiempo. Se aislaron 150 secuencias de ADN de VIH provírico a partir de cultivo longitudinal de células PM-1 tratadas con ZFN de CCR5 infectado con VIH-1_{BAL}; de éstas, se aislaron 88 el día 3, y se aislaron 62 el día 52 después de la infección. Como un control, se aislaron 78 secuencias de ADN del VIH a partir de las células PM-1 tratadas con GFP infectadas con VIH; 45 el día 3 y 33 el día 52. Las secuencias se evaluaron para cambios en el tropismo mediante emparejamiento de las secuencias consenso R5, R5X4, o X4 de bucle V3 que se describen en Hung et al. (1999) J. Virol. 73:8216-8226. Todas las secuencias de bucle V3 de las muestras tanto del día 3 como del día 52 tratadas con GFP y con CCR5-ZFN se emparejaban de forma muy cercana con la secuencia consenso de CCR5, lo que sugiere que no se produjo ninguna evolución rápida hacia el cambio del co-receptor; coherente con los datos anteriores que muestran capacidad de infección solamente en la línea celular indicadora de CCR5-GHOST.

Estos resultados demuestran que la expresión transitoria de las CCR5-ZFN establece una resistencia estable y selectiva al VIH-1 con tropismo de CCR5, similar a la observada en individuos portadores de la mutación Δ32 de CCR5 de origen natural.

Ejemplo 16: Selección in vitro de células T CD4 primarias modificadas con CCR5-ZFN

A. Disrrupción de CCR5 con ZFN

Para determinar la eficacia de las CCR5-ZFN en células humanas primarias, las células T $CD4^+$ de donantes sanos con un gen CCR5 de tipo salvaje se transdujeron con vectores Ad5/35 que codifican CCR5-ZFN 215 o CCR5-ZFN 224 para proporcionar una administración de ZFN de alta eficacia, transitoria. La multiplicidad de niveles de infección dependientes de (MDI) de disrrupción de CCR5 mediada por ZFN (que alcanza un 40-60% de los alelos de CCR5) se observaron en múltiples experimentos usando células aisladas de diferentes donantes. Un ejemplo se muestra en la Figura 17.

Tal como se muestra en la Figura 18, la velocidad de duplicación de la población de las células T CD4 primarios modificados no se distinguían de la de las células sin transducir, con la proporción de alelos modificados con CCR5 permaneciendo estable durante al menos un mes durante el cultivo in vitro.

B. Estimulación con VIH

Además, se evaluó la resistencia a la infección con VIH in vitro de las células T CD4 modificadas por ZFN en masa.

Se ha demostrado que los individuos portadores de la mutación Δ32 de CCR5 de origen natural están protegidos de la infección y de la progresión del VIH. Véase, por ejemplo, Samson et al. (1996) Nature 382:722-725 (1996); Huang (1996) Nat Med. 2:1240-1243 (1996); Berger et al. (1999) Annu. Rev. Immunol 17:657-700. En un experimento de control, las células T $CD4^+$ de un donante homocigoto para el alelo Δ32 de CCR5 se mezclaron con células T $CD4^+$ de un donante de tipo salvaje de CCR5 en las relaciones indicadas, y se estimuló con $VIH\text{-}1_{BAL}$. Después de la estimulación, se observó un enriquecimiento de ~2 veces para las células T CD4 de Δ32 de CCR5, en comparación con las muestras infectadas de forma simulada en paralelo.

La infección de una población de células T $CD4^+$ transducidas con CCR5-ZFN en masa con $VIH\text{-}1_{US1}$ con tropismo de CCR5 también dió como resultado un enriquecimiento de dos veces de células con genes editados que contenían alelos de CCR5 con disrrupción con ZFN (medido usando el ensayo de nucleasa Surveyor® (Cel-1) tal como se ha descrito anteriormente) durante 17 días de cultivo, mientras que las poblaciones de control infectadas de forma simulada mantenían un nivel estable de alelos de CCR5 con disrrupción con ZFN (Figura 19). En experimentos en paralelo, las células transducidas con CCR5-ZFN estimuladas con $VIH\text{-}1_{US1}$ produjeron niveles significativamente menores de p24 soluble que los controles, lo que es coherente con la frecuencia de disrrupción de CCR5 en la población. Las células T CD4 transducidas con un vector control de Ad5/35 GFP no mostraron disrrupción detectable de su gen CCR5.

Por lo tanto, las células T $CD4^+$ convertidas en CCR5 nulos preparadas a través de transducción de ZFN se seleccionaron con eficacia similar a la de los linfocitos T CD4 homocigotos para el alelo CCR5Δ32 de origen natural de infección con VIH-1.

Ejemplo 17: Especificidad de las CCR5-ZFN en Células T CD4 primarias

A. Rupturas bicatenarias

Para cuantificar el número de rupturas bicatenarias (DSB) generadas después de la expresión de ZFN, realizamos la tinción intranuclear para las DSB de todo el genoma a través de inmunodetección de focos de P53BP1 como una medida imparcial de la acción de ZFN por todo el núcleo. P53BP1 se lleva a los sitios que las DSB al comienzo de la respuesta de reparación y es necesaria para NHEJ (Schultz et al. (2000) J Cell Biol. 151:1381-1390). En resumen, 24 horas después de la transducción de las células T $CD4^+$ con vectores Ad5/35 que expresan las ZFN dirigidas a CCR5, se determinó el número de focos inmunorreactivos de 53BP1 por núcleo de las células T CD4.

Se realizó la tinción intranuclear para P53BP1 usando fijación con metanol o paraformaldehído seguido de permeabilización nuclear con Triton al 0,5%. Los anticuerpos anti-P53BP1 de conejo purificados por afinidad (Bethel Laboratories) y el anticuerpo secundario F(ab')2 de cabra anti-IgG Alexa Fluor™ 488 (H+L) de conejo eran de Invitrogen. Los anticuerpos se usaron a una concentración final de de 2 a 5 µg/ml. Se realizó microscopía de epifluorescencia usando un Zeiss Axioplan-II (Thornwood NY) con un objetivo Plan Apo de 63x de Zeiss que tiene una apertura numérica de 1,4.

Las imágenes se adquirieron y se analizaron usando módulos de adquisición y clasificación con el paquete de software Volocity™ de Improvision (Lexington MA). Se realizó el análisis de regiones independientes de fluorescencia de P53BP1 ajustando el tiempo de exposición y los umbrales para minimizar la autofluorescencia mediante la sincronización de la intensidad para incluir el 40% superior de fluorescencia. A continuación, se enumeraron y se midieron las regiones individuales identificadas. En los análisis finales, sólo se incluyeron las regiones con fluorescencia de color verde que se colocalizaron con fluorescencia del DAPI.

Los resultados se muestran en la Figura 20. No hubo ninguna diferencia significativa en el número medio de focos de P53BP1 intranucleares cuando se compararon células T CD4 sin transducir y transducidas con ZFN 224. Por el contrario, las células de control positivo tratadas con etopósido ($p = 0,004$) o células transducidas con un vector Ad5/35 que expresa ZFN 215 ($p = 0,003$) mostraron una elevación estadísticamente significativa en los focos intranucleares de P53BP1 cuando se compararon con las células sin transducir. Además, no se observó diferencia significativa en el perímetro medio de los focos de p53BP1 entre todas las condiciones. El análisis del ADN confirmó grados equivalentes de escisión en el sitio diana pretendido en el gen CCR5 tanto por ZFN 215 como por ZFN 224.

B. Determinación del sitio de unión de ZFN consenso

Para confirmar la especificidad de la acción de ZFN 224, se determinaron los sitios de unión de ZFN consenso y se encontró que coincidían con la única secuencia diana pretendida en CCR5. Se sometieron a ensayo las preferencias del sitio de unión para cada una de las 2 proteínas de dedos de cinc que comprenden ZFN-224 usando un método de selección de sitios tal como sigue a continuación: (1) primero, una versión marcada con HA de la ZFP de interés se expresó a través del sistema de transcripción-traducción acoplada rápida TnT (Promega), y se incubó con un conjunto de secuencias de ADN tomadas de forma parcialmente aleatoria en presencia de fragmentos de Fab anti-HA biotinilados (Roche) ADN competidor poli dIdC (Sigma); (2) la proteína - junto con cualquier secuencia de ADN unida de forma productiva — se capturó en perlas magnéticas revestidas con estreptavidina (Dynal); (3) las perlas magnéticas se colocaron en mezcla máster para PCR de Roche que contenía los cebadores apropiados y el ADN unido se liberó a continuación y se amplificó por PCR. A continuación, este conjunto de ADN amplificado se usó como el conjunto de ADN de partida para los ciclos posteriores de unión a ZFP, enriquecimiento y amplificación. Los ciclos

que comprenden las etapas (I)-(3) se repitieron durante un total de cuatro ciclos de selección. Finalmente, se clonaron y se secuenciaron los fragmentos de ADN amplificados después del ciclo final. La región aleatoria de cada secuencia de ADN se alineó para determinar la secuencia del sitio de unión consenso para el dominio de unión a ADN de dedos de cinc DNA. Los sitios de unión consenso determinados con este método concordaban con los sitios de unión que se especifican en la Tabla 1.

Se usaron las preferencias de secuencias diana para las dos CCR5 ZFN del par ZFN 224 (8196z y 8266, Tabla 1), determinadas tal como se ha descrito anteriormente, para guiar una predicción bioinformática pangenómica de los 15 sitios no diana principales potenciales en el genoma humano. Este análisis bioinformático buscó y clasificó los potenciales sitios no diana tal como sigue a continuación:

Se identificaron en el genoma humano todos los sitios potenciales de unión a ADN para los dos miembros del par ZFN224 (8196z y 8266, Tabla 1), permitiendo hasta dos desapareamientos de pares de bases a partir de las secuencias consenso de cada sitio diana determinadas tal como se ha descrito anteriormente.

Se identificaron todas los posibles sitios de escisión usando la lista completa de sitios de unión (identificados tal como se ha descrito en el párrafo anterior) que permitieron que cualquiera de las dos ZFN (incluyendo sucesos de homodimerización y de heterodimerización) se unieran en la configuración apropiada para la actividad de nucleasa (es decir las ZFN que se unen en sitios opuestos del ADN con un espaciado entre ellas de 5 o 6 pb).

A continuación se clasificó la lista resultante de sitios potenciales de escisión para dar prioridad a los sitios con la similitud más elevada con el consenso para cada ZFN tal como se ha definido con el método de selección de sitios que se ha descrito anteriormente. En resumen, se usaron los datos de selección de sitios para crear una probabilidad para el reconocimiento de todos los cuatro nucleótidos (A, C, G o T) en cada una de las 12 posiciones del sitio de unión para cada ZFN. Cada supuesto sitio de unión a ZFN se puntuó como el producto de estas doce probabilidades (12). (Obsérvese que para eliminar una puntuación o probabilidad de cero, cada posición tenía un solo recuento añadido para cada nucleótido (A, C, G o T) antes de normalización para asegurar que ninguna entrada en la tabla de probabilidades fuera cero). De forma análoga, se calculó la puntuación para un sitio de escisión no diana dado (que requiere que dos de dichos sitios de ZFN estén ocupados) como el producto de las dos puntuaciones dadas a cada uno de los dos sitios de unión a ZFN que comprenden el supuesto sitio de escisión. De los 15 sitios identificados, 7 entran dentro de los genes anotados y 2 de éstos entran dentro de secuencias exónicas. Estos siete genes comparten las siguientes características; (i) su mutación o disrrupción no se ha conectado con ninguna patología conocida; y (ii) con la excepción de CCR2, no tienen ninguna función descrita en las células T CD4.

Los ensayos de nucleasa Surveyor™ no revelaron actividad detectable de ZFN (límite de detección de un 1%) en ninguno de estos sitios con la excepción de CCR2 (el pariente más cercano del gen CCR5 en el genoma humano). Los inventores han observado una modificación de un 4,1% de alelos de CCR2 en la población en condiciones que revelaron un 35,6% de alelos de CCR5 modificados con ZFN. Sin embargo, se debería tolerar bien la pérdida de CCR2 en células T CD4 dado que los ratones CCR2-/- presentan numerosos fenotipos leves asociados predominantemente con un retraso en el tráfico y captación de macrófagos (Peters et al. (2000) J. Immunol. 165:7072-7077). Los alelos mutantes de CCR2 se han correlacionado con un retraso en la progresión del SIDA en individuos infectados con VIH, aunque no se observó ninguna influencia en la incidencia de la infección con VIH-1 (Smith et al. (1997) Nat. Med. 3:1052-1053). Por lo tanto, es poco probable que sea perjudicial la mutación paralela de CCR2 y puede aumentar la protección de células T CD4 modificadas frente a la infección con VIH.

La combinación del análisis dirigido al sitio de unión consenso de ZFP de los sitios no diana más similares en el genoma con la tinción intranuclear sin sesgar para la generación de DSB pangenómica indica que ZFN 224 es una nucleasa modificada por ingeniería genética altamente específica con actividad que solo se puede medir en el gen CCR5 y, con una intensidad menor que □10 veces, en el CCR2 homólogo de CCR5.

Ejemplo 18: Selección in vivo de Celulas T CD4 primarias modificadas con CCR5-ZFN

Se usó un modelo de ratón NOG/SCID de infección con VIH para someter a ensayo la transferencia adoptiva y protección de la infección con VIH de las células T CD4 modificadas in vivo con ZFN. Véase Schultz et al. (2007) Nat. Rev. Immunol 7:118.

Las células T CD4 primarias se transdujeron con los vectores Ad5/35 y se expandieron en cultivo usando perlas magnéticas revestidas con anti-CD3/anti-CD28 en presencia de IL-2. Los ratones NOG/SCID (7-9 semanas de edad) se asignaron aleatoriamente a 2 grupos de tratamiento (n = 8 ratones por grupo) con la misma mezcla de machos y hembras en cada grupo. Estos ratones se mantuvieron en una instalación animal con flora definida. Ambos grupos recibieron una inyección IP de de 100 µl de PBS que contenía 7,5 millones de células T CD4 humanas primarias expandidas ex vivo en CCR5-ZFN y 1 millón de PBMC autólogas, en reposo para favorecer el injerto en combinación. Además, los animales con tratamiento simulado recibieron 1 millón de PBMC autólogas activadas con PHA sin infectar, mientras que el grupo de animales infectados recibió 1 millón de PBMC activadas con PHA infectadas con VIH-1_{US1} con tropismo de CCR5.

Para evaluar el injerto, se realizó toma de muestras de sangre periférica tres y cuatro semanas después de la transferencia adoptiva y se analizó el injerto por citometría de flujo para CD45, CD4 y CD8 humanos. Después de 4,5

semanas, los ratones se sacrificaron y se purificaron los linfocitos T CD4 esplénicos usando el kit de separación MACS de Miltenyi. Solamente se usaron muestras con una pureza mayor que un 75% para el análisis final. Para determinar la frecuencia de disrrupción de CCR5, se usó un ensayo de nucleasa Surveyor™ modificada mediante el uso de un enfoque de PCR anidados para retirar totalmente el ADN genómico contaminante de ratón. El ADN de células CD4 esplénicas purificadas primero se amplificó usando 50 pmoles de cebadores externos (R5-det-out-F1: CTGCCTCATAAGGTTGCCCTAAG (SEC ID Nº: 31); C5_HDR_R: CCAGCAATAGATGATCCAACTCAAATTCC (SEC ID Nº: 32)) durante 25 ciclos (95 ºC - 30 seg, 58 ºC - 30 seg, y 68 ºC - 3 min.), se purificó en gel el material resultante, y se realizó el ensayo de nucleasa Surveyor™ en el producto purificado según las recomendaciones de los fabricantes.

Después de un mes de infección con VIH in vivo, los ratones se sacrificaron y se usó el ADN genómico de linfocitos T CD4 humanos purificados a partir del bazo para análisis de disrrupción de CCR5 mediada por ZFN, usando el ensayo de nucleasa Surveyor™ que se ha descrito anteriormente. Las muestras de 2 ratones (uno infectados con VIH y uno infectado de forma simulada) se excluyeron del análisis debido a la purificación inadecuada de células CD4.

Todos los grupos mostraron el mismo injerto, aunque los grupos infectados con el VIH presentaron una relación de células T CD4 a CD8 reducida, coherente con la supresión de células T CD4 inducida con VIH.

Además, la Figura 21 muestra que se observó un enriquecimiento de aproximadamente 3 veces para alelos de CCR5 con disrrupción con ZFN en el grupo infectado con VIH (disrrupción media de CCR5 de un 27,5%), en comparación con los animales que recibieron una población de partida idéntica de células T CD4 tratadas con ZFN en ausencia de infección con VIH (grupo de simulación, disrupción mediante CCR5 de un 8,5%, p = 0,008).

Estos datos demuestran (i) una ventaja selectiva para las células T $CD4^+$ humanas primarias transducidas con ZFN en presencia de VIH-1 in vivo, y (ii) un injerto y crecimiento normales de estas mismas células transducidas con ZFN incluso en ausencia de esta presión selectiva. Estos datos indican que la administración transitoria de ZFN modificadas por ingeniería genética tuvo éxito en la reproducción del genotipo nulo de CCR5Δ32 (y fenotipos resultantes).

Por lo tanto, las ZFN que se describen en la presente memoria se escinden específicamente en el gen CCR5, y provocan una disrrupción permanente de más de un 50% de los alelos CCR5 en una población en masa de células T $CD4^+$ humanas primarias. Además, la disrrupción genética de CCR5 por las ZFN proporciona una protección robusta, estable, y heredable frente a la infección con VIH-1 in vitro e in vivo. Las células T CD4 modificadas con ZFN se injertan y proliferan normalmente después de la estimulación.

REIVINDICACIONES

1.Una proteína que comprende un dominio de unión al ADN de proteína de dedos de cinc modificado por ingeniería genética, en donde el dominio de unión al ADN comprende cuatro hélices de reconocimiento de dedos de cinc tal como sigue a continuación:

F1: RSDNLSV (SEC ID Nº: 10)

F2: QKINLQV (SEC ID Nº: 17)

F3: RSDVLSE (SEC ID Nº: 12)

F4: QRNHRTT (SEC ID Nº: 13)

2.Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un dominio de escisión o semidominio de escisión.

3.La proteína de la reivindicación 2, en donde el semidominio de escisión es un semidominio de escisión FokI de tipo salvaje o modificado por ingeniería genética.

4.Un polinucleótido que codifica la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5.Un vector de administración génica que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4.

6.El vector de administración génica de la reivindicación 5, en donde el vector es un vector adenovírico tal como un vector Ad5/35.

7.Una célula aislada que comprende la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4 o el vector de administración génica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6.

8.La célula de la reivindicación 7, en donde la célula se selecciona entre el grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula T, macrófagos, una célula dendrítica y una célula que presenta antígenos.

9.La célula de la reivindicación 8, en donde la célula T es una célula $CD4^+$ o la célula se selecciona entre el grupo que consiste en una célula K562, una célula HEK293, una PM-1, una célula THP-1 y una línea celular GHOST.

10.Un método in vitro para inactivar el gen CCR-5 en una célula humana, método que comprende introducir en la célula una proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4 o un vector de administración génico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6.

11.El método in vitro de la reivindicación 10, en donde la célula se selecciona entre el grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula T tal como una célula $CD4^+$, un macrófago, una célula dendrítica y una célula que presenta antígenos.

12.El método in vitro de la reivindicación 11, en donde la célula T es una célula $CD4^+$ o la célula se selecciona entre el grupo que consiste en una célula K-562, una célula HEK293, una PM-1, una célula THP-1 y una línea celular GHOST.

13.Polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, que codifica un polipéptido, en donde el polipéptido comprende

(i) un dominio de unión al ADN de dedos de cinc que se modifica por ingeniería genética para que se una a un sitio diana en un gen CCR5; y

(ii) un dominio de escisión;

para uso como un medicamento para tratar o prevenir la infección con VIH.

14.El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 13 para uso como un medicamento para tratar o prevenir la infección con VIH, en donde el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4 adicionalmente codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende

(i) un dominio de unión al ADN de dedos de cinc que se modifica por ingeniería genética para que se una a un segundo sitio diana en un gen CCR5; y

(ii) un dominio de escisión.

15.El uso del polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14 para uso como un medicamento para tratar o prevenir la infección con VIH, en donde el polipéptido comprende un dominio de unión al ADN de proteína de dedos de cinc modificado por ingeniería genética, en el que el dominio de unión al ADN comprende cuatro regiones de reconocimiento de dedos de cinc tal como sigue a continuación:

F1: DRSNLSR (SEC ID Nº: 2)

F2: VSSNLTS (SEC ID Nº: 6)

F3: RSDNLAR (SEC ID Nº: 4)

F4: TSGNLTR (SEC ID Nº: 8).

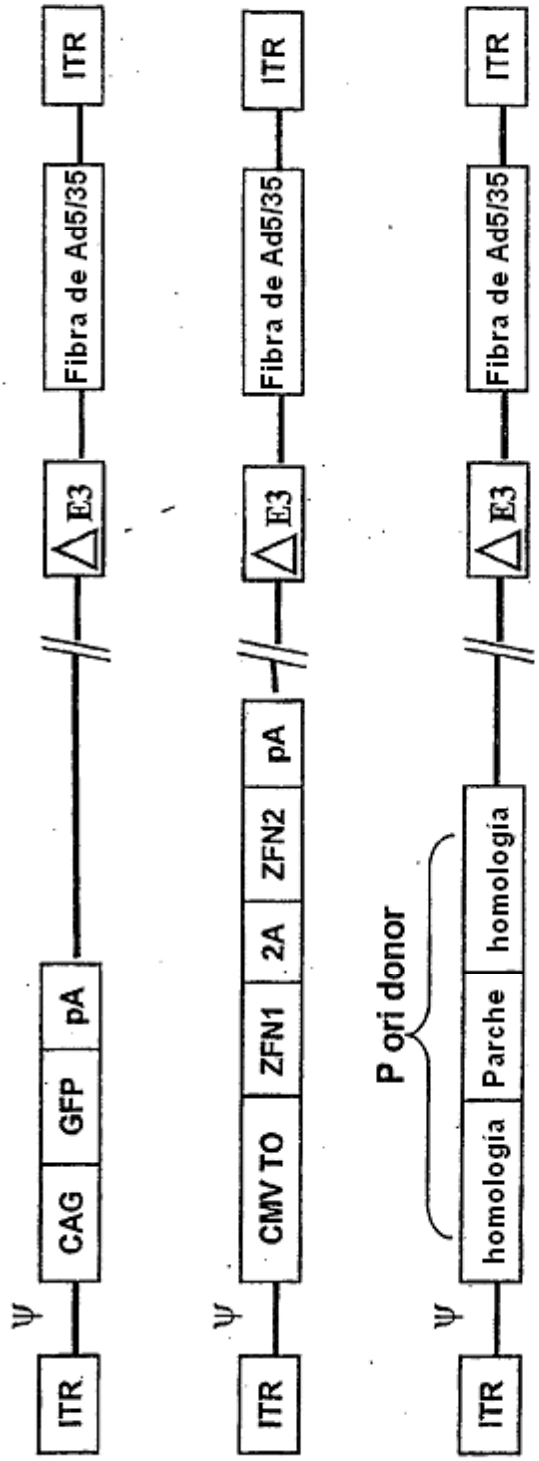


FIG. 1

Vector de Ad5/35: casete de expresión transgénica (GFP y ZFN) o secuencia dadora insertada en la región E1

FIG. 2: **Semidominio de escisión de FokI de tipo salvaje**

QLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPI
GQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNG
EINF (SEC ID Nº: *)

FIG. 3: Q486E:I499L **mutante de dimerización**

QLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPI
GQADEMERYVEENQTRNKHLNPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNG
EINF (SEC ID Nº: *)

FIG. 4: E490K:I538K **mutante de dimerización**

QLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPI
GQADEMQRYVKENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHKTNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNG
EINF (SEC ID Nº: *)

FIG. 5:

gttgtcaaagcttcattcactccatggtgctatagagcacaagattttatttggtgagatggtgctttcatgaattcccccaacagagccaagctc
tccatctagtggacagggaagctagcagcaaaccttcccttcactacaaaacttcattgcttggccaaaaagagagttaattcaatgtagacatct
atgtaggcaattaaaaacctattgatgtataaaacagtttgcattcatggagggcaactaaatacattctaggactttataaaagatcacttttta
tttatgcacagggtggaacaagatggattatcaagtgtcaagtccaatctatgacatcaattattatacatcggagccctgccaaaaaatcaatgt
gaagcaaatcgcagcccgcctcctgcctccgctctactcactggtgttcatctttggttttgtgggcaacatgctggtcatcctcatcctgataaa
ctgcaaaaggctgaagagcatgactgacatctacctgctcaacctggccatctctgacctgtttttccttcttactgtccccttctgggctcacta
tgctgccgcccagtgggactttggaaatacaatgtgtcaactcttgacagggctctattttataggcttcttctctggaatcttcttcatcatcct
cctgacaatcgataggtacctggctgtcgtccatgctgtgtttgctttaaaagccaggacggtcacctttggggtggtgacaagtgtgatcacttg
ggtggtggctgtgtttgcgtctctcccaggaatcatctttaccagatctcaaaaagaaggtcttcattacacctgcagctctcattttccatacag
tcagtatcaattctggaagaatttccagacattaaagatagtcatcttggggctggtcctgccgctgcttgtcatggtcatctgctactcgggaat
cctaaaaactctgcttcggtgtcgaaatgagaagaagaggcacagggctgtgaggcttatcttcaccatcatgattgtttattttctcttctgggc
tccctacaacattgtccttctcctgaacaccttccaggaattctttggcctgaataattgcagtagctctaacaggttggaccaagctatgcaggt
gacagagactcttgggatgacgcactgctgcatcaaccccatcatctatgcctttgtcggggagaagttcagaaactacctcttagtcttcttcca
aaagcacattgccaaacgcttctgcaaatgctgttctattttccagcaagaggctcccgagcgagcaagctcagtttacacccgatccactgggga
gcaggaaatatctgtgggcttgtgacacggactcaagtgggctggtgacccagtcagagttgtgcacatggcttagttttcatacacagcctgggc
tgggggtggggtgggagaggtctttttaaaaggaagttactgttatagagggtctaagattcatccatttatttggcatctgtttaaagtagatt
agatcttttaagcccatcaattatagaaagccaaatcaaaatatgttgatgaaaaatagcaacctttttatctccccttcacatgcatcaagttat
tgacaaactctcccttcactccgaaagttccttatgtatatttaaaagaaagcctcagagaattgctgattcttgagtttagtgatctgaacagaa
ataccaaaattatttcagaaatgtacaactttttacctagtacaaggcaacatataggttgtaaatgtgtttaaaacaggtctttgtcttgctatg
gggagaaaagacatgaatatgattagtaaagaaatgacacttttcatgtgtgatttc

FIG. 6: **Secuencia parche de CCR5 de 47 pb**

ctagatcagtgagtatgccctgatggcgtctggactggatgcctcgt

FIG. 7:

gttgtcaaagcttcattcactccatggtgctatagagcacaagattttatttggtgagatggtgctttcatgaattcccccaacagagccaagctc
tccatctagtggacagggaagctagcagcaaaccttcccttcactacaaaacttcattgcttggccaaaaagagagttaattcaatgtagacatct
atgtaggcaattaaaaacctattgatgtataaaacagtttgcattcatggagggcaactaaatacattctaggactttataaaagatcacttttta
tttatgcacagggtggaacaagatggattatcaagtgtcaagtccaatctatgacatcaattattatacatcggagccctgccaaaaaatcaatgt
gaagcaaatcgcagcccgcctcctgcctccgctctactcactggtgttcatctttggttttgtgggcaacatgctggtcatcctcatctagatcag
tgagtatgccctgatggcgtctggactggatgcctcgtctagataaactgcaaaaggctgaagagcatgactgacatctacctgctcaacctggcc
atctctgacctgtttttccttcttactgtccccttctgggctcactatgctgccgcccagtgggactttggaaatacaatgtgtcaactcttgaca
gggctctattttataggcttcttctctggaatcttcttcatcatcctcctgacaatcgataggtacctggctgtcgtccatgctgtgtttgcttta
aaagccaggacggtcacctttggggtggtgacaagtgtgatcacttgggtggtggctgtgtttgcgtctctcccaggaatcatctttaccagatct
caaaaagaaggtcttcattacacctgcagctctcattttccatacagtcagtatcaattctggaagaatttccagacattaaagatagtcatcttg
gggctggtcctgccgctgcttgtcatggtcatctgctactcgggaatcctaaaaactctgcttcggtgtcgaaatgagaagaagaggcacagggct
gtgaggcttatcttcaccatcatgattgtttattttctcttctgggctccctacaacattgtccttctcctgaacaccttccaggaattctttggc
ctgaataattgcagtagctctaacaggttggaccaagctatgcaggtgacagagactcttgggatgacgcactgctgcatcaaccccatcatctat
gcctttgtcggggagaagttcagaaactacctcttagtcttcttccaaaagcacattgccaaacgcttctgcaaatgctgttctattttccagcaa
gaggctcccgagcgagcaagctcagtttacacccgatccactggggagcaggaaatatctgtgggcttgtgacacggactcaagtgggctggtgac
ccagtcagagttgtgcacatggcttagttttcatacacagcctgggctgggggtggggtgggagaggtctttttaaaaggaagttactgttatag
agggtctaagattcatccatttatttggcatctgtttaaagtagattagatcttttaagcccatcaattatagaaagccaaatcaaaatatgttga
tgaaaaatagcaacctttttatctccccttcacatgcatcaagttattgacaaactctcccttcactccgaaagttccttatgtatatttaaaaga
aagcctcagagaattgctgattcttgagtttagtgatctgaacagaaataccaaaattatttcagaaatgtacaacttttacctagtacaaggca
acatataggttgtaaatgtgtttaaaacaggtctttgtcttgctatggggagaaaagacatgaatatgattagtaaagaaatgacacttttcatgt
gtgatttc

ysy24	Deleción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATC.....AGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy12	Deleción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTC.....AAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
lysy4	Deleción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCAT.....AAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy19	Deleción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCT...AAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy58	Deleción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCT...AAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy34	Deleción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTG.....CAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy45	Deleción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTG.....CAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy27	Deleción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTG..AAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy37	Deleción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTG..AAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy59	Deleción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTG.AAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
lysy20	Deleción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGA.....CAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
lysy15	Deleción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGAT.....AGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
lysy10	Deleción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGAT.....AAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy30	Deleción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGAT.....AAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy13	Deleción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATA.....TGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy51	Deleción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAA.CTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy63	Deleción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAA.CTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy23	Deleción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAA.....GGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC

FIG. 8

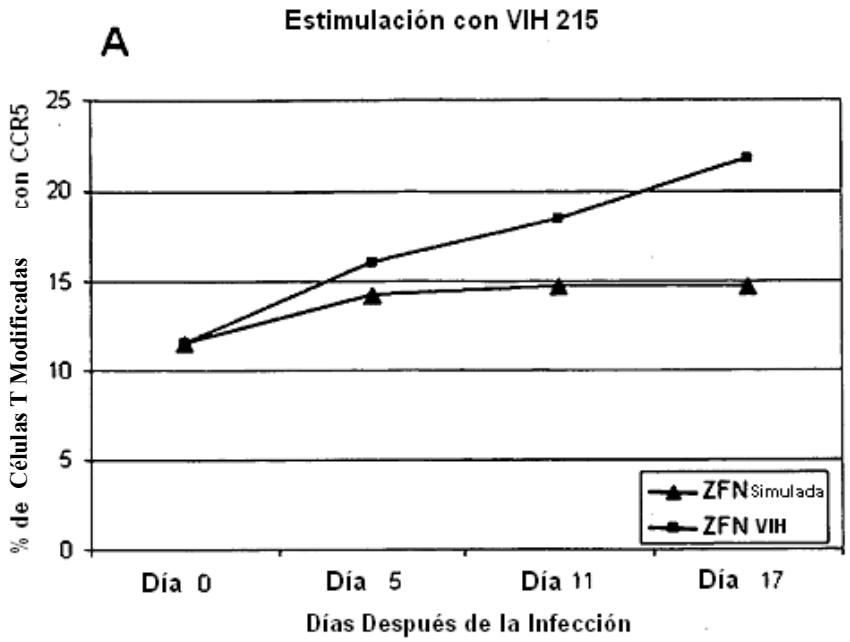
ysy18	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
1ysy14	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
1ysy34	Inserción	Célula T	TTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy14	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy21	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy25	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy26	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy29	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy57	Inserción	Célula T	TTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy7	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy9	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy28	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCGTGATGTGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC

1ysy7	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGA.CTGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
1ysy24	Inserción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy35	Inserción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
1ysy33	Inserción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC

FIG. 9

ysy38	Inserción	Célula T	TTTTGTGGGTAACATGCTGGTCATCCTCATCTAGATCAGTGAGTATGCCCTGATGGCGTCTGGACTGGATGCCTCGCCTAGAAAACTG TAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy56	Inserción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATCAGTGAGTATGCCCTGATGGCGTCTGGACTGGATGCCTCGTCTAGATAA ACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
ysy61	Inserción	Célula T	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTTCTAGATCAGTGAGTATGCCCTGATGGCGTCTGGACTGGATGCCTCGTCTAGATAA ACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC
1ysy3	Inserción	PBMC	TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATGCCCCTGCAGGTCGCACCACAGAGCTCACCCAACCTGAGTCCCTCTGGTACTGA CCACTCCAGACTGAGTCCCTCTGGTACTGACCACTCCGGACTGAGTCCCTCTGGTACTGACCACTCAGGGCTCTGATAAACTGCAAAAGG CTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC

FIG. 10


A
Estimulación con VIH 215
% de Células T Modificadas con CCR5
25
20
15
10
5
0
ZFN Simulada
ZFN VIH
Día 0
Día 5
Día 11
Día 17
Días Después de la Infección

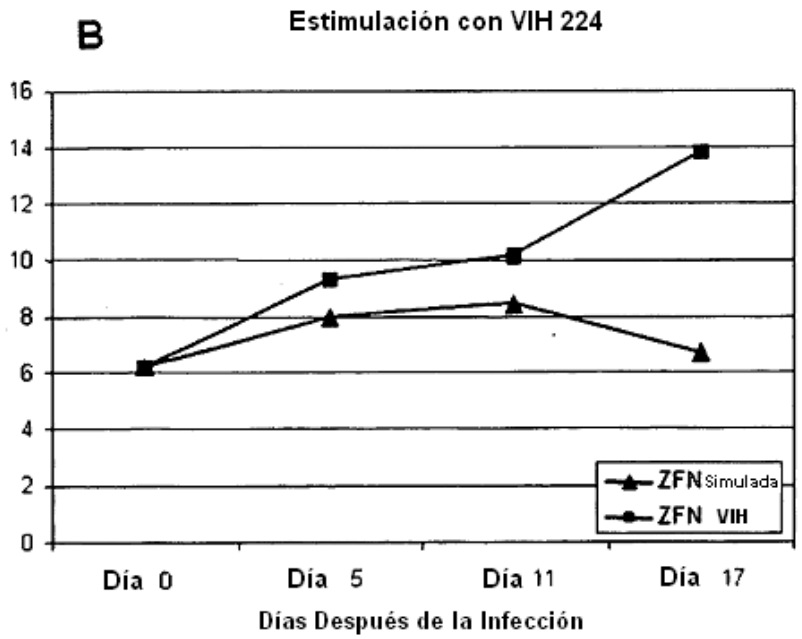

B
Estimulación con VIH 224
16
14
12
10
8
6
4
2
0
ZFN Simulada
ZFN VIH
Día 0
Día 5
Día 11
Día 17
Días Después de la Infección

FIG. 11

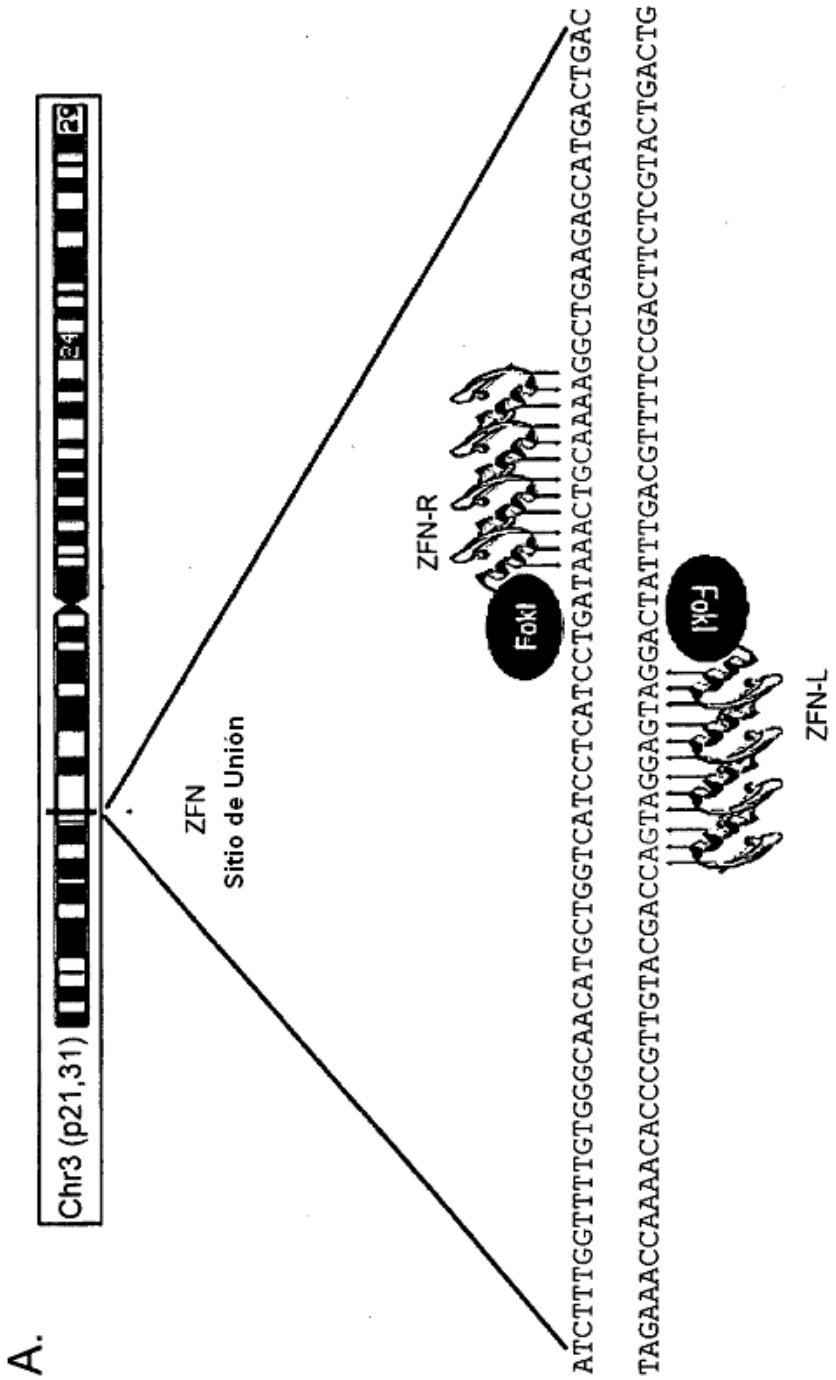


FIG. 12 (SEC ID Nºs: 67 y 68)

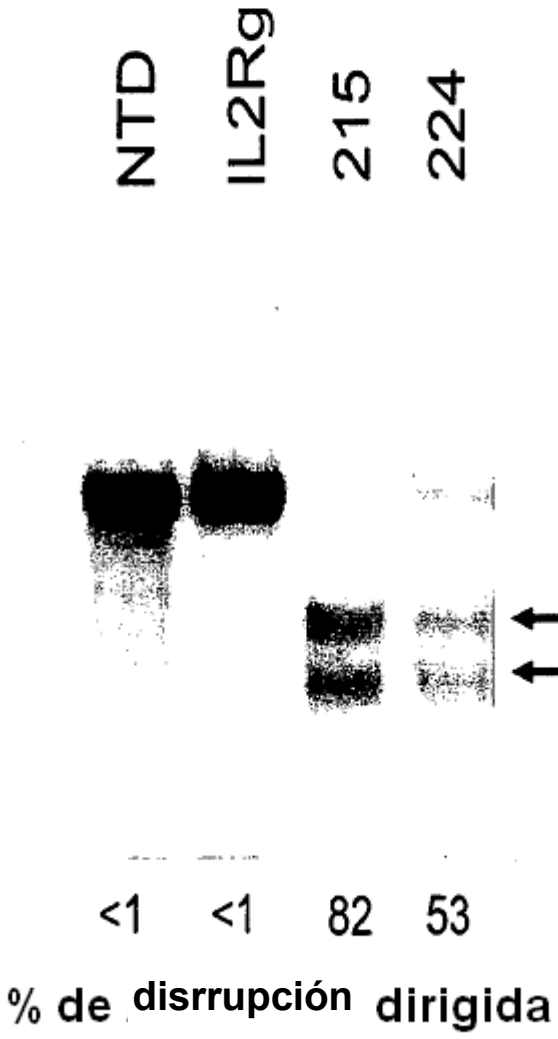


FIG. 13

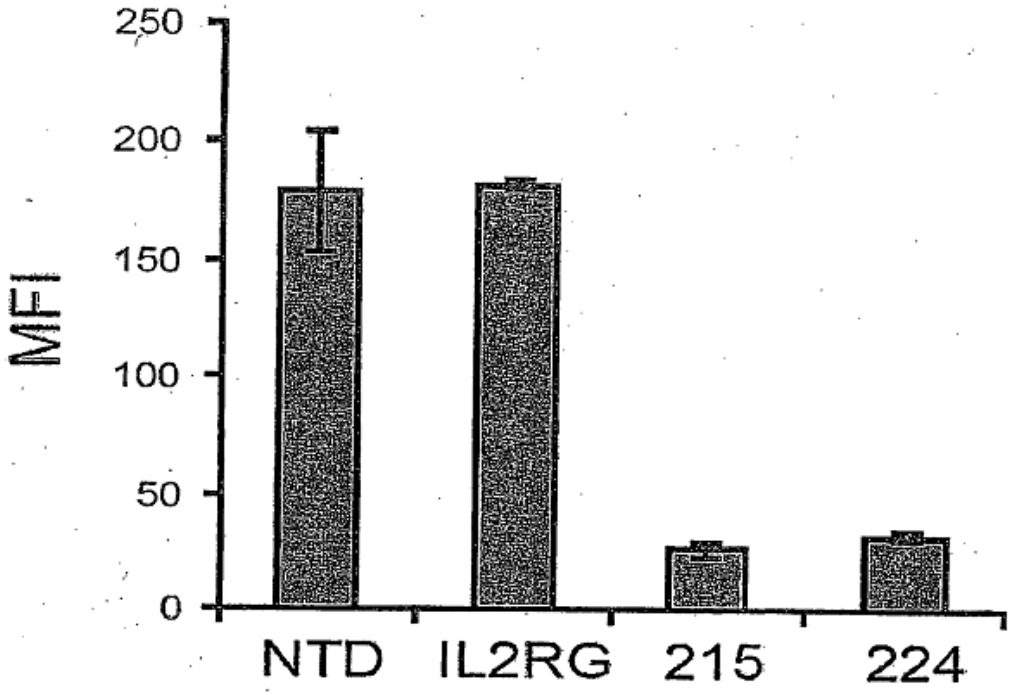


FIG. 14A

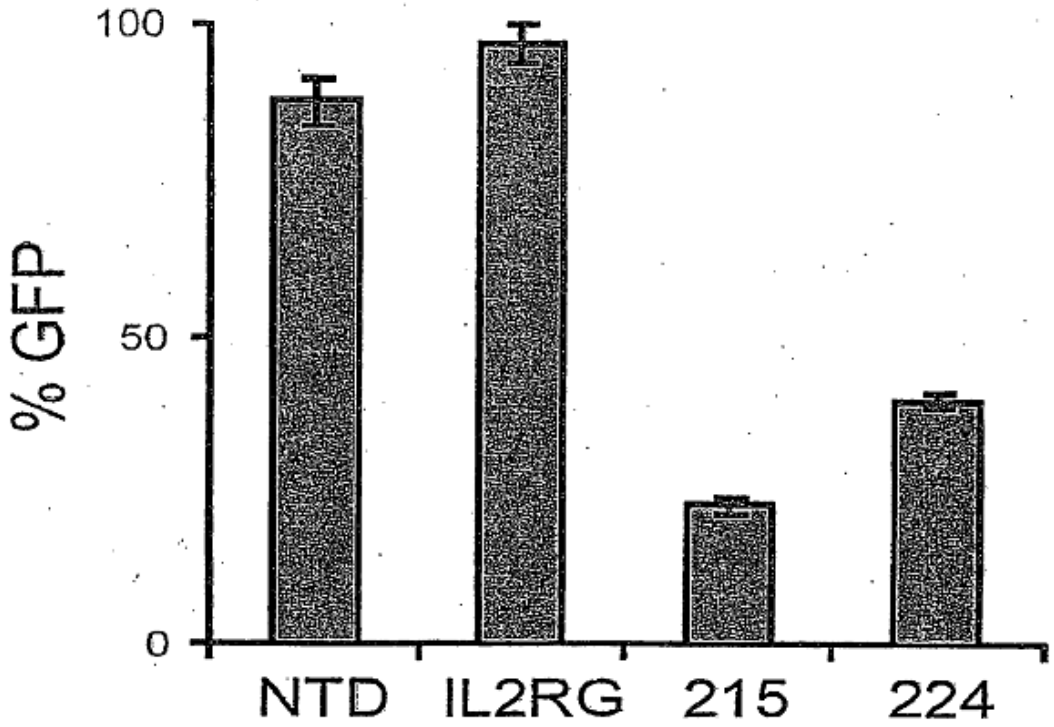


FIG. 14B

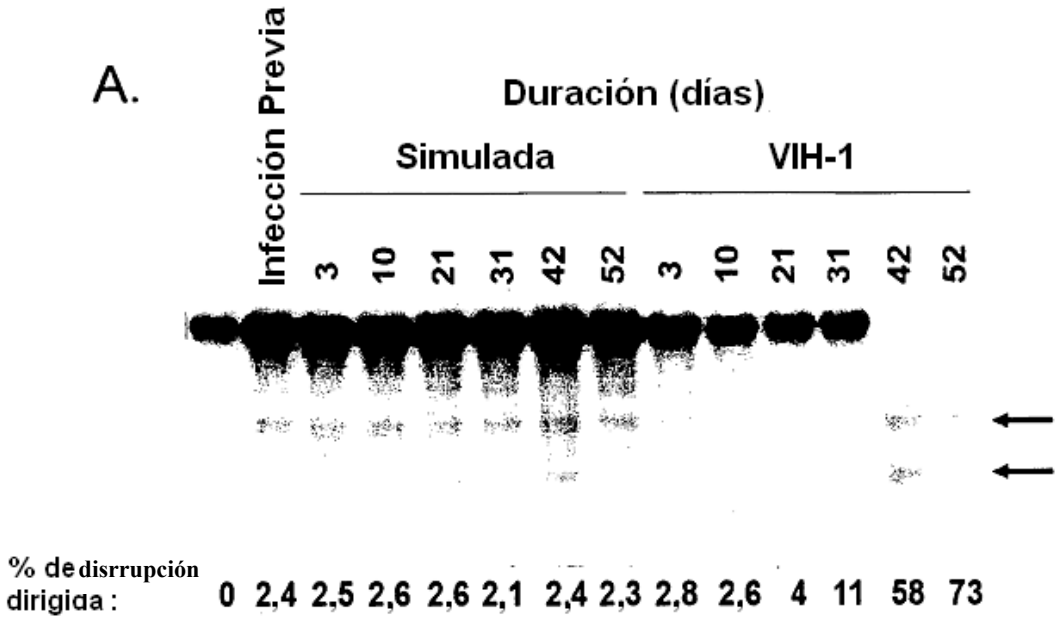

A.
Infección Previa
Duración (días)
Simulada
VIH-1
3
10
21
31
42
52
3
10
21
31
42
52
% de disrrupción dirigida :
0 2,4 2,5 2,6 2,6 2,1 2,4 2,3 2,8 2,6 4 11 58 73

FIG. 15

DELECIONES:

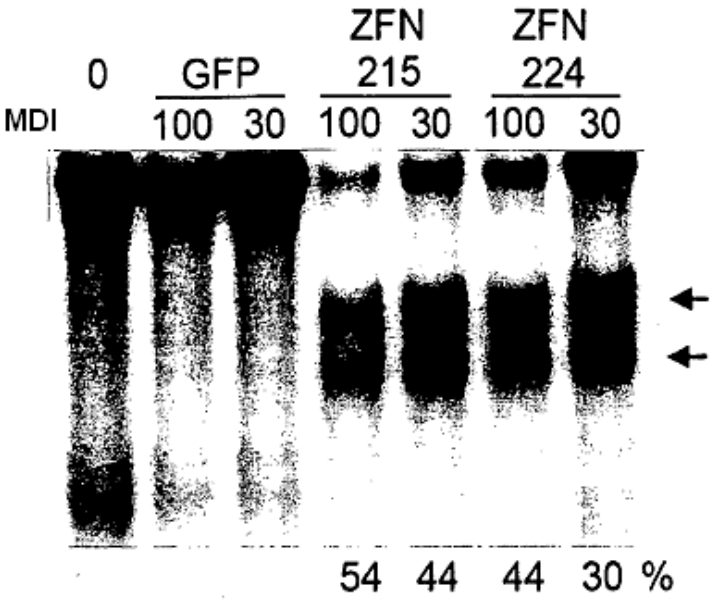
```
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    t. s.
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATC-TGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -1
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTG--AAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -2
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCT--TAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -2
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATC--GATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -2
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCA--CTGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -2
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATC---ATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -3
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATC----TAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -4
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCC----AAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -4
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATC-----AAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -5
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCA-----ATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -5
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATC-------TGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -7
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCC-------GATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -7
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTT----------TGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -10
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATC--------GATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -8
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTC---------AACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -9
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGAT-----GCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -5
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCC-----------AAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -11
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGAT-------AAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -7
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGAT--------AAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -8
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGA------------------AGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -18
TTTTGTAGGCAACATGCTGGTCATCCTCA--------------------CTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -20
TTTTGTGGGCAACATGCTG--------------------ACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -19
TTTTGTGGGCAACATGC-----------------GTAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -17
TTTTGTGGGCAACATG----------------TGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -16
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTC-------------TAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -13
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCA---------------------AAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -21
TTTTGTGGGCAACATGC--------------------------AAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -26
TTTTGTGGGCAACATG-----------------------------------AAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    -36
TTTTGTGGGCAACAT-----------------------------------------ATGACTGACATCTACCTGCTC    -43
```

INSERCIONES:

```
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTC    t. s.
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATatAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGC    +2
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATaaAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGC    +2
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATgatAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTG    +3
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGActgaTAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCT    +4
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATtgatAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCT    +4
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATctgatAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACC    +5
TTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCttaattaATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACC    +8
```

FIG. 16

FIG. 17


ZFN
215
ZFN
224
0
GFP
MDI
100 30 100 30 100 30
54 44 44 30 %

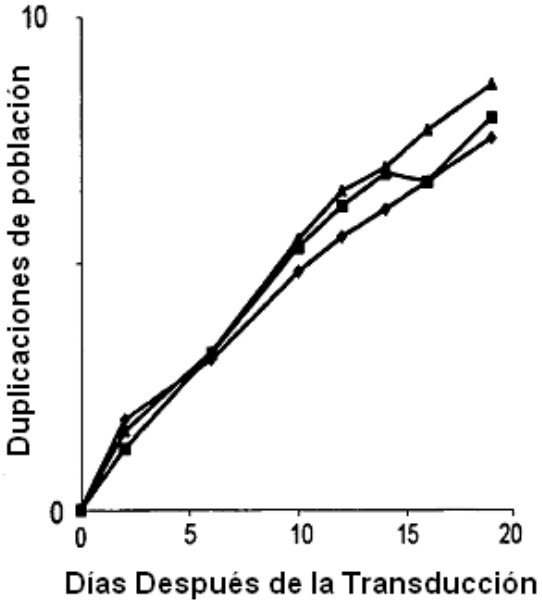

10
0
Duplicaciones de población
0 5 10 15 20
Días Después de la Transducción

FIG. 18

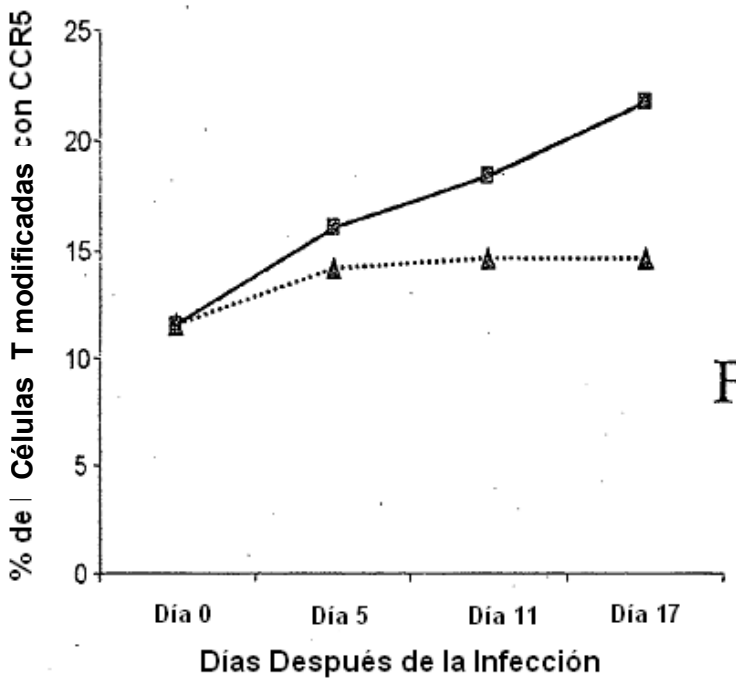

% de Células T modificadas con CCR5
25
20
15
10
5
0
Día 0
Día 5
Día 11
Día 17
Días Después de la Infección

FIG. 19

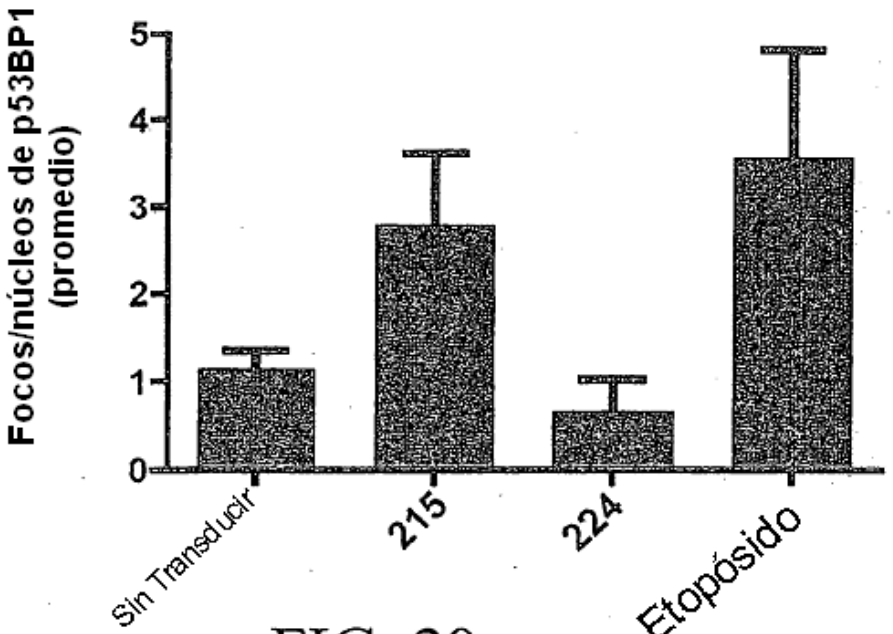

Focos/núcleos de p53BP1 (promedio)
5
4
3
2
1
0
Sin Transducir
215
224
Etopósido

FIG. 20

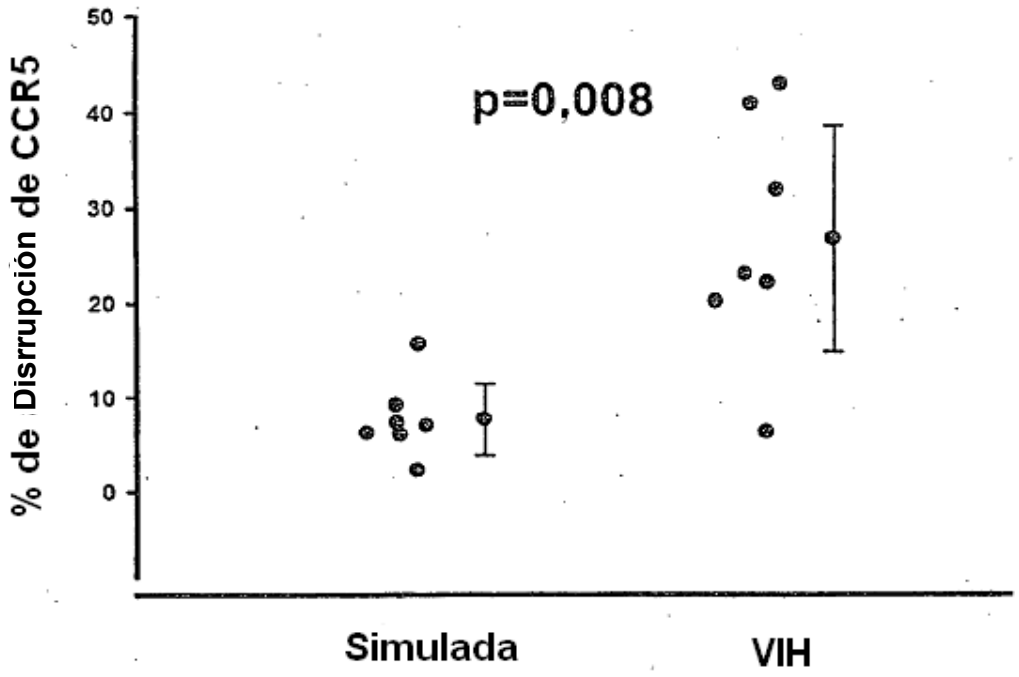


FIG. 21