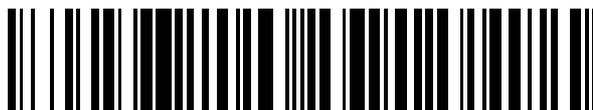


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 421**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2011 E 11833365 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2627665**

54 Título: **Métodos y composiciones para tratar la hemofilia B**

30 Prioridad:

12.10.2010 US 392333 P

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

04.03.2016

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(50.0%)
3501 Civic Center Boulevard
Philadelphia, PA 19104, US y
SANGAMO BIOSCIENCES, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GREGORY, PHILIP D.;
HIGH, KATHERINE A.;
HOLMES, MICHAEL C. y
LI, HOJUN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 562 421 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 tratar la hemofilia B

Campo técnico

La presente descripción está en los campos de la modificación génica y el tratamiento de la hemofilia.

5 Antecedentes

La hemofilia B es un trastorno genético del sistema de coagulación de la sangre, caracterizado por hemorragia en las articulaciones y tejidos blandos, y por hemorragia excesiva en cualquier sitio que experimenta trauma o está sometido a cirugía. Aunque la hemofilia B es clínicamente indistinguible de la hemofilia A, el factor VIII (FVIII) es deficiente o está ausente en la hemofilia A y el factor IX (FIX o F.IX) es deficiente o está ausente en pacientes con hemofilia B. El factor IX codifica una de las serina proteasas implicadas en el sistema de coagulación, y se ha mostrado que la restauración incluso del 3% de los niveles circulantes normales de la proteína Factor IX de tipo salvaje puede prevenir la hemorragia espontánea.

La terapia génica, incluyendo los protocolos de terapia génica dirigidos al hígado y la inyección intramuscular directa, que implican la introducción de plásmido y otros vectores (por ejemplo, AAV) que codifican una proteína FIX funcional se ha descrito para el tratamiento de la hemofilia B. Véanse, por ejemplo, Patente U.S. No. 6.936.243; Lee *et al.* (2004) *Pharm. Res.* 7:1229-1232; Graham *et al.* (2008) *Genet Vaccines Ther.* 3:6-9. Sin embargo, en estos protocolos, la formación de anticuerpos inhibidores anti-factor IX (anti-FIX) y anticuerpos frente al vehículo de administración permanece como una complicación importante del tratamiento basado en el reemplazo de la proteína FIX para la hemofilia B.

US2011027235 describe la integración dirigida de una proteína FIX funcional en células madre aisladas y el tratamiento de la hemofilia B mediante la introducción de las células madre productoras de FIX en pacientes que necesitan tratamiento.

Sin embargo, permanece una necesidad de composiciones y métodos adicionales para tratar la hemofilia B en sujetos con esta enfermedad.

25 Resumen

En la presente memoria se describen métodos y composiciones para la integración dirigida de una secuencia que codifica una proteína FIX funcional para tratar la hemofilia B. En particular, los métodos implican administrar nucleasas que median la inserción dirigida de una secuencia que codifica una proteína FIX funcional en el genoma de células para la mejora de la enfermedad.

En un aspecto, en la presente memoria se describe un dominio de unión a ADN (por ejemplo, proteína con dedos de cinc (ZFP) que se une al sitio diana en una región de interés (por ejemplo, un gen del Factor IX) en un genoma, en el que la ZFP comprende uno o más dominios de unión con dedos de cinc preparados por ingeniería.

En una realización, el dominio de unión a ADN es una nucleasa, por ejemplo, una ZFP es una nucleasa con dedos de cinc (ZFN) que escinde una región genómica diana de interés, en el que la ZFN o TALEN comprende uno o más dominios de unión a ADN preparados por ingeniería y un dominio de escisión o semi-dominio de escisión nucleasa. Los dominios de escisión y semi dominios de escisión pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de varias endonucleasas de restricción y/o endonucleasas de direccionamiento. En una realización, los semi-dominios de escisión derivan de una endonucleasa de restricción de Tipo IIS (por ejemplo, *Fok I*). En determinadas realizaciones, el dominio con dedos de cinc reconoce un sitio diana en un gen FIX endógeno por ejemplo un dominio con dedos de cinc como se muestra en la Tabla 1 (o un dominio con dedos de cinc que se une a un sitio diana como se muestra en la Tabla 1).

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un polinucleótido que codifica una o más ZFN descritas en la presente memoria. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, ARNm.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un vector de expresión de ZFN que comprende un polinucleótido, que codifica una o más ZFN descritas en la presente memoria, unido de manera operativa a un promotor. En una realización, el vector de expresión es un vector viral. En un aspecto, el vector viral presenta tropismo específico de tejido.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe una célula huésped que comprende uno o más vectores de expresión de ZFN. La célula huésped puede estar transformada de manera estable o transfectada de manera transitoria o una combinación de éstas con uno o más vectores de expresión de ZFP.

En otras realizaciones, el uno o más vectores de expresión de ZFP expresa una o más ZFN en la célula huésped. En otra realización, la célula huésped puede comprender además una secuencia donante polinucleotídica exógena. En cualquiera de las realizaciones, descritas en la presente memoria, la célula huésped puede comprender una

célula hepática, una célula muscular, o una célula madre. Las células pueden ser de cualquier organismo, por ejemplo, ser humano, primate no humano, ratón, rata, conejo, gato, perro u otras células de mamíferos.

5 En otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar la hemofilia B usando nucleasas para integrar una secuencia que codifica una proteína FIX en una célula en un sujeto que lo necesita. En determinadas realizaciones, la secuencia que codifica FIX se administra usando un vector viral, un vector no viral (por ejemplo, plásmido) y/o una combinación de éstos. En determinadas realizaciones, el vector comprende un vector AAV, tal como AAV8. En determinadas realizaciones, las nucleasas y/o secuencias que codifican FIX se administran mediante administración intravenosa (por ejemplo, vena intra-portal) en el hígado de un animal intacto.

10 En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, la nucleasa puede ser una o más nucleasas con dedos de cinc, una o más endonucleasas de direccionamiento (meganucleasas).

15 Las nucleasas (por ejemplo, ZFN) como se describe en la presente memoria pueden unirse a y/o escindir la región de interés en una región codificadora o no codificadora en o adyacente al gen, tal como, por ejemplo, una secuencia líder, secuencia tráiler o intrón, o en una región no transcrita, bien en 5' ó 3' de la región codificadora. En determinadas realizaciones, la ZFN se une a y/o escinde un gen de Factor IX endógeno (mutante o de tipo salvaje). En otras realizaciones, la ZFN se une a y/o escinde un gen seguro ("safe-harbor") (por ejemplo, cualquier gen cuya disrupción no es tóxica o disruptiva para la célula), por ejemplo, un gen CCR5, un gen PPP1R12C (también conocido como AAV S1) o un gen *Rosa*. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente U.S. Nos. 20080299580; 20080159996 y 201000218264.

20 Además, cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede comprender además etapas adicionales, incluyendo hepatectomía parcial o tratamiento con agentes secundarios que aumentan la transducción y/o inducen que las células hepáticas entren en el ciclo celular. Los ejemplos de agentes secundarios incluyen irradiación gamma, irradiación UV, nucleótidos tritiados tales como timidina, cis-platino, etopósido, hidroxiurea, afidicolina, prednisolona, tetracloruro de carbono y/o adenovirus.

25 Los métodos descritos en la presente memoria pueden practicarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En determinadas realizaciones, las composiciones se introducen en un mamífero vivo, intacto. El mamífero puede estar en cualquier estadio de desarrollo en el momento de la administración, por ejemplo, embrionario, fetal, neonatal, infantil, juvenil o adulto. Además, las células diana pueden ser sanas o enfermas. En determinadas realizaciones, las composiciones (por ejemplo, polinucleótidos que codifican nucleasa(s) y/o secuencias que codifican FIX) se administran al hígado de un animal vivo, por ejemplo mediante inyección intraportal. En otras realizaciones, una o más de las composiciones se administran intravenosamente (distinta de la vena intraportal, por ejemplo inyección en la vena de la cola), intra-arterialmente, intraperitonealmente, en el parénquima hepático (por ejemplo, mediante inyección), en la arteria hepática (por ejemplo, mediante inyección), y/o a través del árbol biliar (por ejemplo, mediante inyección).

35 Para dirigir las composiciones a un tipo de célula particular, por ejemplo, hepatocitos, una o más de las composiciones administradas puede estar asociada con un agente de direccionamiento que se une específicamente a un receptor de superficie de la célula. Por ejemplo, el vector puede estar conjugado con un ligando (por ejemplo, galactosa) para el que tienen receptores determinadas células madre hepáticas. La conjugación puede ser covalente, por ejemplo, un agente de entrecruzamiento tal como glutaraldehído, o no covalente, por ejemplo, la unión de un ligando avidinilado a un vector biotinilado. Otra forma de conjugación covalente se proporciona preparando por ingeniería el plásmido auxiliar AAV usado para preparar la preparación madre de vector de manera que una o más de las proteínas de cubierta codificadas es un híbrido de una proteína de cubierta de AAV nativa y un ligando peptídico o proteico, de manera que el ligando está expuesto en la superficie de la partícula viral.

45 Las células diana pueden ser células humanas, o células de otros mamíferos (incluyendo animales de veterinaria), especialmente primates no humanos y mamíferos de los órdenes *Rodenta* (ratones, ratas, hámsteres) *Lagomorpha* (conejos), *Carnivora* (gatos, perros), y *Arteriodactyla* (vacas, cerdos, ovejas, cabras, caballos). En algunos aspectos, las células diana comprenden un tejido (por ejemplo, hígado). En algunos aspectos, la célula diana es una célula madre (por ejemplo, una célula madre pluripotente inducida, una célula madre hepática, etc.) o embrión animal por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, y después el embrión se implanta de manera que nace un animal vivo. El animal se crece entonces hasta la madurez sexual y se deja que produzca descendencia en el que al menos parte de la descendencia comprende la modificación genómica.

50 Éstos y otros aspectos serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica a la vista de la descripción como un todo. Así, la descripción engloba las realizaciones siguientes:

1. Una proteína que comprende un dominio de unión a ADN con proteína con dedos de cinc preparado por ingeniería, en el que el dominio de unión a ADN comprende cuatro o cinco regiones de reconocimiento con dedos de cinc ordenadas F1 a F4 o F1 a F5 desde en extremo N-terminal al extremo C-terminal, y en el que

55 (i) cuando el dominio de unión a ADN comprende cinco regiones de reconocimiento con dedos de cinc, F1 a F5 comprenden las secuencias de aminoácidos siguientes:

F1: QSGDLTR (SEQ ID NO:4)

F2: RSDVLSE (SEQ ID NO:5)

F3: DRSNRIK (SEQ ID NO: 6)

F4: RSDNLSE (SEQ ID NO:7)

F5: QNATRIN (SEQ ID NO:8);

- 5 (ii) cuando el dominio de unión a ADN comprende cuatro regiones de reconocimiento con dedos de cinc, F1 a F4 comprenden las secuencias de aminoácidos siguientes:

F1: RSDSLSV (SEQ ID NO:10)

F2: TSGHLR (SEQ ID NO:11)

F3: RSDHLSQ (SEQ ID NO:12)

- 10 F4: HASTRHC (SEQ ID NO:13).

2. La proteína según 1, que comprende además un dominio de escisión o semi-dominio de escisión.

3. La proteína de 2, en la que el semi-dominio de escisión es un semi-dominio de escisión *FokI* de tipo salvaje o preparado por ingeniería.

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

- 15 5. Un vector de administración génica que comprende un polinucleótido de 4.

6. Una célula aislada que comprende la proteína de cualquiera de 1 a 3 o el polinucleótido de 4.

7. Una célula aislada que comprende la proteína de cualquiera de las 1 a 3 o el polinucleótido de 4.

- 20 8. Un método para tratar hemofilia B en un sujeto, comprendiendo el método insertar (por ejemplo, mediante integración dirigida) una secuencia que codifica una proteína Factor IX (FIX) funcional en el genoma de una célula usando al menos una nucleasa, en el que el sujeto comprende la célula.

9. El método de 8, en el que la secuencia se integra en un gen endógeno.

10. El método de 9, en el que el gen endógeno se selecciona del grupo que consiste en un gen FIX y un gen seguro.

11. El método de cualquiera de 8 a 10, en el que la secuencia y/o la nucleasa se administra a la célula usando un vector seleccionado del grupo que consiste en un vector viral, un vector no viral y combinaciones de éstos.

- 25 12. El método de cualquiera de 8 a 11, en el que la célula es una célula hepática y la secuencia se administra a la célula por administración intravenosa (por ejemplo, en el hígado) de un animal intacto.

13. El método de cualquiera de 8 a 12, en el que la al menos una nucleasa es una nucleasa con dedos de cinc.

14. El método de cualquiera de 8 a 13, que comprende además la etapa de llevar a cabo una hepatectomía parcial en el sujeto.

- 30 15. El método de cualquiera de 8 a 14, que comprende además la etapa de tratar el sujeto con al menos un agente secundario.

16. El método de 15, en el que el agente secundario se selecciona del grupo que consiste en irradiación gamma, irradiación UV, nucleótidos tritiados, cis-platino, prednisolona, tetracloruro de carbono, etopósido, hidroxiurea, afidicolina, adenovirus y combinaciones de éstos.

- 35 17. El método de cualquiera de 8 a 16, en el que la célula es una célula aislada y el método comprende además administrar la célula aislada al sujeto.

18. El método de cualquiera de 8 a 17, en el que el sujeto se selecciona del grupo que consiste en un embrión, un feto, un neonato, un infante, un joven o un adulto.

- 40 19. El método de cualquiera de 8 a 18, que comprende además asociar la secuencia con un agente de direccionamiento que se une específicamente a un receptor de superficie de la célula.

20. El método de 19, en el que el agente de direccionamiento comprende galactosa o un híbrido de una proteína de cubierta de AAV y galactosa.

21. El método de cualquiera de 8 a 20, que comprende además asociar un polinucleótido que codifica la al menos una nucleasa con un agente de direccionamiento que se une específicamente a un receptor de superficie de la célula.
- 5 22. El método de 21, en el que el agente de direccionamiento comprende galactosa o un híbrido de una proteína de cubierta de AAV y galactosa.
23. El método de cualquiera de 8 a 22, en el que la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula humana, una célula de primate no humano, una célula de *Rodenta*, una célula de *Lagomorpha*, una célula de *Carnivora* y una célula de *Arteriodactyla*.
24. El método de cualquiera de 8 a 22, en el que la célula diana es una célula madre.
- 10 25. El método de 24, en el que la célula madre es una célula madre pluripotente inducida, una célula madre hematopoyética, un hepatocito o una célula madre hepática.
26. El método de cualquiera de 8 a 25, en el que la nucleasa comprende una nucleasa con dedos de cinc según cualquiera de 1 a 3, un polinucleótido según 4 o un vehículo de administración génica según 5.

Descripción breve de los dibujos

15 La **Figura 1, paneles A-E**, muestran que las N2 ZFN escinden eficazmente el intrón 1 del gen que codifica el Factor IX (F9) e inducen recombinación homóloga en células humanas. La Figura 1A representa un esquema que representa la diana de la pareja N2 ZFN en el intrón 1 del gen F9 humano. La Figura 1B representa el plásmido de expresión bicistrónico ZFN etiquetado con FLAG. La Figura 1C muestra un gel con los resultados de un ensayo de emparejamiento erróneo Surveyor® (Transgenomics, "Cel-I") después de transfección del plásmido de expresión N2

20 ZFN en células K562. El ensayo demuestra el resultado de la reparación por NHEJ de una DSB inducida por las N2 ZFN en el intrón 1 del gen hF9 en el día 3 después de la transfección. La expresión de ZFN se confirmó por la inmunotransferencia α -FLAG y la carga de proteína se ensayó usando un anticuerpo α -NF κ B p65. La Figura 1D muestra un esquema del ensayo de la integración dirigida (TI) detallando el curso de tiempo de direccionamiento mediado por ZFN de una etiqueta de sitio de restricción NheI en el gen hF9. La Figura 1E muestra un gel que

25 representa los resultados de un ensayo RFLP después de la co-administración del plásmido de expresión ZFN con cantidades crecientes del plásmido donante de etiqueta NheI (0-4 μ g). Los datos muestran niveles incrementados de direccionamiento génico en los días 3 y 10 después de la transfección, mientras la transfección del donante de etiqueta NheI solo (4 μ g, "(-) ZFN") no resulta en direccionamiento génico detectable. Las flechas negras indican productos de escisión sensibles a NheI que resultan de TI tanto en el día 3 como 10. La PCR TI realizada con PCR

30 usando nucleótidos marcados con 32 P y la intensidad de la banda de inmunotransferencia y carga de proteínas se evaluó usando un anticuerpo α -NF κ B p65.

La **Figura 2, paneles A-E**, muestran que la administración mediada por AAV de N2 ZFN a ratones incluyendo una "plataforma de aterrizaje" (LP) N2 resulta en la escisión eficiente del intrón 1 de la Plataforma de Aterrizaje (LP). La

35 Figura 2A representa un diagrama que muestra cómo N2 ZFN tiene como diana el intrón 1 de un mini-gen F9 humano (LP), que mimetiza una mutación causada por HB publicada (Thompson *et al*, (1994) *Hum. Genet.* 94: 299-302). La Figura 2B muestra el gel de un análisis de PCR que demuestra que la construcción LP se ha insertado ("knocked in") en el locus ROSA26 de ratón. La Figura 2C muestra los resultados de un ELISA para detectar hFIX plasmático circulante. Los datos muestran que los ratones LP no tienen hFIX plasmático circulante, según se mide usando un ELISA específico de hFIX, a no ser que se inyecte a los ratones un vector viral que expresa hFIX (1e10

40 genomas virales (v.g.) AAV-hFIX inyectados por la vena de la cola). La Figura 2D representa un vector de expresión bicistrónico AAV8-N2 ZFN con la expresión controlada por un potenciador ApoE y promotor de alfa1-antitripsina humano. La Figura 2E muestra los resultados de un ensayo Cel-I realizado después de la inyección en la vena de la cola del vector de expresión 1e11 v.g. AAV-N2 en ratones LP que resulta en la escisión del intrón 1 LP en ADN hepático en el día 7 después de la inyección. El ensayo Cl-1 se realizó con un amplicón de PCR usando nucleótidos

45 marcados con 32 P y la intensidad de las bandas se cuantificó por fosforimager. La expresión de ZFN se confirma por una inmunotransferencia α -FLAG de lisados de hígado completos y la carga de proteínas se evaluó usando un anticuerpo α -NF κ B p65.

La **Figura 3, paneles A y B**, muestran que N2 ZFN estimulan el direccionamiento mediado por AAV de exones F9 de tipo salvaje 2-8 al intrón 1 de la Plataforma de Aterrizaje *in vivo*. La Figura 3A muestra un esquema de cómo la

50 mutación génica LP puede sobrepasarse por TI de los exones 2-8 de hF9 en el intrón 1. Los alelos LP diana y no diana pueden diferenciarse mediante PCR usando los cebadores P1, P2, y P3. La Figura 3B representa un gel de un análisis de PCR con parejas de cebadores P1/P2 y P1/P3 demostrando un direccionamiento génico exitoso después de la co-inyección i.p. de 5e10 v.g. AAV8-N2 y 2,5e11 v.g. AAV8-Donante en ratones LP/HB en el día 2 de vida, pero no con inyección de 5e10 v.g. AAV8-N2 solo, o co-inyección de 5e10 v.g. AAV8-Simulado y 2,5e11 v.g. AAV8-Donante. La PCR se realizó usando nucleótidos marcados con 32 P, permitiendo la cuantificación de la intensidad de

55 las bandas de los productos por fosforimager para evaluar la frecuencia de direccionamiento. En las muestras diana, los cebadores P1 y P2 generarán un producto menor indicando la amplificación exitosa de los exones 2-8 de F9 de tipo salvaje diana, mientras los cebadores P1 y P3 generarán un producto mayor que el alelo no diana.

La **Figura 4, paneles A-F**, muestran que la corrección del gen hepático *in vivo* resulta en niveles terapéuticos de FIX circulante. La Figura 4A es un gráfico que muestra los niveles plasmáticos de hFIX en ratones LP después de inyección I.P. en el día 2 de vida bien con 5e10 v.g. AAV-N2 solo (n= 7 pre- y post-hepatectomía parcial (PHx)), 5e10 v.g. AAV-N2 y 2,5e11 v.g. AAV-Donante (n= 7 pre- y post-PHx), ó 5e10 v.g. AAV-Simulado y 2,5e11 v.g. AAV-Donante (n= 6 pre- y post-PHx). El curso de tiempo de PHx se indica por la flecha. Las barras de error denotan error estándar. La Figura 4B es un gráfico que muestra los niveles plasmáticos de hFIX en ratones de tipo salvaje (n= 5) después de inyección en la vena de la cola de 1e12 v.g. AAV-hFIX (predominantemente episomal) con PHx subsecuente. Las barras de error denotan error estándar. La Figura 4C es un gráfico que muestra los niveles plasmáticos de hFIX en ratones de tipo salvaje después de una inyección I.P. en el día 2 de vida bien con 5e10 v.g. AAV-N2 solo (n= 8 pre-PHx, n= 4 post-PHx), 5e10 v.g. AAV-N2 y 2,5e11 v.g. AAV-Donante (n= 9 pre-PHx, n= 5 post-PHx), ó 5e10 v.g. AAV-Simulado y 2,5e11 v.g. AAV-Donante (n= 6 pre-PHx, n= 5 post-PHx). Las barras de error denotan error estándar. La Figura 4D es un gráfico de los niveles plasmáticos de hFIX en ratones LP/HB después de inyección intraperitoneal (I.P.) en el día 2 de vida bien con 5e10 v.g. AAV-N2 solo (n= 10 pre-PHx, n= 1 post-PHx), 5e10 v.g. AAV-N2 y 2,5e11 v.g. AAV-Donante (n= 9 pre-PHx, n= 5 post-PHx), ó 5e10 v.g. AAV-Simulado y 2,5e11 v.g. AAV-Donante (n= 9 pre-PHx, n= 3 post-PHx). Las barras de error denotan error estándar. La Figura 4E muestra un gel que demuestra la expresión específica de hígado del ARN de hFIX según se detecta por RT-PCR en la semana 20 de vida en un ratón LP/HB que recibió una inyección I.P. en el día 2 de vida de 5e10 v.g. AAV-N2 y 2,5e11 v.g. AAV-Donante. La Figura 4F es un gráfico que muestra el tiempo hasta la formación de coágulos según se ensaya por el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) en la semana 14 de vida de ratones que recibieron inyección LP en el día 2 de vida con 5e10 v.g. AAV-N2 y 2,5e11 v.g. AAV-Donante (n= 5), ó 5e10 v.g. AAV-Simulado y 2,5e11 v.g. AAV-Donante (n= 3) (valor p del ensayo de la t de Student de 2 colas). Los aPTT de ratones de tipo salvaje (WT) y con hemofilia B (HB) se muestran para comparación.

La **Figura 5, paneles A y B**, muestran que la corrección del gen hepático *in vivo* resulta en la expresión de niveles terapéuticos de FIX circulante. La Figura 5A es un gráfico que muestra los niveles plasmáticos de hFIX en ratones LP adultos después de inyección I.V. a las 6 semanas de edad bien con 1e¹¹ v.g./ratón AAV-N2 solo ("ZFN solo"), 1e¹¹ v.g./ratón AAV-N2 y 5,5e11 v.g./ratón AAV-Donante ("ZFN+Donante"), ó 1e¹¹ v.g./ratón AAV-Simulado y 5,5e11 v.g. AAV-Donante ("Simulado+Donante"). Los datos representados son representativos de 3 experimentos con aproximadamente 20 ratones por grupo. En estos experimentos, los niveles de hFIX de tipo salvaje fueron aproximadamente 1.000 ng/mL. La Figura 5B es un gráfico que muestra los niveles plasmáticos de hFIX en ratones LP adultos después de inyección I.V. a las 6 semanas de edad bien con 1e¹¹ v.g./ratón AAV-N2 solo ("ZFN solo"), 1e¹¹ v.g./ratón AAV-N2 y 5,5e11 v.g./ratón AAV-Donante ("ZFN+Donante"), ó 1e¹¹ v.g./ratón AAV-Simulado y 5,5e11 v.g. AAV-Donante ("Simulado+Donante"). Dos días después de la inyección, los grupos en la Figura 5B se sometieron a una hepatectomía parcial. Los datos representados son representativos de 3 experimentos con aproximadamente 20 ratones por grupo. En estos experimentos, los niveles de hFIX de tipo salvaje fueron aproximadamente 1.000 ng/mL. Los datos demuestran que la expresión de hFIX es estable cuando se proporciona a ratones adultos con o sin una hepatectomía parcial posterior, y que es posible llevar a cabo edición genómica en animales adultos.

Descripción detallada

En la presente memoria se describen composiciones y métodos para tratar a pacientes con hemofilia B. En particular, se usa la integración dirigida mediada por nucleasa para insertar una secuencia que codifica FIX en el genoma de una o más células del sujeto (*in vivo* o *ex vivo*), de manera que las células producen FIX *in vivo*. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además inducir a las células del sujeto, particularmente células hepáticas, a proliferar (entrar en el ciclo celular), por ejemplo, por hepatectomía parcial y/o por la administración de uno o más compuestos que inducen a las células hepáticas para entrar en el ciclo celular. Los sujetos incluyen pero no están limitados a seres humanos, primates no humanos, animales de veterinaria tales como gatos, perros, conejos, ratas, ratones, cobayas, vacas, cerdos, caballos, cabras y semejantes.

Los métodos descritos en la presente memoria resultan en el tratamiento de la hemofilia B. A diferencia de los métodos descritos previamente en modelos *in vivo* de corrección génica mediada por nucleasa usando meganucleasas (véase Gouble *et al*, (2006) *J Gene Med.* mayo; 8(5):616-22), se observa poca o ninguna toxicidad después de la integración mediada por nucleasa de un gen FIX en los modelos animales. Además, los métodos y composiciones de la invención son funcionales en animales neonatos y adultos, dando lugar a actividad funcional del transgén de Factor IX insertado.

General

La práctica de los métodos, así como la preparación y uso de las composiciones descritas en la presente memoria emplean, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, estructura y análisis de la cromatina, química computacional, cultivo celular, ADN recombinante y campos relacionados como está dentro de la experiencia en la técnica. 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 *et al*, 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

5 Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido", y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, en conformación lineal o circular, y bien en forma mono o bicatenaria. Para los propósitos de la presente descripción, estos términos no deben considerarse como limitantes respecto a la longitud de un polímero. Los términos pueden englobar análogos conocidos de nucleótidos naturales, así como nucleótidos que están modificados en la base, restos de azúcar y/o fosfato (por ejemplo, núcleos fósforotioato). En general, un análogo de un nucleótido particular tiene la misma especificidad de emparejamiento de bases; es decir, un análogo de A se emparejará por bases con T.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos 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 natural correspondiente.

15 "Unión" se refiere a una interacción no covalente, específica de secuencia, entre macromoléculas (por ejemplo, entre una proteína y un ácido nucleico). No es necesario que todos los componentes de una interacción de unión sean específicos de secuencia (por ejemplo, los contactos con residuos de fosfato en un núcleo de ADN), siempre que la interacción como un todo sea específica de secuencia. Dichas interacciones se caracterizan generalmente por una constante de disociación (K_d) de 10^{-6} M⁻¹ o menor. "Afinidad" se refiere a la fuerza de la unión: estando correlacionada una afinidad de unión incrementada con una K_d menor.

20 Una "proteína de unión" es una proteína que es capaz de unirse no covalentemente a otra molécula. Una proteína de unión puede unirse, 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 proteína). En el caso de una proteína de unión a proteína, puede unirse a sí misma (para formar homodímeros, homotrímeros, etc.) y/o puede unirse 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, las proteínas con dedos de cinc tienen actividad de unión a ADN, unión a ARN y unión a proteína.

30 Una "proteína de unión a ADN con dedos de cinc" (o dominio de unión) es una proteína, o un dominio en una proteína mayor, que se une a ADN de una manera específica de secuencia a través de uno o más dedos de cinc, que son regiones de secuencia de aminoácidos en el dominio de unión cuya estructura se estabiliza mediante la coordinación de un ión de cinc. El término proteína de unión a ADN con dedos de cinc se abrevia frecuentemente como una proteína con dedos de cinc o ZFP.

35 Los dominios de unión con dedos de cinc pueden "prepararse por ingeniería" para unirse a una secuencia de nucleótidos predeterminada, por ejemplo, mediante la preparación por ingeniería (alterando uno o más aminoácidos) de la región en hélice de reconocimiento de una proteína con dedos de cinc natural. Por lo tanto, las proteínas de unión a ADN preparadas por ingeniería (dedos de cinc) son proteínas que no son naturales. Los ejemplos no limitativos de métodos para preparar por ingeniería proteínas de unión a ADN son diseño y selección. Una proteína de unión a ADN diseñada es una proteína que no aparece en la naturaleza cuyo diseño/composición resulta principalmente de criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computerizados para procesar información en una base de datos que almacena información de diseños de ZFP y datos de unión existentes. Véanse, por ejemplo, las Patentes US 6.140.081; 6.453.242; y 6.534.261; véanse también WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496 y US8586526.

45 Una proteína con dedos de cinc "seleccionada" es una proteína que no se encuentra en la naturaleza cuya producción resulta principalmente de un proceso empírico tal como exposición in fago, trampa de interacción o selección de híbrido. Véanse, por ejemplo, US 5.789.538; US 5.925.523; US 6.007.988; US 6.013.453; US 6.200.759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197 y WO 02/099084.

50 "Recombinación" se refiere a un proceso de intercambio de información genética entre dos polinucleótidos, incluyendo, pero no limitado a, captura de donante mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) y recombinación homóloga. Para los propósitos de esta descripción, "recombinación homóloga (HR)" se refiere a la forma especializada de dicho intercambio que tiene lugar, por ejemplo, durante la reparación de roturas de doble cadena en células mediante mecanismos de reparación dirigidos por homología. Este proceso requiere homología en la secuencia de nucleótidos, usa una molécula "donante" para la reparación por molde de una molécula "diana" (es decir, la que experimenta la rotura de doble cadena), y se conoce de diversas maneras como "conversión génica sin entrecruzamiento" o "conversión génica de pista corta", porque da lugar a la transferencia de información genética del donante a la diana. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría particular, dicha transferencia puede implicar la corrección de emparejamiento erróneo de ADN heterodúplex que se forma entre la diana rota y el donante, y/o "hibridación de cadena dependiente de síntesis", en la que el donante se usa para resintetizar

información genética que formará parte de la diana, y/o procesos relacionados. Dicha HR especializada resulta frecuentemente en una alteración de la secuencia de la molécula diana de manera que parte o toda la secuencia del polinucleótido donante se incorpora en el polinucleótido diana.

5 En los métodos de la descripción, una o más nucleasas dirigidas como se describe en la presente memoria crea una rotura de doble cadena en la secuencia diana (por ejemplo, cromatina celular) en un sitio predeterminado, y un polinucleótido "donante", que tiene homología con la secuencia de nucleótidos en la región de la rotura, puede introducirse en la célula. Se ha mostrado que la presencia de la rotura de doble cadena facilita la integración de la secuencia donante. La secuencia donante puede integrarse físicamente o, alternativamente, el polinucleótido donante se usa como un molde para reparar la rotura mediante recombinación homóloga, resultando en la
10 introducción de toda o parte de la secuencia de nucleótidos como en el donante en la cromatina celular. Así, una primera secuencia en la cromatina celular puede alterarse y, en determinadas realizaciones, puede convertirse en una secuencia presente en un polinucleótido donante. Así, el uso de los términos "reemplazar" o "reemplazo" puede entenderse que representa el reemplazo de una secuencia de nucleótidos por otra, (es decir, reemplazo de una secuencia en el sentido informativo), y no requiere necesariamente el reemplazo físico o químico de un
15 polinucleótido por otro.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, pueden usarse parejas adicionales de proteínas con dedos de cinc para escisión adicional de doble cadena de sitios diana adicionales en la célula.

20 En determinadas realizaciones de métodos de recombinación y/o reemplazo y/o alteración dirigidas de una secuencia en una región de interés en la cromatina celular, una secuencia cromosómica se altera por recombinación homóloga con una secuencia de nucleótidos "donante" exógena. Dicha recombinación homóloga se estimula por la presencia de una rotura de doble cadena en la cromatina celular, si están presentes secuencias homólogas a la región de la rotura.

25 En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, la primera secuencia de nucleótidos (la "secuencia donante") puede contener secuencias que son homólogas, pero no idénticas, a secuencias genómicas en la región de interés, estimulando de esta manera la recombinación homóloga para insertar una secuencia no idéntica en la región de interés. Así, en determinadas realizaciones, partes de la secuencia donante que son homólogas a secuencias en la región de interés presentan entre aproximadamente 80 a 99% (o cualquier número entero entre ellos) de identidad de secuencia con la secuencia genómica que se reemplaza. En otras realizaciones, la homología entre la secuencia donante y genómica es mayor de 99%, por ejemplo si sólo 1 nucleótido es la diferencia entre las
30 secuencias donantes y genómica de más de 100 pares de bases contiguas. En determinados casos, una parte no homóloga de la secuencia donante puede contener secuencias no presentes en la región de interés, de manera que se introducen nuevas secuencias en la región de interés. En estos casos, la secuencia no homóloga está flanqueada generalmente por secuencias de 50-1.000 pares de bases (o cualquier valor entero entre ellos) o cualquier número de pares de bases mayor de 1.000, que son homólogas o idénticas a secuencias en la región de interés. En otras
35 realizaciones, la secuencia donante no es homóloga con la primera secuencia, y se inserta en el genoma por mecanismos de recombinación no homóloga.

40 Cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede usarse para la inactivación parcial o completa de una o más secuencias diana en una célula por integración dirigida de secuencia donante que afecta la expresión del o de los genes de interés. También se proporcionan líneas celulares con genes parcialmente o completamente inactivados.

45 Además, los métodos de integración dirigida como se describe en la presente memoria también pueden usarse para integrar una o más secuencias exógenas. La secuencia de ácido nucleico exógena puede comprender, por ejemplo, uno o más genes o moléculas de ADNc, o cualquier tipo de secuencia codificadora o no codificadora, así como uno o más elementos de control (por ejemplo, promotores). Además, la secuencia de ácido nucleico exógena puede producir una o más moléculas de ARN (por ejemplo, ARN de horquilla pequeños (ARNsh), ARN inhibidores (ARNi), microARN (ARNmi), etc.).

50 "Escisión" se refiere a la rotura del núcleo covalente de una molécula de ADN. La escisión puede iniciarse por una variedad de métodos incluyendo, pero no limitado a, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Es posible tanto la escisión de una cadena como la escisión de doble cadena, y la escisión de doble cadena puede ocurrir como un resultado de dos eventos de escisión distintos de una cadena. La escisión del ADN puede resultar en la producción bien de extremos romos o extremos escalonados. En determinadas realizaciones, se usan polipéptidos de fusión para escisión dirigida de ADN de doble cadena.

55 Un "semi-dominio de escisión" es una secuencia polipeptídica que, conjuntamente con un segundo polipéptido (bien idéntico o diferente) forma un complejo que tiene actividad de escisión (preferiblemente, actividad de escisión de doble cadena). Los términos "primer y segundo semi-dominios de escisión"; "semi-dominios de escisión + y - " y "semi-dominios de escisión derecho e izquierdo" se usan indistintamente para hacer referencia a parejas de semi-dominios de escisión que dimerizan.

Un "semi-dominio de escisión preparado por ingeniería" es un semi-dominio de escisión que se ha modificado de manera que forma heterodímeros obligados con otro semi-dominio de escisión (por ejemplo, otro semi-dominio de

escisión preparado por ingeniería). Véanse, también, las Publicaciones de Patente U.S. Nos. 2005/0064474, 20070218528 y 2008/0131962.

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 bien monocatenaria o bicatenaria. El término "secuencia donante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se inserta en un genoma. Una secuencia donante puede tener cualquier longitud, por ejemplo entre 2 y 10.000 nucleótidos de longitud (o cualquier valor entero entre ellos o por encima de ellos), preferiblemente entre aproximadamente 100 y 1.000 nucleótidos de longitud (o cualquier valor entero entre ellos), más preferiblemente entre aproximadamente 200 y 500 nucleótidos de longitud.

"Cromatina" es la estructura de nucleoproteína que comprende el genoma celular. La cromatina celular comprende ácido nucleico, principalmente ADN, y proteína, incluyendo histonas y proteínas cromosómicas no histonas. La mayoría de la cromatina celular eucariota existe en la forma de nucleosomas, en los que un núcleo de nucleosoma comprende aproximadamente 150 pares de bases de ADN asociados con un octámero que comprende dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4; y ADN conector (con una longitud variable dependiendo del organismo) que se extiende entre los núcleos de nucleosoma. Una molécula de histona H1 está asociada generalmente con el ADN conector. Para los propósitos de la presente descripción, el término "cromatina" se pretende que englobe todos los tipos de nucleoproteína celular, tanto procariota como eucariota. La cromatina celular incluye tanto cromatina cromosómica como episomal.

Un "cromosoma", es un complejo de cromatina que comprende todo o una parte del genoma de una célula. El genoma de una célula se caracteriza frecuentemente por su cariotipo, que es la colección de todos los cromosomas que comprende el genoma de la célula. El genoma de una célula puede comprender uno o más cromosomas.

Un "episoma" es un ácido nucleico replicante, complejo de nucleoproteína u otra estructura que comprende un ácido nucleico que no es parte del cariotipo cromosómico de una célula. Los ejemplos de episomas incluyen plásmidos y determinados genomas virales.

Un "sitio diana" o "secuencia diana" es una secuencia de ácido nucleico que define una parte de un ácido nucleico al que se unirá una molécula de unión, siempre que existan las condiciones de unión suficientes.

Una molécula "exógena" es una molécula que normalmente no está presente en una célula, pero que puede introducirse en una célula por uno o más métodos genéticos, bioquímicos u otros. La "presencia normal en la célula" se determina respecto al estadio de desarrollo particular y condiciones medioambientales de la célula. Así, por ejemplo, una molécula que está presente sólo durante el desarrollo embrionario del músculo es una molécula exógena respecto a una célula muscular adulta. De manera similar, una molécula inducida por choque térmico es una molécula exógena respecto a una célula sin choque térmico. Una molécula exógena puede comprender, por ejemplo, una versión funcional de una molécula endógena con funcionamiento erróneo o una versión con funcionamiento erróneo de una molécula endógena con funcionamiento normal.

Una molécula exógena puede ser, entre otras cosas, una molécula pequeña tal como se genera por un proceso de química combinatoria, o una macromolécula tal como una proteína, ácido nucleico, carbohidrato, 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 tener cualquier longitud. Los ácidos nucleicos incluyen aquellos capaces de formar dúplex, así como ácidos nucleicos que forman tríplex. Véase, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5.176.996 y 5.422.251. Las proteínas incluyen, pero no están limitadas a, proteínas de unión a ADN, factores de transcripción, factores de remodelado de cromatina, proteínas de unión a ADN metilado, polimerasas, metilasas, desmetilasas, acetilasas, quinasas, fosfatasa, integrasas, recombinasas, ligasas, topoisomerasas, girasas y helicasas.

Una molécula exógena puede ser del mismo tipo de molécula que una molécula endógena, por ejemplo, una proteína o ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, un ácido nucleico exógeno puede comprender un genoma viral infeccioso, un plásmido o episoma introducido en una célula, o un cromosoma que normalmente no está presente en la célula. Los métodos para la introducción de moléculas exógenas en células son conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, transferencia mediada por lípidos (es decir, liposomas, incluyendo lípidos neutros y catiónicos), electroporación, inyección directa, fusión celular, bombardeo de partículas, co-precipitación con fosfato de calcio, transferencia mediada por DEAE-dextrano y transferencia mediada por un vector viral. Una molécula exógena también puede ser del mismo tipo de molécula que una molécula endógena pero derivada de una especie diferente de la que deriva la célula. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico humano puede introducirse en una línea celular derivada originalmente de un ratón o hámster.

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

Una molécula "de fusión" es una molécula en la que dos o más moléculas de subunidades están unidas, preferiblemente covalentemente. Las moléculas de subunidades pueden ser del mismo tipo químico, o pueden ser diferentes tipos químicos de moléculas. Los ejemplos del primer tipo de molécula de fusión incluyen, pero no están limitados a, proteínas de fusión (por ejemplo, una fusión entre dominio de unión a ADN ZFP y uno o más dominios de activación) y ácidos nucleicos de fusión (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión descrita *supra*). Los ejemplos del segundo tipo de molécula de fusión incluyen, pero no están limitados a, una fusión entre un ácido nucleico que forma tríplex y un polipéptido, y una fusión entre un agente de unión al surco menor y un ácido nucleico.

La expresión de una proteína de fusión en una célula puede resultar de la administración de la proteína de fusión a la célula o por administración de un polinucleótido que codifica la proteína de fusión a la célula, en el que el polinucleótido se transcribe, y el transcrito se traduce, para generar la proteína de fusión. El corte y empalme en trans, escisión del polipéptido y ligación del polipéptido también pueden estar implicados en la expresión de una proteína en una célula. Los métodos para la administración de polinucleótidos y polipéptidos a células se presentan en otro lugar de esta descripción.

Un "gen", para los propósitos de la presente descripción, incluye una región de ADN que codifica un producto génico (véase *infra*), así como todas las regiones de ADN que regulan la producción del producto génico, ya estén o no dichas regiones reguladoras adyacentes a las secuencias codificadoras y/o transcritas. De acuerdo con esto, un gen incluye, pero no está necesariamente limitado a, secuencias promotoras, terminadoras, secuencias reguladoras de la traducción tales como sitios de unión a ribosomas y sitios de entrada a ribosomas internos, potenciadores, silenciadores, aislantes, elementos limitrofes, orígenes de replicación, sitios de unión a matriz y regiones de control de 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, ARNm, ARNt, ARNr, ARN antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína producida por la traducción de un ARNm. Los productos génicos también incluyen ARN que están modificados, por procesos tales como recubrimiento, poliadenilación, metilación, y edición, y proteínas modificadas, por ejemplo, por metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, miristilación, y glicosilación.

"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 está limitado a, activación génica y represión génica. La edición del genoma (por ejemplo, escisión, alteración, inactivación, reducción aleatoria en la expresión génica comparada con una célula que no incluye una ZFP como se describe en la presente memoria. Así, la inactivación génica puede ser parcial o completa.

Una "región de interés" es cualquier región de cromatina celular, tal como, por ejemplo, un gen o una secuencia no codificadora en o adyacente a un gen, a la que es deseable unir una molécula exógena. La unión puede ser para los propósitos de escisión de ADN dirigida y/o recombinación dirigida. Una región de interés puede estar presente en un cromosoma, un episoma, un genoma de orgánulo (por ejemplo, mitocondrial, de cloroplasto), o un genoma viral infeccioso, por ejemplo. Una región de interés puede estar en la región codificadora de un gen, en regiones no codificadoras transcritas tales como, por ejemplo, secuencias líder, secuencias tráiler o intrones, o en regiones no transcritas, bien en 5' ó 3' de la región codificadora. Una región de interés puede ser tan pequeña como un único par de nucleótidos o hasta 2.000 pares de nucleótidos de longitud, o cualquier valor entero de pares de nucleótidos.

Las células "eucariotas" incluyen, pero no están limitadas a, células fúngicas (tales como levadura), células de plantas, células animales, células de mamíferos y células humanas (por ejemplo, células T).

Los términos "unión operativa" y "unido de manera operativa" (o "unido de manera operable") se usan indistintamente con referencia a una yuxtaposición de dos o más componentes (tales como elementos de secuencia), en la que los componentes están organizados de manera que ambos componentes funcionan normalmente y permiten la posibilidad de que al menos uno de los componentes pueda mediar una función que se ejerce tras al menos uno de los demás componentes. Como ilustración, una secuencia reguladora de la transcripción, tal como un promotor, está unida de manera operativa a una secuencia codificadora si la secuencia reguladora de la transcripción controla el nivel de transcripción de la secuencia codificadora en respuesta a la presencia o ausencia de uno o más factores reguladores de la transcripción. Una secuencia reguladora de la transcripción generalmente está unida de manera operativa en *cis* con una secuencia codificadora, pero no es necesario que sea directamente adyacente a ésta. Por ejemplo, un potenciador es una secuencia reguladora de la transcripción que está unida de manera operativa a una secuencia codificadora, incluso si no son contiguas.

Respecto a los polipéptidos de fusión, el término "unido de manera operativa" puede hacer referencia al hecho de que cada uno de los componentes lleva a cabo la misma función unido al otro componente como lo haría si no estuvieran así unidos. Por ejemplo, respecto a un polipéptido de fusión en el que el dominio de unión a ADN ZFP está fusionado con un dominio de activación, el dominio de unión a ADN ZFP y el dominio de activación están unidos de manera operativa si, en el polipéptido de fusión, la parte del dominio de unión a ADN ZFP es capaz de unirse a su sitio diana y/o su sitio de unión, mientras el dominio de activación es capaz de regular al alza la expresión génica. Cuando un polipéptido de fusión en el que un dominio de unión a ADN ZFP está fusionado con un

dominio de escisión, el dominio de unión a ADN ZFP y el dominio de escisión están unidos de manera operativa si, en el polipéptido de fusión, la parte del dominio de unión a ADN ZFP es capaz de unirse a su sitio diana y/o su sitio de unión, mientras el dominio de escisión es capaz de escindir el ADN en la proximidad del sitio diana.

5 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 retiene 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 residuos que la molécula nativa correspondiente, 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 codificadora, capacidad de hibridar con otro ácido nucleico) son muy conocidos en la técnica. 10 De manera similar, los métodos para determinar la función de proteínas son muy conocidos. Por ejemplo, la función de unión a ADN de un polipéptido puede determinarse, por ejemplo, por ensayos de unión a filtro, desplazamiento en la movilidad electroforética, o de inmunoprecipitación. La escisión del ADN puede ensayarse por electroforesis en gel. Véase Ausubel *et al.*, *supra*. La capacidad de una proteína para interactuar con otra proteína puede determinarse, por ejemplo, por co-inmunoprecipitación, ensayos de dos híbridos o complementación, tanto genético como bioquímico. Véase, por ejemplo, Fields *et al.*, (1989) *Nature* **340**: 245-246; Patente U.S. No. 5.585.245 y PCT WO 98/44350. 15

Un "vector" es capaz de transferir secuencias génicas a células diana. Típicamente, "construcción de vector", "vector de expresión", y "vector de transferencia génica", significan cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir secuencias génicas a células diana. Así, el término incluye vehículos de clonación, y expresión, así como vectores de integración. 20

Un "gen informador" o "secuencia informadora" se refiere a cualquier secuencia que produce un producto proteico que se mide fácilmente, preferiblemente aunque no necesariamente, en un ensayo rutinario. Los genes informadores adecuados incluyen, pero no están limitados a, secuencias que codifican proteínas que median resistencia a antibiótico (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a neomicina, resistencia a G418, resistencia a puromicina), secuencias que codifican proteínas coloreadas o fluorescentes o luminiscentes (por ejemplo, proteína verde fluorescente, proteína verde fluorescente aumentada, proteína roja fluorescente, luciferasa), y proteínas que median el crecimiento celular aumentado y/o amplificación génica (por ejemplo, dihidrofolato reductasa). Las etiquetas de epítipo incluyen, por ejemplo, una o más copias de FLAG, His, myc, Tap, HA o cualquier secuencia de aminoácidos detectable. Las "etiquetas de expresión" incluyen secuencias que codifican informadores que pueden unirse de manera operativa a una secuencia génica deseada con el fin de monitorizar la expresión del gen de interés. 25 30

Un locus "seguro" ("safe-harbor") es un locus en el genoma en el que un gen puede insertarse sin efectos perjudiciales en la célula huésped. Lo más beneficioso es un locus seguro en el que la expresión de la secuencia génica insertada no se perturba por ninguna expresión de la lectura de genes vecinos. Los ejemplos no limitativos de loci seguros en células de mamífero son el gen AAVS1 (véase la Publicación U.S. No. 20080299580), el gen CCR5 (véase la Publicación U.S. No. 20080159996), y/o el locus Rosa (véase WO 2010/065123). 35

Nucleasas

En la presente memoria se describen composiciones, particularmente nucleasas, que son útiles en la integración de una secuencia que codifica una proteína FIX funcional en el genoma de una célula de un sujeto con hemofilia B. En determinadas realizaciones, la nucleasa es natural. En otras realizaciones, la nucleasa no es natural, es decir, modificada por ingeniería en el dominio de unión a ADN y/o dominio de escisión. Por ejemplo, el dominio de unión a ADN de una nucleasa natural puede alterarse para unirse a un sitio diana seleccionado (por ejemplo, una meganucleasa que se ha modificado por ingeniería para unirse a un sitio diferente del sitio de unión cognado). En otras realizaciones, la nucleasa comprende dominios de unión a ADN y de escisión heterólogos (por ejemplo, nucleasas con dedos de cinc). 40 45

A. Dominios de unión a ADN

En determinadas realizaciones, el dominio de unión a ADN comprende una proteína con dedos de cinc. Preferiblemente, la proteína con dedos de cinc no es natural ya que se modifica por ingeniería para unirse a un sitio diana elegido. Véanse, 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; Patentes U.S. Nos. 6.453.242; 6.534.261; 6.599.692; 6.503.717; 6.689.558; 7.030.215; 6.794.136; 7.067.317; 7.262.054; 7.070.934; 7.361.635; 7.253.273; y las Publicaciones de Patente U.S. Nos. 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061. 50

Un dominio de unión con dedos de cinc modificado por ingeniería puede tener una especificidad de unión nueva, comparada con una proteína con dedos de cinc natural. Los métodos de modificación por ingeniería incluyen, pero no están limitados a, diseño racional y varios tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, usar bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos de triplete (o cuadruplete) y secuencias de aminoácidos con dedos de cinc individuales, en las que cada secuencia de nucleótido en triplete o cuadruplete está asociada con una 55

o más secuencias de aminoácidos de dedos de cinc que se unen a la secuencia en triplete o cuadruplete particular. Véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. en co-propiedad 6.453.242 y 6.534.261.

Los métodos de selección ejemplares, incluyendo exposición en fago y sistemas de dos híbridos, se describen en las Patentes US 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.410.248; 6.140.466; 6.200.759; y 6.242.568; así como WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 y GB 2.338.237. Además, el aumento de la especificidad de unión para dominios de unión con dedos de cinc se ha descrito, por ejemplo, en WO 02/077227 en co-propiedad.

Además, como se describe en éstas y otras referencias, los dominios con dedos de cinc y/o proteínas con dedos de cinc con múltiples dedos pueden unirse entre sí usando cualquier secuencia conectora adecuada, incluyendo por ejemplo, conectores de 5 o más aminoácidos de longitud. Véanse, también, las Patentes U.S. Nos. 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para secuencias conectoras ejemplares de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en la presente memoria pueden incluir cualquier combinación de conectores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína.

La selección de sitios diana; ZFP y métodos para el diseño y construcción de proteínas de fusión (y polinucleótidos que codifican las mismas) son conocidos para los expertos en la técnica y se describen con detalle en las Patentes U.S. Nos. 6.140.0815; 789.538; 6.453.242; 6.534.261; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.200.759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496.

Además, como se describe en éstas y otras referencias, los dominios con dedos de cinc y/o proteínas con dedos de cinc con múltiples dedos pueden unirse entre sí usando cualquier secuencia conectora adecuada, incluyendo por ejemplo, conectores de 5 o más aminoácidos de longitud. Véanse, también, las Patentes U.S. Nos. 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para secuencias conectoras ejemplares de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en la presente memoria pueden incluir cualquier combinación de conectores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína.

Así, la nucleasa comprende un dominio de unión a ADN ya que se une específicamente a un sitio diana en cualquier gen en el que se desea insertar una secuencia que codifica una proteína FIX.

B. Dominios de escisión

Cualquier dominio de escisión adecuado puede unirse de manera operativa a un dominio de unión a ADN para formar una nucleasa. Por ejemplo, los dominios de unión a ADN ZFP se han fusionado a dominios de nucleasa para crear ZFN - una entidad funcional que es capaz de reconocer su ácido nucleico diana pretendido mediante su dominio de unión a ADN modificado por ingeniería (ZFP) y causar que el ADN se corte cerca del sitio de unión ZFP mediante la actividad nucleasa. Véanse, por ejemplo, Kim *et al.* (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93(3):1156-1160. Más recientemente, las ZFN se han usado para la modificación del genoma en una variedad de organismos. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; y la Publicación Internacional WO 07/014275.

Como se ha indicado anteriormente, el dominio de escisión puede ser heterólogo respecto al dominio de unión a ADN, por ejemplo, un dominio de unión a ADN con dedos de cinc y un dominio de escisión de una nucleasa.

Los dominios de escisión heterólogos pueden obtenerse de cualquier endonucleasa o exonucleasa. Las endonucleasas ejemplares a partir de las cuales puede obtenerse un dominio de escisión incluyen, pero no están limitadas a, endonucleasas de restricción y endonucleasas de direccionamiento. Véanse, por ejemplo, Catálogo 2002-2003, New England Biolabs, Beverly, MA; y Belfort *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388. Las enzimas adicionales que escinden ADN son conocidas (por ejemplo Nucleasa S1, nucleasa de frijol mungo; ADNasa I pancreática, nucleasa micrococcal; 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 éstas) pueden usarse como una fuente de dominios de escisión y semi-dominios de escisión.

De manera similar, un semi-dominio de escisión puede derivar de cualquier nucleasa o parte de ésta, como se ha mostrado anteriormente, que requiere dimerización para actividad de escisión. En general, se requieren dos proteínas de fusión para la escisión si las proteínas de fusión comprenden semi-dominios de escisión. Alternativamente, puede usarse una única proteína que comprende dos semi-dominios de escisión. Los dos semi-dominios de escisión pueden derivar de la misma endonucleasa (o fragmentos funcionales de ésta), o cada semi-dominio de escisión puede derivar de una endonucleasa diferente (o fragmentos funcionales de ésta). Además, los sitios diana para las dos proteínas de fusión están dispuestos preferiblemente, uno respecto al otro, de manera que la unión de las dos proteínas de fusión a sus respectivos sitios diana pone a los semi-dominios de escisión en una orientación espacial uno respecto al otro que permite a los semi-dominios de escisión formar un dominio de escisión funcional, por ejemplo, por dimerización. Así, en determinadas realizaciones, los bordes 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 puede interponerse entre dos sitios diana (por ejemplo, de 2 a 50 pares de nucleótidos o más). En general, el sitio de escisión se encuentra entre los sitios diana.

Las endonucleasas de restricción (enzimas de restricción) están presentes en muchas especies y son capaces de unirse al ADN de manera específica de secuencia (en un sitio de reconocimiento), y escindir el ADN en o cerca del sitio de unión. Determinadas enzimas de restricción (por ejemplo, Tipo IIS) escinden el ADN en sitios eliminados del sitio de reconocimiento y tienen dominios de unión y de escisión separables. Por ejemplo, la enzima Tipo IIS *Fok I* cataliza la escisión de doble cadena de ADN, a 9 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en una cadena y 13 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en la otra. Véanse, por ejemplo, las Patentes US 5.356.802; 5.436.150 y 5.487.994; así como Li *et al.* (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. Así, en otra realización, las proteínas de fusión comprenden el dominio de escisión (o semi-dominio de escisión) de al menos una enzima de restricción Tipo IIS y uno o más dominios de unión con dedos de cinc, que pueden estar o no modificados por ingeniería.

Una enzima de restricción de Tipo IIS ejemplar, cuyo dominio de escisión es separable del dominio de unión, es *Fok I*. Esta enzima particular es activa como un dímero. Bitinaite *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10.570-10.575. De acuerdo con esto, para los propósitos de la presente descripción, la parte de la enzima *Fok I* usada en las proteínas de fusión descritas se considera un semi-dominio de escisión. Así, para la escisión de doble cadena dirigida y/o el reemplazo dirigido de secuencias celulares usando fusiones dedo de cinc-*Fok I*, pueden usarse dos proteínas de fusión, comprendiendo cada una un semi-dominio de escisión *Fok I*, para reconstituir un dominio de escisión catalíticamente activo. Alternativamente, también puede usarse una única molécula de polipéptido que contiene un dominio de unión con dedos de cinc y dos semi-dominios de escisión *Fok I*. Los parámetros para la escisión dirigida y alteración de secuencia dirigida usando fusiones dedo de cinc-*Fok I* se proporcionan en otro lugar de esta descripción.

Un dominio de escisión o semi-dominio de escisión puede ser cualquier parte de una proteína que retiene la actividad de escisión, o que retiene la capacidad de multimerizar (por ejemplo, dimerizar) para formar un dominio de escisión funcional.

Las enzimas de restricción de Tipo IIS ejemplares se describen en la Publicación Internacional WO 07/014275. Las enzimas de restricción adicionales también contienen dominios de unión y escisión separables, y éstas se contemplan por 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 semi-dominios de escisión modificados por ingeniería (también referidos como mutantes de dominio de dimerización) que minimizan o evitan la homodimerización, como se describe, por ejemplo, en las Publicaciones de Patente U.S. Nos. 20050064474; 20060188987; 20070305346 y 20080131962.

Los residuos 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 todos dianas para influir en la dimerización de los semi-dominios de escisión de *Fok I*.

Los semi-dominios de escisión de *Fok I* modificados por ingeniería ejemplares que forman heterodímeros obligados incluyen una pareja en la que un primer semi-dominio de escisión incluye mutaciones en los residuos de aminoácidos en las posiciones 490 y 538 de *Fok I* y un segundo semi-dominio de escisión incluye mutaciones en los residuos de aminoácidos 486 y 499.

Así, en una realización, una mutación en 490 reemplaza Glu (E) con Lys (K); la mutación en 538 reemplaza Iso (I) con Lys (K); la mutación en 486 reemplaza Gin (Q) con Glu (E); y la mutación en la posición 499 reemplaza Iso (I) con Lys (K). Específicamente, los semi-dominios de escisión modificados por ingeniería descritos en la presente memoria se prepararon mutando las posiciones 490 (E→K) y 538 (I→K) en un semi-dominio de escisión para producir un semi-dominio de escisión modificado por ingeniería designado "E490K:I538K" y mutando las posiciones 486 (Q→E) y 499 (I→L) en otro semi-dominio de escisión para producir un semi-dominio de escisión modificado por ingeniería designado "Q486E:I499L". Los semi-dominios de escisión modificados por ingeniería descritos en la presente memoria son mutantes de heterodímeros obligados en los que la escisión aberrante se minimiza o suprime. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente U.S. No. 2008/0131962.

En determinadas realizaciones, el semi-dominio de escisión modificado por ingeniería comprende mutaciones en las posiciones 486, 499 y 496 (numerado respecto a *Fok I* de tipo salvaje), por ejemplo mutaciones que reemplazan el residuo Gln (Q) de tipo salvaje en la posición 486 con un residuo Glu (E), el residuo Iso (I) de tipo salvaje en la posición 499 con un residuo Leu (L) y el residuo Asn (N) de tipo salvaje en la posición 496 con un residuo Asp (D) o Glu (E) (también referido como un dominio "ELD" y "ELE", respectivamente). En otras realizaciones, el semi-dominio de escisión modificado por ingeniería comprende mutaciones en las posiciones 490, 538 y 537 (numerado respecto a *Fok I* de tipo salvaje), por ejemplo mutaciones que reemplazan el residuo Glu (E) de tipo salvaje en la posición 490 con un residuo Lys (K), el residuo Iso (I) de tipo salvaje en la posición 538 con un residuo Lys (K), y el residuo His (H) de tipo salvaje en la posición 537 con un residuo de Lys (K) o un residuo de Arg (R) (también referido como dominios "KKK" y "KKR", respectivamente). En otras realizaciones, el semi-dominio de escisión modificado por ingeniería comprende mutaciones en las posiciones 490 y 537 (numerado respecto a *Fok I* de tipo salvaje), por ejemplo mutaciones que reemplazan el residuo Glu (E) de tipo salvaje en la posición 490 con un residuo de Lys (K) y

el residuo de His (H) de tipo salvaje en la posición 537 con un residuo de Lys (K) o un residuo de Arg (R) (también referidos como dominios "KIK" y "KIR", respectivamente). (Véase la Publicación de Patente US No. 20110201055). En otras realizaciones, el semi-dominio de escisión modificado por ingeniería comprende las mutaciones "Sharkey" y/o "Sharkey" (véase Guo *et al.*, (2010) *J. Mol. Biol.* 400(1):96-107).

- 5 Los semi-dominios de escisión modificados por ingeniería descritos en la presente memoria pueden prepararse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio de semi-dominios de escisión de tipo salvaje (*Fok I*) como se describe en las Publicaciones de Patente U.S. Nos. 20050064474; 20080131962; y 20110201055.

- 10 Alternativamente, pueden ensamblarse nucleasas *in vivo* en el sitio diana del ácido nucleico usando la tecnología denominada "enzima fraccionada" ("split-enzyme") (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente U.S. No. 20090068164). Los componentes de dichas enzimas fraccionadas pueden expresarse bien en construcciones de expresión separadas, o pueden unirse en un marco de lectura abierto en el que los componentes individuales se separan, por ejemplo, por un péptido 2A auto-escindible o secuencia IRES. Los componentes pueden ser dominios de unión con dedos de cinc individuales o dominios de un dominio de unión a ácido nucleico de meganucleasa.

- 15 Las nucleasas pueden cribarse para actividad antes del uso, por ejemplo, en un sistema cromosómico basado en levadura como se describe en WO 2009/042163 y 20090068164. Las construcciones de expresión de nucleasa pueden diseñarse fácilmente usando métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; y la Publicación Internacional WO 07/014275. La expresión de la nucleasa puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o un promotor inducible, por ejemplo, el promotor de galactocinasa que se activa (desreprime) en presencia de rafinosa y/o galactosa y se reprime en presencia de glucosa.

Sitios diana

- 25 Como se describe con detalle anteriormente, los dominios de ADN pueden modificarse por ingeniería para unirse a cualquier secuencia elegida, por ejemplo en un gen FIX endógeno o un gen seguro endógeno o insertado. Un dominio de unión a ADN modificado por ingeniería puede tener una especificidad de unión nueva, comparado con un dominio de unión a ADN natural. Los métodos de modificación por ingeniería incluyen, pero no están limitados a, diseño racional y varios tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, el uso de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos en triplete (o cuadruplete) y secuencias de aminoácidos con dedos de cinc individuales, en las que cada secuencia de nucleótidos en triplete o cuadruplete está asociada con una o más secuencias de aminoácidos de dedos de cinc que se unen a la secuencia en triplete o cuadruplete particular. Véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. en co-propiedad 6.453.242 y 6.534.261.

- 30 Los métodos de selección ejemplares aplicables a dominios de unión a ADN, incluyendo exposición en fago y sistemas de dos híbridos, se describen en las Patentes US 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.410.248; 6.140.466; 6.200.759; y 6.242.568; así como WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 y GB 2.338.237. Además, el aumento de la especificidad de unión para dominios de unión con dedos de cinc se ha descrito, por ejemplo, en WO 02/077227 en co-propiedad.

La selección de sitios diana; nucleasas y métodos para el diseño y construcción de proteínas de fusión (y polinucleótidos que codifican las mismas) son conocidos para los expertos en la técnica y se describen con detalle en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. Nos. 20050064474 y 20060188987.

- 40 Además, como se describe en éstas y otras referencias, los dominios de unión a ADN (por ejemplo, proteínas con dedo de cinc con múltiples dedos) pueden unirse entre sí usando cualquier secuencia conectora adecuada, incluyendo por ejemplo, conectores de 5 o más aminoácidos. Véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para secuencias conectoras ejemplares de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en la presente memoria pueden incluir cualquier combinación de conectores adecuados entre los dominios de unión a ADN individuales de la proteína.

Para el tratamiento de la hemofilia B mediante la inserción dirigida de una secuencia que codifica una proteína FIX funcional, cualquier sitio de inserción deseado en el genoma del sujeto se escinde con una nucleasa, lo que estimula la inserción dirigida del polinucleótido donante que porta la secuencia que codifica FIX. Los dominios de unión a ADN de las nucleasas pueden estar dirigidos a cualquier sitio deseado en el genoma.

- 50 En determinadas realizaciones, el dominio de unión a ADN de la nucleasa está dirigido al gen endógeno FIX (F9), como se describe por ejemplo en la Solicitud de Patente U.S. No. 12/798.749. Los sitios diana pueden estar en cualquier lugar en la secuencia codificadora o en 5' ó 3' de la secuencia codificadora. En determinadas realizaciones, el o los sitios diana están cerca del extremo 3' de la secuencia codificadora.

- 55 En otras realizaciones, la nucleasa (componente de dominio de unión a ADN) está dirigida a un locus "seguro", que incluye, sólo como ejemplo, el gen AAVS1 (véase la Publicación U.S. No. 20080299580), el gen CCR5 (véase la Publicación U.S. No. 20080159996), y/o el locus Rosa (véase WO 2010/065123).

Secuencias donantes

Para tratar la hemofilia, la secuencia donante comprende una secuencia que codifica una proteína FIX funcional, o parte de ésta, para resultar en una secuencia que codifica y expresa una proteína FIX funcional después de la integración del donante. La molécula donante puede insertarse en un gen endógeno, de manera que se exprese todo, parte o nada del gen endógeno. Por ejemplo, un transgén que comprende secuencias FIX funcionales como se describe en la presente memoria puede insertarse en un locus FIX endógeno de manera que parte o nada del FIX endógeno se expresa con el transgén FIX (por ejemplo, el donante puede corregir una mutación de manera que se expresen las secuencias endógenas de tipo salvaje). En otras realizaciones, el transgén FIX se integra en cualquier locus endógeno, por ejemplo un locus seguro (endógeno o insertado). Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente US 20080299580; 20080159996 y 201000218264.

La secuencia donante de FIX puede introducirse en la célula antes de, simultáneamente con, o posteriormente a, la expresión de la o las proteínas de fusión. El polinucleótido donante de FIX contiene típicamente una homología suficiente con una secuencia genómica para soportar recombinación homóloga (o reparación dirigida por homología) entre él y la secuencia genómica con la que presenta homología. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente U.S. Nos. 2005/0064474; 2007/0134796 y 2009/0263900. Será fácilmente evidente que la secuencia donante típicamente no es idéntica a la secuencia genómica que reemplaza. Por ejemplo, la secuencia del polinucleótido donante puede contener uno más cambios únicos de bases, inserciones, deleciones, inversiones o reorganizaciones respecto a la secuencia genómica, siempre que esté presente una homología suficiente con secuencias cromosómicas. Alternativamente, una secuencia donante puede contener una secuencia no homóloga flanqueada por dos regiones de homología. Además, las secuencias donantes pueden comprender una molécula de vector que contiene secuencias que no son homólogas a la región de interés en la cromatina celular. Una molécula donante puede contener varias regiones discontinuas de homología con la cromatina celular. Por ejemplo, para la inserción dirigida de secuencias que normalmente no están presentes en una región de interés, dichas secuencias pueden estar presentes en una molécula de ácido nucleico donante y flanqueadas por regiones de homología con la secuencia en la región de interés.

El polinucleótido donante de FIX puede ser ADN o ARN, monocatenario o bicatenario y puede introducirse en una célula en forma lineal o circular. Si se introduce en forma lineal, los extremos de la secuencia donante pueden estar protegidos (por ejemplo, de degradación exonucleolítica) por métodos conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, uno o más residuos de disesoxinucleótidos se añaden al extremo 3' de una molécula lineal y/o oligonucleótidos auto-complementarios se ligan a uno o ambos extremos. Véanse, por ejemplo, Chang *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:4959-4963; Nehls *et al.* (1996) *Science* **272**:886-889. Los métodos adicionales para proteger polinucleótidos exógenos de degradación incluyen, pero no están limitados a, adición de grupo o grupos amino terminales y el uso de uniones internucleótido modificadas tales como, por ejemplo, fósforotioatos, fósforamidatos, y residuos de O-metil ribosa o desoxiribosa. Un polinucleótido puede introducirse en una célula como parte de una molécula de vector que tiene secuencias adicionales tales como, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores y genes que codifican resistencia a antibiótico. Además, los polinucleótidos donantes pueden introducirse como ácido nucleico desnudo, como ácido nucleico formando un complejo con un agente tal como un liposoma o poloxámero, o pueden administrarse por virus (por ejemplo, adenovirus, AAV, herpesvirus, retrovirus, lentivirus).

El donante de FIX se inserta generalmente de manera que su expresión está dirigida por el promotor endógeno en el sitio de integración (por ejemplo, el promotor de FIX endógeno cuando el donante se integra en el locus de FIX (F9) defectuoso del paciente). Sin embargo, será evidente que el donante puede comprender un promotor y/o potenciador, por ejemplo un promotor constitutivo o un promotor inducible o específico de tejido (por ejemplo, específico del hígado) que dirige la expresión de la proteína FIX funcional después de la integración.

La secuencia donante de FIX puede integrarse específicamente en cualquier sitio diana elegido, eliminando de esta manera los problemas asociados con la integración aleatoria en la terapia génica tradicional. En determinadas realizaciones, la secuencia donante se integra en el locus FIX endógeno para corregir la deficiencia en el paciente con hemofilia B. En otras realizaciones, la secuencia donante de FIX se integra en un locus seguro, por ejemplo locus CCR5, locus AAVS1 o semejantes.

Además, aunque no se requiere para la expresión, las secuencias exógenas también pueden contener secuencias reguladoras de la transcripción o traducción, por ejemplo, promotores, potenciadores, aislantes, sitios de entrada a ribosoma internos, secuencias que codifican péptidos 2A y/o señales de poliadenilación.

Administración

Las nucleasas, polinucleótidos que codifican estas nucleasas, polinucleótidos donantes y composiciones que comprenden las proteínas y/o los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden administrarse *in vivo* o *ex vivo* por cualquier medio adecuado.

Los métodos para administrar nucleasas como se describe en la presente memoria se describen, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 6.453.242; 6.503.717; 6.534.261; 6.599.692; 6.607.882; 6.689.558; 6.824.978; 6.933.113; 6.979.539; 7.013.219; y 7.163.824.

Las nucleasas y/o construcciones donantes como se describe en la presente memoria también pueden administrarse usando vectores que contienen secuencias que codifican una o más de la o las proteínas con dedos de cinc. Puede usarse cualquier sistema de vector incluyendo, pero no limitado a, vectores plasmídicos, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores de adenovirus, vectores de poxvirus; vectores de herpesvirus y vectores de virus adeno-asociados, etc. Véanse también las Patentes U.S. Nos. 6.534.261; 6.607.882; 6.824.978; 6.933.113; 6.979.539; 7.013.219; y 7.163.824. Además, será evidente que cualquiera de estos vectores puede comprender una o más secuencias necesarias para el tratamiento. Así, cuando una o más nucleasas y una construcción donante se introducen en una célula, las nucleasas y/o polinucleótido donante pueden estar en el mismo vector o en vectores diferentes. Cuando se usan múltiples vectores, cada vector puede comprender una secuencia que codifica una o múltiples nucleasas y/o construcciones donantes.

Pueden usarse métodos de transferencia génica con base viral y no viral convencionales para introducir ácidos nucleicos que codifican nucleasas y construcciones donantes en células (por ejemplo, células de mamífero) y tejidos diana. Los sistemas de administración de vector no viral incluyen plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo, y ácido nucleico formando un complejo con un vehículo de administración tal como un liposoma o un poloxámero. Los sistemas de administración de vector viral incluyen virus con ADN y ARN, que tienen genomas bien episomales o integrados después de la administración a la célula. Para una revisión de la administración *in vivo* de proteínas de unión a ADN modificadas por ingeniería y proteínas de fusión que comprenden estas proteínas de unión, véanse, por ejemplo, Rebar (2004) *Expert Opinion Invest. Drugs* 13(7):829-839; Rossi *et al.* (2007) *Nature Biotech.* 25(12):1444-1454 así como referencias generales de administración génica tales como Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); Nabel y Feigner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993); Mitani y Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11:167-175 (1993); Miller, *Nature* 357:455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10): 1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995); Kremer y Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995); Haddada *et al.*, en *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler y Böhm (eds.) (1995); y Yu *et al.*, *Gene Therapy* 1:13-26 (1994).

Los métodos de administración no viral de ácidos nucleicos incluyen electroporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, polimerización o conjugados lípido:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, y captación de ADN potenciada por un agente. La sonoporación usando, por ejemplo, el sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) también puede usarse para la administración de ácidos nucleicos.

Los sistemas de administración de ácidos nucleicos ejemplares adicionales incluyen los proporcionados por Amaxa Biosystems (Colonia, Alemania), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) y Copernicus Therapeutics Inc, (véase, por ejemplo, US6008336). La lipofección se describe, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 5.049.386; 4.946.787; y 4.897.355) y los reactivos de lipofección se venden comercialmente (por ejemplo, Transfectam™ y Lipofectin™). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para lipofección de reconocimiento de receptor eficiente de polinucleótidos incluyen los de Feigner, WO 91/17424, WO 91/16024.

La preparación de complejos lípido:ácido nucleico, incluyendo liposomas dirigidos tales como complejos de inmunolípidos, es muy conocida para un experto en la técnica (véanse, por ejemplo, Crystal, *Science* 270:404-410 (1995); Blaese *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995); Behr *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2:710-722 (1995); Ahmad *et al.*, *Cancer Res.* 52:4817-4820 (1992); Pat. U.S. Nos. 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028, y 4.946.787).

Los métodos adicionales de administración incluyen el uso de empaquetamiento de ácidos nucleicos que se van a administrar en vehículos de administración EnGeneIC (EDV). Estos EDV se administran específicamente a los tejidos diana usando anticuerpos biespecíficos en los que un brazo del anticuerpo tiene especificidad para el tejido diana y el otro tiene especificidad para el EDV. El anticuerpo lleva a los EDV a la superficie de la célula diana y después el EDV se introduce en la célula pro endocitosis. Una vez en la célula, los contenidos se liberan (véase MacDiarmid *et al* (2009) *Nature Biotechnology* 27(7):643).

El uso de sistemas basados en virus con ARN o ADN para la administración de ácidos nucleicos que codifican ZFP modificadas por ingeniería tiene la ventaja de procesos altamente evolucionados para dirigir un virus a células específicas en el cuerpo y transportar la carga viral al núcleo. Los vectores virales pueden administrarse directamente a los pacientes (*in vivo*) o pueden usarse para tratar células *in vitro* y las células modificadas se administran a los pacientes (*ex vivo*). Los sistemas basados en virus convencionales para la administración de ZFP incluyen, pero no están limitados a, vectores de virus retrovirales, lentivirus, adenovirales, adeno-asociados, vaccinia y herpes simple para transferencia génica. La integración en el genoma huésped es posible con los métodos de transferencia génica de retrovirus, lentivirus, y virus adeno-asociados, resultando frecuentemente en la expresión a largo plazo del transgén insertado. Además, se han observado eficiencias de transducción altas en muchos tipos de células y tejidos diana diferentes.

El tropismo de un retrovirus puede alterarse incorporando proteínas de cubierta extrañas, expandiendo la población diana potencial de células diana. Los vectores lentivirales son vectores retrovirales que son capaces de transducir o infectar células que no están en división y típicamente producen altas titulaciones virales. La selección de un sistema de transferencia génica retroviral depende del tejido diana. Los vectores retrovirales están comprendidos por

repeticiones terminales largas que actúan en *cis* con capacidad de empaquetamiento para hasta 6-10 kb de secuencia extraña. Las LTR que actúan en *cis* mínimas son suficientes para la replicación y empaquetamiento de los vectores, que se usan entonces para integrar el gen terapéutico en la célula diana para proporcionar expresión permanente del transgén. Los vectores retrovirales ampliamente usados incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), virus de la Inmunodeficiencia de Simios (VIS), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y combinaciones de éstos (véanse, por ejemplo, Buchscher *et al.*, *J. Virol.* 66:2731-2739 (1992); Johann *et al.*, *J. Virol.* 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt *et al.*, *Virol.* 176:58-59 (1990); Wilson *et al.*, *J. Virol.* 63:2374-2378 (1989); Miller *et al.*, *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700).

En aplicaciones en las que se prefiere una expresión transitoria, pueden usarse los sistemas basados en adenovirus. Los vectores basados en adenovirus son capaces de una eficiencia de transducción muy alta en muchos tipos celulares y no requieren la división celular. Con dichos vectores, se han obtenido altas titulaciones y altos niveles de expresión. Este vector puede producirse en grandes cantidades en un sistema relativamente simple. Los vectores de virus adeno-asociados ("AAV") también se usan para transducir células con ácidos nucleicos diana, por ejemplo, en la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos, y para los procedimientos de terapia génica *in vivo* y *ex vivo* (véanse, por ejemplo, West *et al.*, *Virology* 160:38-47 (1987); Patente U.S. No. 4.797.368; WO 93/24641; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994); Muzyczka, *J. Clin. Invest.* 94:1351 (1994). La construcción de vectores AAV recombinantes se describe en varias publicaciones, incluyendo la Pat. U.S. No. 5.173.414; Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985); Tratschin, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1984); Hermonat y Muzyczka, *PNAS* 81:6466-6470 (1984); y Samulski *et al.*, *J. Virol.* 63:03822-3828 (1989).

Al menos seis estrategias con vectores virales están disponibles actualmente para la transferencia génica en estudios clínicos, que utilizan estrategias que implican la complementación de vectores defectuosos por genes insertados en líneas celulares auxiliares para generar el agente transductor.

pLASN y MFG-S son ejemplos de vectores retrovirales que se han usado en ensayos clínicos (Dunbar *et al.*, *Blood* 85:3048-305 (1995); Kohn *et al.*, *Nat. Med.* 1:1017-102 (1995); Malech *et al.*, *PNAS* 94:22 12133-12138 (1997)). PA317/pLASN fue el primer vector terapéutico usado en un estudio de terapia génica. (Blaese *et al.*, *Science* 270:475-480 (1995)). Se han observado eficiencias de transducción del 50% o mayores para vectores MFG-S empaquetados. (Ellem *et al.*, *Immunol Immunother.* 44(1):10-20 (1997); Dranoff *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 1:111-2 (1997).

Los vectores de virus adeno-asociados recombinantes (rAAV) son sistemas de administración génica alternativos prometedores basados en el virus parvovirus adeno-asociado tipo 2 defectuoso y no patógeno. Todos los vectores derivan de un plásmido que retiene sólo las repeticiones terminales invertidas de 145 pb de AAV flanqueando el casete de expresión del transgén. La transferencia génica eficiente y la administración estable del transgén debido a la integración en los genomas de la célula transducida son características clave para este sistema de vector. (Wagner *et al.*, *Lancet* 351:9117 1702-3 (1998), Kearns *et al.*, *Gene Ther.* 9:748-55 (1996)). Otros serotipos de AAV, incluyendo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 y AAVrh.10 y cualquier serotipo AAV nuevo también pueden usarse según la presente invención.

Los vectores adenovirales (Ad) recombinantes deficientes en la replicación pueden producirse a una titulación alta e infectan fácilmente varios tipos celulares diferentes. La mayor parte de los vectores de adenovirus se modifican por ingeniería de manera que un transgén reemplaza los genes Ad E1a, E1b, y/o E3; posteriormente, el vector defectuoso para la replicación se propaga en células 293 humanas que suministran la función del gen deletado en *trans*. Los vectores Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos *in vivo*, incluyendo células diferenciadas que no están en división tales como las encontradas en el hígado, riñón y músculo. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad de carga. Un ejemplo del uso de un vector Ad en un ensayo clínico implicó terapia con polinucleótido para inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Sterman *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 7: 1083-9 (1998). Los ejemplos adicionales del uso de vectores de adenovirus para transferencia génica en ensayos clínicos incluyen Rosenecker *et al.*, *Infection* 24:1 5-10 (1996); Sterman *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 9:7 1083-1089 (1998); 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); Sterman *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 7:1083-1089 (1998).

Las células de empaquetamiento se usan para formar partículas de virus que son capaces de infectar una célula huésped. Dichas células incluyen células 293, que empaquetan adenovirus, y células Ψ 2 o células PA317, que empaquetan retrovirus. Los vectores virales usados en terapia génica se generan habitualmente por una línea celular productora que empaqueta un vector de ácido nucleico en una partícula viral. Los vectores contienen típicamente las secuencias virales mínimas requeridas para el empaquetamiento e integración posterior en un huésped (si es aplicable), reemplazándose otras secuencias virales por un casete de expresión que codifica la proteína que se va a expresar. Las funciones virales ausentes se suministran en *trans* por la línea celular de empaquetamiento. Por ejemplo, los vectores AAV usados en terapia génica típicamente sólo poseen secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) del genoma de AAV que se requieren para el empaquetamiento e integración en el genoma huésped. El ADN viral se empaqueta en una línea celular, que contiene un plásmido auxiliar que codifica los demás genes de AAV, concretamente *rep* y *cap*, pero que carece de secuencias de ITR. La línea celular también se infecta con adenovirus como un auxiliar. El virus auxiliar estimula la replicación del vector AAV y la expresión de genes AAV a partir del plásmido auxiliar. El plásmido auxiliar no se empaqueta en cantidades

significativas debido a la ausencia de secuencias ITR. La contaminación con adenovirus puede reducirse, por ejemplo, por tratamiento con calor al que el adenovirus es más sensible que AAV.

En muchas aplicaciones de terapia génica, es deseable que el vector de terapia génica se administre con un alto grado de especificidad a un tipo de tejido particular. De acuerdo con esto, un vector viral puede modificarse para tener especificidad para un tipo celular dado expresando un ligando como una proteína de fusión con una proteína de la cubierta viral en la superficie externa del virus. El ligando se elige para tener afinidad para un receptor que se sabe que está presente en el tipo celular de interés. Por ejemplo, Han *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9747-9751 (1995), reportaron que el virus de la leucemia murina de Moloney puede modificarse para expresar heregulina humana fusionada con gp70, y el virus recombinante infecta determinadas células de cáncer de mama humano que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Este principio puede extenderse a otras parejas de virus-célula diana, en las que la célula diana expresa un receptor y el virus expresa una proteína de fusión que comprende un ligando para el receptor de la superficie celular. Por ejemplo, un fago filamentosos puede modificarse por ingeniería para exponer fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, FAB o Fv) que tienen afinidad de unión específica virtualmente para cualquier receptor celular elegido. Aunque la descripción anterior se aplica principalmente a vectores virales, los mismos principios pueden aplicarse a vectores no virales. Dichos vectores pueden modificarse por ingeniería para contener secuencias de captación específicas que favorecen la captación por células diana específicas.

Los vectores de terapia génica pueden administrarse *in vivo* por administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica, o infusión intracraneal) o aplicación tópica, como se describe más adelante. Alternativamente, los vectores pueden administrarse a células *ex vivo*, tal como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido) o células madre hematopoyéticas donantes universales, seguido de reimplante de las células en un paciente, habitualmente después de seleccionar las células que han incorporado el vector.

Los vectores (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, liposomas, etc.) que contienen nucleasas y/o construcciones donantes también pueden administrarse directamente a un organismo para transducción de células *in vivo*. Alternativamente, puede administrarse ADN desnudo. La administración es por cualquiera de las rutas usadas normalmente para introducir una molécula en contacto último con sangre o células tisulares incluyendo, pero no limitado a, inyección, infusión, aplicación tópica y electroporación. Los métodos adecuados para administrar dichos ácidos nucleicos están disponibles y son muy conocidos para los expertos en la técnica, y, aunque puede usarse más de una ruta para administrar una composición particular, una ruta particular puede proporcionar frecuentemente una reacción más inmediata y más efectiva que otra ruta.

Los vectores adecuados para la introducción de polinucleótidos (por ejemplo, que codifican nucleasa y/o que codifican FIX) descritos en la presente memoria incluyen vectores lentivirus no integrativos (IDLV). Véanse, por ejemplo, Ory *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11382-11388; Dull *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:8463-8471; Zuffery *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:9873-9880; Follenzi *et al.* (2000) *Nature Genetics* 25:217-222; Publicación de Patente U.S. No 2009/054985.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables están determinados en parte por la composición particular que se está administrando, así como por el método particular usado para administrar la composición. De acuerdo con esto, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas disponible, como se describe más adelante (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17^a ed., 1989).

Será evidente que las secuencias que codifican nucleasa y las construcciones donantes pueden administrarse usando el mismo sistema o sistemas diferentes. Por ejemplo, un polinucleótido donante puede estar portado por un plásmido, mientras que una o más nucleasas pueden estar portadas por un vector AAV. Además, los diferentes vectores pueden administrarse por la misma ruta o rutas diferentes (inyección intramuscular, inyección en la vena de la cola, otra inyección intravenosa, administración intraperitoneal y/o inyección intramuscular. Los vectores pueden administrarse simultáneamente o en cualquier orden secuencial.

Así, la presente descripción incluye el tratamiento *in vivo* o *ex vivo* de la Hemofilia B, mediante la integración mediada por nucleasa de una secuencia que codifica FIX. Las composiciones se administran a un paciente humano en una cantidad efectiva para obtener la concentración deseada del polipéptido FIX terapéutico en el suero, el hígado o las células diana. La administración puede ser por cualquier medio en el que los polinucleótidos se administran a las células diana deseadas. Por ejemplo, se contemplan tanto los métodos *in vivo* como *ex vivo*. La inyección intravenosa en la vena portal es un método preferido de administración. Otros modos de administración *in vivo* incluyen, por ejemplo, inyección directa en los lóbulos del hígado o el conducto biliar e inyección intravenosa distal al hígado, incluyendo a través de la arteria hepática, inyección directa en el parénquima hepático, inyección por la arteria hepática, y/o inyección retrógrada a través del árbol biliar. Los modos de administración *ex vivo* incluyen la transducción *in vitro* de hepatocitos resecados u otras células del hígado, seguido de infusión de los hepatocitos resecados, transducidos, de nuevo en la vasculatura portal, parénquima hepático o árbol biliar del paciente humano, véase, por ejemplo, Grossman *et al.*, (1994) *Nature Genetics*, 6:335-341.

La cantidad efectiva de nucleasa(s) y donante de FIX que se va a administrar variará de paciente a paciente y según el polipéptido terapéutico de interés. De acuerdo con esto, las cantidades efectivas son determinadas de la mejor manera por el médico que administra las composiciones y las dosificaciones apropiadas pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica. Después de permitir un tiempo suficiente para la integración y expresión (típicamente 4-15 días, por ejemplo), el análisis de los niveles en suero u otros tejidos del polipéptido terapéutico y comparación con el nivel inicial antes de la administración determinará si la cantidad que se está administrando es demasiado baja, está en el intervalo correcto o es demasiado alta. Los regímenes adecuados para las administraciones iniciales y posteriores también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de administraciones posteriores si es necesario. Las administraciones posteriores pueden administrarse a intervalos variables, que varían de diariamente a anualmente a cada varios años. Un experto en la técnica apreciará que pueden recomendarse técnicas inmunosupresoras apropiadas para evitar la inhibición o bloqueo de la transducción por la inmunosupresión de los vectores de administración, véase, por ejemplo, Vilquin *et al.*, (1995) *Human Gene Ther.*, 6:1391-1401.

Las formulaciones tanto para las administraciones *ex vivo* como *in vivo* incluyen suspensiones en líquidos o líquidos emulsionados. Los ingredientes activos se mezclan frecuentemente con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, glicerol, etanol o semejantes, y combinaciones de éstos. Además, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como, agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, agentes estabilizadores u otros reactivos que aumentan la eficacia de la composición farmacéutica.

Los Ejemplos siguientes se refieren a realizaciones ejemplares de la presente descripción en las que la nucleasa comprende una nucleasa con dedos de cinc (ZFN).

Ejemplos

Ejemplo 1: ZFN específicas de FIX y su uso para integración dirigida

La transferencia génica como una estrategia para tratar una enfermedad genética se ha llevado a cabo con éxito en una variedad de modelos animales de enfermedad, y más recientemente, en aplicaciones humanas (véanse, por ejemplo, Aiuti *et al.*, (2009) *N. Engl. J. Med.* 360: 447-458; Maguire *et al.*, (2009) *N. Engl. J. Med.* 358: 2240-2248; Cartier *et al.*, (2009) *Science* 326: 818-823). El direccionamiento génico se ha usado para corregir células madre pluripotentes inducidas semejantes a ES cultivadas *ex vivo* (Hanna *et al.*, (2007) *Science* 318: 1920-1923), pero la mayoría de las enfermedades genéticas afectan sistemas de órganos en los que la manipulación *ex vivo* no es factible actualmente. Uno de dichos órganos es el hígado, el sitio principal de síntesis de proteínas plasmáticas, incluyendo los factores de coagulación de la sangre. Una enfermedad genética modelo para la terapia génica en el hígado es la hemofilia B, causada por una deficiencia en el factor de coagulación de la sangre IX (FIX), codificado por el gen *F9*. La integración dirigida (TI) de los exones 2-8 de tipo salvaje en el intrón 1 de *F9* permitiría el corte y empalme de la secuencia codificadora de tipo salvaje con el exón 1 (Figura 1A), dando lugar a la expresión de FIX de tipo salvaje y el rescate del defecto causado por la mayoría de las mutaciones en *F9*. Así, consideramos investigar si las ZFN combinadas con un vector de direccionamiento que porta los exones 2-8 de *F9* de tipo salvaje podía inducir direccionamiento génico *in vivo*, para corregir un gen *F9* mutado *in situ* en el genoma de los hepatocitos.

Se usaron parejas de ZFN dirigidas al intrón 1 de *F9* humano para ensayar la capacidad de estas ZFN para inducir DSB en un sitio diana específico. Se usó el ensayo Cel-I (Surveyor™, Transgenomics. Perez *et al.*, (2008) *Nat. Biotechnol.* 26: 808-816 y Guschin *et al.*, (2010) *Methods Mol Biol.* 649:247-56), en el que la amplificación por PCR del sitio diana fue seguida de la cuantificación de inserciones y deleciones (indels) usando la enzima que detecta emparejamientos erróneos Cel-I (Yang *et al.*, (2000) *Biochemistry* 39, 3533-3541) que proporciona una estimación con límite bajo de la frecuencia de DSB. Tres días después de la transfección del vector de expresión de ZFN, el ADN genómico se aisló de células K562 usando el kit DNeasy (Qiagen). Los cebadores para el análisis Cel-I del intrón 1 de hF9 fueron N2 Dir (TCGGTGAGTGATTTGCTGAG, SEQ ID NO:1) y N2 Inv (AACCTCTCACCTGGCCTCAT, SEQ ID NO:2). La pareja de ZFN con la actividad más alta, designada N2, dirigida al intrón 1 del gen hF9, se muestra a continuación en la Tabla 1 (véase también la Publicación de los Estados Unidos No. 20110027235):

Tabla 1: pareja de ZFN específica de hFactor 9 N2

Nombre ZFN Sitio diana	F1	F2	F3	F4	F5
SBS#9802 tgACACAGTACCTGGCAccatagttgta (SEQ ID NO:3)	QSGDLTR (SEQ ID NO:4)	RSDVLSE (SEQ ID NO:5)	DRSNRIK (SEQ ID NO:6)	RSDNLSE (SEQ ID NO:7)	QNATRIN (SEQ ID NO:8)
SBS#11004 gtACTAGGGGTATGgggataaaccagac (SEQ ID NO:9)	RSDLSLV (SEQ ID NO:10)	TSGHLSR (SEQ ID NO:11)	RSDHLSQ (SEQ ID NO:12)	HASTRHC (SEQ ID NO:13)	N/A

El plásmido de expresión de ZFN N2 para transfección de cultivo celular se construyó insertando un conector 2A del virus *Thosea asigna* entre las secuencias codificadoras de ambas ZFN, e insertando este casete en 3' de un promotor CMV. Después de la transfección de la pareja ZFN N2 en células K562 humanas, encontramos que el 30% de los alelos del sitio diana N2 estaban escindidos (Figura 1C). Para ensayar la capacidad de las ZFN N2 para estimular recombinación homóloga mediante la inducción de DSB, co-transfectamos las ZFN N2 en células K562 con un vector de direccionamiento que inserta un sitio de restricción NheI (Figura 1D). El plásmido donante NheI se construyó amplificando los brazos izquierdo y derecho de homología del ADN genómico de K562 por PCR. Una secuencia corta que contenía un sitio de restricción NheI se introdujo posteriormente entre los brazos izquierdo y derecho de homología. Encontramos que en los días 3 y 10 después de la transfección, el 14% y 12%, respectivamente, de los alelos eran sensibles a digestión con NheI (Figura 1E), indicativo de proporciones eficientes de integración dirigida (TI) mediante recombinación homóloga.

Ejemplo 2: Modelo murino *in vivo* de hemofilia humana

El sitio diana N2 está presente en el intrón 1 de hF9, pero está ausente en el gen F9 murino. Así, para ensayar las ZFN N2 *in vivo* generamos un modelo de ratón humanizado de hemofilia B (HB). Construimos un mini-gen hF9 (Figura 2A) bajo el control de un promotor específico de hígado (Shen *et al*, (1989) *DNA* 8: 101-108 y Miao *et al*, (2000) *Mol. Ther.* 1: 522-532). Los cebadores para TI del intrón 1 de hF9 fueron N2 TI Dir (GGCCTTATTACACAAAAAGTCTG, SEQ ID NO: 14) y N2 TI Inv (TTTGCTCTAACTCCTGTTATCCATC, SEQ ID NO: 15).

El intrón 1 de esta construcción contiene el sitio diana N2 humano (Plataforma de Aterrizaje, LP). El resto de la secuencia de F9 en la construcción LP mimetiza una mutación sin sentido previamente identificada (Y155stop) (Thompson *et al*, (1989) *Hum. Genet.* 94: 299-302) en la que un codón de parada prematuro antes de los exones que codifican el dominio catalítico de FIX resulta en una ausencia de proteína FIX circulante. La construcción LP se construyó por síntesis génica (Genscript) y se ligó en el plásmido pUC57. La construcción LP se escindió por digestión con Swal y se ligó en el sitio Swal de un plásmido patentado entre los sitios de recombinasa FLP compatible para intercambio de casete mediado por recombinasa (RCME) (Taconic-Artemis) para crear el plásmido LP KI. El plásmido LP KI y un plásmido de expresión de recombinasa FLP (Taconic-Artemis) se transfectaron en células madre embrionarias (ES) B6S6F1 que contienen sitios de recombinasa FLP compatibles para RCME en el locus ROSA26 (Zambrowicz *et al*, (1997) *Proc Natl Acad Sci* 94: 3789-3794). Los clones de células ES B6S6F1-LP correctamente tomados como diana se identificaron por transferencia Southern y se inyectaron en blastocitos B6D2F1. Los ratones B6S6F1-LP derivados de células ES puras (G0) nacieron por parto natural, y las crías quiméricas se retro-cruzaron con ratones C57BL/6J de tipo salvaje (Jackson Laboratories) durante 5 generaciones (experimentos de escisión *in vivo*) ó 7-10 generaciones (experimentos TI *in vivo*).

Los ratones LP se genotiparon usando los cebadores LP Oligo 1 (ACTGTCCTCTCATGCGTTGG, SEQ ID NO: 16), LP Oligo 2 (GATGTTGGAGGTGGCATGG, SEQ ID NO: 17), wtROSA Oligo 1 (CATGTCTTAACTACCTCGATGG, SEQ ID NO: 18), y wtROSA Oligo2 (CTCCCTCGTGATCTGCAACTCC, SEQ ID NO: 19) (Figura 2B). También cruzamos ratones LP con un modelo de ratón existente que tiene una delección del gen F9 murino (Lin *et al*, (1997) *Blood* 90, 3962-3966) para generar ratones LP/HB en los que pudimos ensayar la actividad ZFN N2 *in vivo*.

Los ratones HB se han retro-cruzado con ratones C57BL/6J (Jackson Laboratories) durante >10 generaciones. Los ratones C57BL/6J (Jackson Laboratories) se usaron para experimentos TI negativos para LP. Como se esperaba, los ratones LP no tenían hFIX circulante detectable (Figura 2c). La cuantificación de hFIX plasmático se realizó usando un kit ELISA de hFIX (Affinity Biologicals), con una curva estándar de plasma humano normal combinado (Trinity Biotech). A todos los valores por debajo del último valor de la curva estándar (15 ng/mL) se les proporcionó arbitrariamente el valor de 15 ng/mL, que el límite de detección. El plasma para ELISA de hFIX se obtuvo por sangrado retro-orbital en tubos capilares heparinizados.

Ejemplo 3: Administración dirigida de ZFN específicas de FIX *in vivo*

Para administrar ZFN N2 al hígado, el sitio normal de producción de FIX, generamos un vector de virus adeno asociado hepatotrópico, serotipo 8 (AAV8-N2) que expresaba las ZFN N2 de un potenciador y promotor específico de hígado (Shen *et al, ibid* y Miao *et al, ibid*) (Figura 2D).

- 5 Para ensayar la actividad de escisión de las ZFN N2 *in vivo* realizamos inyecciones en la vena de la cola en ratones LP usando el vector de expresión 1e11 v.g. AAV8-N2 y aislamos ADN hepático en el día 7 después de la inyección. La amplificación por PCR del LP y ensayo Cel-I demostraron que el 34-47% de los alelos LP se habían escindido (Figura 2E). Los cebadores para Cel-I de la construcción LP fueron LP N2 Dir (CTAGTAGCTGACAGTACC, SEQ ID NO:20) y LP N2 Inv (GAAGAACAGAAGCCTAATTATG, SEQ ID NO:21).

10 Ejemplo 4: Co-administración *in vivo* de un ácido nucleico donante y ZFN específicas de FIX

La inserción de los exones 2-8 de tipo salvaje, precedido por un aceptor de corte y empalme (SA), en el intrón 1 de la construcción LP permite el corte y empalme de la secuencia codificadora de tipo salvaje con el exón 1 (Figura 3A). Para corregir el gen F9 mutado *in situ* en ratones LP, generamos un vector molde donante AAV (AAV-Donante) para direccionamiento génico, con brazos de homología, flanqueando un casete "SA-exones 2-8 de hF9 de tipo salvaje" (Figura 3A). Los plásmidos de producción del vector donante se construyeron amplificando los brazos izquierdo y derecho de homología de ADN genómico de ratón LP por PCR. El casete "aceptor de corte y empalme-secuencia codificadora de los exones 2-8-señal poliA de la hormona de crecimiento bovina" se obtuvo por amplificación por PCR del plásmido pAAV-hFIX16 (Manno *et al, (2006) Nat. Med. 12: 342-347*) y se ligó entre los brazos izquierdo y derecho de homología. Como HR se favorece durante las fases S/G2 del ciclo celular, administramos los vectores N2 y donante a ratones neonatales, en los que los hepatocitos que proliferan rápidamente entran en S/G2 durante la progresión del ciclo celular.

Inyectamos a ratones LP/HB en el día 2 de vida bien AAV-N2 (5e10 v.g) solo (n=1), AAV-N2 (5e10 v.g) + AAV-Donante (2,5e11 v.g) (n=5), o AAV-Simulado (5e10 v.g) + AAV-Donante (2,5e11 v.g) (n=5). En el vector simulado, las ZFN N2 se han reemplazado por luciferasa de renilla.

- 25 En la semana 10 de vida, sacrificamos los ratones y aislamos el ADN hepático para ensayar para TI del donante usando dos estrategias de PCR separadas. La primera estrategia usa cebadores que generan un amplicón menor para un alelo LP diana y un amplicón mayor para un alelo LP no diana (Figura 3a, cebadores P1/P2). La segunda estrategia implica usar cebadores que generan un amplicón mayor para un alelo LP diana y un amplicón menor para un alelo LP no diana (Figura 3A, cebadores P1/P3). Los cebadores para TI de la construcción LP fueron P1 (ACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTAG, SEQ ID NO:22), P2 (CACTGATCTCCATCAACATACTGC, SEQ ID NO:23), y P3 (GAATAATTCTTTAGTTTATAGCAA, SEQ ID NO:24).

Cuando realizamos ambos análisis por PCR, encontramos evidencias de TI sólo en los ratones que recibieron N2+Donante (Figura 3B). La cuantificación de las intensidades de las bandas sugirió 1-7% de frecuencia de TI (Figura 3B).

- 35 Para determinar si la corrección genómica resulta en la producción de hFIX circulante, inyectamos a ratones LP en el día 2 de vida AAV-N2 solo (n= 7), AAV-Simulado + AAV-Donante (n= 6), o AAV-N2 + AAV-Donante (n= 7) (mismas dosis de vector que anteriormente). Los niveles plasmáticos de hFIX para ratones que recibieron N2 solo o Simulado+Donante promediaron menos de 15 ng/mL (el límite de detección más bajo del ensayo), mientras los ratones que recibieron N2+Donante promediaron 116-121 ng/mL (correspondiente a 2-3% del normal) (Figura 4A), 40 significativamente mayor que los ratones que recibieron N2 solo y Simulado+Donante ($p \leq 0,006$ en todos los puntos de tiempo, ensayo T de dos colas).

Para confirmar una corrección genómica estable, realizamos hepatectomías parciales (PHx), que causan que los episodios extra-cromosómicos se diluyan y se pierdan al proliferar los hepatocitos durante la regeneración hepática (Nakai *et al, (2001), J. Virol. 75: 6969-6976*) (Figura 4 A,B). Las hepatectomías parciales se realizaron como se ha descrito previamente (Mitchell y Willenbring, (2008) *Nat. Prot. 3: 1167- 1170*) y todos los procedimientos en animales fueron aprobados por el IACUC del Children's Hospital of Philadelphia. La medida de los niveles de hFIX en ratones tratados con N2+Donante no cambiaron después de la regeneración hepática posterior a la hepatectomía, indicando una corrección estable. Los ratones control que recibieron N2 solo o Simulado+Donante continuaron promediando menos de 15 mg/mL (Figura 4A) después de la hepatectomía, significativamente menor que los ratones que recibieron N2+Donante ($p \leq 0,004$ a todos los puntos de tiempo, ensayo T de 2 colas). Para asegurar que la expresión de hFIX era específica de LP y que no resultaba de la integración aleatoria del donante en el genoma, inyectamos a ratones de tipo salvaje que carecían del transgén LP en el día 2 de vida AAV-N2 solo (n= 8), AAV-Simulado+AAV-Donante (n= 6), o AAV-N2+AAV-Donante (n= 9) (mismas dosis de vector que anteriormente). Los niveles plasmáticos de hFIX para los ratones que recibieron N2 solo, Simulado+Donante, y N2+Donante promediaron 50 menos de 15, 19, y 27 ng/mL, respectivamente, indicando que la mayoría de la expresión de hFIX en ratones LP que recibieron N2+Donante provenía de la corrección específica de LP (Figura 4C).

Para determinar si los niveles de hFIX eran suficientes para corregir el fenotipo HB, inyectamos a ratones LP/HB en el día 2 de vida AAV-N2 solo (n= 10), AAV-Simulado+AAV-Donante (n= 9), o AAV-N2+AAV-Donante (n= 9) (mismas

- dosis de vector que anteriormente). Los niveles plasmáticos de hFIX para los ratones que recibieron N2 solo promediaron de nuevo menos de 15 ng/mL. Los ratones que recibieron Simulado+Donante promediaron menos de 25 ng/mL, y los ratones que recibieron N2+Donante tenían unos niveles de hFIX significativamente mayores ($p \leq 0,04$ a todos los puntos de tiempo comparado con Simulado+Donante, ensayo T de 2 colas), promediando 166-354 ng/mL (3-7% de los niveles circulantes normales) (Figura 4D). Confirmamos la expresión de hFIX específica de hígado por RT-PCR para ARNm de hFIX (Figura 4E). El ARN de tejido de ratón congelado se aisló usando el kit RNeasy (Qiagen) y el kit RNase-free DNase (Qiagen). La síntesis de ADNc se realizó usando el kit iSCRIPT (Bio-Rad). La RT-PCR para el transcrito de hFIX se realizó usando los cebadores hFIX Gen1 Dir (ACCAGCAGTGCCATTCCA, SEQ ID NO:25) y hFIX Gen1 inv (GAATTGACCTGGTTTGGCATCT, SEQ ID NO:26).
- 5
- 10 Para ensayar si el fenotipo HB se corrigió, medimos el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), una medida de la cinética de la formación de coágulos de fibrina que está marcadamente prolongada en hemofilia. aPTT se realizó mezclando plasma muestra 1:1:1 con plasma humano HB combinado y reactivo aPTT. La formación de coágulos se inició por la adición de 25 mM cloruro de calcio. El plasma para aPTT se obtuvo por sangrado de la cola 9:1 en citrato de sodio. Los aPTT promedios para ratones de tipo salvaje ($n = 5$) y ratones HB ($n = 12$) fueron 36 segundos y 67 segundos, respectivamente (Figura 4F). Los ratones que recibieron Simulado+Donante ($n = 3$) promediaron 60 segundos, mientras que los ratones que recibieron N2+Donante ($n = 5$) tenían un aPTT significativamente acortado, promediando 44 segundos ($p = 0,0014$ comparado con Simulado+Donante, ensayo T de 2 colas) (Figura 4F).
- 15
- 20

Ejemplo 5: Co-administración *in vivo* de nucleasas modificadas por ingeniería y donante en animales adultos

- 20 Se sometieron animales adultos a edición genómica en el F.IX LP humano como se ha descrito anteriormente para los neonatos. Se trataron ratones LP adultos por inyección I.V. a las 6 semanas bien con $1e^{11}$ v.g./ratón AAV-N2 solo ("ZFN solo"), $1e^{11}$ v.g./ratón AAV-N2 y $5,5e^{11}$ v.g./ratón AAV-Donante ("ZFN-Donante"), ó $1e^{11}$ v.g./ratón AAV-Simulado y $5,5e^{11}$ v.g. AAV-Donante ("Simulado+Donante"). Los datos representados en la Figura 5A son representativos de 3 experimentos con aproximadamente 20 ratones por grupo. En estos experimentos, los niveles
- 25 de hF.IX de tipo salvaje fueron aproximadamente 1.000 ng/mL. De manera similar, la Figura 5B es un gráfico que muestra los niveles plasmáticos de hFIX en ratones LP adultos después de inyección I.V. a las 6 semanas de edad bien con $1e^{11}$ v.g./ratón AAV-N2 solo ("ZFN solo"), $1e^{11}$ v.g./ratón AAV-N2 y $5,5e^{11}$ v.g./ratón AAV-Donante ("ZFN+Donante"), ó $1e^{11}$ v.g./ratón AAV-Simulado y $5,5e^{11}$ v.g. AAV-Donante ("Simulado+Donante"). Dos días después de la inyección, los grupos en la Figura 5B se sometieron a una hepatectomía parcial. Los datos representados son representativos de 3 experimentos con aproximadamente 20 ratones por grupo. En estos
- 30 experimentos, los niveles de hF.IX de tipo salvaje fueron aproximadamente 1.000 ng/mL. Los datos demuestran que la expresión de hF.IX es estable cuando se administra a ratones adultos con o sin una hepatectomía parcial, y que es posible realizar edición genómica en animales adultos.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que comprende un dominio de unión a ADN de proteína con dedos de cinc modificado por ingeniería, en el que el dominio de unión a ADN comprende cuatro o cinco regiones de reconocimiento con dedos de cinc ordenadas F1 a F4 o F1 a F5 desde el extremo N al extremo C, y en el que
- 5 (i) cuando el dominio de unión a ADN comprende cinco regiones de reconocimiento con dedos de cinc, F1 a F5 comprenden las secuencias de aminoácidos siguientes:
- F1: QSGDLTR (SEQ ID NO:4)
- F2: RSDVLSE (SEQ ID NO:5)
- F3: DRSNRIK (SEQ ID NO: 6)
- 10 F4: RSDNLSE (SEQ ID NO:7)
- F5: QNATRIN (SEQ ID NO:8);
- (ii) cuando el dominio de unión a ADN comprende cuatro regiones de reconocimiento con dedos de cinc, F1 a F4 comprenden las secuencias de aminoácidos siguientes:
- F1: RSDSLSV (SEQ ID NO:10)
- 15 F2: TSGHLSR (SEQ ID NO:11)
- F3: RSDHLSQ (SEQ ID NO:12)
- F4: HASTRHC (SEQ ID NO:13).
2. La proteína según la reivindicación 1, que comprende además un dominio de escisión o semi-dominio de escisión de tipo salvaje o modificado por ingeniería.
- 20 3. Un polinucleótido que codifica la proteína de la reivindicación 1 o reivindicación 2.
4. Una célula aislada que comprende la proteína de la reivindicación 1 o reivindicación 2 o el polinucleótido de la reivindicación 3.
5. Un polinucleótido que codifica una proteína Factor IX (FIX) funcional para uso en el tratamiento de la hemofilia B en un sujeto en el que dicho polinucleótido se inserta en el genoma de una célula usando al menos una nucleasa con dedos de cinc que comprende una proteína según la reivindicación 1 o reivindicación 2 o codificada por una secuencia que comprende un polinucleótido según la reivindicación 3, en el que el sujeto comprende la célula.
- 25 6. El polinucleótido de la reivindicación 5 para uso en el tratamiento según la reivindicación 5, en el que el polinucleótido se integra en un gen endógeno.
7. El polinucleótido de la reivindicación 5 ó 6 para uso en el tratamiento según la reivindicación 5, en el que el gen endógeno se selecciona del grupo que consiste en un gen FIX y un gen seguro.
- 30 8. El polinucleótido de la reivindicación 5 a 7 para uso en el tratamiento según la reivindicación 5, en el que la célula es una célula hepática y el polinucleótido se administra a la célula por administración intravenosa en el hígado de un animal intacto, administración intraperitoneal, inyección directa en el parénquima hepático, inyección en la arteria hepática, o inyección retrógrada a través del árbol biliar.
- 35 9. El polinucleótido de la reivindicación 5 a 8 para uso en el tratamiento según la reivindicación 5, en el que se realiza una hepatectomía parcial en el sujeto y/o el sujeto se trata con al menos un agente secundario.
10. El polinucleótido de la reivindicación 9 para uso en el tratamiento según la reivindicación 5, en el que el agente secundario se selecciona del grupo que consiste en irradiación gamma, irradiación UV, nucleótidos tritizados, cisplatino, etopósido, hidroxiurea, afidicolina, prednisona, adenovirus y combinaciones de éstos.
- 40 11. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 para uso en el tratamiento según la reivindicación 5, en el que la célula es una célula aislada y la célula aislada se administrada al sujeto.
12. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 para uso en el tratamiento según la reivindicación 5, en el que el sujeto se selecciona del grupo que consiste en un embrión, un feto, un neonato, un infante, un joven o un adulto.
- 45 13. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12 para uso en el tratamiento según la reivindicación 5, que comprende además asociar el polinucleótido, la nucleasa con dedos de cinc, el polinucleótido que codifica la

nucleasa con dedos de cinc o combinaciones de éstos con un agente de direccionamiento que se une específicamente a un receptor de superficie de la célula.

14. El polinucleótido de la reivindicación 13 para uso en el tratamiento según la reivindicación 5, en el que el agente de direccionamiento comprende galactosa o un híbrido de una proteína de cubierta de AAV y galactosa.

- 5 15. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14 para uso en el tratamiento según la reivindicación 5, en el que la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula humana, una célula de primate no humano, una célula de *Rodenta*, una célula de *Lagomorpha*, una célula de *Carnivora* y una célula de *Arteriodactyla*, y una célula madre tal como una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente inducida, un hepatocito o una célula madre hepática.

10

Figura 1

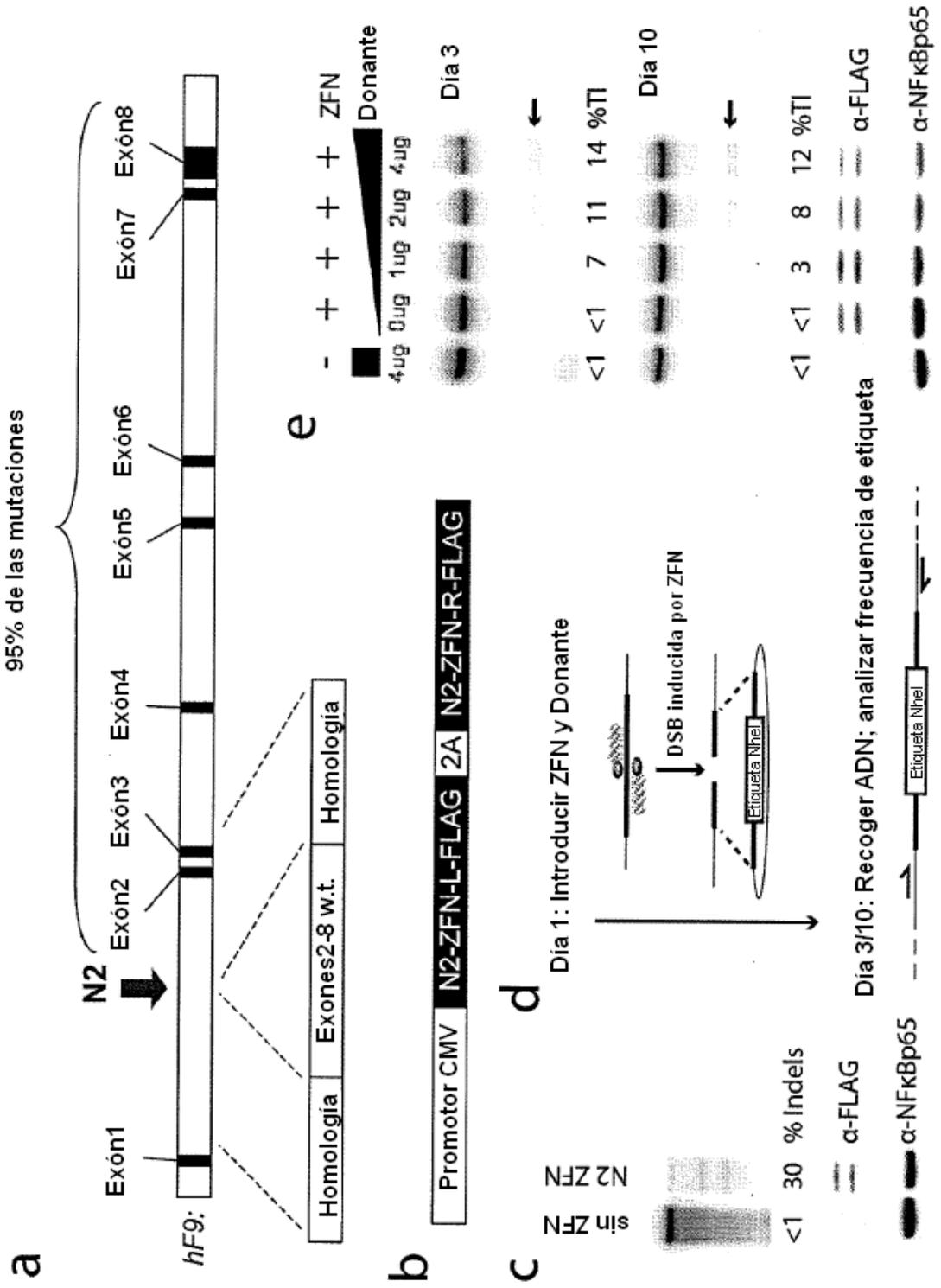


Figura 2

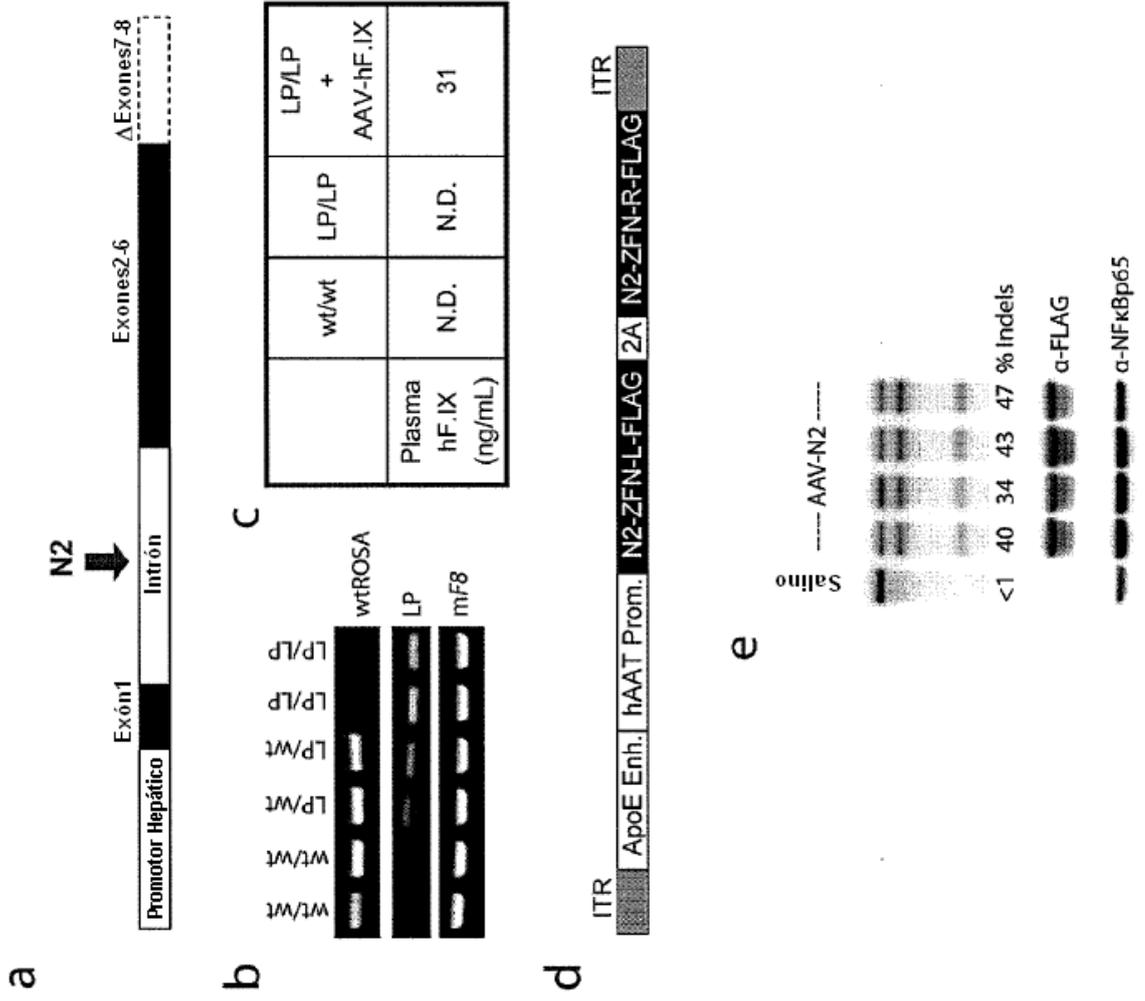


Figura 3

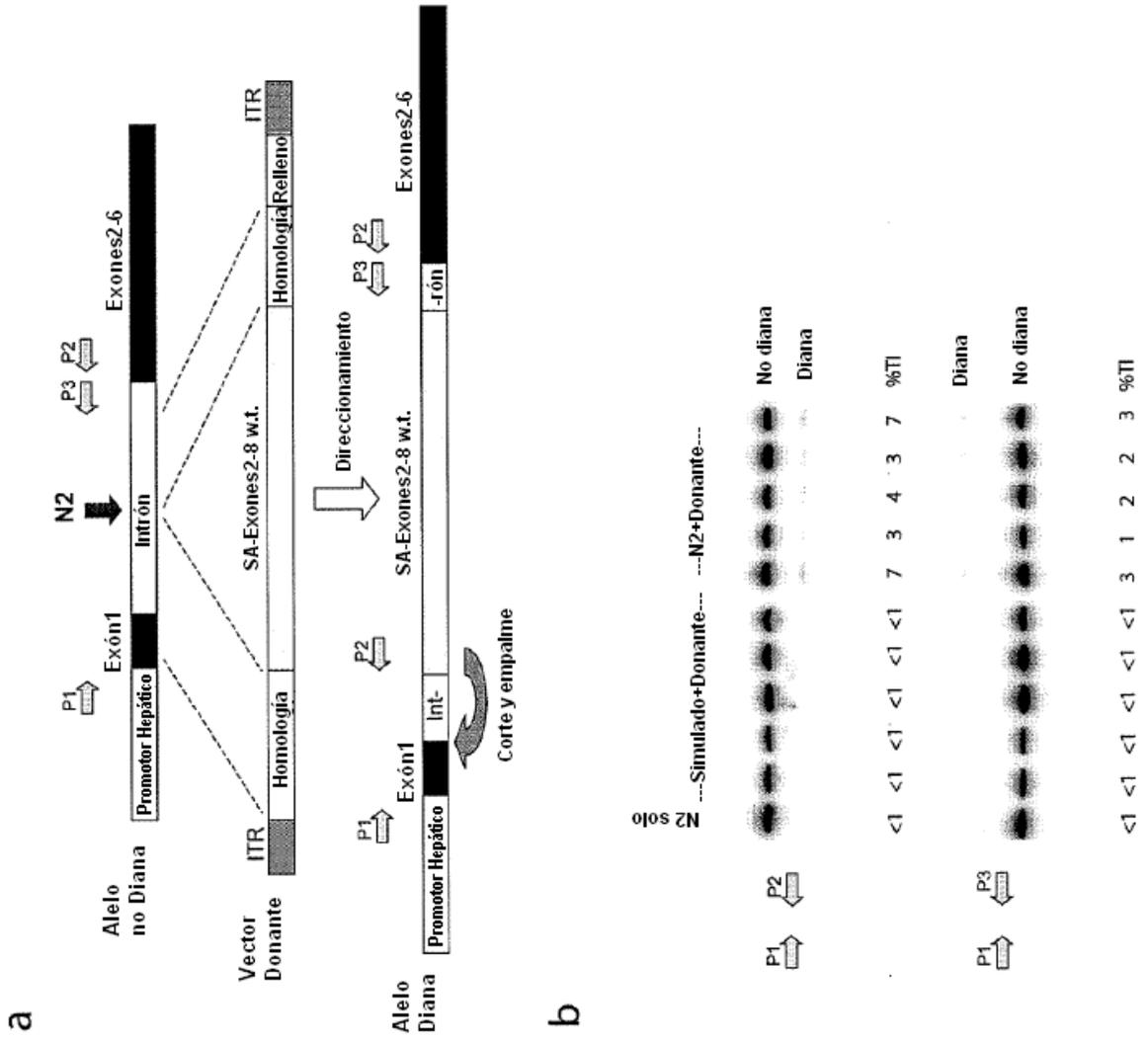
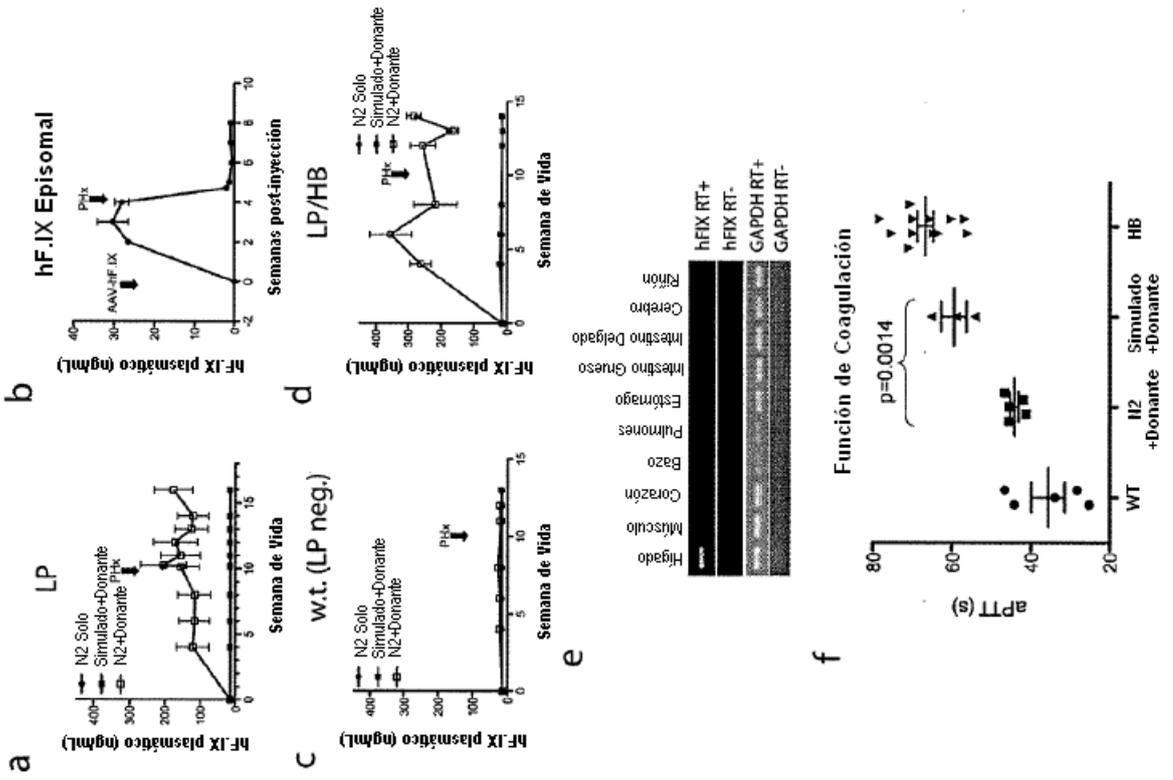


Figura 4



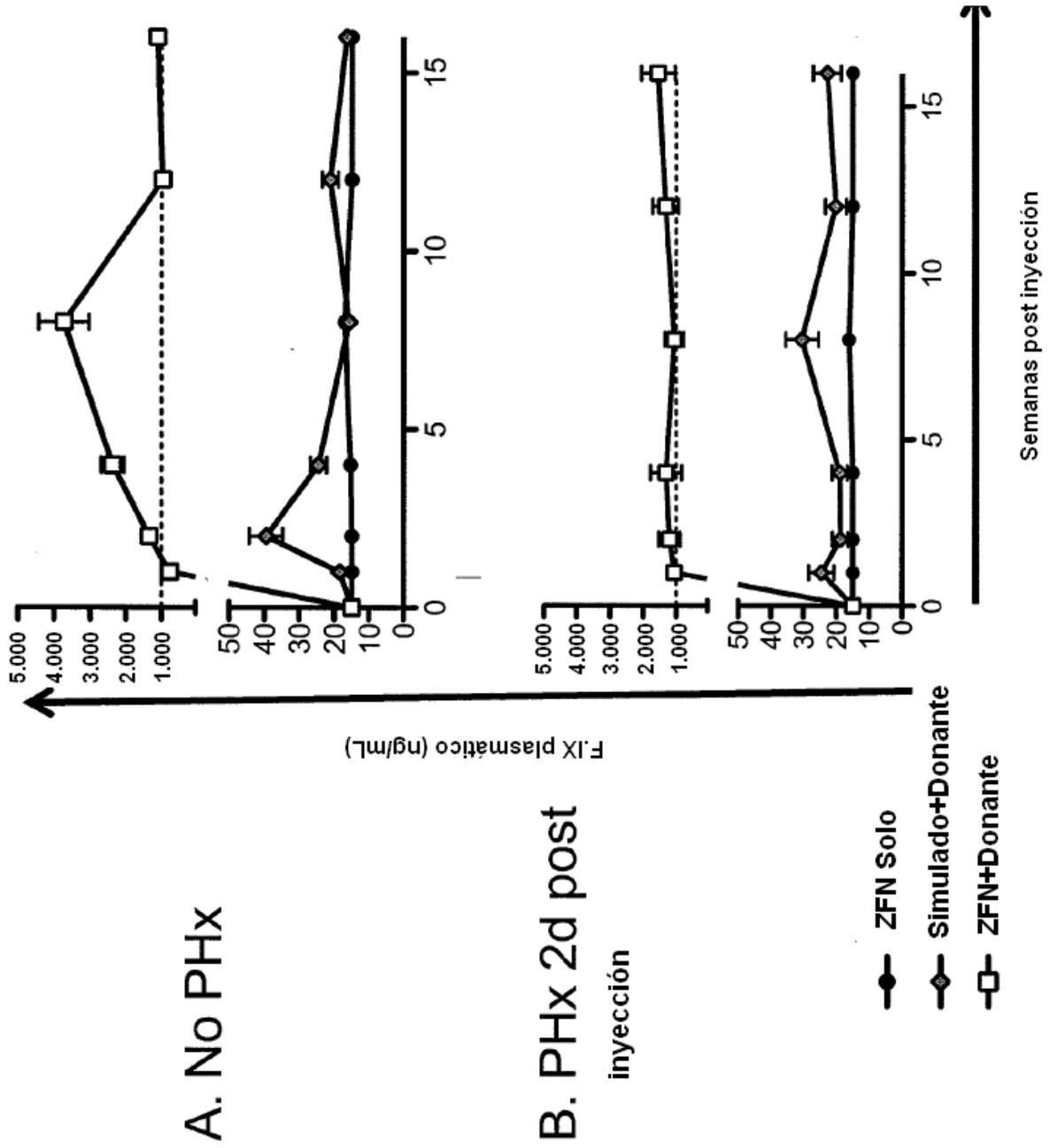


Figura 5