

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 205**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2011 PCT/EP2011/068139**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12049332**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2011 E 11781463 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2627668**

54 Título: **Péptidos y usos**

30 Prioridad:

15.10.2010 EP 10187818

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2017

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ CENTRE DE REGULACIÓ GENÒMICA
(100.0%)**

**Doctor Aiguader, 88
08003 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**ISALAN, MARK y
GARRIGA-CANUT, MIREIA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 626 205 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

Péptidos y usos

5 Campo de la invención

10 Esta invención se refiere a nuevos péptidos de dedo de zinc que tienen propiedades deseables, incluyendo especificidad de unión y afinidad por secuencias de ácido nucleico seleccionadas y represión de la expresión génica diana. En particular, la invención se refiere a proteínas represoras transcripcionales dedos de zinc y a la represión de los genes implicados en trastornos neurológicos, y a métodos y usos terapéuticos que implican dichas proteínas.

Antecedentes de la invención

15 Los trastornos neurológicos son enfermedades que afectan el sistema nervioso central (cerebro y médula espinal), el sistema nervioso periférico (nervios periféricos y nervios craneales) y el sistema nervioso autónomo (cuyas partes se encuentran tanto en el sistema nervioso central como en el periférico). Más de 600 enfermedades neurológicas se han identificado en los seres humanos, que en conjunto afectan a todas las funciones del cuerpo, incluyendo la coordinación, comunicación, memoria, aprendizaje, alimentación y en algunos casos la mortalidad.

20 Aunque muchos tejidos y órganos en animales son capaces de autorreparación, generalmente el sistema neurológico no lo es. Por lo tanto, los trastornos neurológicos a menudo se caracterizan por un empeoramiento progresivo de los síntomas, comenzando con problemas menores que permiten la detección y el diagnóstico, pero que se tornan cada vez más graves - a veces dando lugar a la muerte del individuo afectado. Si bien las causas exactas o desencadenantes de muchos trastornos neurológicos son aún desconocidos, para otros las causas están bien documentadas e investigadas. Para algunas de estas enfermedades existen tratamientos "eficaces", que alivian los síntomas y/o prolongan la supervivencia. Sin embargo, a pesar de los intensos esfuerzos de investigación, para la mayoría de los trastornos neurológicos, y particularmente para las enfermedades más graves, todavía no hay cura. Por lo tanto, existe una clara necesidad de nuevas terapias y tratamientos para los trastornos neurológicos.

30 El conocimiento actual de los trastornos neurológicos muestra que pueden ser causados por muchos factores diferentes, incluyendo (pero sin limitarse a): anomalías genéticas hereditarias, problemas en el sistema inmunitario, lesiones en el cerebro o sistema nervioso o diabetes. Una causa conocida de trastorno neurológico es una anomalía genética que conduce a la expansión patológica de las repeticiones de CAG en ciertos genes, lo que da lugar a extensas regiones de poliglutamina (poliQ) en los productos génicos mutados expresados (Walker (2007) Lancet 369 (9557): 218-228). Se cree que las proteínas resultantes se agregan y causan enfermedades tóxicas de ganancia de función, incluyendo las ataxias espinocerebelosas, la atrofia muscular espinobulbar y la enfermedad de Huntington (HD, Orr y Zoghbi, Ann. Rev. Neurosci. 30: 575-621; Cha (2007) Prog. Neurobiol, 83 (4): 228-248). La neuropatología de la HD se asocia con la muerte selectiva de células neuronales, principalmente de neuronas espinosas medianas del caudado y putamen, y en menor grado las neuronas corticales, lo que conduce a disfunción cognitiva y corea (Walker (2007) Lancet 369 (9557): 218-228; y Kumar et al., Pharmacol., Rep. 62 (1): 1-14). Desde el descubrimiento, en 1993, de que el gen *htt* causa la HD (The-Huntington's-Disease-Collaborative-Research-Group (1993) Cell 72 (6): 971-983), mucha atención se ha enfocado en cómo el número de repeticiones de CAG afecta la patología y la progresión de esta enfermedad. Normalmente, el número de repeticiones de CAG en el gen *htt* de tipo silvestre varía de 10 a 29 (con una mediana de 18), mientras que en pacientes con HD suele estar en el intervalo de 36 a 121 (con una mediana de 44). Además, se ha demostrado que la edad de aparición de la enfermedad HD se correlaciona con el número de repetición de CAG (Walker (2007) Lancet 369 (9557): 218-228, y Kumar et al., Pharmacol Rep. 62 (1): 1 -14).

50 Aunque ha habido una gran cantidad de investigación sobre curas para la enfermedad HD, los fármacos actualmente disponibles tratan solamente los síntomas de la enfermedad y, por lo tanto, todavía no hay manera de detener o retrasar la aparición o progresión de HD (Walker (2007) Lancet 369 (9557): 218-228, y Kumar et al., Pharmacol Rep. 62 (1): 1-14). Por esta razón sería extremadamente deseable tener un tratamiento para la enfermedad HD que aborda la causa más que los síntomas de la enfermedad.

55 Recientemente, se demostró que la interferencia de ARN (iARN) reduce la expresión de *htt* mutante (van Bilsen et al., (2008) Hum. Gene Ther. 19 (7): 710-719, Zhang et al. (2009) J. Neurochem 108 (1): 82-90; Pfister et al. (2009) Curr. Biol. 19 (9):774-778). Aunque el iARN ha demostrado ser una herramienta muy potente, el éxito de esta técnica depende de dirigir polimorfismos de supresión o nucleótidos individuales que diferencian entre alelos mutantes y de tipo silvestre, y estos a menudo difieren de paciente a paciente. El requisito evidente para los diseños personalizados de ARNpi plantea actualmente desafíos para ensayos clínicos y uso aprobado en seres humanos.

60 En un enfoque más general, Hu et al. usaron ácido nucleico peptídico (PNA) y oligómeros antisentido de ácido nucleico bloqueados (LNA), para dirigirse a las repeticiones de CAG expandidas de los genes *ataxin-3* y *htt* (Hu et al. (2009) Natl. Biotechnol., 27 (5): 478-484, Hu et al. (2009) Ann. NY Acad. Sci. 1175: 24-31). Informaron de la inhibición selectiva del alelo mutante con ácidos nucleicos peptídicos (PNA) durante un máximo de 22 días. Aunque estos resultados fueron prometedores, los PNA no pueden ser administrados al sistema nervioso central. Por lo tanto, los autores también trataron ácidos nucleicos bloqueados (LNA), que son quizás más adecuados para su uso *in vivo*. Aunque se observó

inhibición selectiva del alelo mutante, sólo se observó hasta un 30% de inhibición de *htt* silvestre a la concentración más alta y más eficaz de LNA utilizada.

5 Por lo tanto, sería altamente deseable tener moléculas y tratamientos terapéuticos alternativos y/o más eficaces para HD y trastornos relacionados causados por repeticiones de CAG expandidas.

Por consiguiente, la presente invención trata de superar o al menos aliviar uno o más de los problemas en la técnica anterior.

10 Resumen de la invención

En términos generales, la presente invención proporciona nuevos marcos de péptidos de dedo de zinc (y moléculas de ácido nucleico que los codifican) que pueden usarse para la modulación de la expresión génica *in vitro* y/o *in vivo*. Los nuevos péptidos de dedo de zinc de la invención pueden ser particularmente útiles en la modulación de genes diana asociados con repeticiones expandidas de nucleótidos, tales como repeticiones de CAG, y más específicamente la represión de tales genes. En algunas realizaciones, los nuevos péptidos de dedo de zinc de la invención contienen un mayor número de dominios de dedo de zinc individuales que cualquier péptido de dedo de zinc artificial conocido que muestre que posee actividad de modulación transcripcional *in vitro* o *in vivo* y, por tanto, la invención abre la posibilidad de dirigir secuencias de ácido nucleico más largas de lo que se creía posible. Como consecuencia, se prevé la posibilidad de un direccionamiento genético más específico, que puede ser particularmente útil para la modulación de la expresión génica dentro del genoma y/o para distinguir entre secuencias de ácido nucleico similares de diferentes longitudes. Además, la invención se refiere a moléculas terapéuticas y composiciones para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con secuencias de repeticiones expandidas de CAG, tales como enfermedades neurológicas, y particularmente enfermedad de Huntington (HD). También se prevén métodos y regímenes de tratamiento terapéutico para el tratamiento de pacientes afectados o diagnosticados con HD. Por ejemplo, las moléculas terapéuticas de la invención pueden usarse para retrasar la aparición de los síntomas y/o para tratar o aliviar los síntomas de la enfermedad, y/o para reducir la gravedad o prevenir la progresión de la enfermedad.

30 Por lo tanto, el solicitante ha creado nuevos péptidos de dedo de zinc (ZFP) que pueden usarse para reducir la expresión de genes *htt* mutantes. Además, dado que los dedos de zinc se pueden volver a modificar fácilmente para unirse a diferentes secuencias de ADN (Annu. Rev. Biochem., 70: 313-340 (2001); Chem. Rev. 104 (2): 789-799, Biochemistry 41 (22): 7074-7081 (2002); Nucleic Acids Res. 34 (edición del servidor Web): W516-523, 92006); Natl. Methods 7 (2): 91-9, (2009); Genome Res. 19 (7): 1279-1288 (2009); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (21): 12271-12276 (2003); Natl. Protoc. 1 (3): 1637-1652 (2006); Mol. Cell 31 (2): 294-301 (2008), incluyendo repeticiones de CAG (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (24): 9607-9612, (2009)), pueden ser útiles para dirigir genes tales como *htt* a nivel transcripcional. En particular, la naturaleza modular de los péptidos de dedo de zinc de la invención los hace particularmente adecuados para dirigir secuencias de repetición expandida que pueden encontrarse en genomas y especialmente secuencias de repetición de triplete para las cuales existe una correspondencia conveniente en el registro entre el tramo de ácido nucleico del triplete seleccionado y su respectivo péptido de dedo de zinc unido.

40 Se utilizó un diseño racional para crear ZFP capaces de reconocer y unir poli-5'-GC (A/T)-3', de tal manera que reconocerían tanto las secuencias de poli-CAG como su cadena de ADN complementaria. Se demostró que la expresión estable de los ZFP reduce la expresión del gen *htt* mutante cromosómico en una línea celular modelo, tanto a nivel de proteína como de ARN. Además, se demostró que la represión del gen mutante persiste durante períodos prolongados de al menos 20 días. Las pruebas *in vivo* demostraron además la capacidad de estos péptidos de dedo de zinc para retrasar el inicio de los síntomas de HD.

45 Se sintetizaron ZFP de 4 a 18 dedos y se mostró que reprimen un gen diana con 35 o más repeticiones de CAG preferencialmente, cuando se comparan con repeticiones más cortas, demostrando así la utilidad de estas moléculas en direccionar preferencialmente repeticiones expandidas de CAG. Por consiguiente, la expresión del gen *htt* mutante puede ser reprimida dejando al alelo de tipo silvestre relativamente no afectado.

55 Mediante concatenación de dominios individuales de dedo de zinc en cadenas largas usando secuencias enlazadoras seleccionadas, se han diseñado y sintetizado péptidos de dedo de zinc de la invención con un mayor número de dominios de dedo de zinc que los conocidos previamente; y se ha demostrado que estos ZFP extendidos dirigen selectivamente secuencias de ácido nucleico con alta afinidad y especificidad. Los dedos de zinc y los métodos de la invención son particularmente beneficiosos para dirigir secuencias repetidas de ácido nucleico concatenando dominios esencialmente idénticos de unión de ácido nucleico con dedo de zinc.

60 Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención se proporciona un péptido de dedo de zinc que comprende la secuencia: N'-[(Fórmula 2)-X₆]_{n0}-[(Fórmula 2)-X₅-(Fórmula 2)-X₆]_{n1}-[(Fórmula 2)-X₅-(Fórmula 2)-X_L]_{n2}-[(Fórmula 2)-X₅-(Fórmula 2)-X₆]_{n3}-[(Fórmula 2)-X₅-(Fórmula 2)]_{n4}-C', en donde n₀ es 0 o 1, n₁ es de 1 a 4, n₂ es 1 o 2, n₃ es de 1 a 4, n₄ es 0 o 1, X₅ es una secuencia enlazadora de 5 aminoácidos que tiene la secuencia -TG^{E/Q}/R^P-, X₆ es una secuencia enlazadora de 6 o 7 aminoácidos que tiene la secuencia -TG^(G/S)₁₋₂^{E/Q}/R^P- o -T^(G/S)₁₋₂^{G^{E/Q}/R^P}-, y X_L es una secuencia enlazadora de al menos 8 aminoácidos; y la Fórmula 2 es un dominio de dedo de zinc de la secuencia -X₀₋₂ C X₁₋₅ C X₂₋₇ X⁻¹ X⁺¹ X⁺² X⁺³ X⁺⁴ X⁺⁵ X⁺⁶ H X₃₋₆ H/C-, en la que X es cualquier aminoácido, los números en subíndice

indican los posibles números de residuos representados por X en esa posición, y el número en superíndice indica la posición del aminoácido en la secuencia de reconocimiento del dominio de dedo de zinc; y en donde el péptido de dedo de zinc comprende de 8 a 32 dominios de dedo de zinc, y en donde al menos un dominio de dedo de zinc tiene una secuencia de reconocimiento $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$ de acuerdo con la SEQ ID NO: 101.

Ventajosamente, n_0 y/o $n_4 = 0$. Convenientemente, en este y otros aspectos y realizaciones, X_6 es un enlazador de 6 aminoácidos. Por lo tanto, en una realización preferida, el péptido de dedo de zinc de la invención tiene la fórmula $N'-\{[(\text{Fórmula 2})-X_5-(\text{Fórmula 2})-X_6]_{n_1}-[(\text{Fórmula 2})-X_5-(\text{Fórmula 2})-X_L]_{n_2}-[(\text{Fórmula 2})-X_5-(\text{Fórmula 2})-X_6]_{n_3}-[(\text{Fórmula 2})-X_5-(\text{Fórmula 2})]-C'$, en la que X_6 es una secuencia enlazadora de 6 aminoácidos, y n_1 , n_2 , n_3 , n_4 , X_5 y X_L son como se ha descrito previamente. En algunas realizaciones beneficiosas, la secuencia enlazadora extendida X_L es de 8 a 50 aminoácidos, o de 11 a 40 aminoácidos; n_1 es preferiblemente 2 y n_3 es preferiblemente 2.

Mediante el establecimiento de la secuencia $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$ para que sea la misma secuencia de aminoácidos o similar en una pluralidad de dominios de dedo de zinc adyacentes (de manera que cada uno de la pluralidad de dedos se une preferencialmente a la misma secuencia trinucleotídica), los péptidos de la invención son ventajosamente capaces de dirigir (o enlazarse) a secuencias de repetición de trinucleótidos en ADN, las cuales pueden estar asociadas con anomalías genéticas. En una realización de este y otros aspectos de la invención, por tanto, al menos una secuencia $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$ es la secuencia de aminoácidos QRATLQR (SEQ ID NO: 1), que permite el direccionamiento de secuencias de repetición de CAG y/o repetición de CTG. Puede ser posible realizar mutaciones conservadoras en la secuencia de reconocimiento mientras se sigue permitiendo el reconocimiento de dedos de zinc de las mismas secuencias de nucleótidos de tripletes. Por lo tanto, cada secuencia $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$ puede ser mutada (conservativamente - de modo que aún se une a tripletes de CAG o CTG), de tal manera que es idéntica a QRATLQR (SEQ ID NO: 1) en las posiciones 4, 5, 6 o 7. Por consiguiente, en algunas realizaciones las secuencias de reconocimiento se seleccionan del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107 o combinaciones de las mismas.

También se describe aquí un péptido de dedo de zinc que comprende al menos 4 dominios de dedo de zinc de Fórmula 2: $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{2-7} X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6} H X_{3-6}^H/C$, en la que X es cualquier aminoácido, los números en subíndice indican los posibles números de residuos representados por X en esa posición, y el número en superíndice indica la posición del aminoácido en la secuencia de reconocimiento del dominio de dedo de zinc; y al menos una secuencia $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$ se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107. Por lo tanto, al menos 4 (por ejemplo 4, 6, 11, 12, 18 o todos) los dominios de dedo de zinc adyacentes del péptido pueden tener una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107. Una secuencia de reconocimiento preferida es QRATLQR (SEQ ID NO: 1); y adecuadamente todos los dominios de dedo de zinc del péptido tienen esta secuencia.

Los péptidos particularmente útiles de la invención comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 108; o secuencias que tienen al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia.

Convenientemente, el péptido de la invención se une a las secuencias bicatenarias de ácido nucleico de repetición de trinucleótidos que comprenden secuencias de repetición de CAG, repetición de CTG y/o repetición de CAGCTG que contienen al menos 10, al menos 22 repeticiones de tripletes, al menos 35 repeticiones, o al menos 63 repeticiones de tripletes. Deseablemente, los péptidos de la invención tienen afinidad de unión (constante de disociación) para su secuencia diana respectiva de al menos 1 nM; al menos 100 pM o al menos 10 pM. La afinidad de unión se puede determinar de cualquier manera adecuada conocida por la persona experta en la técnica, tal como Biacore.

En otro aspecto, la invención se refiere a proteínas quiméricas o de fusión que comprenden los péptidos de dedo de zinc de la invención conjugados con un dominio de dedo no de zinc.

También se describe una biblioteca de péptidos de dedo de zinc no alterados. La biblioteca de péptidos no alterados comprende una pluralidad de péptidos de dedo de zinc de acuerdo con la invención, en los que al menos un dominio de dedo de zinc está diversificado en una o más de las posiciones $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5}$ y X^{+6} . Se prevé el uso de una biblioteca de péptidos de dedo de zinc no alterados en la selección de un péptido de dedo de zinc capaz de unirse a una secuencia de ácido nucleico diana deseada y péptidos de dedo de zinc identificados a partir de las bibliotecas.

En otro aspecto, la invención proporciona usos terapéuticos y no terapéuticos (por ejemplo, de diagnóstico) para los péptidos de dedo de zinc y las proteínas de fusión de la invención. Aspectos y realizaciones de la invención por lo tanto incluyen formulaciones, medicamentos y composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos de dedo de zinc. En una realización, la invención se refiere a un péptido de dedo de zinc para uso en medicina. Más específicamente, los péptidos de dedo de zinc y los agentes terapéuticos de la invención se pueden usar para modular la expresión de un gen diana en una célula. Los péptidos de dedo de zinc de la invención pueden usarse en el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones del cuerpo humano o animal, tales como enfermedades neurológicas, por ejemplo, enfermedad de Huntington; y otras enfermedades causadas o diagnosticadas por la expansión génica de secuencias

repetidas de nucleótidos, particularmente secuencias de repetición de trinucleótidos. En una realización, la invención se refiere al tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas con el gen de repetición de CAG mutado y/o la expresión de productos génicos que contienen tramos de poliglutamina (poliQ). El tratamiento también puede incluir tratamientos preventivos, así como terapéuticos y el alivio de una enfermedad o condición.

La invención comprende además ácidos nucleicos que codifican los péptidos de dedo de zinc y las proteínas de fusión de la invención, por ejemplo: vectores de expresión y vectores virales, tales como AAV (por ejemplo, para uso en terapia génica). También está comprendida una célula que comprende los ácidos nucleicos y/o polipéptidos de la invención.

También se describe un método para elaborar una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de dedo de poli-zinc que comprende al menos 8 dominios de dedo de zinc de Fórmula 1: $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{9-14} H X_{3-6} H/C$, donde X es cualquier aminoácido y los números en subíndice indican el número posible de residuos representados por X en esa posición. El método comprende: (a) proporcionar moléculas de ácido nucleico que codifican un par de dominios de dedo de zinc de Fórmula 1, en donde los dominios de dedo de zinc adyacentes de cada par están separados por una secuencia enlazadora de 5 aminoácidos; (b) unir moléculas de ácido nucleico de la etapa (a) para crear moléculas de ácido nucleico que codifican una matriz de 4 o 6 dominios de dedo de zinc, en la que los pares adyacentes de dominios de dedo de zinc de la etapa (a) están separados por una secuencia de unión de 6 o 7 aminoácidos; y (c) unir moléculas de ácido nucleico de la etapa (b) para crear una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de dedo de poli-zinc, en el que las matrices adyacentes de dominios de dedo de zinc de la etapa (b) están separadas por una secuencia enlazadora de al menos 8 aminoácidos. Opcionalmente, el método puede comprender además la adición de un único dominio de dedo de zinc para crear un péptido de dedo de poli-zinc que tiene un número impar de dominios de dedo de zinc. Por ejemplo: el método puede comprender además la etapa (d) que se une al extremo terminal N o C del péptido de dedo de poli-zinc de la etapa (c), un único dominio de dedo de zinc unido al extremo terminal N o C por un extremo enlazador de 5 a 7 aminoácidos para crear un péptido de dedo de poli-zinc que tiene un número impar de dominios de dedo de zinc. Las etapas del método pueden realizarse en cualquier orden apropiado. Se apreciará que hay muchos métodos diferentes por los que se puede obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho péptido de tal dedo de poli-zinc. Por lo tanto, la invención está dirigida también a ácidos nucleicos que codifican tales péptidos de dedo de poli-zinc, sin embargo, se los obtiene, y con péptidos de dedo de poli-zinc que se pueden obtener expresando las secuencias de ácido nucleico anteriores.

También se describe un método para preparar un péptido de dedo de poli-zinc que comprende al menos 8 dominios de dedo de zinc de Fórmula 1: $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{9-14} H X_{3-6} H/C$, en la que X es cualquier aminoácido y los números en subíndice indican el posible número de residuos representados por X en esa posición, comprendiendo el método la expresión de una secuencia de ácido nucleico obtenible por el método anterior.

También se describe un método para elaborar un péptido de dedo de poli-zinc que comprende al menos 8 dominios de dedo de zinc de Fórmula 1: $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{9-14} H X_{3-6} H/C$, en la que X es cualquier aminoácido y los números en subíndice indican el número posible de residuos representados por X en esa posición, comprendiendo el método: (a) crear al menos 4 pares de dominios de dedo de zinc de Fórmula 1, estando separados los dominios de dedo de zinc adyacentes de cada par por una secuencia enlazadora de 5 aminoácidos; (b) crear al menos 2 matrices de 4 o 6 dominios de dedo de zinc cada uno uniendo entre sí 2 o 3 pares de dedos de zinc de la etapa (a) usando una secuencia enlazadora de 6 o 7 aminoácidos; y (c) unir entre sí al menos 2 matrices de dominios de dedo de zinc de la etapa (b) usando una secuencia enlazadora de al menos 8 aminoácidos. Convenientemente, el método es para preparar un péptido de dedo de poli-zinc de acuerdo con la invención.

En los métodos descritos aquí cada dominio de dedo de zinc puede comprender una secuencia de reconocimiento $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$, que es idéntica a QRATLQR (SEQ ID NO: 1) en 4, 5, 6 o 7 posiciones.

Se apreciará que los péptidos de dedo de zinc de la invención pueden formar derivados o conjugarse adicionalmente con moléculas adicionales y que tales derivados y conjugados pueden caer dentro del alcance de la invención.

También debe apreciarse que, a menos que se indique lo contrario, características opcionales de uno o más aspectos de la invención pueden incorporarse en cualquier otro aspecto de la invención.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece esta invención.

Breve descripción de los dibujos

La invención se ilustra adicionalmente mediante los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1. Las matrices de dedos de zinc de acuerdo con la invención se unen a repeticiones de CAG. (A) Una ilustración esquemática de una matriz de 12 dedos, que muestra hélices de reconocimiento que ponen en contacto las bases 5'-GCT-3' en la cadena de ADN inferior. Se construyeron matrices similares de 4, 6, 12 o 18 dedos de zinc (ZF4xHunt, ZF6xHunt, ZF12xHunt y ZF18xHunt). Se añadieron señales de localización nuclear (NLS) y efectores (por ejemplo, dominio de represión de transcripción de Kox-1) a extremos terminales N y C, respectivamente. (B) Los ensayos de

desplazamiento en gel muestran matrices de 4, 6 o 12 dedos que unen ADNbc de poli-CAG y forman complejos distintos; control negativo, mezcla de transcripción-traducción (TNT). (C) Columna de la mano izquierda - una ilustración esquemática de un diseño híbrido de dedo de zinc de acuerdo con una realización de la invención, que reconoce la secuencia de ácido nucleico 5'-GC (A/T)-3', que permite la unión ya sea de las cadenas complementarias (GCA)_n o (GCT)_n de la secuencia de ADNbc de repetición de CAG. Columna de la mano derecha - un ensayo de desplazamiento en gel que demuestra que el dedo híbrido de zinc se une igualmente a tripletes de GCA o GCT en secuencias mixtas. (D) Ensayo de desplazamiento en gel de especificidad que ilustra que un péptido de dedo de zinc de acuerdo con una realización de la invención (ZF6xHunt), se une preferencialmente a las repeticiones de CAG cuando se compara con secuencias mutantes (D = A, G, T; S = C, G; H = A, C, T).

Figura 2. Represión del informador de poli-CAG episomal por péptidos de dedo de zinc de la invención. Los resultados se ilustran para los ZFP sin dominios efectores (paneles B a D), o se fusionan al dominio represor Kox-1 (paneles E a G). (A) El plásmido informador pEH contiene EGFP, fusionado a secuencias de codificación de poli-Q de longitud diferente, bajo un promotor de SV40. Un gen HcRed de control, bajo un promotor de CMV, mide la represión fuera del blanco o de largo alcance; clave: constructos de expresión de ZFP que contienen 0, 4, 6, 11 o 18 dedos. (B) Ensayo FACS que mide las veces que hay reducción en células fluorescentes EGFP y HcRED, en respuesta a la exposición a diferentes dedos de zinc. Una represión de 10 veces es equivalente a una reducción del 90% en la fluorescencia de la proteína. (C) Ilustra una transferencia Western de EGFP para la represión de ZFP de dianas pEH-Qx. (D) Muestra los resultados de un ensayo de qRT-PCR para medir las veces que se produce represión del ARNm de EGFP o HcRED por ZFP. (E a G) Los mismos tres ensayos (FACS, Western, qRT-PCR) se repitieron para los ZFP fusionados a Kox-1. En los paneles E a G, las escalas verticales son más grandes, lo que refleja la represión más fuerte causada por el dominio Kox-1 (represión > 100 veces, > 99% de reducción en la fluorescencia de la proteína) y represión de largo alcance del gen HcRed por Kox-1.

Figura 3. Represión del informador episomal por ZFxHunt-FokI. Las células se cotransfectaron con los plásmidos de expresión informador y ZFP-FokI: el plásmido informador pEH contiene EGFP, fusionado a secuencias codificantes de poli-Q de longitud diferente, bajo un promotor de SV40. Un gen HcRed de control, bajo un promotor de CMV, mide la represión de fuera del blanco o de largo alcance. Los constructos de expresión de ZF-FokI (promotor de CMV) contienen cadenas de ZFxHunt (0, 4, 6 o 12 dedos, como se indica). El vector pTarget no contiene ZFP y se utiliza como control. (A) El ensayo FACS que mide las veces que se reduce en células fluorescentes EGFP o HcRED, en respuesta a diferentes dedos de zinc. Una represión de 2,5 veces equivale a una reducción del 60%. (B) ensayo qRT-PCR para medir las veces que hay represión del ARNm de EGFP o HcRED por ZFP. (C) Transferencia Western de EGFP para la represión de ZFP de pEH-Qx objetivos. La tinción con β-actina se usa como un control de carga.

Figura 4. Represión del informador episomal por los ZFP de la invención. Las células se cotransfectaron con plásmidos informadores y dedo de zinc: el plásmido informador pEH contiene EGFP, fusionado a secuencias de codificación de poli-Q de longitud diferente, bajo un promotor de SV40. Un gen HcRed de control, bajo un promotor de CMV, mide la represión de fuera del blanco o de largo alcance. Los constructos de expresión pPGK-ZF (promotor de PGK) contienen cadenas de ZFxHunt (0, 4, 6, 12 o 18 dedos, como se indica). Los ZFP no están fusionados con ningún dominio efector. El vector pTarget no contiene un ZFP y se utiliza como un control. (A) Ensayo FACS que mide las veces que se reduce en células fluorescentes EGFP o HcRED, en respuesta a diferentes dedos de zinc. Una represión de 5 veces equivale a una reducción del 80%. (B) Ensayo qRT-PCR para medir las veces que hay represión del ARNm de EGFP o HcRED por ZFP. (C) transferencia Western de EGFP para la represión de ZFP de pEH-Qx objetivos. La tinción con β-actina se usa como un control de carga.

Figura 5. Ensayo de competición de ZFP contra pares de secuencias de repetición de CAG de longitud diferente. Cada cuadrado pequeño representa un experimento de transfección, donde las células reciben simultáneamente dos plásmidos informadores: poli-Q-EGFP y poli-Q-mCherry de repeticiones de CAG de longitud diferente (Q0 = sin repeticiones, Q10 = 10 repeticiones, Q22 = 22 repeticiones; Q35 = 35 repeticiones, Q63 = 63 repeticiones, y Q104 = 104 repeticiones). Los péptidos de dedo de zinc de la invención con 4, 6, 11 o 18 dedos fueron ensayados en cuanto a su capacidad para reducir el número de células verdes y rojas detectables en ensayos FACS (%). Fila superior: cajas de color gris claro representan altos niveles de expresión de la proteína GFP, las cajas de color gris oscuro representan bajos niveles de expresión de la proteína GFP; fila intermedia: cajas de color gris claro representan altos niveles de expresión de proteína mCherry, cajas de color gris oscuro representan bajos niveles de expresión de proteína mCherry; fila inferior: cajas de color gris claro representan niveles más altos de expresión de la proteína GFP en comparación con mCherry, cajas de color gris oscuro representan mayores niveles de expresión de la proteína mCherry en comparación con GFP. Se obtuvieron resultados similares usando los ZFP fusionados al dominio de nucleasa FokI (no mostrado).

Figura 6. Expresión de genes cromosómicos de repetición de CAG, 20 días después de la administración de ZFP retroviral. Los ensayos se llevaron a cabo en células *STHdh* de ratón de tipo silvestre (wt) con 7 repeticiones de CAG asociadas con cada copia del gen *Hdh* (Q7/Q7); en ratones mutantes *STHdh* poli-Q con 111 repeticiones de CAG asociadas con cada copia del gen *Hdh* (Q111/Q111); y en HEK293T humanas, como se indica. (A) Que ilustra la represión de *htt* endógeno por péptidos de 6 y 11 dedos de la invención (ZF6xHunt y ZF11xHunt, respectivamente), con o sin el dominio represor Kox-1. Las transferencias Western para Htt (fila superior) se controlaron con tinción con β-actina y se cuantificaron usando ImageJ (veces que se reprime la proteína, fila del medio). Se utilizó qRT-PCR para comparar los niveles de ARNm de htt (veces que se reprime el ARN, fila inferior). (B) Muestra que los niveles de ARNm

de otros genes de repetición de CAG wt no se ven afectados en general. Los niveles de expresión de siete genes wt asociados con las repeticiones de CAG se ensayaron mediante qRT-PCR (atrofina 1: ATN1, ataxina 1, 2, 3 y 7: ATXN1, ATXN2, ATXN3 y ATXN7; subunidad alfa 1A del canal de calcio: CACNA1A; y proteína de unión TATA: TBP). Los números de repetición de CAG se ilustran en la Tabla 3. Dos vecinos genómicos de *htt* (receptor quinasa 4 acoplado a la proteína G: GRK4; y señalización de proteína G 12: Rgs12) tampoco fueron afectados en células *STHdh*. (C) Los niveles de ARNm de los siete genes CAG wt y HTT wt (huntingtina, 21 repeticiones de CAG) tampoco fueron afectados en general en células HEK293T (N.B. CACNA1A no se expresa en células HEK293T).

Figura 7. Ensayo de toxicidad de ZFP. Se transfectaron células HEK-293T con los constructos de vectores indicados. Como control, se usaron células no transfectadas o sólo con Lipofectamina 2000 (negativas). La citotoxicidad se analizó usando el ensayo de toxicidad de las células de guayaba (PCA) y las barras muestran el porcentaje de células muertas medio-apoptóticas y viables. Los resultados son un promedio de al menos 3 experimentos independientes.

Figura 8. Ilustra datos de qRT-PCR que cuantifican los niveles de ARNm en muestras de estriado de ratón inyectadas con ZF11xHunt-Kox-1. (A) La medición de los niveles de Kox-1 revela la expresión máxima de los dedos de zinc a las 6 semanas con una disminución constante a partir de entonces. (B) La represión de la huntingtina mutante (*htt mut*) fue reprimida principalmente en la semana 6 y ya no se reprime significativamente en la semana 10. (C) El tratamiento con dedos de zinc no tiene efecto significativo sobre los niveles de huntingtina de tipo silvestre (*htt wt*).

Figura 9. Ensayos de comportamiento sobre el rendimiento y estado general de R6/2 y ratones macho wt tratados ya sea con ZFP o con GFP. (A) Gráfico en el que se muestran los resultados de la prueba de comportamiento de enganche. El tratamiento con ZFP dio como resultado un retraso en el inicio del comportamiento de enganche cuando se comparó con los ratones control R6/2 tratados con GFP y no operados. (B) Gráfico que muestra los resultados de la prueba de campo abierta. El aumento del tiempo pasado en el centro del campo abierto también se retrasó por el tratamiento con ZFP en la semana 7. Se observó una diferencia significativa en ratones R6/2-GFP en la semana 7 con relación a todos los otros grupos, pero el efecto había desaparecido en gran medida en la semana 9. (C) Gráfico que muestra los resultados de la prueba de rotación en barra. La disminución en el rendimiento de rotación en barra de los niveles prequirúrgicos fue atenuada por ZFP. Un ANOVA con mediciones repetidas reveló que el grupo R6/2-GFP difiere de WT-GFP, mientras que R6/2-ZFP no difiere de su control WT-ZFP. (D) Gráfico que muestra la ganancia de peso corporal durante el transcurso del experimento. El aumento de peso corporal fue similar en ratones tratados tanto con ZFP como con GFP, y comenzó a disminuir después de la semana 7 de edad, sin efecto del tratamiento. (E) Gráfico de barras que muestra el tiempo de supervivencia. La supervivencia no fue significativamente diferente entre los grupos de ratones R6/2. Todos los datos se presentan como la media \pm S.E.M. **, $p < 0,01$. ***, $p < 0,001$.

Figura 10. Represión de constructos de poli-CAG por ZF10xHunt (SEQ ID NO: 108) que contiene diferentes secuencias conservadoras en la hélice de reconocimiento de ácido nucleico. Se utilizó un ensayo episomal que incluía transfección transitoria seguida de FACS para células fluorescentes. Los constructos informadores de poli-CAG-GFP codifican para 0 (pEH), 10 (Q10), 35 (Q35) y 104 (Q104) repeticiones de CAG, respectivamente. (a) Los dedos de zinc ZF10xHunt-Kox-1 reprimen el gen informador de GFP fusionado. Para comparación, el control pTarget no contiene dedos de zinc. (b) Las fusiones de Kox-1-ZFP también reprimen ligeramente un gen HcRed de control en el mismo plásmido.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos y bioquímica).

A menos que se indique lo contrario, la práctica de la presente invención emplea técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante, métodos químicos, formulaciones farmacéuticas y suministro y tratamiento de pacientes, que están dentro de las capacidades de una persona experta en la técnica. Tales técnicas también se explican en la literatura, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos, *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulos 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridisation: Principles and Practice*, Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Parte A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press. Cada uno de estos textos generales se incorporan aquí como referencia.

Con el fin de ayudar con la comprensión de la invención, se definen aquí varios términos.

El término "aminoácido" en el contexto de la presente invención se usa en su sentido más amplio y se pretende que incluya L α -aminoácidos o residuos naturales. Se usan aquí las abreviaturas comúnmente usadas de una y tres letras para aminoácidos de origen natural: A = Ala; C = Cys; D = Asp; E = Glu; F = Phe; G = Gly; H = His; I = Ile; K = Lys; L = Leu; M = Met; N = Asn; P = Pro; Q = Gln; R = Arg; S = Ser; T = Thr; V = Val; W = Trp; y Y = Tyr (Lehninger, A.L., (1975) *Biochemistry*, 2a ed., páginas 71-92, Worth Publishers, New York). El término general "aminoácido" incluye además

aminoácidos D, aminoácidos retro-inversos así como aminoácidos modificados químicamente tales como análogos de aminoácidos, aminoácidos naturales que normalmente no se incorporan en proteínas tales como norleucina y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica como características de un aminoácido, tales como β -aminoácidos. Por ejemplo, se incluyen en la definición de aminoácidos análogos o miméticos de fenilalanina o prolina, que permiten la misma restricción conformacional de los compuestos peptídicos que Phe o Pro naturales. Tales análogos y miméticos se denominan en la presente memoria como "equivalentes funcionales" del aminoácido respectivo. Otros ejemplos de aminoácidos son enumerados por Roberts y Vellaccio, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Gross y Meiehofer, eds., Vol. 5, página 341, Academic Press, Inc., N.Y. 1983, que se incorpora aquí como referencia.

El término "péptido" tal como se utiliza en la presente memoria (por ejemplo, en el contexto de un péptido de dedo de zinc (ZFP) o estructura) se refiere a una pluralidad de aminoácidos unidos entre sí en una cadena lineal o circular. El término oligopéptido se usa típicamente para describir péptidos que tienen entre 2 y aproximadamente 50 o más aminoácidos. Los péptidos mayores de aproximadamente 50 aminoácidos se denominan a menudo polipéptidos o proteínas. Sin embargo, para los propósitos de la presente invención, el término "péptido" no está limitado a ningún número particular de aminoácidos, y se usa indistintamente con los términos "polipéptido" y "proteína".

Tal como se usa en la presente memoria, el término "dominio de dedo de zinc" se refiere a un "dedo" individual, que comprende un pliegue $\beta\beta\alpha$ estabilizado por un ión zinc (como se describe en otra parte en la presente memoria). Cada dominio de dedo de zinc incluye típicamente aproximadamente 30 aminoácidos. El término "dominio" (o "módulo"), de acuerdo con su uso ordinario en la técnica, se refiere a una parte continua discreta de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que se puede equiparar con una función particular. Los dominios de los dedos de zinc son en gran parte estructuralmente independientes y pueden conservar su estructura y función en diferentes entornos. Típicamente, un dominio de dedo de zinc se une a una secuencia de nucleótidos en triplete o cuadruplete (que se superpone). Los dominios de dedo de zinc adyacentes dispuestos en tándem se unen entre sí mediante secuencias enlazadoras. Un péptido de dedo de zinc de la invención está compuesto por una pluralidad de "dominios de dedo de zinc", que en combinación no existen en la naturaleza. Por lo tanto, pueden considerarse como péptidos de dedo de zinc artificiales o sintéticos.

Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan de forma intercambiable y se refieren a un polímero de desoxirribonucleótidos (ADN) o ribonucleótidos (ARN), en conformación lineal o circular, y en forma monocatenaria o bicatenaria. Para los propósitos de la presente invención, tales polímeros de ADN o ARN pueden incluir nucleótidos naturales, nucleótidos no naturales o sintéticos, y mezclas de los mismos. Los nucleótidos no naturales pueden incluir análogos de nucleótidos naturales, así como nucleótidos que están modificados en las fracciones de bases, azúcares y/o fosfatos (por ejemplo, estructuras principales de fosforotioato). Ejemplos de ácidos nucleicos modificados son PNA y ácidos nucleicos morfolino. Generalmente, un análogo de G se unirá mediante un par de bases con C. Para los propósitos de la invención, estos términos no deben considerarse limitantes con respecto a la longitud de un polímero.

Un "gen", tal como se utiliza aquí, es el segmento de ácido nucleico (típicamente ADN) que está implicado en la producción de un producto génico polipeptídico o de ácido ribonucleico. Incluye regiones que preceden y siguen a la región de codificación (guía y remolque), así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos de codificación individuales (exones). Convenientemente, este término incluye también las secuencias de control necesarias para la expresión génica (por ejemplo, potenciadores, silenciadores, promotores, terminadores, etc.), que pueden ser adyacentes o distantes a la secuencia codificante relevante, así como las regiones codificantes y/o transcritas que codifican el producto génico.

Tal como se utiliza aquí, el término "modulación", en relación con la expresión de un gen se refiere a un cambio en la actividad del gen. La modulación incluye tanto la activación (es decir, aumento de la actividad o nivel de expresión) como la represión o inhibición de la actividad génica. En realizaciones preferidas de la invención, las moléculas terapéuticas (por ejemplo, péptidos) de la invención son represores de la expresión o actividad génica.

Un ácido nucleico "diana", "sitio diana" o "secuencia diana", tal como se usa aquí, es una secuencia de ácido nucleico a la que se unirá un péptido de dedo de zinc de la invención, siempre que las condiciones de la reacción de unión no sean prohibitivas. Un sitio diana puede ser una molécula de ácido nucleico o una porción de un polinucleótido más grande. Los sitios diana particularmente adecuados comprenden secuencias de ácido nucleico repetitivas; especialmente secuencias de repetición de trinucleótidos. Las secuencias diana preferidas de acuerdo con la invención incluyen aquellas definidas por secuencias de repetición de CAG (por ejemplo, CAGCAG ..., AGCAGC ... y GCAGCA ...), y sus secuencias complementarias, repeticiones de CTG (por ejemplo, CTGCTG ...; TGCTGC ... y GCTGCT ...). De acuerdo con la invención, una secuencia diana para un péptido de dedo de poli-zinc de la invención puede comprender una única secuencia de ácido nucleico contigua, o más de una secuencia de ácido nucleico no contigua (por ejemplo, dos secuencias contiguas separadas, representando cada una, un sitio diana parcial), que están intercaladas por uno o más nucleótidos o secuencia de nucleótidos intervinientes. Estos términos también pueden sustituirse o complementarse con los términos "sitio de unión", "secuencia de unión", "sitio de reconocimiento" o secuencia de reconocimiento, que se usan indistintamente.

Tal como se usa en la presente memoria, "unión" se refiere a una interacción no covalente entre macromoléculas (por ejemplo, entre un péptido de dedo de zinc y un sitio diana de ácido nucleico). En algunos casos, la unión será específica de la secuencia, tal como entre uno o más nucleótidos específicos (o pares de bases) y uno o más aminoácidos específicos. Se apreciará, sin embargo, que no todos los componentes de una interacción de unión deben ser específicos de la secuencia (por ejemplo, interacciones no covalentes con residuos de fosfato en una cadena principal de ADN). Las interacciones de unión entre una secuencia de ácido nucleico y un péptido de dedo de zinc de la invención pueden caracterizarse por afinidad de unión y/o constante de disociación (Kd). Una constante de disociación adecuada para un péptido de dedo de zinc de la invención que se une a su sitio diana puede ser del orden de 1 μ M o inferior, 1 nM o inferior, o 1 pM o inferior. La "afinidad" se refiere a la fuerza de unión, de tal manera que el aumento de la afinidad de unión se correlaciona con un valor de Kd más bajo. Los péptidos de dedo de zinc de la invención pueden tener actividad de unión al ADN, actividad de unión al ARN y/o incluso actividad de unión a proteínas. Preferiblemente, los péptidos de dedo de zinc de la invención se diseñan o seleccionan para tener actividad de unión al ADNbc específico de la secuencia. Preferiblemente, el sitio diana para un péptido de dedo de zinc particular es una secuencia a la que el dedo de zinc de interés es capaz de unirse en forma específica con el nucleótido. Sin embargo, se apreciará que dependiendo de la secuencia de aminoácidos de un péptido de dedo de zinc puede unirse o reconocer más de una secuencia diana, aunque típicamente una secuencia se unirá preferiblemente a cualquier otra secuencia reconocida, dependiendo de la especificidad relativa de las interacciones no covalentes individuales. Generalmente, la unión específica se logra preferiblemente con una constante de disociación (Kd) de 1 nM o inferior, 100 pM o inferior; o 10 pM o inferior. Preferiblemente, un péptido de dedo de zinc de la invención se une a una secuencia diana específica con una constante de disociación de 1 pM o inferior; tal como 0,1 pM o inferior, o incluso 10 fM o inferior.

Por "no diana" se entiende que la secuencia de ácido nucleico en cuestión no está ligada apreciablemente por el péptido de dedo de zinc relevante. En algunas realizaciones puede considerarse que, cuando un péptido de dedo de zinc de la invención tiene una secuencia diana conocida específica de secuencia, se puede considerar que todas las demás secuencias de ácido nucleico no son diana. Desde una perspectiva práctica, puede ser conveniente definir una interacción entre una secuencia no diana y un péptido de dedo de zinc particular como subfisiológica (es decir, no capaz de crear una respuesta fisiológica bajo concentraciones de secuencia diana fisiológica/dedo de zinc). Por ejemplo, si se puede medir cualquier unión entre el péptido de dedo de zinc y la secuencia no diana, la constante de disociación (Kd) es típicamente más débil que 1 μ M, tal como 10 μ M o más débil, 100 μ M o más débil, o al menos 1 mM.

El término "biblioteca" se usa de acuerdo con su uso común en la técnica, para denotar una colección de diferentes polipéptidos o una colección de ácidos nucleicos que codifican diferentes polipéptidos. Los marcos de péptidos de dedo de zinc de la invención son útiles para crear bibliotecas de péptidos de dedo de zinc que tienen tramos extendidos de dominios adyacentes de dedo de zinc, que comprenden o codifican un repertorio de polipéptidos de diferentes secuencias, cada una de las cuales puede tener una secuencia de unión preferida diferente. Las bibliotecas de estructuras de dedos de zinc preferidas comprenden al menos 8 dedos de zinc adyacentes, y más preferiblemente al menos 11 o 12 dedos de zinc adyacentes. En algunas ejemplificaciones, una biblioteca de estructuras de dedos de zinc comprende 18 dominios de dedos de zinc adyacentes. Como se usa en el presente documento, una biblioteca "no alterada" se refiere a una colección de diferentes péptidos de dedo de zinc o ácidos nucleicos de codificación correspondientes que no han sido predeterminados o seleccionados para tener un sitio de unión diana particular preferido.

Péptidos de dedo de zinc

La presente invención se refiere a dedos de zinc que no ocurren naturalmente para unirse a cualquier secuencia de ácido nucleico deseada, y su uso como moléculas terapéuticas; por ejemplo, en el tratamiento de HD. La invención proporciona además el uso de módulos de dedo de zinc en péptidos de dedo de poli-zinc para unir secuencias de ácido nucleico repetitivas, tales como repeticiones de trinucleótidos, y particularmente repeticiones de CAG expandidas en secuencias de ADN genómico. Preferiblemente, los péptidos de dedo de poli-zinc de la invención unen repeticiones de CAG expandidas asociadas con secuencias de genes mutadas preferiblemente y/o selectivamente sobre las secuencias de repetición de CAG más cortas de genes normales.

Un dedo de zinc es un dominio de polipéptido relativamente pequeño que comprende aproximadamente 30 aminoácidos, que se pliega para formar una hélice α adyacente a una lámina β antiparalela (conocida como un pliegue $\beta\beta\alpha$). El pliegue se estabiliza mediante la coordinación de un ion de zinc entre cuatro residuos de Cys y/o His en gran parte invariantes (dependiendo del tipo de estructura de dedo de zinc), como se describe más adelante. Los dominios naturales de dedos de zinc han sido bien estudiados y descritos en la literatura, véase, por ejemplo, Miller et al., (1985) EMBO J. 4: 1609-1614; Berg (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 99-102; Y Lee et al., (1989) Science 245: 635-637. Un dominio de dedo de zinc reconoce y se une a un triplete de ácido nucleico, o un cuadruplete solapante (como se explica más adelante), en una secuencia diana de ADN bicatenario. Sin embargo, también se sabe que los dedos de zinc se unen al ARN y a las proteínas (Clemens, KR et al., (1993) Science 260: 530-533, Bogenhagen, DF (1993) Mol. Cell. Biol. 13: 5149-5158; Searles, MA et al. (2000) J. Mol. Biol. 301: 47-60, Mackay, JP y Crossley, M. (1998) Trends Biochem. Sci. 23: 1-4).

Las proteínas de dedo de zinc contienen generalmente hebras o cadenas de dominios (o módulos) de dedo de zinc. De este modo, una proteína de dedo de zinc natural puede incluir 2 o más dominios de dedo de zinc, que pueden estar

directamente adyacentes entre sí (es decir, separados por una secuencia enlazadora corta (canónica)), o pueden ser separados por secuencias de polipéptidos más largas, flexibles o estructuradas. Se espera que los dominios de dedo de zinc directamente adyacentes se unan a secuencias de ácido nucleico contiguas, es decir a trinucleótidos/tripletes adyacentes. En algunos casos, la unión cruzada también puede ocurrir entre los dedos de zinc adyacentes y sus respectivas tripletes diana, lo que ayuda a fortalecer o mejorar el reconocimiento de la secuencia diana y conduce a la unión de secuencias de cuadrupletes que se superponen (Isalan et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 5617-5621). En comparación, los dominios de dedos de zinc distantes dentro de la misma proteína pueden reconocer (o unirse a) secuencias de ácido nucleico no contiguas o incluso a diferentes moléculas (por ejemplo, proteína en lugar de ácido nucleico).

La mayoría de las cadenas laterales de aminoácidos en un dominio de dedo de zinc que son importantes para el reconocimiento de bases de ADNbc se localizan en la hélice α del dedo. Convenientemente, por lo tanto, las posiciones de aminoácidos en un dominio de dedo de zinc están numeradas a partir del primer residuo en la hélice α , que recibe el número (+) 1; y la hélice se considera generalmente que termina en el residuo de Cys o His que se coordina con zinc, que es típicamente la posición +11. Por lo tanto, "-1" se refiere al residuo en la estructura marco inmediatamente anterior al primer residuo de la hélice α . Como se usan aquí, los residuos denominados "++" están situados en el dominio de dedo de zinc inmediatamente adyacente (extremo terminal C). Generalmente, el reconocimiento de ácido nucleico por un módulo de dedo de zinc se logra principalmente por las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones -1, +3, +6 y ++2; aunque otras posiciones de aminoácidos pueden a veces contribuir a la unión entre el dedo de zinc y la molécula diana. Por lo tanto, es conveniente definir la secuencia de un dominio de dedo de zinc de -1 a (+) 6 (es decir, los residuos -1, 1, 2, 3, 4, 5 y 6) como una "secuencia de reconocimiento" de dedo de zinc. El primer residuo de histidina invariante que coordina el ión de zinc está en la posición (+) 7 del dominio del dedo de zinc.

Cuando se une a una secuencia de ácido nucleico, un dominio de dedo de zinc interactúa generalmente principalmente con una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenario (la cadena primaria o secuencia). Sin embargo, puede haber interacciones subsidiarias entre aminoácidos de un dominio de dedo de zinc y la cadena complementaria (o secundaria) de la molécula de ácido nucleico bicatenario. La hélice α del dominio de dedo de zinc casi invariablemente se encuentra dentro de la ranura principal del ADNbc y se alinea en forma antiparalela a la cadena de ácido nucleico diana. Por consiguiente, la secuencia primaria de ácido nucleico está dispuesta de 3' a 5' para corresponder con la secuencia desde el extremo terminal N al extremo terminal C del péptido de dedo de zinc. Dado que las secuencias de ácido nucleico se escriben convencionalmente de 5' a 3' y las secuencias de aminoácidos del extremo terminal N al extremo terminal C, cuando una secuencia de ácido nucleico diana y un péptido de dedo de zinc están alineados de acuerdo con la convención, la interacción primaria del péptido de dedo de zinc es con la cadena complementaria (o menos) de la secuencia de ácido nucleico, ya que es esta cadena la que está alineada 3' a 5'. Estas convenciones se siguen en la nomenclatura utilizada en este documento.

Los péptidos de dedo de zinc de acuerdo con la invención no son naturales y contienen adecuadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 (por ejemplo, hasta aproximadamente 30 o 32) dominios de dedo de zinc, dispuestos en forma adyacente entre sí en tándem. Dichos péptidos se pueden denominar como "péptidos de dedo de poli-zinc". Los péptidos de dedo de zinc particularmente beneficiosos de la invención incluyen al menos 8 dominios de dedo de zinc, al menos 11 o al menos 12 dominios de dedo de zinc; y en algunos casos al menos 18 dominios de dedo de zinc. Los péptidos de dedo de zinc de la invención pueden unirse a sitios de unión de ácidos nucleicos contiguos o no contiguos. Cuando se dirigen a sitios de unión no contiguos, cada subsitio (o semisitio donde hay dos secuencias no contiguas) tiene adecuadamente aproximadamente 18 bases de longitud, pero puede alternativamente tener aproximadamente 12 o 24 bases de longitud.

En péptidos de dedo de (poli) zinc de la presente invención, los dominios de dedo de zinc adyacentes están unidos entre sí por "secuencias enlazadoras" que pueden ser canónicas, tipo canónico, flexibles o estructuradas, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/53480 (Moore et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1437-1441). Generalmente, una secuencia natural enlazadora de dedos de zinc carece de estructura secundaria en la forma libre del péptido. Sin embargo, cuando la proteína está unida a su sitio diana, un enlazador canónico está típicamente en una conformación lineal extendida, y las cadenas laterales de aminoácidos dentro del enlazador pueden formar interacciones locales con el ADN. En una disposición en tándem de dominios de dedo de zinc, la secuencia enlazadora es la secuencia de aminoácidos que se encuentra entre el último residuo de la hélice α en un dedo de zinc del extremo terminal N y el primer residuo de la lámina β en el siguiente dedo de zinc (es decir, adyacente al extremo terminal C). Para los fines de la presente invención, se considera que el último aminoácido de la hélice α en un dedo de zinc es el residuo de histidina (o cisteína) de coordinación de zinc, mientras que el primer aminoácido del dedo siguiente es generalmente una tirosina, fenilalanina u otro residuo hidrófobo.

60 Estructuras y bibliotecas de péptidos de dedo de zinc

Los péptidos de dedo de zinc han probado ser estructuras extremadamente versátiles para la ingeniería de nuevos dominios de unión al ADN (por ejemplo, Rebar y Pabo (1994) Science 263: 671-673; Jamieson et al., (1994) Biochemistry 33: 5689-5695; Choo y Klug (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11163-11167, Choo et al., (1994) Nature 372: 642-645; Isalan y Choo (2000) J. Mol. Biol. 295: 471-477, y muchos otros).

Para funcionalidad biológica específica y uso terapéutico, particularmente *in vivo* (por ejemplo, en terapia génica y animales transgénicos), es deseable que un péptido de dedo de poli-zinc de la invención sea capaz de dirigirse a sitios únicos o virtualmente únicos dentro de cualquier genoma. Para genomas complejos, como en seres humanos, se considera generalmente que se requiere una dirección de al menos 16 pb para especificar una secuencia de ADN potencialmente única. Las secuencias de ADN más cortas tienen una probabilidad significativa de aparecer varias veces en un genoma, lo que aumenta la posibilidad de obtener efectos biológicos y de direccionamiento génico no específicos indeseables. Puesto que los dedos de zinc individuales se unen generalmente a 3 nucleótidos consecutivos, 6 dominios de dedo de zinc con un sitio de unión de 18 pb podrían ser, en teoría, usados para el reconocimiento específico de una secuencia diana única dentro de cualquier genoma. Por consiguiente, se ha llevado a cabo una gran cantidad de investigación sobre los denominados "factores de transcripción de diseñador" para regulación génica dirigida, que típicamente implican 4 o 6 dominios de dedo de zinc que pueden disponerse en tándem o en grupos dimerizables (por ejemplo, de 3 unidades por dedo). Sin embargo, no se ha demostrado previamente que se puedan sintetizar y expresar disposiciones en tándem de más de 6 dominios de dedo de zinc, tales como 8, 9, 10, 11, 12 o más dedos de zinc (por ejemplo 15, 16 o 18). Además, nunca se ha demostrado previamente que tales disposiciones largas de dominios de dedos de zinc no naturales puedan tener actividad de unión a ácidos nucleicos *in vitro* o *in vivo* (específica). Ciertamente, no se ha informado anteriormente que tales conjuntos extendidos de péptidos de dedo de zinc puedan dirigirse a secuencias de ADN genómico e incluso tener actividad de modulación genética *in vitro* y/o *in vivo*.

Tal como se describe en la presente memoria, se han creado nuevas estructuras extendidas de péptidos de dedo de zinc que comprenden al menos 4, al menos 6, al menos 10, al menos 11, al menos 12 o al menos 18 dominios de dedo de zinc. Por lo tanto, las estructuras preferidas de péptidos de dedo de zinc de la invención comprenden 10, 11, 12 o 18 dominios de dedo de zinc.

Las estructuras de péptidos de dedo de zinc de la invención pueden comprender dominios de dedo de zinc directamente adyacentes que tienen secuencias enlazadoras canónicas (o de tipo canónico) entre dominios de dedos de zinc adyacentes, de tal manera que se unen preferencialmente a secuencias de ácido nucleico contiguas. De acuerdo con esto, un péptido de 6 dedos de zinc (estructura) de la invención es particularmente adecuado para unirse a tramos contiguos de aproximadamente 18 bases de ácido nucleico o más, particularmente de la cadena menos de ácido nucleico; un péptido de 12 dedos de zinc (estructura) de la invención es particularmente adecuado para la unión a aproximadamente 36 bases de ácido nucleico o más, que pueden estar dispuestas como un tramo contiguo o como subsitios no contiguos, por ejemplo, de 18 bases de ácido nucleico; un péptido de 10 dedos de zinc es adecuado para unir aproximadamente 30 bases de ácido nucleico o más; un péptido 11 dedos de zinc es adecuado para unir aproximadamente 33 bases de ácido nucleico o más, mostrando que también son funcionales números impares de cadenas de dedo largo; y un péptido de 18 dedos de zinc (estructura) de la invención es particularmente adecuado para la unión a aproximadamente 54 bases de ácido nucleico o más, que pueden estar dispuestos contiguamente o en subsitios no contiguos, por ejemplo, de 18 bases de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, uno o más pares de dominios de dedo de zinc adyacentes pueden separarse por secuencias enlazadoras flexibles cortas (por ejemplo de 6 o 7 aminoácidos). En este caso, tales péptidos de dedo de poli-zinc se unen típicamente a sitios diana de ADN contiguos, como se ha indicado anteriormente. En algunas otras realizaciones, uno o más pares de dominios de dedo de zinc adyacentes pueden estar separados por secuencias enlazadoras flexibles más largas, por ejemplo, que comprenden 8 o más aminoácidos, tales como entre 8 y 50 aminoácidos. Los enlazadores flexibles largos particularmente adecuados tienen entre aproximadamente 11 y 40 aminoácidos, entre 15 y 35 aminoácidos, o entre 19 y 30 aminoácidos. Los enlazadores flexibles largos preferidos tienen 15, 18 o 29 aminoácidos. Los dominios de dedo de zinc adyacentes separados por enlazadores flexibles largos tienen la capacidad de unirse a sitios de unión no contiguos además de la capacidad de unirse a sitios de unión contiguos. La longitud del enlazador flexible puede influir en la longitud del ADN que puede estar entre dichos subsitios de unión no contiguos.

Las estructuras de dedo de zinc de la invención pueden comprender dos o más (por ejemplo 2, 3 o 4) matrices de 4, 6 u 8 dominios de dedo de zinc directamente adyacentes separados por enlazadores flexibles largos (o estructurados). Preferiblemente, dichos péptidos de dedos de (poli-) zinc extendidos están dispuestos en múltiples matrices de unidades de 6 dedos separadas por enlazadores flexibles largos.

Los inventores han mostrado por primera vez que tales péptidos de dedo de zinc extendidos de más de 6 dedos de zinc pueden presentar una unión específica y de alta afinidad a las secuencias diana deseadas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se ha demostrado que estos péptidos extendidos de dedo de zinc pueden expresarse de forma estable dentro de una célula diana, pueden ser no tóxicos para la célula diana y pueden tener una actividad de modulación genética específica y deseada.

Los péptidos extendidos de dedo de zinc de la invención son particularmente adecuados para unirse a secuencias repetidas (por ejemplo, repeticiones de trinucleótidos) en genes diana. Las secuencias de repetición diana adecuadas comprenden al menos 10 repeticiones de trinucleótidos, al menos 12 repeticiones de trinucleótidos o al menos 20 repeticiones de trinucleótidos. En forma beneficiosa, hay al menos 22 repeticiones de trinucleótidos, al menos 29 repeticiones de trinucleótidos o más.

5 En una realización, los péptidos de dedo de zinc extendido de la invención se unen a secuencias dentro de las secuencias expandidas de repetición de CAG y/o CTG en ADN bicatenario, por ejemplo, moléculas de ADN, fragmentos, secuencias de genes o cromatina. Convenientemente, el sitio de unión comprende repeticiones de 5'-GCA-3' y/o 5'-GCT-3'. Por lo tanto, el sitio de unión preferiblemente comprende repeticiones de la secuencia 5'-GCT/A-3'. Deseablemente, las secuencias diana para los péptidos de dedo de zinc extendido preferidos de la invención comprenden 22 o más repeticiones CAG (o CTG) contiguas, tales como al menos 35 repeticiones CAG (o CTG) contiguas, al menos 63 repeticiones CAG (o CTG) contiguas, al menos 104 repeticiones CAG (o CTG) contiguas, o al menos 111 repeticiones CAG (o CTG) contiguas.

10 Una ventaja sorprendente de los péptidos de dedo de zinc de una realización de la invención es que se unen a matrices más largas de secuencias de repetición de CAG o de CTG en preferencia a matrices más cortas. De acuerdo con esto, los péptidos de dedo de zinc que se dirigen a CAG (o CTG) de la invención se unen más eficazmente (por ejemplo, con mayor afinidad o mayor capacidad de modulación génica) a secuencias expandidas de repeticiones de CAG o CTG que contienen al menos 22 repeticiones, comparadas con secuencias que contienen por ejemplo, 10 o menos repeticiones. De forma similar, las secuencias que contienen al menos 35 repeticiones de CAG o CTG pueden unirse preferencialmente sobre secuencias que contienen 22 o menos repeticiones (incluyendo 10 o menos); las secuencias que contienen al menos 63 repeticiones de CAG o CTG pueden unirse preferencialmente sobre secuencias que contienen 35 o menos repeticiones (incluyendo 22 o menos, o 10 o menos); y las secuencias que contienen al menos 104 repeticiones de CAG o CTG pueden unirse preferencialmente sobre secuencias que contienen 63 o menos repeticiones (incluyendo 35 o menos, 22 o menos, o 10 o menos).

25 Las estructuras extendidas de péptidos de dedo de zinc de la invención son también adecuadas para la generación de bibliotecas de péptidos de dedo de zinc no alterados, que pueden ser seleccionados o bien probados por las propiedades deseables, tales como afinidad de unión a una secuencia diana elegida (tal como ADN o ARN). Por lo tanto, la presente invención se refiere a una estructura extendida de péptidos de dedo de zinc que puede formar una estructura para la selección o diseño de factores de transcripción de dedo de zinc artificial y/o proteínas de unión al ADN. Por ejemplo, la estructura extendida de la matriz de dedo de zinc puede comprender 10, 11, 12 o más (tal como 18) dominios de dedo de zinc, que pueden diversificarse en una o más posiciones de aminoácidos.

30 Existen varias estructuras naturales de dedos de zinc conocidas en la técnica, y cualquiera de estas estructuras puede ser adecuada para su uso en las estructuras extendidas de péptidos de dedo de zinc de la invención. En general, una estructura de dedo de zinc natural tiene la secuencia, Fórmula 1: $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{9-14} H X_{3-6} H/C$; o Fórmula 2: $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{2-7} X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6} H X_{3-6} H/C$ donde X es cualquier aminoácido, los números en el subíndice indican los posibles números de residuos representados por X, y los números en superíndice indican la posición del aminoácido en la hélice α . En una realización de la invención, la estructura extendida de péptidos de dedo de zinc se basa en una matriz de dominios de dedo de zinc de Fórmula 1 o 2. Alternativamente, el motivo de dedo de zinc puede representarse por la secuencia general, Fórmula 3: $X_2 C X_{2,4} C X_{12} H X_{3,4,5} H/C$; o Fórmula 4 (SEQ ID NO: 112): $X_2 C X_{2,4} C X_5 X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6} H X_{3,4,5} H/C$. Todavía más preferiblemente, el motivo de dedo de zinc puede representarse por la secuencia general, Fórmula 5: $X_2 C X_2 C X_{12} H X_3 H$; o Fórmula 6 (SEQ ID NO: 113): $X_2 C X_2 C X_5 X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6} H X_3 H$. En consecuencia, una estructura extendida de péptido de dedo de zinc de la invención puede basarse en dominios de dedo de zinc de Fórmulas 1 a 6, o combinaciones de Fórmulas 1 a 6, unidas entre sí en una matriz usando las secuencias enlazadoras descritas en la presente memoria.

45 En estas fórmulas, los residuos fijos C y H coordinan el ion zinc para estabilizar la estructura de dedo de zinc: el primer residuo H está en la posición +7 de la hélice α . Las posiciones particularmente preferidas para la diversificación dentro de las estructuras del dominio de dedos de zinc de la invención son aquellas dentro o adyacentes a la hélice α , por ejemplo, las posiciones -1, 2, 3 y 6.

50 Las estructuras extendidas de péptidos de dedo de zinc de la invención pueden comprender al menos 11 dominios de dedo de zinc de una de las Fórmulas 1 a 6, unidos entre sí por secuencias enlazadoras, es decir, Fórmula 7: [(Fórmula 1-6)-enlazador]_n-(Fórmula 1-6)], donde n es ≥ 10 , tal como entre 10 y 31, como se describe con mayor detalle en esta memoria. Como se indica, en la Fórmula 7 puede usarse cualquier combinación de las Fórmulas 1 a 6. En otra realización, la estructura extendida de péptidos de dedo de zinc comprende entre 10 y 18 (por ejemplo, 11 a 18) dominios de dedo de zinc de las Fórmulas anteriores. Adecuadamente, por lo tanto, n es 9 a 17 (por ejemplo, 10 a 17); más convenientemente n es 9, 10, 11, 13, 14, 15 o 17; y preferiblemente n es 10, 11 o 17.

60 De acuerdo con la invención, la secuencia de reconocimiento de uno o más dominios de dedo de zinc (es decir, las posiciones X^{-1} , X^{+1} , X^{+2} , X^{+3} , X^{+4} , X^{+5} y X^{+6} en las Fórmulas 2, 4 y 6 anteriores están representadas por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 101. En algunas realizaciones, la secuencia de reconocimiento de uno o más dominios de dedo de zinc se selecciona de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107 o combinaciones de las mismas. En una realización particularmente preferida, la secuencia de reconocimiento de uno o más de los dominios de dedo de zinc están representados por la secuencia de aminoácidos QRATLQR (SEQ ID NO: 1). Se identifican también secuencias de reconocimiento alternativas que se unen a secuencias de repetición de CAG o CTG, tales como aquellas que tienen uno o más, como 1, 2 o 3 mutaciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras) en la SEQ ID NO: 1. De este modo, en una realización, se proporciona un péptido de dedo de zinc modificado (unión al ADN) que comprende al menos 10 dominios de dedo de zinc, en donde al

menos una secuencia de reconocimiento de dedos de zinc tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 101. De manera beneficiosa, el péptido de dedo de zinc modificado de la invención comprende al menos 11 secuencias de reconocimiento de dedo de zinc de la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 101. Convenientemente, el péptido de dedo de zinc comprende entre 11 y 18 (por ejemplo, 12) secuencias de reconocimiento de dedos de zinc de las SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 101. En cualquiera de las realizaciones de la invención se entenderá que una o más secuencias de reconocimiento de SEQ ID NO: 1 pueden ser reemplazadas por una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107 sin cambiar sustancialmente las características de reconocimiento y unión de ácido nucleico del ZFP, y tales ZFP alternativos están abarcados dentro del alcance de la invención.

Los péptidos de dedo de zinc de la invención se unen preferiblemente a secuencias de repetición de CAG y/o secuencias de repetición de CTG; y más preferiblemente a secuencias del gen *htt* expandido humano.

Como ya se ha descrito, los dominios de dedo de zinc adyacentes están unidos entre sí por secuencias enlazadoras. En una proteína natural de dedo de zinc, la treonina es a menudo el primer residuo en el enlazador, y la prolina es a menudo el último residuo del enlazador. Sobre la base de la homología de secuencia, se considera que la secuencia enlazadora natural canónica es -TGEKP- (enlazador 1 o L1; SEQ ID NO: 20). Sin embargo, los enlazadores naturales pueden variar mucho en términos de secuencia de aminoácidos y longitud. Por lo tanto, una secuencia de consenso común basada en secuencias enlazadoras naturales puede estar representada por -TGE/QK/RP- (enlazador 2 o L2; SEQ ID NO: 21), y esta secuencia se prefiere para su uso como un enlazador "canónico" o "tipo canónico" de acuerdo con la invención.

Sin embargo, en las matrices extendidas de dedos de zinc por ejemplo, de 4 o más dominios de dedo de zinc, se ha demostrado que puede ser beneficioso interrumpir periódicamente la secuencia enlazadora canónica, cuando se usa entre dedos de zinc adyacentes en una matriz, mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, Gly y/o Ser), con el fin de crear sub-arreglos de dominios de dedo de zinc (por ejemplo, grupos de 2 o 3) dentro de la matriz (Moore et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1437-1441; y el documento WO 01/53480). Por lo tanto, las secuencias enlazadoras adecuadas para uso de acuerdo con la invención incluyen secuencias enlazadoras canónicas de 5 aminoácidos (por ejemplo, enlazador 1 o enlazador 2, anteriores) o secuencias enlazadoras de tipo canónico relacionadas entre 5 y 7 aminoácidos.

Los enlazadores de tipo canónico para uso de acuerdo con la invención pueden basarse adecuadamente en la secuencia, $-TG^{G/S}E/Q^K/RP-$ (enlazador 3 o L3; SEQ ID NO: 22). Por lo tanto, los enlazadores de tipo canónico preferidos incluyen las secuencias específicas: TGGERP (SEQ ID NO: 23), TGSERP (SEQ ID NO: 24), TGGQRP (SEQ ID NO: 25), TGSQRP (SEQ ID NO: 26), TGGEKP (SEQ ID NO: 27), TGSEKP (SEQ ID NO: 28), TGGQKP (SEQ ID NO: 29), o TGSQKP (SEQ ID NO: 30). Un enlazador de tipo canónico particularmente preferido es TGSERP (enlazador 4 o L4; SEQ ID NO: 24). Sin embargo, también se pueden usar otras secuencias enlazadoras entre uno o más pares de dominios de dedo de zinc, por ejemplo, enlazadores de la secuencia $-TG(G/S)_{0-2}E/Q^K/RP-$ (enlazador 5 o L5; SEQ ID NO: 33) o $-T(G/S)_{0-2}G^E/Q^K/RP-$ (enlazador 6 o L6; SEQ ID NO: 34).

En algunas realizaciones se pueden usar enlazadores flexibles aún más largos de 8 o más aminoácidos, como se ha descrito anteriormente. Los enlazadores de 8 aminoácidos incluyen las secuencias $-TG^{(G/S)}_3E/Q^K/RP-$ (SEQ ID NO: 31) y $-T^{(G/S)}_3G^E/Q^K/RP-$ (L12; SEQ ID NO: 32). Ejemplos de enlazadores flexibles largos son: LRQKDGGGGSQLVGTAERP (enlazador 7 o L7; SEQ ID NO: 35), LRQKDGGGGSGGGGSQLVGTAERP (enlazador 8 o L8; SEQ ID NO: 36), LRQKDGGGGSGGGGSQLVGTAERP (enlazador 9 o L9; SEQ ID NO: 37), LRQKDGGGSQLVGTAERP (enlazador 10 o L10; SEQ ID NO: 38) y LRQKDGGGSGTAERP (enlazador 11 o L11; SEQ ID NO: 39).

Los presentes inventores han demostrado que, seleccionando secuencias enlazadoras apropiadas y combinaciones adecuadas de secuencias enlazadoras dentro de una matriz de dedos de zinc, las matrices extendidas de péptidos de dedo de zinc de al menos 10 dedos de zinc (tales como 10, 11, 12 o 18) pueden sintetizarse, expresarse y pueden tener actividad selectiva de direccionamiento génico. Las matrices extendidas de péptidos de dedo de zinc de la invención se disponen preferiblemente en tándem. Dichos péptidos de 11 o 12 dedos de zinc pueden reconocer y unir específicamente a 33 o 36 residuos de ácido nucleico, respectivamente, y las matrices más largas (tales como péptidos de 18 dedos de zinc) reconocen secuencias de ácido nucleico aún más largas. De esta manera, los péptidos extendidos de dedo de zinc de la invención pueden dirigirse a secuencias genómicas únicas. Además, la longitud de reconocimiento de secuencia proporciona un mayor número de combinaciones de secuencias únicas dentro de la secuencia de reconocimiento, que puede proporcionar potencialmente una mayor selectividad para que la secuencia diana se distinga sobre secuencias no diana. De esta manera, los péptidos de dedo de zinc de la invención tienen el potencial de ser más específicos que cualquier factor de transcripción artificial sintetizado hasta la fecha.

Además, también podría esperarse un aumento significativo en la afinidad de unión, en comparación con los péptidos de dedo de zinc con menos dedos. Por ejemplo, cuando un péptido de 3 dedos (con una secuencia de reconocimiento de 9 pb) se une al ADN con afinidad nanomolar, se podría esperar que un péptido de 6 dedos se una a una secuencia de 18 pb con una afinidad entre 10^{-9} y 10^{-18} M, dependiendo de la disposición y secuencia de péptidos de dedo de zinc. Para optimizar tanto la afinidad como la especificidad de péptidos de 6 dedos, se ha demostrado que una fusión de tres dominios de 2 dedos es ventajosa (Moore et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1437-1441 y el documento WO

01/53480). Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, los péptidos de dedo de zinc de la invención comprenden subarreglos de unidades de 2 dedos dispuestas en tándem. En otras realizaciones, los péptidos de dedo de zinc de la invención comprenden subarreglos de unidades de 3 dedos dispuestas en tándem.

5 Por consiguiente, la estructura de dedo de zinc extendida de la invención puede comprender una secuencia seleccionada entre:

10 SEQ ID NO: 2 N'- [(Fórmula 2) -X₆]_{n0}-{[(Fórmula 2) -X₅-(Fórmula 2)- X₆]_{n1}-[(Fórmula 2) -X₅-(Fórmula 2)-X_L]_{n2}- [(Fórmula 2)- X₅-(Fórmula 2)-X₆]_{n3}-[(Fórmula 2)- X₅-(Fórmula 2)-[X₆-(Fórmula 2) -]_{n4}-C', en donde n0 es 0 o 1, n1 es de 1 a 4, n2 es 1 o 2, n3 es de 1 a 4, n4 es 0 o 1, X₅ es una secuencia enlazadora de 5 amino ácidos que tiene la secuencia-TG^{E/Q}/R^KP-, X₆ es una secuencia enlazadora de 6 o 7 amino ácidos teniendo la secuencia -TG^(G/S)₁₋₂^{E/Q}/R^KP- o -T^(G/S)₁₋₂G^{E/Q}/R^KP-, y X_L es un enlazador de al menos 8 amino ácidos;

15 SEQ ID NO: 3 N'- [(Fórmula 1-6)-L3]_{n0}-{[(Fórmula 1-6)-L2-(Fórmula 1-6)-L3]_{n1}-[(Fórmula 1-6)-L2-(Fórmula 1-6)-X_L]_{n2}- [(Fórmula 1-6)-L2-(Fórmula 1-6)-L3]_{n3}-[(Fórmula 1-6)-L2-(Fórmula 1-6)]-[L3-(Fórmula 1-6)]_{n4}-C' en donde n0, n1, n2, n3, n4 y X_L son como se definió anteriormente;

20 SEQ ID NO: 4 N'- [(Fórmula 1-6)-L4]_{n0}-{[(Fórmula 1-6)-L1-(Fórmula 1-6)-L4]_{n1}-[(Fórmula 1-6)-L1-(Fórmula 1-6)-X_L]_{n2}- [(Fórmula 1-6)-L1-(Fórmula 1-6)-L4]_{n3}-[(Fórmula 1-6)-L1-(Fórmula 1-6)]-[L4-(Fórmula 1-6)]_{n4}-C', donde n0, n1, n2, n3, n4 y X_L son como se definió anteriormente;

25 SEQ ID NO: 5 N'- [(Fórmula 6)-L4]_{n0}-{[(Fórmula 6)-L1-(Fórmula 6)-L4]_{n1}-[(Fórmula 6)-L1-(Fórmula 6) -X_L]_{n2}-[(Fórmula 6)-L1-(Fórmula 6)-L4]_{n3}-[(Fórmula 6)-L1-(Fórmula 6)]-[L4-(Fórmula 6)]_{n4}-C', en donde n0, n1, n2, n3, n4 y X_L son como se definió anteriormente.

Para evitar dudas, los guiones ("-") en las Fórmulas y en las SEQ ID NO de la invención representan únicamente enlaces, y por tanto estas Fórmulas y las SEQ ID también pueden estar representadas sin guiones.

30 Preferiblemente en las SEQ ID NO: 2 a 5, n0 es 0 o 1, n1 es de 1 a 3, n2 es 1 o 2, n3 es 2 o 3, n4 es 0 y X_L es aproximadamente 8 a 50. Más Preferiblemente, n0 es 0, n1 es 2 o 3, n2 es 1 o 2, n3 es 2 y n4 es 0, y/o X_L es aproximadamente 11 a 40 aminoácidos. Todavía más preferiblemente, n0 es 0, n1 es 2, n2 es 1 o 2, n3 es 2 y n4 es 0; y/o X_L es aproximadamente 15 a 35 aminoácidos. Todavía más preferiblemente X_L es aproximadamente 15 a 29 aminoácidos. Lo más preferiblemente, X_L se selecciona entre L7, L8, L9, L10, L11 y L12.

35 Por consiguiente, la invención proporciona además el uso de péptidos de dedo de poli-zinc que comprenden al menos 8 y preferiblemente al menos 11 o 12 (por ejemplo 11, 12 o 18) dominios de dedo de zinc. Los métodos descritos en la presente memoria son particularmente adecuados para construir matrices de dominios de dedos de zinc idénticos, que pueden unirse a secuencias diana repetidas de trinucleótidos.

40 En las estructuras de dedo de zinc anteriores, el número total de dominios de dedo de zinc es preferiblemente de 11 a 18 y la secuencia de reconocimiento de dedo de zinc es preferiblemente la SEQ ID NO: 1. Los péptidos de dedo de zinc preferidos tienen 11, 12 o 18 dominios de dedo de zinc, y comprenden las secuencias de las SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14 respectivamente (véase Tabla 1).

45 La invención también abarca moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias peptídicas de la invención. Las secuencias de codificación de péptidos de dedo de zinc preferidas comprenden las SEQ ID NOs: 9, 11, 13 y 15 que codifican los péptidos de dedo de zinc de las SEQ ID NOs: 8, 10, 12 y 14, respectivamente.

50 Se apreciará que las secuencias de las estructuras de péptidos de dedo de zinc de la invención pueden incluir además secuencias guía opcionales (extremo terminal N), tales como: aminoácidos para ayudar a la expresión (por ejemplo dipéptido Met-Ala del extremo terminal N); etiquetas de purificación (por ejemplo, etiquetas FLAG); y secuencias de localización/direccionamiento (por ejemplo, secuencias de localización nuclear (NLS), tales como PKKKRKY, (SEQ ID NO: 40). Además, los péptidos pueden incluir opcionalmente secuencias adicionales del extremo terminal C, tales como: secuencias enlazadoras para fusionar dominios de dedo de zinc a moléculas efectoras; y moléculas efectoras. Se pueden emplear otras secuencias para propósitos de clonación. Las secuencias de cualquiera de las secuencias del extremo terminal N o C pueden variarse, típicamente sin alterar la actividad de unión de la estructura de dedo de zinc, y tales variantes están incluidas dentro del alcance de la invención.

60 Las estructuras de dedo de zinc de la invención se pueden usar para diseñar o seleccionar matrices de péptidos de dedo de zinc que se dirigen a cualquier secuencia de ácido nucleico deseada. En este caso, las estructuras de dedos de zinc pueden diversificarse en una o más posiciones. Por ejemplo, la estructura puede diversificarse en una o más de las posiciones de aminoácidos -1, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de las Fórmulas 1 a 6 y, por lo tanto, de las SEQ ID NOs: 2 a 5. Los cambios en la secuencia de polipéptidos se pueden lograr convenientemente diversificando la secuencia de ácido nucleico que codifica las estructuras de péptidos de dedo de zinc en los codones para al menos una de esas posiciones, de manera que codifique más de una variante de polipéptido. Además, el ácido nucleico o péptido estructural puede variarse de forma específica o aleatoria en una o más (por ejemplo, todas) de las posiciones -1, 2, 3 y 6.

Alternativamente, el marco se puede variar en las posiciones -1, 3 y 6. En forma beneficiosa, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o al menos 6 de las posiciones en la secuencia de reconocimiento de cada dominio de dedo de zinc están diversificadas.

5 Por lo tanto, también se prevé una biblioteca no alterada de ácidos nucleicos o polipéptidos que comprende más de un péptido de dedo de zinc o secuencia de ácido nucleico codificante, que permiten la selección de péptidos de dedo de zinc que tienen propiedades deseables (tales como la afinidad de unión para una secuencia escogida de ácido nucleico diana), a partir de un método adecuado de cribado/selección de bibliotecas. En este contexto, una biblioteca que tiene una mezcla de péptidos o ácidos nucleicos que no ha sido optimizada o seleccionada para tener una funcionalidad particular se denomina aquí una biblioteca "no alterada". Una ventaja potencial de la estructura de péptidos de dedo de zinc es que los sitios diana que pueden estar unidos por miembros individuales de la biblioteca de estructuras pueden no estar restringidos a un tipo particular o conformación de molécula (por ejemplo, ADN bicatenario). De este modo, cualquier molécula o secuencia diana deseable puede ser reconocida (es decir, unida), tal como ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN o ARN), proteínas o péptidos. Una molécula diana preferida es un ácido nucleico bicatenario, y es más adecuadamente ADN.

20 Los residuos de aminoácidos en cada una de las posiciones diversificadas pueden seleccionarse aleatoriamente de manera no selectiva, es decir, al permitir que el aminoácido en la posición en cuestión sea cualquiera de los 20 aminoácidos comunes que ocurren de forma natural; o puede seleccionarse aleatoriamente, es decir, permitiendo que el aminoácido especificado sea cualquiera de entre un subgrupo definido de los 20 aminoácidos naturales. Se apreciará que una manera conveniente de crear una biblioteca de péptidos mutantes con aminoácidos aleatorios en cada ubicación seleccionada es volver aleatorio el codón de ácido nucleico de la correspondiente secuencia de ácido nucleico que codifica el aminoácido seleccionado. Por otro lado, dado el conocimiento que ahora se ha acumulado en relación con la unión específica de secuencia de dominios de dedo de zinc a ácidos nucleicos, puede ser conveniente seleccionar un aminoácido específico (o subgrupo pequeño de aminoácidos) a una o más posiciones elegidas en el dominio de dedo de zinc, por ejemplo, donde se sabe que un aminoácido específico proporciona una unión óptima a un residuo de nucleótido particular en una secuencia diana específica. Tales péptidos o estructuras son el resultado de un diseño "inteligente". Convenientemente, la totalidad de la secuencia de reconocimiento de dedos de zinc se puede seleccionar mediante un diseño inteligente y se inserta/incorpora en una estructura de dedo de zinc apropiada. La persona experta en la técnica conoce bien las secuencias de codones que pueden usarse para especificar uno o más de un residuo de aminoácido particular dentro de una biblioteca. Las posiciones de aminoácidos no aleatorios en cada dominio de dedo de zinc pueden elegirse entre estructuras conocidas de dedos de zinc de tipo silvestre o artificiales.

35 También se prevé la selección, identificación y/o caracterización de péptidos de dedo de zinc que tengan una propiedad deseada, a partir de una estructura de dedo de zinc no alterado. Una biblioteca no alterada comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, al menos 10^6 , 10^8 , 10^9 , 10^{12} o más secuencias de codificación diferentes) que pueden ser expresadas y seleccionadas para identificar péptidos de dedo de zinc que tienen la propiedad deseada.

40 La invención también abarca derivados de los péptidos de dedo de zinc de la invención que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En este sentido, se apreciará que pueden hacerse modificaciones, tales como sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones en el péptido sin afectar adversamente sus propiedades físicas (tales como especificidad o afinidad de unión). Por "derivado" de un péptido de dedo de zinc se entiende una secuencia peptídica que tiene la actividad deseada seleccionada (por ejemplo, afinidad de unión para una secuencia diana seleccionada), pero que además incluye una o más mutaciones o modificaciones a la secuencia primaria de aminoácidos. De este modo, un derivado de la invención puede tener una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o más) cadenas laterales de aminoácidos modificadas químicamente, tales como modificaciones por pegilación, sialilación y glicosilación. Además, o alternativamente, un derivado puede contener una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o más) mutaciones, sustituciones o supresiones de aminoácidos en la secuencia primaria de un péptido de dedo de zinc seleccionado. Por consiguiente, la invención abarca los resultados de experimentos de maduración llevados a cabo sobre un péptido de dedo de zinc seleccionado o una estructura de péptido de dedo de zinc para mejorar o cambiar una o más características del péptido inicialmente identificado que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. A modo de ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos de un dominio de dedo de zinc seleccionado pueden ser mutados aleatoriamente o específicamente (o sustituidos) usando procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, modificando la secuencia de ADN o ARN que codifica). La biblioteca o población resultante de péptidos que forman derivados puede seleccionarse, además -por cualquier método conocido en la técnica- de acuerdo con requisitos predeterminados: tales como especificidad mejorada contra sitios diana particulares; o propiedades mejoradas del fármaco (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, inmunogenicidad, etc.). Los péptidos seleccionados para exhibir tales características adicionales o mejoradas y que muestran la actividad para la que se seleccionó inicialmente el péptido son derivados de los péptidos de dedo de zinc de la invención y también pueden caer dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Moduladores y efectores del péptido de dedo de zinc

65 Aunque los péptidos de dedo de zinc de la invención pueden tener propiedades biológicas útiles en aislamiento, también pueden proporcionarse funciones biológicas útiles mediante la adición de dominios efectores. Por lo tanto, en algunos casos es deseable conjugar un péptido de dedo de zinc de la invención con uno o más dominios de dedos no de zinc,

creando así péptidos de dedo de zinc quiméricos o de fusión. También puede ser deseable, en algunos casos, crear un multímero (por ejemplo, un dímero), de un péptido de dedo de zinc de la invención, por ejemplo, para unir más de una secuencia diana simultáneamente.

5 Por lo tanto, habiendo identificado un péptido de dedo de zinc deseable, se puede unir, conjugar o fusionar un efector o grupo funcional apropiado al péptido de dedo de zinc. La proteína resultante de la invención, que comprende al menos una porción de dedo de zinc (de más de un dominio de dedo de zinc) y un dominio porción o fracción efectora, de dedo no de zinc, se puede denominar como un péptido de dedo de zinc de "fusión", "quimérico" o "compuesto". De manera beneficiosa, el péptido de dedo de zinc estará unido a la otra fracción a través de sitios que no interfieren con la actividad de cualquiera de las fracciones.

10 Un "dominio de dedo no de zinc" (o fracción) como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una entidad que no contiene un pliegue de dedo de zinc ($\beta\beta\alpha$). Por lo tanto, las fracciones de dedos no de zinc incluyen ácidos nucleicos y otros polímeros, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y pequeñas moléculas, entre otros.

15 De manera beneficiosa, se usan péptidos de dedo de zinc quiméricos o proteínas de fusión de la invención para sobrerregular o subregular genes diana deseados, *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, los dominios efectores potenciales incluyen dominios represores transcripcionales, dominios activadores transcripcionales, dominios aisladores transcripcionales, dominios de remodelación, condensación o descondensación de cromatina, dominios de escisión de ácidos nucleicos o proteínas, dominios de dimerización, dominios enzimáticos, secuencias o dominios de señalización/direccionamiento o cualquier otro dominio biológicamente funcional apropiado. Otros dominios que también pueden estar unidos a péptidos de dedo de zinc de la invención (y que tienen funcionalidad biológica) incluyen secuencias peptídicas implicadas en el transporte de proteínas, secuencias de localización (por ejemplo, secuencias de localización subcelulares, localización nuclear, direccionamiento de proteínas) o secuencias señal. Los péptidos de dedo de zinc también pueden fusionarse a marcadores de epítipo (por ejemplo, para su uso para señalar la presencia o localización de una secuencia de nucleótidos diana reconocida por el péptido de dedo de zinc. Se pueden utilizar fragmentos funcionales de cualquier dominio de este tipo.

20 La expresión de muchos genes también se logra controlando el destino del transcripto de ARN asociado. Las moléculas de ARN a menudo contienen sitios para las proteínas de unión al ARN, que determinan la semivida del ARN y, por lo tanto, los niveles de expresión de la proteína. Por lo tanto, los moduladores de péptidos de dedo de zinc de la invención también pueden controlar la expresión génica dirigiendo específicamente los transcriptos de ARN ya sea para aumentar o disminuir su semivida dentro de una célula.

25 De manera beneficiosa, los péptidos de dedo de zinc y las proteínas de fusión de la invención tienen actividad transcripcional y, por lo tanto, los dominios efectores biológicos preferidos incluyen dominios de modulación transcripcional tales como activadores transcripcionales y represores transcripcionales, así como sus fragmentos funcionales. El dominio efector puede derivarse directamente de un factor de transcripción basal o regulado tal como, por ejemplo, transactivadores, represores y proteínas que se unen a secuencias aislantes o silenciadoras (véase Choo y Klug (1995) *Curr. Opin. Biotech.*, 6: 431-436, Choo y Klug (1997) *Curr. Opin. Str. Biol.* 7: 117-125, y Goodrich et al., (1996) *Cell* 84: 825 - 830); o de receptores tales como receptores de hormonas nucleares (Kumar y Thompson (1999) *Steroids* 64: 310-319); o co-activadores y co-represores (Ugai et al., (1999) *J. Mol. Med.* 77: 481-494).

30 Otros dominios funcionales útiles para el control de la expresión génica incluyen, por ejemplo, dominios modificadores de proteínas tales como histona acetiltransferasas, quinasas, metilasas y fosfatasa, que pueden silenciar o activar genes modificando la estructura del ADN o las proteínas que se asocian con los ácidos nucleicos (Wolffe (1996) *Science* 272: 371-372 y Hassig et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3519-3524). Otros dominios efectores útiles incluyen aquellos que modifican o reordenan moléculas de ácido nucleico tales como metiltransferasas, endonucleasas, ligasas, recombinasas y dominios de escisión de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Smith et al., (2000) *Nucleic Acids Res.*, 17: 3361-9, documento WO 2007/139982 y las referencias citadas en el mismo).

35 Los dominios potenciales de activación transcripcional/génica para la fusión con los péptidos de dedo de zinc de la invención incluyen al dominio VP64 (véase Seipel et al., (1996) *EMBO J.* 11: 4961-4968) y el dominio VP16 del virus del herpes simple (HSV) (Hagmann et al., (1997) *J. Virol.* 71: 5952 - 5962; Sadowski et al., (1988) *Nature* 335: 563 - 564); y el dominio de transactivación 1 y/o 2 de la subunidad p65 del factor nuclear κB (NF κB ; Schmitz et al., (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 15576-15584).

40 Un dominio de represión transcripcional preferido es el dominio de caja asociada a Kruppel (KRAB), que es un poderoso represor de actividad génica. En algunas realizaciones preferidas, por lo tanto, los péptidos de dedo de zinc o estructuras de la invención se fusionan con el dominio represor KRAB de la proteína Kox-1 humana con el fin de reprimir una actividad génica diana (por ejemplo, véase Thiesen et al., (1990) *New Biologist* 2 : 363-374). Pueden usarse fragmentos de la proteína Kox-1 que comprende el dominio KRAB, hasta e incluyendo la proteína Kox de longitud completa como dominios de represión transcripcional, como se describe en Abrink et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 1422-1426. Una secuencia de dominio Kox-1 útil se muestra en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 16, SEQ ID

NO: 17). Alternativamente se pueden usar otros dominios represores transcripcionales conocidos en la técnica, tales como el dominio *engrailed*, el dominio *snag*, y el dominio de represión transcripcional de v-erbA.

5 Se incorporan todos los métodos conocidos de conjugación de un dominio efector a una secuencia peptídica. El término "conjugado" se usa en su sentido más amplio para abarcar todos los métodos de ligación o unión que son conocidos en la técnica y se usa indistintamente con términos tales como "enlazado", "unido", "asociado" o "ligado". El dominio o dominios efectores pueden estar unidos covalentemente o no covalentemente al dominio de unión: por ejemplo, cuando el dominio efector es un polipéptido, puede estar directamente unido a un péptido de dedo de zinc (por ejemplo, en el extremo terminal C) mediante una secuencia de aminoácidos flexible o estructurada (enlazador) codificada por la correspondiente molécula de ácido nucleico. Una secuencia enlazadora adecuada para unir un dominio efector al extremo terminal C de un péptido de dedo de zinc se ilustra en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19). Alternativamente, se puede usar un enlazador no aminoácido químico sintético, tal como polietilenglicol, un enlace maleimida-tiol (útil para enlazar ácidos nucleicos con aminoácidos), o un enlace disulfuro. Los enlazadores sintéticos están comercialmente disponibles, y los métodos de conjugación química son conocidos en la técnica.

10 Los enlaces no covalentes entre un péptido de dedo de zinc y un dominio efector pueden formarse usando, por ejemplo, dominios de cremallera de leucina/bobina en espiral u otros dominios de dimerización sintéticos o de origen natural (Luscher & Larsson (1999) *Oncogene* 18: 2955-2966; y Gouldson et al., (2000) *Neuropsychopharm.* 23: S60-S77. Otros medios de conjugación no covalente pueden incluir un enlace de biotina-(Strept)avidina o similares en algunos casos, las interacciones anticuerpo (o fragmento de anticuerpo)-antígeno también pueden ser empleadas adecuadamente, tales como la interacción fluoresceína-antifluoresceína.

15 Para provocar un efecto biológico deseado por medio de la modulación de la expresión génica, se permite que los péptidos de dedo de zinc o sus correspondientes péptidos de fusión interactúen y se unan a una o más secuencias de nucleótidos diana asociadas con el gen diana, ya sea *in vivo* o *in vitro* dependiendo de la aplicación. Por lo tanto, de manera beneficiosa, un dominio de localización nuclear se une al dominio de unión al ADN para dirigir la proteína al núcleo.

20 Cuando la secuencia diana es ADN, las regiones de ADN preferidas a partir de las cuales se efectúa la sobreexpresión o subregulación de genes específicos incluyen promotores, potenciadores o regiones de control de locus (LCR). Otras regiones adecuadas dentro de los genomas, que pueden proporcionar objetivos útiles para los péptidos de dedo de zinc de la invención, incluyen telómeros y centrómeros. En una realización, la secuencia diana de ADN genómico comprende una secuencia de repetición trinucleotídica que comprende al menos 10 de tales repeticiones. En otra realización, la secuencia diana del ADN genómico comprende una secuencia de repetición de CAG tal como se encuentra en las repeticiones de CAG expandidas de genes mutantes. En otra realización más, la secuencia diana de ADN comprende una secuencia de repetición de CTG, que es el complemento de una secuencia de repetición de CAG expandida.

Ácidos nucleicos y expresión peptídica

25 30 35 40 45 Los péptidos de dedo de zinc según la invención y, cuando sea apropiado, las moléculas conjugadas/efectoras de péptido de dedo de zinc de la invención pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante y procedimientos estándar de expresión y purificación de proteínas. De este modo, la invención proporciona además moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos de dedo de zinc de la invención, así como sus derivados; y constructos de ácido nucleico, tales como vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican péptidos y derivados de acuerdo con la invención.

50 Por ejemplo, el ADN que codifica el péptido relevante puede insertarse en un vector de expresión adecuado (por ejemplo, pGEM®, Promega Corp., EE.UU.), donde está unido operativamente a secuencias de expresión apropiadas y transformado en una célula huésped adecuada para expresión de proteína según técnicas convencionales (Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Las células huésped adecuadas son aquellas que pueden crecer en cultivo y son susceptibles de transformación con ADN exógeno, incluyendo bacterias, células fúngicas y células de origen eucariótico superior, preferiblemente células de mamífero.

55 60 Para ayudar en la purificación, los péptidos de dedo de zinc (y los ácidos nucleicos correspondientes) de la invención pueden incluir una secuencia de purificación, tal como una etiqueta His. Además, o alternativamente, los péptidos de dedo de zinc pueden crecer, por ejemplo, en fusión con otra proteína y purificarse como cuerpos de inclusión insolubles a partir de células bacterianas. Esto es particularmente conveniente cuando el péptido de dedo de zinc o la fracción efectora pueden ser tóxicos para la célula huésped en la que se va a expresar. Alternativamente, los péptidos de la invención pueden sintetizarse *in vitro* usando un sistema de (transcripción y) traducción *in vitro* adecuado (por ejemplo, el sistema de extracción S30, *E. coli*, Promega corp., EE.UU.).

65 El término "enlazado operativamente", cuando se aplica a secuencias de ADN, por ejemplo, en un vector de expresión o constructo, indica que las secuencias están dispuestas de manera que funcionen cooperativamente con el fin de lograr los propósitos previstos, es decir, una secuencia promotora que permite el inicio de la transcripción que procede a través de una secuencia de codificación enlazada hasta la secuencia de terminación.

Se apreciará que, dependiendo de la aplicación, el péptido de dedo de zinc o proteína de fusión de la invención puede comprender una secuencia o secuencias peptídicas adicionales en el extremo terminal N y/o C para facilitar la expresión, clonación de proteínas, y/o estabilidad del péptido o ARN, sin cambiar la secuencia de cualquier dominio de dedo de zinc. Por ejemplo, las secuencias de péptido guía del extremo terminal N adecuadas son MA, MAERP (SEQ ID NO: 41) o MAERP (SEQ ID NO: 42).

En algunas aplicaciones, puede ser deseable controlar la expresión de polipéptidos de dedo de zinc (fusión) de la invención mediante secuencias promotoras específicas de tejido o promotores inducibles, que pueden proporcionar los beneficios de la expresión específica y/o inducible de órganos o tejidos de polipéptidos de la invención. Estos sistemas pueden ser particularmente ventajosos para aplicaciones *in vivo* y terapia génica. Ejemplos de promotores específicos de tejidos incluyen el promotor CD2 humano (para células T y timocitos, Zhumabekov et al., (1995) J. Immunological Methods 185: 133-140); el promotor de la quinasa II dependiente de alfa-calcio calmodulina (para células del hipocampo y del neocórtex, Tsien et al., (1996) Cell 87: 1327-1338); el promotor de proteína ácida de suero de leche (glándula mamaria, Wagner et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25: 4323 - 4330); el promotor de la miogenina de ratón (músculo esquelético, Grieshammer et al. (1998) Dev. Biol. 197: 234-247); y muchos otros promotores específicos de tejido que son conocidos en la técnica. Para la terapia génica de la enfermedad de Huntington, es deseable infectar partes particulares del cerebro (el cuerpo estriado). Por lo tanto, los vectores del subtipo AAV2/1 (véase, por ejemplo, Molecular Therapy (2004) 10: 302-317) son ideales para este propósito y pueden usarse con un promotor fuerte de AAV incluido en los vectores.

Los sistemas inducibles adecuados pueden utilizar la inducción de moléculas pequeñas, tales como los sistemas controlados con tetraciclina (tetraciclina activa y tetraciclina no activa), el promotor del gen-1 de respuesta de crecimiento temprano inducible por radiación (EGR1), y cualquier otro sistema inducible apropiado conocido en la técnica.

Expresión y caracterización de péptidos de dedo de zinc de bibliotecas

Los péptidos de dedo de zinc que tienen actividad de unión deseable pueden seleccionarse cribando bibliotecas de péptidos de una estructura de péptidos de dedo de zinc. Se expresan bibliotecas de ácido nucleico que codifican una pluralidad de péptidos de dedo de zinc y se seleccionan inicialmente los péptidos sintetizados por su capacidad para unirse a una secuencia diana deseada. La selección se puede realizar utilizando cualquier sistema de generación y selección de bibliotecas conocido por la persona experta en la técnica, tal como las identificadas a continuación.

Un enfoque consiste en producir una población mixta de péptidos candidatos mediante la clonación de una biblioteca de oligonucleótidos aleatorizados en un gen de fago filamentosos Ff, que permite expresar péptidos grandes en la superficie del bacteriófago (H. Lowman (1997) Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 26: 401 - 424, y G. Smith et al. (1993) Meth. Enz., 217: 228 - 257). También se han elaborado bibliotecas de péptidos aleatorizados de hasta 38 aminoácidos de longitud, y se pueden conseguir péptidos más largos utilizando este sistema. Las bibliotecas de péptidos que se producen se mezclan entonces típicamente con una secuencia diana de ácido nucleico unida a la matriz preseleccionada. Los péptidos que se unen se aíslan y se determinan sus secuencias. A partir de esta información se sintetizan nuevos péptidos y se pueden evaluar sus propiedades biológicas.

Una desventaja potencial de los procedimientos anteriores es que el tamaño de las bibliotecas que se generan típicamente tanto con la expresión en fagos como con la síntesis química está limitado dentro del intervalo 10^6 - 10^9 . Esta limitación puede resultar en el aislamiento de péptidos de afinidad de unión relativamente baja para el ligando diana, a menos que posteriormente se utilice un proceso de maduración que consume tiempo. Esta limitación del tamaño de la biblioteca ha llevado al desarrollo de técnicas para la generación *in vitro* de bibliotecas de péptidos que incluyen: expresión en ARNm (Roberts, & Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 12297-12302); expresión en ribosoma (Mattheakis et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9022 - 9026); y despliegue en CIS (Odegrip et al., (2004) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 101 2806-2810) entre otros. Estas bibliotecas pueden ser superiores a las bibliotecas de expresión en fagos (y otros procedimientos *in vivo*), en que el tamaño de las bibliotecas generadas puede ser de 2 a 5 órdenes de magnitud mayor que lo que es posible con la expresión en fagos.

Cuando el tamaño de la biblioteca es demasiado grande o la longitud del péptido es demasiado larga para una estrategia de cribado particular de la biblioteca, los dominios peptídicos de dedo de zinc pueden cribarse y seleccionarse como parte de subdominios más pequeños (por ejemplo, de 2 o 3 dominios de dedo de zinc adyacentes), y después se unen utilizando enzimas, tales como la disposición del enlazador descrita en relación con los péptidos estructurales de la invención. Alternativamente, las secuencias de ácido nucleico que codifican los residuos de unión de ácido nucleico (por ejemplo, la secuencia de reconocimiento) de cada dominio de dedo de zinc pueden sintetizarse e injertarse o clonarse en la secuencia genética que codifica cada dominio de dedo de zinc de la estructura.

La afinidad de unión de un péptido de dedo de zinc seleccionado para la secuencia diana seleccionada se puede medir usando técnicas conocidas por la persona experta en la técnica, tales como resonancia de plasmón superficial o interferometría de biocapa. Los enfoques de biosensor son revisados por Rich et al. (2009), " A global benchmark study using affinity-based biosensors", Anal. Biochem., 386: 194 - 216. Alternativamente, los ensayos de unión en tiempo real

entre un péptido de dedo de zinc y el sitio diana se pueden realizar usando interferometría de biocapa con un sistema Octet Red (Fortebio, Menlo Park, CA).

Los péptidos de dedo de zinc de la invención tienen afinidad de unión μM o superior para una secuencia de ácido nucleico diana. Adecuadamente, un péptido de dedo de zinc de la invención tiene afinidad de unión nM o por debajo de nM para su secuencia diana específica; por ejemplo, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M o menos. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la afinidad de un péptido de dedo de zinc de la invención por su secuencia diana está en el intervalo pM o inferior, por ejemplo, en el intervalo de 10^{-13} M, 10^{-14} M o 10^{-15} M o menos.

En algunas realizaciones de péptidos de dedo de zinc para dirigirse a repeticiones de CAG expandidas, el péptido de dedo de zinc tiene una constante de disociación para secuencias de 35 o más repeticiones de CAG que es al menos 2 veces mayor, al menos 5 veces o al menos 10 veces mayor que para las secuencias de menos de 22 repeticiones de CAG. Adecuadamente, la afinidad de tales péptidos de dedo de zinc de la invención para secuencias de ADN que tienen al menos 63 repeticiones de CAG es al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 20 veces mayor que para secuencias que tienen menos de 22 repeticiones de CAG. En algunas realizaciones particularmente ventajosas, la afinidad de tales péptidos de dedo de zinc por secuencias de ADN que tienen al menos 104 repeticiones de CAG es al menos 2 veces, al menos 10 veces o al menos 50 veces mayor que para secuencias que tienen menos de 22 repeticiones de CAG.

Los métodos de cribado y selección usados junto con la invención se pueden aplicar a la selección de péptidos de dedo de zinc para la unión a cualquier sitio diana deseado o secuencia de ácido nucleico; las secuencias de reconocimiento particularmente adecuadas comprenden 18 o más, 36 o más, o 54 o más nucleótidos, que pueden ser contiguos o no contiguos, que comprenden preferiblemente subsitios de 18 nucleótidos contiguos. Las secuencias diana adecuadas de ácido nucleico son aquellas asociadas con trastornos genéticos, particularmente con trastornos neurológicos, y aún más adecuadamente con trastornos asociados con la duplicación, inserción y expansión de secuencias genómicas, tales como HD.

Composiciones terapéuticas

Un péptido de dedo de zinc o modulador quimérico de la invención se puede incorporar en una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un animal; preferiblemente un ser humano. Un péptido terapéutico de la invención (o derivado del mismo) puede usarse para tratar una o más enfermedades o infecciones, dependiendo de qué sitio de unión se seleccionó o se diseñó para reconocimiento por parte del péptido de dedo de zinc. Alternativamente, un ácido nucleico que codifica el péptido terapéutico puede insertarse en un constructo / vector de expresión e incorporarse en formulaciones / medicamentos farmacéuticos para el mismo propósito.

Los péptidos de dedo de zinc y los moduladores quiméricos de la invención típicamente contienen residuos de aminoácidos naturales, pero en algunos casos también pueden estar presentes residuos de aminoácidos que no ocurren naturalmente. Por lo tanto, también se pueden usar los llamados "miméticos peptídicos" y "análogos peptídicos", que pueden incluir estructuras químicas que no son de aminoácidos que imitan la estructura de un aminoácido o péptido particular, dentro del contexto de la invención. Tales miméticos o análogos se caracterizan generalmente por presentar características físicas similares tales como tamaño, carga o hidrofobicidad y la orientación espacial apropiada que se encuentra en sus homólogos de péptidos naturales. Un ejemplo específico de un compuesto mimético peptídico es un compuesto en el que el enlace amida entre uno o más de los aminoácidos se sustituye, por ejemplo, por un enlace carbono-carbono u otro enlace no amida, como es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Sawyer, en *Peptide Based Drug Design*, páginas 378 - 422, ACS, Washington DC, 1995). Tales modificaciones pueden ser particularmente ventajosas para aumentar la estabilidad de los agentes terapéuticos de péptidos de dedo de zinc y/o para mejorar o modificar las características de solubilidad, biodisponibilidad y suministro (por ejemplo, para aplicaciones *in vivo*).

Los péptidos terapéuticos y los ácidos nucleicos de la invención pueden ser particularmente adecuados para el tratamiento de enfermedades, afecciones y/o infecciones que pueden ser dirigidas (y tratadas) intracelularmente, por ejemplo, dirigiendo secuencias genéticas dentro de una célula animal; y también para aplicaciones *in vitro* y *ex vivo*. Como se usa en la presente memoria, los términos "agente terapéutico" y "agente activo" abarcan tanto los péptidos como los ácidos nucleicos que codifican un péptido de dedo de zinc terapéutico de la invención. Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen vectores, genomas virales y virus modificados, tales como AAV, que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican péptidos de dedo de zinc y proteínas de fusión de la invención.

Los usos terapéuticos y aplicaciones para los péptidos de dedo de zinc y los ácidos nucleicos de la invención pueden incluir: agentes anti-VEGF para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos neoplásicos y no neoplásicos; cánceres/enfermedades neoplásicas y condiciones relacionadas; condiciones no neoplásicas, tales como trastornos neurológicos, incluyendo lesión en la cabeza, lesión de la médula espinal, hipertensión aguda, meningitis, encefalitis, malaria cerebral, esclerosis múltiple y encefalopatía; retinopatía diabética y otras retinopatías proliferativas; inflamación y condiciones inflamatorias. Otros usos terapéuticos para las moléculas y composiciones de la invención pueden incluir el tratamiento de infecciones microbianas y afecciones asociadas, por ejemplo, infección bacteriana, viral, fúngica o parasitaria. Las enfermedades de la expansión de repetición de trinucleótidos son particularmente preferidas y susceptibles a las terapias de la presente invención, por ejemplo: enfermedad de Huntington (poli-CAG), ataxias

espino cerebelares (poli-CAG), atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (poli-CAG), epilepsia mioclónica juvenil (repeticiones dodecaméricas; poli-CCCCGCCCGCG, SEQ ID NO: 43), ataxia de Friedreich (poli-GAA), síndrome X frágil (poli-CGG), síndrome X-E frágil (poli-CCG), distrofia miotónica (poli-CTG).

5 Se pueden combinar uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales (tales como diluyentes, adyuvantes, excipientes o vehículos) con el péptido terapéutico de la invención en una composición farmacéutica. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Las formulaciones farmacéuticas y las composiciones de la invención se formulan para ajustarse a las normas reguladoras y pueden administrarse por vía oral, intravenosa, tópica o por otras vías estándar.

10 De acuerdo con la invención, el péptido terapéutico o ácido nucleico puede fabricarse en medicamentos o puede formularse en composiciones farmacéuticas. Cuando se administra a un sujeto, se administra adecuadamente un agente terapéutico como un componente de una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las moléculas, compuestos y composiciones de la invención pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intravaginal, transdérmica, rectal, por inhalación o tópicamente a la piel. La administración puede ser sistémica o local. Los sistemas de suministro que se conocen también incluyen, por ejemplo, encapsulación en microgeles, liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y pueden usarse para administrar los compuestos de la invención. Cualquier otro sistema de suministro adecuado conocido en la técnica también está previsto en el uso de la presente invención.

20 Vehículos farmacéuticos aceptables pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Cuando se administran a un sujeto, los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferiblemente estériles. El agua es un vehículo adecuado cuando el compuesto de la invención se administra en forma intravenosa. Soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados incluyen también excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones, si se desea, pueden contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores.

25 Los medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden tomar la forma de líquidos, soluciones, suspensiones, lociones, geles, comprimidos, píldoras, gránulos, polvos, formulaciones de liberación modificada (tales como liberación lenta o sostenida), supositorios, emulsiones, aerosoles, atomizadores, cápsulas (por ejemplo, cápsulas que contienen líquidos o polvos), liposomas, micropartículas o cualquier otra formulación adecuada conocida en la técnica. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Alfonso R. Gennaro ed., Mack Publishing Co. Easton, Pa., 19ª ed., 1995, véase, por ejemplo, las páginas 1447-1676.

30 Convenientemente, las composiciones terapéuticas o medicamentos de la invención se formulan de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración oral (más adecuadamente para seres humanos). Las composiciones para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires, por ejemplo. Por lo tanto, en una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una cápsula, comprimido o píldora.

35 Las composiciones administradas oralmente pueden contener uno o más agentes, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes saborizantes tales como menta, aceite de gaulteria o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente aceptable. Cuando la composición está en forma de comprimido o píldora, las composiciones pueden recubrirse para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal, para proporcionar una liberación sostenida de agente activo durante un periodo de tiempo prolongado. Las membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto conductor osmóticamente activo son también adecuadas para composiciones administradas oralmente. En estas formas de dosificación, el fluido procedente del entorno que rodea la cápsula es embebido por el compuesto conductor, que se hincha para desplazar el agente o la composición del agente a través de una abertura. Estas formas de dosificación pueden proporcionar un perfil de suministro de orden esencialmente cero en oposición a los perfiles con picos de formulaciones de liberación inmediata. También se puede utilizar un material de retardo de tiempo tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol. Las composiciones orales pueden incluir vehículos estándar tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Tales vehículos son preferiblemente de grado farmacéutico. Para las formulaciones orales, el sitio de liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno o el íleon) o el intestino grueso. Un experto en la técnica es capaz de preparar formulaciones que no se disuelven en el estómago, pero liberarán el material en el duodeno o en cualquier otra parte del intestino. Convenientemente, la liberación evitará los efectos deletéreos del medio estomacal, ya sea por protección del péptido (o derivado) o por liberación del péptido (o derivado) más allá del medio estomacal, tal como en el intestino. Para asegurar una resistencia gástrica completa, sería esencial un recubrimiento impermeable hasta al

menos pH 5,0. Ejemplos de los ingredientes inertes más comunes que se usan como revestimientos entéricos son acetato-trimelitato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, acetato ftalato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, acetato ftalato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y Shellac, que pueden utilizarse como películas mixtas.

Para ayudar a la disolución del agente terapéutico o ácido nucleico (o derivado) en el medio acuoso, se puede añadir un surfactante como agente humectante. Los surfactantes pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio y dioctil sulfonato de sodio. Pueden usarse detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. Los detergentes no iónicos potenciales que podrían incluirse en la formulación como surfactantes incluyen: lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 20, 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. Estos surfactantes, cuando se usan, podrían estar presentes en la formulación del péptido o ácido nucleico o derivado, ya sea solos o como una mezcla en diferentes proporciones.

Típicamente, las composiciones para administración intravenosa comprenden un regulador acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante.

Otra vía de administración adecuada para las composiciones terapéuticas de la invención es mediante administración pulmonar o nasal.

Se pueden incluir aditivos para aumentar la captación celular del péptido terapéutico (o derivado) o ácido nucleico de la invención, tal como los ácidos grasos ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico.

En una composición farmacéutica, se puede mezclar un péptido de dedo de zinc o un ácido nucleico de la invención (y opcionalmente cualquier fracción de dedo no de zinc asociado, por ejemplo un modulador de expresión génica y/o fracción de direccionamiento) con una población de liposomas (es decir, una vesícula lipídica u otro compartimento artificial encapsulado en una membrana), para crear una población terapéutica de liposomas que contienen el agente terapéutico y opcionalmente el modulador o fracción efectora. La población terapéutica de liposomas puede entonces administrarse a un paciente por cualquier medio adecuado, tal como por inyección intravenosa. Cuando es necesario que la composición terapéutica liposómica se dirija específicamente a un tipo celular particular, tal como una especie microbiana particular o una célula infectada o anormal, la composición de liposomas puede formularse adicionalmente con un dominio de anticuerpo apropiado o similar (por ejemplo, Fab, F(ab)₂, scFv, etc.) o fracción de direccionamiento alternativo, que reconoce el tipo de célula diana. Tales métodos son conocidos por la persona experta en la técnica.

Los péptidos terapéuticos o ácidos nucleicos de la invención también pueden formularse en composiciones para aplicación tópica a la piel de un sujeto.

Los péptidos de dedo de zinc y los ácidos nucleicos de la invención también pueden ser útiles en aplicaciones no farmacéuticas, tales como en pruebas de diagnóstico, formación de imágenes, como reactivos de afinidad para purificación y como vehículos de suministro.

Terapia génica

Un aspecto de la invención se refiere a tratamientos de terapia génica que utilizan péptidos de dedo de zinc de la invención para tratar enfermedades.

La terapia génica es la inserción de genes en células de un individuo (por ejemplo, animal o humano) y tejidos biológicos para tratar enfermedades, por ejemplo, reemplazando alelos deletéreos mutantes con versiones funcionales / corregidas. Las enfermedades más prometedoras hasta la fecha son las causadas por defectos de un solo gen, como fibrosis quística, hemofilia, distrofia muscular, anemia de células falciformes y HD. Otros objetivos comunes de terapia génica están dirigidos contra el cáncer y las enfermedades hereditarias relacionadas con un defecto genético, como las repeticiones de nucleótidos expandidas.

La terapia génica se clasifica en dos tipos: la terapia génica de línea germinal, en la cual las células germinales (es decir, espermatozoides u óvulos), se modifican mediante la introducción de genes terapéuticos, que están típicamente integrados en el genoma y tienen la capacidad de ser heredables (es decir, transmitido a generaciones posteriores); y terapia génica somática, en la que los genes terapéuticos se transfieren a las células somáticas de un paciente, lo que significa que pueden ser localizados y no son heredados por generaciones futuras.

Los tratamientos de terapia génica requieren la administración del gen terapéutico (o molécula de ADN o ARN) en células diana. Existen dos categorías de sistemas de administración, bien sea mecanismos de administración basados en virus o mecanismos no virales, y ambos mecanismos están previstos para uso con la presente invención.

Los sistemas virales pueden estar basados en cualquier virus adecuado, tal como: retrovirus, que portan ARN (por ejemplo, influenza, SIV, HIV, lentivirus y leucemia murina de Moloney); adenovirus, que portan ADNbc; virus adeno-

asociados (AAV), que portan ADNmc; virus del herpes simple (HSV), que porta ADNbc; y virus quiméricos (por ejemplo, cuando la envoltura del virus se ha modificado utilizando proteínas de envoltura de otro virus).

Un sistema de administración viral particularmente preferido es AAV. El AAV es un pequeño virus de la familia del parvovirus con un genoma de ADN monocatenario. Una característica clave del AAV de tipo silvestre es que casi invariablemente inserta su material genético en un sitio específico en el cromosoma humano 19. Sin embargo, el AAV recombinante, que contiene un gen terapéutico en lugar de sus genes virales normales, puede no integrarse en el genoma animal, y en su lugar puede formar el ADN episomal circular, que es probablemente la causa primaria de la expresión génica a largo plazo. Las ventajas de los vectores de terapia génica basados en AAV incluyen: que el virus no es patógeno para los seres humanos (y ya es portado por la mayoría de las personas); la mayoría de las personas tratadas con AAV no construirán una respuesta inmune para eliminar el virus o las células que se han infectado con éxito con él; infectará las células que se dividen y las que no se dividen (quiescentes); y muestra una promesa particular para los tratamientos de terapia génica de músculo, ojo y cerebro. Hasta la fecha, los vectores de AAV se han utilizado para ensayos clínicos de primera y segunda fase para el tratamiento de la fibrosis quística; y se han realizado ensayos clínicos de primera fase para el tratamiento de la hemofilia. También ha habido resultados alentadores a partir de la fase I de ensayos clínicos para la enfermedad de Parkinson, que proporciona esperanza para los tratamientos que requieren la administración al sistema nervioso central. También se han reportado ensayos de terapia génica usando AAV para el tratamiento de la enfermedad de Canavan, distrofia muscular y la lipofuscinosis ceroidal neuronal tardía. HSV, que naturalmente infecta las células nerviosas en los seres humanos también puede ofrecer ventajas para la terapia génica de las enfermedades que afectan al sistema nervioso.

De manera adecuada, de acuerdo con la invención, se insertan constructos de ácido nucleico que codifican dedo de zinc (como se describe en otra parte en este documento) en un vector de virus adeno-asociado (AAV), particularmente del subtipo AAV2/1 (véase, por ejemplo, *Molecular Therapy* (2004) 10: 302 - 317). Este vector es particularmente adecuado para la inyección e infección del estriado, en el cerebro, donde los efectos deletéreos de la agregación de Htt mutante son más prevalentes en HD. De este modo, los constructos de ácido nucleico codificantes de dedo de zinc de la invención pueden suministrarse a las células diana deseadas y los péptidos de dedo de zinc expresados con el fin de reprimir la expresión de genes *htt* mutantes.

Los enfoques no basados en virus para la terapia génica pueden proporcionar ventajas sobre los métodos virales, por ejemplo, en vista de la producción simple a gran escala y baja inmunogenicidad del huésped. Los tipos de mecanismo no viral incluyen: ADN desnudo (por ejemplo, plásmidos); oligonucleótidos (por ejemplo, antisentido, ARNpi, oligodesoxinucleótidos y oligonucleótidos bicatenarios señuelo, y oligonucleótidos de ADNmc); lipoplexos (complejos de ácidos nucleicos y liposomas); poliplexos (complejos de ácidos nucleicos y polímeros); y dendrímeros (macromoléculas altamente ramificadas, aproximadamente esféricas).

Por consiguiente, los ácidos nucleicos que codifican los dedos de zinc de la invención pueden usarse en métodos de tratamiento de enfermedades mediante terapia génica. Las enfermedades particularmente adecuadas son las del sistema nervioso (periférico y/o central); y una enfermedad preferida es HD.

En particular, los agentes terapéuticos y los regímenes de terapia génica de la invención pueden proporcionar la expresión de dedos de zinc terapéuticos en células diana para reprimir la expresión de genes diana, tales como los que tienen secuencias de repetición expandidas de CAG no de tipo silvestre, y especialmente el gen mutante *htt*. Las nucleasas de dedo de zinc de la invención (por ejemplo, como proteínas de fusión con dominio de nucleasa Fok-1) también pueden ser útiles en tratamientos de terapia génica para cortar o dirigir genes al sitio de integración de genes terapéuticos a sitios cromosómicos específicos, según se ha informado previamente por Durai et al. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, 18: 5978 - 5990.

Enfermedad de Huntington (HD) y terapias

A diferencia de otros trastornos neurológicos, tales como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, HD es monogénica (The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) *Cell*, 72 (6): 971-983). Por lo tanto, una estrategia terapéutica útil contra HD sólo puede necesitar dirigir la expresión del único gen causal con el fin de revertir y tratar los efectos de la proteína mutante. Sin embargo, puesto que la proteína Htt de wt se expresa ampliamente (Sharp et al., (1995) *Neuron* 14 (5): 1065-1074); es esencial para el desarrollo embrionario temprano (Duyao et al., (1995) *Science* 269 (5222): 407-410); y se requiere para la función neuronal y la supervivencia en el cerebro (Dragatsis et al. (2000) *Natl. Genet.* 26 (3): 300 - 306); es importante reducir la expresión de la proteína mutante específicamente, y dejar intacta la expresión de la proteína wt.

Recientemente, se demostró que la interferencia de ARN (ARNi) reduce la expresión de *htt* mutante (van Bilsen et al., (2008) *Hum. Gene Ther.* 19 (7): 710-719; Zhang et al. *Neurochem* 108 (1): 82-90; Pfister et al. (2009) *Curr. Biol.* 19 (9): 774 - 778). Aunque esta técnica puede tener el potencial de ser muy potente, el éxito del ARNi depende del direccionamiento de un solo nucleótido o la supresión de polimorfismos que diferencian entre alelos mutantes y wt, y estos a menudo difieren de paciente a paciente. El requerimiento de diseños personalizados de ARNpi plantea actualmente desafíos para ensayos clínicos y uso aprobado en seres humanos.

5 En un enfoque más general, Hu et al. usaron ácido nucleico peptídico (PNA), y oligómeros antisentido de ácido nucleico bloqueado (LNA), para dirigirse a las repeticiones de CAG expandidas de los genes *ataxina-3* y *htt* (Hu et al. (2009) Natl. Biotechnol., 27 (5): 478 -484; Hu et al. (2009) Ann. NY Acad. Sci. 1175: 24 - 31). Observaron la inhibición selectiva del alelo mutante con ácidos nucleicos peptídicos (PNA) durante un máximo de 22 días. Aunque estos resultados también parecen prometedores, los PNA no se pueden administrar al sistema nervioso central. Por lo tanto, los autores también trataron de utilizar ácidos nucleicos bloqueados (LNA), que son más adecuados para aplicaciones *in vivo*. En este experimento se observó la inhibición del alelo mutante, pero también se observó hasta un 30% de inhibición de *htt* de wt a la concentración más eficaz del LNA utilizado.

10 Por lo tanto, todavía hay una clara necesidad en la técnica por terapias eficaces para inhibir la expresión de la proteína Htt mutante, mientras que dejan la expresión del alelo de tipo silvestre en gran parte no afectada.

15 En consecuencia, en este trabajo, los inventores diseñaron racionalmente péptidos de dedo de zinc para poder reconocer y unir secuencias de poli-5'-GC(A/T)-3', de tal manera que reconocerían tanto el poli-CAG como su cadena de ADN complementaria, poli-CTG. Los péptidos de dedo de zinc beneficiosos de la invención fueron capaces de reprimir un gen diana con secuencias de repetición de CAG expandidas preferiblemente a través de secuencias de repetición más cortas en ensayos de informador de transfección transitoria. Utilizando una línea celular modelo para HD, los inventores alcanzaron una expresión estable de péptidos de dedo de zinc, que también redujo la expresión del gen mutante cromosómico *htt* (que tiene 111 repeticiones de CAG). La represión de la expresión génica se demostró tanto en la proteína como en los niveles de ARN. Se demostró que la represión de los genes mutantes que fueron dirigidos persiste durante períodos prolongados (por ejemplo, durante 20 días), y se encontró que la expresión de genes que tienen secuencias de repetición de CAG genómicas más cortas permanece ampliamente inalterada. De este modo, los péptidos de dedo de zinc de la invención se dirigen a las repeticiones de CAG expandidas asociadas con el gen *Htt* mutante de preferencia a las repeticiones de CAG normales asociadas con el gen *Htt* de tipo silvestre. Por lo tanto, los péptidos de dedo de zinc de la invención son represores eficientes y selectivos de genes con largos tramos de CAG.

20 Del mismo modo, los péptidos de dedo de zinc de la invención son adecuados para el direccionamiento y la modulación de genes que contienen secuencias de repetición largas (particularmente repeticiones de trinucleótidos) asociadas con genes distintos de *Htt*, como se ha indicado anteriormente.

30 La invención se ilustrará adicionalmente a continuación por medio de los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

35 A menos que se indique lo contrario, se usaron reactivos comercialmente disponibles y técnicas estándar en biología molecular y bioquímica.

Materiales y métodos

40 Los siguientes procedimientos utilizados por el solicitante se describen en Sambrook, J. et al., 1989, citado más arriba: análisis de productos de digestión con enzimas de restricción sobre geles de agarosa y preparación de solución salina regulada con fosfato. Se adquirieron reactivos, oligonucleótidos, productos químicos y disolventes de uso general a través de Sigma-Aldrich Química SA (Madrid, España). Se obtuvieron enzimas y polimerasas a través de New England Biolabs (NEB Inc., c/o IZASA, S.A. Barcelona, España).

45 Construcción del vector y péptido de dedo Zinc (ZFP)

50 Para construir una estructura de péptido de dedo de zinc (ZFP) que reconoce tanto las secuencias de ADN de GCA como de GCT (que se encuentran dentro de repeticiones de CAG expandidas), se seleccionó una estructura de dedos de zinc con base en la secuencia de la cadena principal de tipo silvestre de la región de dedo de zinc de *zif268* de tipo silvestre. Los residuos de aminoácidos responsables del reconocimiento objetivo del ADN (es decir, la "secuencia de reconocimiento", que corresponde esencialmente a la región α -helicoidal de la estructura) se diseñaron teniendo en cuenta dos estudios previamente reportados: (1) Choo et al. (1994) Nature 372 (6507): 642-645, ZFP modificados con las siguientes secuencias de reconocimiento α -helicoidales (residuos -1 a 6), QAATLQR (SEQ ID NO: 44) para la unión al triplete GCA y QAQTLQR (SEQ ID NO: 45) para unirse al triplete GCT; y (2) Isalan et al. (1998) Biochemistry 37 (35): 12026-12033, reportaron que la secuencia QRASRKR (SEQ ID NO: 46) fue capaz de reconocer tripletes GN(T/A). Estas secuencias de aminoácidos α -helicoidales se combinaron para generar una nueva secuencia de hélices α híbrida, QRATLQR (SEQ ID NO: 1), que comprende las posiciones -1, 1 y 2 de Isalan et al. y los residuos 3, 4, 5 y 6 de Choo et al. Se esperaba que el dominio de dedos de zinc resultante se uniera a la secuencia GC(T/A), y se denominó ZFxHunt (Figura 1C). Se sintetizó un vector pUC57 que contenía 6 dominios de dedo de zinc de este tipo, denominado ZF6xHunt, (Genscript Corporation (Piscataway, NJ)). Este vector también incluía un promotor T7, un NLS en el extremo terminal N PKKKRKV, (SEQ ID NO: 40), y sitios de restricción para derivar 4 (ZF4), 11 (ZF11), 12 (ZF12) y 18 (ZF18) péptidos de dedo de zinc en arreglos en tándem mediante subclonación (véase la Tabla 1 para las secuencias de dedos de zinc; SEQ ID NOs: 6 a 15). Por ejemplo, para clonar pUC57 ZF4, se cortó el vector pUC57 ZF6 con *Eag1* y se ligó nuevamente (péptido de dedo de zinc SEQ ID NO: 6). Para clonar ZF12, se digirió pUC ZF6 con *SpeI*, y se clonó un fragmento de PCR que contenía ZF6 (con enlazadores *SpeI*) en el sitio *SpeI* (péptido de dedo de zinc, SEQ ID NO: 12).

Se añadió un sitio *KpnI* para futuros propósitos de clonación (fragmento de PCR: "Spel-KpnI-ZF6-Spel"). ZF11 se derivó de ZF12 por supresión del dedo del extremo terminal N por recombinación homóloga (péptido de dedo de zinc, SEQ ID NO: 10). ZF18 se construyó con una estrategia de clonación de PCR similar a la de ZF12, dando como resultado enlazadores ligeramente más cortos (péptido de dedo de zinc, SEQ ID NO: 14).

Los péptidos de dedo de zinc se subclonaron a continuación en el vector de expresión de mamífero pTarget (Promega). Se introdujo una secuencia de etiqueta de 3xFLAG (DYKDHDG DYKDHDH DYKDDDDK; SEQ ID NO: 47) por PCR en el extremo terminal N, y se introdujeron ya sea las secuencias codificantes del dominio endonucleasa FokI o Kox-1 (dominio de represión de KRAB) en el extremo terminal C, con un enlazador 3Xggggs (SEQ ID NO: 48) entre el péptido de dedo de zinc y el dominio efector.

La serie de vectores pEH se clonó en dos etapas. En primer lugar, la región codificante de EGFP se escindió de pEGFP-N1 (Clontech), utilizando *HindIII* / *XbaI*, y se clonó en pGL4.13 (Promega) para producir pSV40-EGFP. A continuación, un producto de PCR que contenía enlaces CMV-HcRed-poliA y *ClaI* se clonó en pSV40-EGFP (parcialmente digerido con *ClaI*). El codón de inicio de EGFP se mutó a alanina por mutagénesis dirigida al sitio, y los fragmentos de PCR que contenían el exón I de *Htt* humano de diferentes plantillas genómicas humanas (para obtener diferentes números de repeticiones de CAG), se clonaron en el sitio pEH *EcoRI*, secuencia arriba y en marco con EGFP (Serie pEH-Q). La serie del vector pSV40-mCherry se generó reemplazando EGFP de la serie de vectores pSV40-EGFP con mCherry usando sitios *XmaI* / *XbaI*.

Ensayos de desplazamiento de gel *in vitro*

En primer lugar, se utilizaron cebadores pUC57-ZFxHunt, M13fwd y M13rev (M13fwd, GTAAAACGACGGCCAG, M13rev, CAGGAAACAGCTATGAC, véase la Tabla 3) para generar productos de PCR para la expresión *in vitro* del ZFP, usando el kit de ADN de PCR TNT T7 Quick de Promega). Se produjeron sondas de ADN bicatenarias con diferentes números de repeticiones de CAG basadas en la secuencia estándar: 5'-ACG TAC (CAG)_n TCA CAG TCA GTC CAC ACG TC-3' (SEQ ID NO: 49) mediante relleno de Klenow. Se usaron 100 ng de ADN bicatenario en una reacción de marcación con DIG usando el kit de desplazamiento en gel, 2ª generación (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los ensayos de desplazamiento en gel, se incubaron 0,005 pmoles de sonda marcada con DIG con cantidades crecientes de proteína expresada en TNT en una reacción de 20 µl que contenía 0,1 mg/ml de BSA, 0,1 µg/ml de polidI:dC, glicerol al 5%, Bis-Tris Propano 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, 50 mg/ml de ZnCl₂, NonidetP40 al 0,1% y DTT 5 mM durante 1 hora a 25°C. Las reacciones de unión se separaron en un gel de acrilamida no desnaturizante al 7% durante 1 hora a 100 V, se transfirieron a una membrana de nailon durante 30 min a 400 mA y la visualización se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cultivo celular y suministro de genes

La línea celular HEK-293T (ATCC) se cultivó en CO₂ al 5% a 37°C en DMEM (Gibco) complementado con FBS al 10% (Gibco). El ADN purificado Qiagen se transfectó en células usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se sembraron en placas sobre pozos de 10 mm hasta una densidad de 50% y 70 ng de plásmido informador, se mezclaron 330 ng de plásmido de expresión ZFP y 2 µl de Lipofectamina 2000 y se añadieron a las células. Las células se recogieron para su análisis 48 horas más tarde.

Se cultivaron células STHdh+ / Hdh+ y STHdhQ111 / Hdh111 (obsequio de M.E. MacDonald) en CO₂ al 5% a 33°C en DMEM complementado con FBS al 10% (Gibco) y 400 µg/ml de G418 (PAA). Las células se infectaron con partículas retrovirales usando el sistema pRetroX (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis de citometría de flujo

Las células se cosecharon 48 horas después de la transfección y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto usando el software BD FACSDiva.

Transferencia Western

Se cosecharon células 293T 48 horas después de la transfección en 100 µl de colorante de carga 2xSDS con inhibidor de proteasa completo (Roche). Se separaron 20 µl de muestra en geles listos Tris-HCl Criterion al 4-15% (BioRad) durante 2 horas a 100 V, se transfirieron a una membrana Hybond-C (GE Healthcare) durante 1 hora a 100 V. Las proteínas se detectaron con el anticuerpo primario anti-β-actina (Sigma A1978) a una dilución 1:3.000 o anti-EGFP (Roche) a una dilución de 1:1.500 y con un anticuerpo secundario antirrátón de burro conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1:10.000. La visualización se realizó con el sistema ECL (GE Healthcare) utilizando un sistema de formación de imágenes LAS-3000 (Fujifilm). Las células STHdh se tripsinizaron y se recogieron en PBS que contenía un inhibidor de proteasa completo (Roche). Las células se resuspendieron en regulador RIPA (TritonX-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, Tris-HCl 40 mM, NaCl 150 mM, SDS al 0,2%, completo), se incubaron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min. Se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína usando el ensayo de proteína D_c de BioRad. Se separaron 60 µg de proteína en un gel listo Tris-HCl Criterion al 5% (BioRad) durante 2 horas a 100 V, se transfirieron utilizando el sistema de transferencia

seca iBlot (Invitrogen) durante 8 min y se detectó la proteína Htt endógena con anticuerpo primario anti-Huntingtina (Millipore MAB2166) a una dilución 1:1.000.
qRT-PCR

5 Se preparó ARN con el kit RNeasy (Qiagen) y se transcribió en forma inversa con Superscript II (Invitrogen). La PCR en tiempo real se realizó en un instrumento LightCycler® 480 (Roche) usando LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche). Los conjuntos de cebadores se presentan en su totalidad en la Tabla 3.

Producción del vector viral adeno-asociado

10

Se produjeron AAV2/1-CAG-GFP-WPRE y AAV2/1-CAG-ZF11xHunt-Kox1-WPRE que contenían un promotor CAG (elemento potenciador temprano de CMV y el promotor de beta-actina de pollo) y WPRE (elemento regulador postraduccional de marmota americana) en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Genética de la Universidad Autónoma de Barcelona (CBATEG-UAB) como se describió anteriormente (Salveti et al., 1998) Hum. Gene Ther. 9: 695-706). El virus recombinante se purificó por precipitación con PEG8000 seguido de ultracentrifugación con gradiente de iodixanol con un título final de $7,41 \times 10^{11}$ copias del genoma/ml.

15

Animales - ratones transgénicos R6/2 ratones

20

Se adquirieron ratones transgénicos R6/2 a través de Jackson Laboratories (B6CBA-Tg (HDexon1) 62Gpb/3J). Las hembras hemicigotas de ovario trasplantado y los machos B6CBAF1/J wt fueron criados en casa, y la progenie fue genotipificada como se describió anteriormente (Benn, et al. (2009), PLoS One 4, e5747).

25

Se aplicaron inyecciones estereotáxicas en ratones de 4 semanas de edad. Brevemente, los ratones se anestesiaron con isofluorano y se fijaron en un marco estereotáxico. Se inyectó buprenorfina a razón de 0,05 mg/kg. Se inyectaron bilateralmente los AAV en el cuerpo estriado (A/P +0,7 mm, M/L \pm 1,8 mm, D/V -3,0 mm con respecto al bregma) usando una jeringa Hamilton de 10 μ l a una velocidad de 0,25 μ l/min controlada por una Ultramicropump (World Precision Instruments). Para cada hemisferio se inyectó un volumen total de 3 μ l ($2,2 \times 10^9$ partículas genómicas) en dos etapas: se inyectaron 1,5 μ l a -3,0 mm de DV, se dejó reposar la aguja durante 3 minutos en posición y la otra mitad se inyectó a -2,5 mm de DV. Las hembras fueron inyectadas aleatoriamente con AAV-CAG-ZF11xHunt-Kox-1-WPRE en un hemisferio y con AAV de control que expresaba GFP (AAV2/1-GFP) en el otro hemisferio. Algunas hembras se inyectaron sólo en un hemisferio ya sea con AAV-CAG-ZF11xHunt-Kox-1-WPRE o con AAV2/1-GFP. Se sacrificaron los ratones hembras a diferentes edades para análisis posterior mediante RT-PCR, inmunohistoquímica o transferencia Western. Los machos fueron inyectados bilateralmente con 3 μ l del mismo virus en ambos hemisferios (AAV-CAG-ZF11xHunt-Kox-1-WPRE o AAV2/1-GFP) para ensayos conductuales.

30

35

Pruebas de comportamiento animal

40

El control del comportamiento comenzó a las 3 semanas de edad y las pruebas se realizaron bimestralmente hasta las 11 semanas de edad. Todos los experimentos se realizaron en forma de doble ciego con respecto al genotipo y el tratamiento de los ratones.

45

El comportamiento de agarre se comprobó suspendiendo el animal por la cola durante 20 segundos. Los ratones sujetados por sus miembros posteriores recibieron una puntuación de 1, y los ratones que no se sujetaron recibieron una puntuación de 0.

50

Se midió la fuerza de agarre permitiendo que los ratones se sujetaran a un medidor de fuerza de agarre y tirando suavemente por la cola. La prueba se repitió tres veces y se registró la fuerza media y máxima.

55

Para la prueba de aceleración con la barra rotatoria con actividad motora forzada, los ratones fueron entrenados a las 3 semanas de edad para permanecer en la barra a una velocidad constante de 4 rpm hasta que alcanzaron un criterio de 3 minutos consecutivos en la barra. En la fase de prueba, los ratones se colocaron en la barra rotatoria a 4 rpm y la velocidad aumentó constantemente durante 2 minutos hasta 40 rpm. El ensayo se repitió dos veces y se registró la latencia máxima y media de caída de la barra.

60

Para la prueba a campo abierto, se pusieron los ratones en el centro de un campo abierto de metacrilato blanco (70x70 cm) iluminado por una luz tenue (70 lux) para evitar la aversión, y se midieron automáticamente su distancia recorrida, la velocidad y la posición con un software de seguimiento de video (sistema SMART, Panlab, España). Otras actividades, como el levantamiento, la inclinación, el acicalado y el número de heces fueron controlados por observación directa.

65

Para la prueba de impresión de la pata, se pintaron las patas traseras de los ratones con un colorante no tóxico y se permitió a los ratones caminar a través de un pequeño túnel (10 x 10 x 70 cm) con una hoja limpia de papel blanco en el suelo. Los pasos se analizaron para ciclos de tres pasos y se midieron tres parámetros: (1) longitud de la zancada - la distancia media entre un paso y el siguiente; (2) ancho de la base trasera - la distancia media entre las huellas traseras

izquierda y derecha; y (3) longitud de desplegado - la distancia diagonal entre las patas traseras contralaterales cuando el animal camina.

Ejemplo 1

Diseño de arreglos de péptidos de dedo de zinc (ZFP) para enlazar repeticiones de CAG

Se sabe que los dominios de dedo de zinc se pueden concatenar para formar cadenas de varios dedos (por ejemplo, 6 dedos) (Moore et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (4): 1437-1441; y Kim & Pabo (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(6): 2812-2817), pero hasta la fecha no se ha reportado una exploración sistemática de los modos de unión de ZFP de diferente longitud a tramos largos repetitivos de ADN.

Los inventores, por lo tanto, utilizaron un diseño racional para construir un dominio de dedo de zinc (ZF_xHunt) que se uniría a la secuencia 5'-GC(A/T)-3' en ADN bicatenario. Por lo tanto, se esperaba que las proteínas de múltiples dedos que comprenden matrices de ZfxHunt se unieran a secuencias de poli-GCA y poli-GCT (véase Materiales y métodos más arriba y la Figura 1). Ambas cadenas de ADN de la repetición bicatenaria de CAG fueron dirigidas porque: (i) se pensó que esto aumentaría la avidéz de los péptidos de dedo de zinc por dianas cromosómicas de baja copia; y (ii) permitía ensayar los diseños de fusión de nucleasa Fok-I (como se describe más adelante). Para tratar de evitar que los péptidos de dedo de zinc de la invención perdieran su registro con ADN afín (después de 3 o más dedos adyacentes y 9 pares de bases contiguos de ADN de doble hélice), se diseñaron cuidadosamente las secuencias enlazadoras. En particular, se moduló la longitud de los enlazadores entre los dedos de zinc adyacentes en las matrices. De esta forma, el registro entre las matrices más largas de péptidos de dedo de zinc, especialmente en la unión con ADN_{bc}, podría ser optimizado. Utilizando consideraciones estructurales, se decidió modificar periódicamente las secuencias enlazadoras canónicas estándar en las matrices. Por lo tanto, se incluyeron secuencias enlazadoras de tipo canónico que contenían un residuo Gly (o Ser) extra o secuencias enlazadoras flexibles (hasta 29 residuos) en la matriz de dedos de zinc larga después de cada 2 y 6 dedos respectivamente (véase la Tabla 1 y las SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 12 y 14). De esta manera, se podría probar diferentes números de dedos de zinc para la discriminación óptima dependiente de la longitud.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de la estructura del péptido de dedo de zinc y de los ácidos nucleicos que las codifican. En las secuencias de aminoácidos, las secuencias de reconocimiento están subrayadas y las secuencias enlazadoras se muestran en negrita.

Secuencia de aminoácidos de ZF4xHunt (SEQ ID NO: 6)

FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHRTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHRTKIH

Secuencia de ácido nucleico de ZF4xHunt (SEQ ID NO: 7)

TTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGTCATATTCGCACC
 CATAACCGGTGAAAAACCGTTTTCGGTTCGATATTTGCGGTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCGACCCTG
 CAGCGCCATACCAAATTCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCAGGATTTGCATGCGTAAT
 TTTTCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATATTCGCACCCATACTGGTGAAAAACCGTTTGCCTGC
 GATATTTGCGGTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCTACCTTACAGCGCCATACCAAATTCAT

Secuencia de aminoácidos de ZF6xHunt (SEQ ID NO: 8)

FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHRTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHRTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHRTKIH

Secuencia de ácido nucleico de ZF6xHunt (SEQ ID NO: 9)

5

10

15

20

25

30

35

(continuación)

TTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGTCATATTCGCACC
 CATAACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCAGACCCTG
 CAGCGCCATAACAAAATTCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGTAAT
 TTTAGCCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCATATTCGTACCCATAACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGC
 GATATTTGTGGCCGTAAATTTGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATAACAAAATTCATAACCGGT
 TCTGAACGGCCGTTTCAGTGCGAGGATTTGCATGCGTAATTTTCCCAGCGCGGACCCTGCAGCGC
 CATATTCGCACCCATACTGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTTCGTAAATTTGCGCAG
 CGTGCTACCTTACAGCGCCATAACAAAATTCAT

Secuencia de aminoácidos de ZF11xHunt (SEQ ID NO: 10):

FQCRICMRNFSQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **LRQKDGSGSGSGSGSGSQLVGT AERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH

Secuencia de ácido nucleico de ZF11xHunt (SEQ ID NO: 11):

TTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATAACAAAATTC
 CACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGTAATTTTAGCCAGCGTGCAGACC
 CTGCAGCGCCATATTCGTACCCATAACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGTGGCCGTAAA
 TTTGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATAACAAAATTCATAACCGGTTCTGAACGGCCGTTTCAG
 TGCAGGATTTGCATGCGTAATTTTCCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATATTCGCACCCATACT
 GGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCTACCTTACAGCGC
 CATAACAAAATTCATCTGCGCCAGAAAGATGGTGGCGGCGGCTCAGGTGGCGGCGGTAGTGGTGGC
 GGCGGCTCACAAGTAGTCGGTACCGCCGAGCGCCCTTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTT
 AGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGTCATATTCGCACCCATAACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGAT
 ATTTGCGGTTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCATAACAAAATTCACACCGGATCC
 GAACGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGTAATTTAGCCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCAT
 ATTCGTACCCATAACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGTGGCCGTAAATTTGCCAGCGC
 GCGACCCTGCAGCGCCATAACAAAATTCATAACCGGTTCTGAACGGCCGTTTCAGTGCGAGGATTTGC
 ATGCGTAATTTTCCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATATTCGCACCCATACTGGTGAAAAACCG
 TTTGCCTGCGATATTTGCGGTTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCTACCTTACAGCGCCATAACAAAATTC
 AT

Secuencia de aminoácidos de ZF12xHunt (SEQ ID NO: 12):

(continuación)

FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **LRQKDGGGSGGGGSQLVGTAEPR**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH

Secuencia de ácido nucleico de ZF12xHunt (SEQ ID NO: 13):

TTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGTCATATTCGCACC
 CATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCGACCCTG
 CAGCGCCATACCAAATTCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGTAAT
 TTTAGCCAGCGTGCGACCCTGCAGCGCCATATTCGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGC
 GATATTTGTGGCCGTAAATTTGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATACCAAATTCATACCGGT
 TCTGAACGGCCGTTTCAGTGCCAGGATTTGCATGCGTAATTTTTCCAGCGCGGACCCTGCAGCGC
 CATATTCGCACCCATACTGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTCGTAAATTTGCGCAG
 CGTGCTACCTTACAGCGCCATACCAAATTCATCTGCGCCAGAAAGATGGTGGCGGGCGCTCAGGT
 GCGGGCGGTAGTGGTGGCGGGCTCACAACTAGTCGGTACCGCCGAGCGCCCTTCCAGTGCCGC
 ATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGTCATATTCGCACCCATACCGGTGAA
 AAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCGACCCTGCAGCGCCATACC
 AAAATTCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGTAATTTTAGCCAGCGT
 GCGACCCTGCAGCGCCATATTCGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGTGGC
 CGTAAATTTGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATACCAAATTCATACCGGTTCTGAACGGCCG
 TTTAGTGCCAGGATTTGCATGCGTAATTTTTCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATATTCGCACC
 CATACTGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCTACCTTA
 CAGCGCCATACCAAATTCAT

Secuencia de aminoácidos de ZF18xHunt (SEQ ID NO: 14):

FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **LRQKDGGGSQLVGTAEPR**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **LRQKDGGGSGTAERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH

(continuación)

Secuencia de ácido nucleico de ZF18xHunt (SEQ ID NO: 15):

```

TTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGACCCTGCAGCGTCATATTCGCACC
CATACCGGTGAAAAACCGTTTTCGCGTGCATATTTGCGGTTCGTAATTTGCGCAGCGTGCAGACCCTG
CAGCGCCATACCAAATTCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGTAAT
TTTAGCCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCATATTCGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGC
GATATTTGTGGCCGTAATTTGCCAGCGCGCGACCCTGCAGCGCCATACCAAATTCATACCGGT
TCTGAACGGCCGTTTCAGTGCCAGGATTTGCATGCGTAATTTTCCAGCGCGCGACCCTGCAGCGC
CATATTCGCACCCATACTGGTAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTTCGTAATTTGCGCAG
CGTGCTACCTTACAGCGCCATACCAAATTCATCTGCGCCAGAAAGATGGTGGCGGCTCACAACCTA
GTCCGTACCGCCGAGCGCCCTTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGCGACC
CTGCAGCGTCATATTCGCACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTTCGCGTGCATATTTGCGGTTCGTA
TTTTCGCGCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCATACCAAATTCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAG
TGCCGTATTTGCATGCGTAATTTTAGCCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCATATTCGTACCCATACC
GGTAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGTGGCCGTAATTTGCCAGCGCGCGACCCTGCAGCGC
CATACCAAATTCATACCGGTTCTGAACGGCCGTTTCAGTGCCAGGATTTGCATGCGTAATTTTCC
CAGCGCGCGACCCTGCAGCGCCATATTCGCACCCATACTGGTAAAAACCGTTTGCCTGCGATATT
TGCGGTTCGTAATTTGCGCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCATACCAAATTCATCTGCGCCAGAAA
GATGGTGGCGGCTcaggtaccGCCGAGCGCCCTTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGC
CAGCGCGCGACCCTGCAGCGTCATATTCGCACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTTCGCGTGCATATT
TGCGGTTCGTAATTTGCGCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCATACCAAATTCACACCGGATCCGAA
CGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGTAATTTTAGCCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCATATT
CGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGTGGCCGTAATTTGCCAGCGCGCG
ACCCTGCAGCGCCATACCAAATTCATACCGGTTCTGAACGGCCGTTTCAGTGCCAGGATTTGCATG
CGTAATTTTCCAGCGCGCGACCCTGCAGCGCCATATTCGCACCCATACTGGTAAAAACCGTTT
GCCTGCGATATTTGCGGTTCGTAATTTGCGCAGCGTGCAGTACCTTACAGCGCCATACCAAATTCAT

```

Ejemplo 2

5

Unión de péptidos de dedo de zinc a secuencias diana de ADN *in vitro*

Para mostrar que los péptidos de dedo de zinc de la invención son capaces de unirse a secuencias de repetición de CAG, se llevaron a cabo ensayos de desplazamiento en gel *in vitro* como sigue.

10

Se construyeron matrices de péptidos de dedo de zinc que contenían 4, 6 o 12 dominios de ZFxHunt y se analizaron en ensayos de desplazamiento en gel, para unión a sondas de CAG bicatenarias (Figura 1B). Estos resultados muestran que los ZFP más largos produjeron una unión más completa de la sonda. Curiosamente, se observaron distintos complejos enlazados en el desplazamiento en el gel, lo que indica que los ZFP encontraron equilibrios termodinámicos individuales y no fueron atrapados por intermediarios cinéticos. Se podría esperar que las secuencias de ADN y de dedo de zinc altamente repetitivas formaran eventos de unión parciales contiguos, lo que se esperaba que produjera extensas manchas en el desplazamiento en el gel; pero éste no era el caso. Notablemente, el ZFP de 12 dedos produjo un desplazamiento secundario inferior, que presumiblemente es causado por un subproducto de degradación de 6 dedos (los dedos de zinc pueden ser inestables en regiones enlazadoras; Miller et al. (1985) EMBO J. 4 6): 1609 - 1614). Se cree que los constructos de 12 dedos y posteriormente de 18 dedos (véase más adelante) descritos en este documento son las cadenas de ZFP artificiales funcionales más largas jamás construidas.

15

20

Para probar si los dominios de dedos de zinc ZFxHunt eran capaces de unirse a ambas cadenas de una sonda de ADN de repetición de CAG, se ensayó ZF6xHunt (es decir, el péptido de 6 dedos) por desplazamiento en gel y se demostró que se unía por igual tanto a la sonda repetitiva de CAG, (GCA)₆ (SEQ ID NO: 98), como a una sonda de CAG-CTG alternativa (GCA-GCT)₃ (SEQ ID NO: 99), como se muestra en la Figura 1C. Además, cuando se compara con secuencias mutadas, ZF6xHunt mostró especificidad por la secuencia (CAG)₇ (SEQ ID NO: 100) (véase la Figura 1D).

25

En resumen, se sintetizaron los ZFP de 4, 6 y 12 dedos y se demostró que eran capaces de unirse a sondas de ADN poli 5'-GC(A/T)-3' *in vitro*; y se demostró que los ZFP más largos se unían de manera más específica y eficiente a sus secuencias diana.

30

Ejemplo 3

35

Represión de genes informadores poliQ *in vivo*

La actividad intracelular del dominio de dedo de zinc ZFxHunt se ensayó *in vivo* usando vectores informadores con números diferentes de repeticiones de 5' CAG en marco con EGFP (Q0, Q10, Q35 y Q104, donde Q = CAG y el número indica el número de repeticiones). Para evaluar si hubo efectos no específicos causados por las proteínas de dedo de zinc, se clonó el informador HcRed en una región diferente del mismo vector, bajo un promotor independiente (Figura 2A).

Las células HEK293T se cotransfectaron transitoriamente con los vectores informador y ZFxHunt indicados, en los que la expresión de los dedos de zinc fue impulsada por promotores de CMV. Se llevaron a cabo tres series de ensayos: cuantificación de EGFP y células fluorescentes HcRed usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS); niveles de proteína EGFP en transferencias Western; y niveles de ARNm de EGFP y HcRed en qRT-PCR (Figuras 2B a 2D). Mientras que las repeticiones de CAG más cortas (Q0, Q10) no fueron afectadas esencialmente por ninguno de los péptidos ZF4, ZF6, ZF11 o ZF18xHunt, los blancos de repetición de CAG más largos (Q35, Q104) fueron fuertemente reprimidos en los tres ensayos, por ejemplo, una represión de hasta 10 veces de EGFP por FACS, lo que equivale a una reducción del 90% (Figura 2B).

También se encontró que las cadenas de dedos de zinc más largas producían una mayor represión de la expresión génica diana como la determinada en qRT-PCR (Figura 2D). Se encontró que la proteína de 6 dedos, ZF6xHunt, era óptima en FACS (Figura 2B) y transferencia Western (Figura 2C).

Para probar el potencial de represión aún más fuerte, se fusionó el dominio Kox-1 de represión de KRAB (Groner et al., PLoS Genet 6 (3): e1000869) al extremo terminal C de las proteínas ZFxHunt (Figuras 2E a 2G; Tabla 2). Como era de esperar, la represión de Kox-1 fue realmente mucho más fuerte. Por ejemplo, había una reducción del 98% de las células verdes por FACS para Q35-EGFP y Q104-EGFP, con niveles indetectables de proteína EGFP por análisis de transferencia Western (Figura 2F). Aunque la represión era generalmente más fuerte, aún era proporcional a la longitud de ZFP y CAG: por ejemplo, el constructo EGFP que carecía de repeticiones de CAG no se reprimió, y los constructos que tenían repeticiones de CAG más largas (por ejemplo, Q35) se reprimieron más fuertemente que constructos de repetición más cortos (por ejemplo, Q10-EGFP). En este ensayo, se encontró que la proteína ZF11xHunt-Kox-1 proporcionaba el nivel más fuerte de represión, como se muestra en las Figuras 2E y G. Esto demuestra que, con diseños de enlazadores adecuados, las cadenas largas que contienen números impares de dedos de zinc también pueden funcionar. Además, se demuestra que el mecanismo de la represión de HcRed mediada por Kox-1 depende de la presencia de repeticiones de CAG largas en el plásmido. El nivel no deseado de represión del gen vecino (HcRed) con proteínas Kox-1 puede ser debido a los efectos a largo plazo de Kox-1 en la estructura de la cromatina.

Se llevó a cabo un ensayo similar para probar la capacidad de los péptidos ZF4, ZF6 y ZF12xHunt para inhibir la expresión del informador episomal cuando se fusiona con el dominio de la nucleasa Fok1 y los resultados se muestran en las Figuras 3A a 3C. Los resultados de estos experimentos fueron similares a los reportados para péptidos de dedo de zinc "desnudos" (es decir, carentes del dominio Kox-1), aunque la reducción en la fluorescencia celular medida por FACS fue menos significativa para las proteínas de fusión Fok1. Los resultados sugieren que el dominio de la nucleasa Fok1 puede actuar por impedimento estérico en estos ensayos porque no se observó escisión de ADN y el nivel de represión fue similar a los dedos de zinc desnudos (sin ningún dominio de represión, que sólo puede funcionar mediante mecanismos estéricos).

Con el fin de comprobar que estos resultados no eran puramente específicos para ZFP bajo el control del promotor de CMV, también se llevaron a cabo ensayos equivalentes con los ZFP que son expresados bajo el control del promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK). Como se ilustra en la Figura 4, se obtuvieron esencialmente los mismos resultados para los constructos del péptido de dedo de zinc desnudo.

Es importante destacar que no se observó ninguna represión no específica de HcRed con ZFP desnudo, lo que sugiere que se requiere la unión específica de las proteínas ZFxHunt a repeticiones de CAG largas para la represión.

En resumen, en ensayos de transfección transitoria, las proteínas ZFxHunt desnudas reprimen específicamente la expresión de un gen informador que contiene 35 o más repeticiones de CAG. Las proteínas ZFxHunt fusionadas al dominio Kox-1 tuvieron un efecto represivo más fuerte y redujeron la expresión de todos los genes informadores que contenían CAG, teniendo los constructos más largos un ligero efecto en un gen informador vecino de control.

Tabla 2: Péptido del dominio Kox-1 y secuencias de ácido nucleico que lo codifican, y péptido enlazador del dominio efector de dedo de zinc y secuencias de ácido nucleico que lo codifican.

Secuencia de aminoácidos del dominio Kox-1 (SEQ ID NO: 16):

SSLSPQHSVAVTQGSIIKNKEGMDAKSLTAWSRITLVTFKDFVDFDTREEWKLKLLDTAQQIVYRNVMLE
 NYKNLVS LGYQLTKPDVILRLEKGEPPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV

Secuencia de ácido nucleico del dominio Kox-1 (SEQ ID NO: 17):

TCTAGTTTGTCTCCTCAGCACTCTGCTGTCACCTCAAGGAAGTATCATCAAGAACAAGGAGGGCATG
 GATGCTAAGTCACTAACTGCCTGGTCCCGGACACTGGTGACCTTCAAGGATGTATTTGTGGACTTC
 ACCAGGGAGGAGTGGAAAGCTGCTGGACACTGCTCAGCAGATCGTGTACAGAAATGTGATGCTGGAG
 AACTATAAGAACCTGGTTTCCTTGGGTTATCAGCTTACTAAGCCAGATGTGATCCTCCGGTTGGAG
 AAGGGAGAAGAGCCCTGGCTGGTGGAGAGAGAAATTCACCAAGAGACCCATCCTGATTCAGAGACT
 GCATTTGAAATCAAATCATCAGTT

Secuencia del péptido del dominio efector de dedos de zinc (SEQ ID NO: 18):

LRQKGGGGSGGGSGGGGSQLV

Secuencia de ácido nucleico del dominio efector de dedos de zinc (SEQ ID NO: 19):

CTGCGCCAGAAAGATGGTGGCGGGCTCAGGTGGCGGGGTAGTGGTGGCGGGCTCACAAC
 TCACTGTC

Ejemplo 4

5

Ensayos de unión de competición para la represión de repeticiones largas de CAG

Para el uso terapéutico humano, los ZFP deben reprimir preferencialmente los alelos mutantes largos de CAG y tener menos efecto en los alelos cortos de wt (por ejemplo, 10 a 29 repeticiones, la longitud de *htt* wt varía en la población humana, pero usualmente está en este intervalo; mediana = 18). Por lo tanto, se desarrolló un ensayo de competencia para medir la preferencia de longitud directamente. Las células HEK293T se cotransfectaron con tres plásmidos: los vectores informadores indicados poliQ-EGFP y poliQ-mCherry, junto con diversos vectores ZFxHunt.

10

La expresión relativa de los dos reporteros se midió mediante FACS (células positivas para EGFP o mCherry), y los resultados se muestran en la Figura 5. En la fila superior, las cajas de color gris claro representan altos niveles de expresión de proteína GFP, mientras que las cajas de color gris oscuro representan bajos niveles de expresión de proteínas GFP; en la fila del medio, las cajas de color gris claro representan altos niveles de expresión de la proteína mCherry, mientras que las cajas de color gris oscuro representan niveles bajos de expresión de la proteína mCherry; y en la fila inferior, las cajas claras (gris) representan niveles más altos de expresión de la proteína GFP en comparación con mCherry, las cajas de color gris oscuro representan mayores niveles de expresión de la proteína mCherry en comparación con GFP. Los resultados demuestran que las repeticiones de CAG más largas son preferiblemente dirigidas y reprimidas por todos los péptidos ZFxHunt, de modo que las células están dominadas por la expresión de los constructos verdes o rojos más cortos cuando el número de secuencias de repetición de CAG de su contraparte opuesta es más largo. Esto se observa directamente mirando la proporción de la expresión de verde con respecto a rojo en la fila inferior, en la que la esquina superior derecha de cada cuadrícula es un tono más claro, lo que indica mayores niveles de expresión de GFP; y la esquina inferior izquierda de cada cuadrícula es un tono más oscuro, lo que indica mayores niveles de expresión de mCherry. Todos los constructos, de cadenas de hasta 18 dedos, demuestran la represión activa de los informadores de repetición de CAG más largos.

15

20

25

30

El experimento se repitió utilizando los mismos péptidos de dedo de zinc fusionados al dominio efector de Fok1 (nucleasa), y se observaron los mismos resultados generales (datos no mostrados). Este resultado confirma una vez más que las proteínas de dedo de zinc son capaces de unirse a ambas cadenas de la secuencia de repetición de CAG y que las proteínas de dedo de zinc de la invención son capaces de dirigirse preferencialmente a repeticiones de CAG expandidas.

35

Es posible que la inhibición selectiva de secuencias diana más largas se deba al menos parcialmente a un efecto de acción de masa (es decir, las repeticiones de CAG más largas contienen más sitios de unión potenciales para los péptidos de dedo de zinc). Sin embargo, también es posible que en el caso de matrices más largas de dedos de zinc y secuencias de repetición de CAG más cortas, los péptidos puedan competir entre sí por el sitio de unión, y como consecuencia, las matrices más largas de dedos de zinc pueden unirse más transitoriamente o más débilmente (por ejemplo, a secuencias de reconocimiento parciales o por debajo del óptimo).

40

Ejemplo 5

Represión cromosómica de *htt* mutante

5 A continuación, se probaron los efectos de los péptidos represores de los dedos de zinc, ZF6xHunt y ZF11xHunt, sobre genes cromosómicos *htt*. Las células *STHdh* (Trettel et al. (2000) Hum. Mol. Genet. 9 (19): 2799-2809) son una línea celular progenitora neuronal establecida a partir de primordios estriados E14, derivados de ratones wt (*STHdh*^{Q7} / *Hdh*^{Q7}) o modificados por introducción de ADNc, donde el primer exón del gen *htt* de ratón con 7 repeticiones de CAG ha sido reemplazado por un exón humano con 111 repeticiones de CAG (*STHdh*^{Q111} / *Hdh*^{Q111}). Las células *STHdh* que expresan de manera estable péptidos ZF6xHunt y ZF11xHunt desnudos o fusionados a Kox-1 se recogieron 20 días después de la infección retroviral, y se analizaron los niveles de *htt* mediante transferencia Western y qRT-PCR. El experimento se repitió independientemente dos veces, y se obtuvieron resultados similares en ambas ocasiones. Los resultados de un experimento se muestran en la Figura 6.

15 Tal como se ilustra en la Figura 6A, ni los niveles de proteína ni de ARN de *htt* wt (Q7) se redujeron por ZF6xHunt y ZF11xHunt fusionados con Kox-1. Por el contrario, se reprimieron los niveles de ARN y de proteína de *htt* mutante-Q111 con ZF6xHunt-Kox-1 hasta 2,5 veces (60% de reducción) y 2 veces (50% de reducción), respectivamente. ZF11xHunt-Kox-1 mostró una represión aún más fuerte, con casi 80% de reducción en la expresión de ARNm y 95% de reducción en los niveles de proteína. ZF6xHunt y ZF11xHunt desnudos tenían menos efecto reprimiendo el gen mutante cromosómico *htt*, lo que sugiere que el efecto de represión de Kox-1 más fuerte puede ser beneficioso para la represión cromosómica de *htt*.

20 Ejemplo 6

Especificidad de la represión en genomas de tipo silvestre

25 Los genomas normales contienen varios genes endógenos que se sabe que tienen secuencias de repetición de CAG. Por lo tanto, se ensayaron los efectos secundarios potenciales de las proteínas ZFxHunt expresadas de forma estable en las células mediante qRT-PCR para los genes wt atrofina1, ataxina-1, ataxina-2, ataxina-3, ataxina-7, subunidad α 1A del canal de calcio y la proteína de unión TATA que contienen todos, las secuencias de repetición de CAG. El número de secuencias de repetición de CAG en cada gen de tipo silvestre se muestra en la Tabla 3 a continuación.

30 Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras 6B y 6C. Como se ilustra, no se midieron efectos adversos ni en células de ratón *STHdh* (Figura 6B), ni en células humanas HEK293T (Figura 6C). En este último, incluso *htt* humano, que tiene la mayoría de las repeticiones de CAG en esta línea celular particular (21 repeticiones), tampoco fue reprimido.

35 Dado que la represión de Kox-1 se propaga mediante el establecimiento de heterocromatina (Groner et al., PLoS Genet 6 (3): e1000869), también se probaron los efectos de ZF6xHunt-Kox-1 y ZF11xHunt-Kox-1 en genes vecinos *htt*, en células *STHdh* transducidas en forma estable, por qRT-PCR (Figura 6B). Los dos genes adyacentes, del receptor quinasa 4 acoplado a la proteína G, que está aproximadamente 7 kb secuencia arriba; y se ensayaron la señalización de la proteína G 12, que está aproximadamente 188 kb secuencia abajo, y se encontró que no se ve afectada por la presencia de las proteínas represoras de los dedos de zinc. Esto sugiere que ambos genes vecinos están fuera del intervalo de los efectos de Kox-1.

40 Los resultados indican que tanto la represión por ZF6xHunt-Kox-1 como por ZF11xHunt-Kox-1 es específica para *htt* mutante en loci cromosómicos.

45 Tabla 3: Número de repeticiones de CAG por gen y conjuntos de cebadores correspondientes para qRT-PCR. Prefijos del nombre: h = humano; m = ratón. El número aproximado de repeticiones de CAG para los genes de tipo silvestre se obtuvo a partir de datos de ARNm del GenBank.

50

Gen	Longitud de la repetición de CAG	Cebador directo (SEQ ID NO:)	Cebador inverso (SEQ ID NO:)
EGFP	0-104	CCTGAAGTTCATCTGCACCA (50)	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG (51)
HcRed	0	AGATGCTGCGGAAGAAGAAG (52)	GGTACCGTCCGACTGCAGAA (53)
hHPRT	N/A	CTTTGCTTTCCCTTGGTCAGG (54)	TATCCAACACTTCGTGGGGT (55)
hATN1	15	GTCTCCCTCCGATCTGGATA (56)	CACACTTCAGGGCTGTAGA (57)
hATXN1	12	CCAGCACCGTAGAGAGGATT (58)	AGCCCTGTCCAAACACAAA (59)
hATXN2	13	GACGCAGCTGAGCAAGTTAG (60)	GAAGGAACGTGGGTTGAACT (61)

(continuación)

Gen	Longitud de la repetición de CAG	Cebador directo (SEQ ID NO:)	Cebador inverso (SEQ ID NO:)
hATXN3	7	AGAGCTTCGGAAGAGACGAG (62)	ACTCCCAAGTGCTCCTGAAC (63)
hATXN7	10	AACTGTGTGGCTCACTCTGG (64)	TGGGAAGATGTTACCGTTGA (65)
hCACNA1A	13	GGGAACTACACCCTCCTGAA (66)	CGCTGCTTCTTCTCCTCTT (67)
hTBP	19	ACGCCGAATATAATCCCAAG (68)	CTTCACTCTTGGCTCCTGTG (69)
hHtt	21	CAGATGTCAGAATGGTGGCT (70)	GCCTTGAAGATTAGAATCCA (71)
mATN1	3	CACCTGCCTCCACCTCATGGC (72)	ATGCTCCTTGGGGGCCCTGG (73)
mATXN1	2	TGTGGAGAGAATCGAGGAGA (74)	CAGCCCTGTCCAAATACAAA (75)
mATXN2	6	ATCCCAATGCAAAGGAGTTC (76)	CTGCTGATGACCCACCATAG (77)
mATXN3	5	ACCTCGCACTATTCTTGGCT (78)	TGCATCTGTTGGACCTTGAT (79)
mATXN7	5	TGCCCGTGTTCCCTACCGGA (80)	GCGCGGAGACAGTGGTTGCT (81)
mCACNA1A	2	CACTGGCAATAGCAAAGGAA (82)	TTCTTGAGCGAGTTCACCAC (83)
mTBP	3	ACTTCGTGCAAGAAATGCTG (84)	GCTCATAGCTCTTGGCTCCT (85)
mGRK4	N/A	TCCTGGCTTTGAGGAGCCGA (86)	CCACAGCACAGCTCTGCAGCAT (87)
mRgs12	N/A	GGGGGCTCAAGCAGGCATGG (88)	GGGAGCCAGCCTCCGAGTCA (89)
mHtt	7 o 111	CAGATGTCAGAATGGTGGCT (90)	GCCTTGAAGATTAGAATCCA (91)
mHPRT	N/A	GGTTAAGCAGTACAGCCCA (92)	AGAGGTCCTTTTACCAGCA (93)
M13	N/A	GTA AACGACGGCCAG (94)	CAGGAAACAGCTATGAC (95)

Ejemplo 7

5 Ensayo de toxicidad celular

Puesto que sería ventajoso para una terapia con represor de ZFP tener una toxicidad baja, se llevaron a cabo un ensayo de viabilidad de células marcadas con colorante para probar la toxicidad (no específica) de los ZFP.

10 Se transfectaron células HEK-293T con 400 ng de los constructos de vectores indicados usando Lipofectamina 2000 y se recolectaron 48 horas después de la transfección. Como control, se usaron células únicamente con Lipofectamina 2000 o no transfectadas (negativas). La citotoxicidad se analizó utilizando el ensayo de toxicidad celular de guayaba (PCA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se presentan como el porcentaje de células muertas, medio apoptóticas y viables (véase la Figura 7), en las que las barras expresan resultados de al menos 3 experimentos independientes.

15 Estos datos muestran que no se produjeron efectos de toxicidad estadísticamente significativos en células que expresan péptidos de dedo de zinc de la invención, en comparación con experimentos de control. Además, ZF6xHunt-Kox-1 y ZF11xHunt-Kox-1 se toleraron durante más de 20 días después de la transfección retroviral estable, sin efectos celulares adversos evidentes. En general, las propiedades represoras de los péptidos de dedo de zinc de la invención y su potencial para la expresión estable, particularmente de las proteínas ZF6xHunt-Kox-1 y ZF11xHunt-Kox-1, sugieren que los péptidos de la invención tienen un potencial significativo para aplicaciones terapéuticas génicas.

20 Ejemplo 8

25 Represión del gen *htt* mutante en un modelo de ratón para la enfermedad de Huntington

Tal como se describió anteriormente, los inventores han diseñado cadenas largas de proteína de dedo de zinc (ZFP) para reprimir preferencialmente genes diana con aproximadamente 35 o más repeticiones de CAG. También se ha demostrado que la expresión estable de las proteínas de dedo de zinc de la invención en una línea de células modelo de HD reduce la expresión cromosómica del gen *htt* mutante (con 111 repeticiones de CAG), tanto a nivel de proteína como de ARNm. Mientras tanto, el gen *htt* de tipo silvestre más corto (con 7 repeticiones de CAG en esta línea celular particular de ratón) no se vio afectado, al igual que otros genes de repetición de CAG genómicos de tipo silvestre.

Los ratones R6/2 son un modelo animal bien establecido para el estudio de HD y de compuestos terapéuticos potenciales. Estos ratones expresan el exón 1 del gen HD humano con aproximadamente 150 repeticiones de CAG. Los ratones R6/2 tienen un inicio temprano de los síntomas de HD y una progresión rápida de la enfermedad, mostrando una esperanza de vida de 12 a 17 semanas (Gil & Rego (2009) Brain Res. Rev. 59: 410-431).

En este estudio, se analizaron las proteínas de dedo de zinc de la invención en cuanto a su capacidad para reducir la expresión del *htt* mutante en un modelo de ratón transgénico de HD, de acuerdo con la línea de tiempo que se muestra a continuación.

En primer lugar, se insertaron las proteínas represoras ZF6xHunt-Kox-1, ZF11xHunt-Kox-1 y ZF12xHunt-Kox-1 en vectores del virus adeno-asociado (AAV) (subtipo AAV2/1, Molecular Therapy (2004) 10: 302-317). En experimentos paralelos, los vectores de AAV de dedo de zinc se inyectan en el cuerpo estriado de ratones R6/2 con el fin de mediar la expresión de proteínas de fusión ZFP-Kox-1 en células estriadas. La capacidad de las proteínas de fusión ZFP-Kox-1 expresadas en células estriadas para reducir los síntomas de HD en ratones R6/2 se evalúa durante un periodo de al menos 20 semanas analizando periódicamente el comportamiento y los síntomas de ratones R6/2 infectados con AAV de dedo de zinc, así como los niveles de expresión de la proteína *htt* mutante, en comparación con los ratones R6/2 de control infectados con un vector de control AAV - GFP.

Cronología:

- Semana 0: - Ratones R6/2 recién nacidos.
- Semana 4: - Inyección estereotáctica en el cuerpo estriado de ratones R6/2 con AAV, por ejemplo, ZF6xHunt-Kox-1-ires-GFP y AAV-GFP de control.
- Semana 4 a 20: - Prueba de comportamiento semanal: prueba en barra rotatoria acelerada, agarre de las patas traseras y análisis de la longitud de la zancada.
- Cada dos semanas: sacrificio de ratones para qRT-PCR para comprobar la reducción de la expresión de fragmentos de HD mutante e inmunohistoquímica para mostrar una reducción en los agregados poliQ y la expresión de otros marcadores neuronales tales como DARPP-32 y NeuN.

Se demuestra que las proteínas de fusión ZFP-Kox1 de la invención reducen la expresión de la proteína *htt* mutante, mejoran las anomalías motoras y neuropatológicas y prolongan la longevidad (es decir, la edad de los ratones que mueren naturalmente antes del sacrificio), de ratones R6/2 en comparación con los controles negativos.

Ejemplo 9

El suministro estriatal de dedos de zinc en ratones R6/2 causa la represión dependiente de la dosis de la huntingtina mutante y atenúa los fenotipos de la enfermedad

Se demostró que el péptido ZF11xHunt-Kox-1 era eficaz para inhibir la expresión de *htt* mutante en la línea celular del modelo *STHdh* (Ejemplo 5). Por lo tanto, para probar la capacidad de los péptidos de dedo de zinc de la invención para tratar / aliviar la HD *in vivo* en un modelo de ratón HD, se usaron virus AAV para suministrar ZF11xHunt-Kox-1 al área del cerebro afectada en ratones R6/2.

ZFxHunt fusionado a Kox-1 reduce la expresión de *htt* mutante *in vivo*

Se inyectaron estereotáxicamente ratones R6/2 hembra a las 4 semanas de edad con virus AAV2/1 que expresaban ZF11xHunt-Kox-1, bajo un promotor de CAG con elementos WPRE (Garg et al. (2004) J. Immunol., 173: 550 - 558). Las inyecciones fueron en el cuerpo estriado de un hemisferio cerebral, con inyecciones de control de AAV2/1-GFP en el otro.

El análisis por qRT-PCR mostró los niveles de expresión más altos de ZF11xHunt-Kox-1 en el cuerpo estriado inyectado de ratones de 6 semanas de edad (véase la Figura 8A). Al mismo tiempo, se redujeron los niveles de ARNm del transen *htt* mutante en estas porciones del cerebro en más del 45% (en promedio), en comparación con los niveles medidos en el hemisferio de control (véase la Figura 8B).

Además, en el análisis de regresión lineal, se observó que los niveles de ARNm de ZF11xHunt-Kox-1 se correlacionaban negativamente y estrechamente con los niveles de ARNm de *htt* mutante ($r^2 = 0,79$; $p = 0,0072$), lo cual es consistente con una represión dependiente de la dosis *in vivo* de *htt* mutante por el constructo de dedo de zinc.

Los niveles de represión del ARNm de *htt* mutante alcanzaron hasta 60% en algunos de los ratones analizados a la semana 6. Notablemente, esta represión era específica para el *htt* mutante, puesto que *htt* wt no se alteró en todos los puntos temporales analizados (véase la Figura 8C). Sin embargo, la expresión del ZFP se redujo significativamente a la semana 8, y concomitantemente, los niveles de represión del gen *htt*, aunque sigue siendo estadísticamente significativa, se redujo al 20% en comparación con el hemisferio de control. A las 10 semanas después de la inyección, los niveles de expresión de ZFP se redujeron considerablemente y los niveles de *htt* mutante no se redujeron en comparación con el hemisferio de control.

Se obtuvieron resultados similares en ratones inyectados en un solo hemisferio con AAV-ZF11xHunt-Kox-1, en comparación con hemisferios de control no inyectados (datos no mostrados).

ZFxHunt Kox-1 retrasa la expresión de síntomas conductuales en ratones R6/2

En un experimento doble ciego, ratones R6/2 macho y sus compañeros de camada de tipo silvestre fueron tratados en ambos hemisferios, a las 4 semanas de edad, con AAV2/1-ZF11xHunt-Kox-1 o AAV2/1-GFP (es decir carece de una proteína de represión del dedo de zinc). El estado general de los ratones (peso corporal, fuerza de agarre, comportamiento de agarre) y su comportamiento en diferentes pruebas motoras de comportamiento (barra rotatoria que acelera, actividad en campo abierto, huella de pata) se analizaron dos veces al mes, a partir de la tercera semana de edad (previo a la cirugía).

De forma consistente con el pico observado de represión a las 6 semanas de edad (Figura 8B), las mayores mejoras en los síntomas de HD se encontraron entre las semanas 5 y 7. Por ejemplo, ZF11xHunt-Kox-1 claramente retrasó el inicio del comportamiento de agarre en comparación con los ratones de control R6/2 tratados con AAV2/1-GFP o no operados, como se muestra en la Figura 9A. Por tanto, mientras que tanto los ratones R6/2 tratados con GFP como los no tratados comenzaron a sujetarse a la semana 5, este comportamiento de enfermedad no se detectó en este momento en ninguno de los ratones tratados con ZF11xHunt-Kox-1 a las 5 semanas de edad. Además, a la semana 7, cuando el 67% de los ratones en los grupos control exhibían la agarre, solamente el 25% de los ratones tratados exhibían tal comportamiento.

En la prueba de campo abierto, la distancia recorrida y la velocidad media no variaron entre ratones R6/2 tratados y no tratados. Sin embargo, el tiempo transcurrido en el centro del campo abierto en la semana 7 se incrementó en ratones tratados con GFP, con respecto a ambos grupos de ratones de tipo silvestre, pero no en ratones tratados con ZF11xHunt-Kox-1 (Mediciones repetidas ANOVA: interacción significativa del grupo x semana, $p < 0,01$, comparaciones después de esto por pares en la semana 7: WT-GFP frente a R6/2-GFP, $p < 0,001$; WT-ZF frente a R6/2-ZF, n.s.), como se indica en Figura 9B. Este efecto podría deberse a la dificultad para los ratones R6/2 no tratados en iniciar el movimiento de escape hacia la periferia del campo abierto, o simplemente debido a una reactividad disminuida.

En el ensayo de barra rotatoria con aceleración, se encontró también que el tratamiento con ZF11xHunt-Kox-1 atenúa la disminución del rendimiento con la edad, con respecto a los niveles previos a la cirugía (Mediciones repetidas ANOVA: efecto principal significativo del Grupo, $p < 0,05$; comparaciones después de esto entre grupos: WT-GFP frente a R6/2-GFP, $p < 0,05$; WT-ZF frente a R6/2-ZF, n.s.), y los resultados se muestran en la Figura 9C.

Sin embargo, la fuerza de agarre y los parámetros de la marcha medidos en el ensayo de impresión de la pata no revelaron ninguna diferencia notable entre los grupos, ni la pérdida de peso ni el tiempo de supervivencia (véase la Figura 9D).

En resumen, los datos *in vivo* en los modelos de la enfermedad de Huntington son consistentes con una mejora parcial de los síntomas debidos a la expresión de la proteína represora de los dedos de zinc, que coincidía con un pico en la represión del dedo de zinc a las 6 semanas. Sin embargo, la pérdida en la expresión de ZFP a lo largo del tiempo permitió que los síntomas de HD volvieran a los ratones tratados, indicó que el control y tratamiento de los síntomas es transitorio: es decir, dependiente de la expresión del represor de ZFP en estas pruebas. Aunque el sistema CAG-WPRE ya está diseñado para ser una mejora en los constructos de expresión anteriores (Garg et al., (2004) J. Immunol., 173: 550-558), es posible que se puedan conseguir mejoras adicionales si aumentaron el nivel de expresión del dedo de zinc y la duración. Por lo tanto, los datos aquí proporcionados demuestran tanto la represión mediada por dedo en zinc del gen *htt* *in vivo*, como la mejora parcial del fenotipo de la enfermedad.

Ejemplo 10

Variantes de secuencia ZFxHunt para mejorar el empaquetado viral

La hélice de dedo de zinc QRATLQR fue diseñada racionalmente, como se describe en otra parte de este documento, y se demostró que se unía específicamente al ADN de *htt* con alta afinidad cuando se concatenaba en cadenas de ZFP largas. Sin embargo, esto requiere la realización de constructos de expresión de ADN y proteína altamente repetitivos, que en algunos casos pueden estar por debajo del óptimo para empaquetado viral en aplicaciones de terapia génica con AAV2.

5 Por lo tanto, para idear una solución a este problema potencial, se decidió hacer una serie de variantes del ZFP que conservan la funcionalidad de unión de ADN / reconocimiento de ácido nucleico deseada de los ZFP descritos en la presente memoria. Por consiguiente, las secuencias de aminoácidos de las hélices de reconocimiento de ácido nucleico se variaron ligeramente usando las reglas conocidas de reconocimiento de ácido nucleico de dedo de zinc (por ejemplo, tal como se ha revisado en Pabo et al. (2001), *Annu Rev. Biochem*, 70: 313-340).

10 También es posible variar las secuencias de la cadena principal de ZFP de forma conservadora sin afectar a la funcionalidad de los dedos de zinc. Por lo tanto, en uno o más dominios de dedo de zinc, los residuos de la cadena principal que forman el pliegue beta-beta-alfa también se pueden variar para evitar la repetición indeseable de secuencias.

Además, como ya se ha expuesto anteriormente, las secuencias enlazadoras de ZFP entre dominios adyacentes de dedos de zinc también se pueden variar en secuencia, si se desea.

15 En este ejemplo, por lo tanto, para optimizar el empaquetamiento viral, se hicieron varias variantes de ZFxHunt, incluyendo la secuencia ejemplificada a continuación (SEQ ID NO: 108), que tiene cadenas principales de dedos de zinc y hélices α ligeramente alteradas y ensayada para la unión a las secuencias diana de repetición CAG apropiadas. Las cadenas principales alteradas se basan en diferentes secuencias de dedo de zinc que se unen al ADN, incluyendo dedos de zif268 y sp1 de tipo silvestre. Además, con el fin de reducir el tamaño del constructo de AAV2 en aprox. 240 pb, se removieron también la etiqueta del epítipo FLAG y un dominio ZFxHunt, resultando en un paquete viral de tamaño óptimo que codifica un péptido de 10 dedos.

25 El ZFP ZF10xHunt resultante se dirige y se une a las secuencias CAG repetitivas con alta afinidad y especificidad, al igual que los ZFP previamente descritos. Además, se demostró que el ZFP ZF10xHunt retiene una fuerte actividad de represión de *HTT* en ensayos episomales, como se muestra en la Figura 10. Se usó un ensayo episomal, que implicó transfección transitoria seguido de FACS para células fluorescentes. Los constructos informadores de poli-CAG-GFP codifican para repeticiones CAG 0 (pEH), 10 (Q10), 35 (Q35) y 104 (Q104), respectivamente. Como se muestra en la Figura 10(a) los dedos de zinc de ZF10xHunt-Kox-1 reprimen el gen informador GFP fusionado. Para comparación, el control pTarget no contiene dedos de zinc. Sin embargo, como se muestra en la Figura 10(b), las fusiones Kox-1-ZFP también reprimieron ligeramente un gen HcRed de control en el mismo plásmido, cuyo efecto es probable que se deba al reclutamiento de factores de represión de la cromatina.

35 Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de ZF10xHunt y secuencias de ácidos nucleicos que los codifican. En el reconocimiento de secuencias de aminoácidos, las secuencias están subrayadas y las secuencias enlazadoras se muestran en negrita. Los aminoácidos mutados en las secuencias de reconocimiento se muestran en minúsculas.

Secuencia de aminoácidos de ZF10xHunt (SEQ ID NO: 108):

YACPVESCDRRFSQRATL**t**RHIRIH **TGQKP**
 FQCRI CMRNFSQRATL**s**RHIRTH **QNKKGS**
 HICHIQCGKQVYQORATLQ**R**HLRWH **TGERP**
 FMCTWSYCGKRFTQORATLQ**R**HKRTH **LRQKGERP**
 YACPVESCDRRFSQRATL**s**RHIRIH **TGEKP**
 YKCP E CGKSFSQRATLQ**R**HQORTH **TGSERP**
 FMCNWSYCGKRFTQORATL**t**RHKRTH **TGEKP**
 FACPE CPKRFMORATLQ**R**HIKTH **TGSEKP**
 FQCRI CMRNFSQRATLQ**R**HIRTH **TGERP**
 FACDI CGRKFAQORATLQ**R**HTKIH

Secuencia de ácido nucleico de ZF10xHunt (SEQ ID NO: 109):

TACGCCTGCCCTGTGGAGTCCTGCGATAGAAGATTTTCCCAGAGAGCAACCCCTGACCAGACATATT
 CGGATTCACACCGGCCAGAAGCCATTCCAGTGCAGAATCTGTATGCGGAACTTTTCCCAGAGAGCC
 AACTGTCTCGGCACATTCGCACTCATCAGAATAAGAAAGGGTCTCACATCTGCCATATTCAGGGG
 TGTGGCAAAGTGTATGGACAGCGAGCCACCCTGCAGCGACACCTGAGGTGGCATAACGGAGAGAGG
 CCCTTCATGTGCACATGGAGTTACTGTGGCAAGAGGTTACCCAGCGAGCTACACTGCAGAGACAC
 AACCGACACATCTGCGACAGAAGGACGGAGAGCGACCATATGCATGCCAGTCGAAAGTTGTGAT
 AGGAGATTCTCACAGCGCGCTACTCTGAGCCGCCACATCCGAATTCATACCGGCGAGAAACCTTAC
 AAGTGCCCAAGATGTGGAAAGAGCTTTTCCCAGAGAGCAACTCTGCAGAGGCACCAGAGAACCCAT
 ACAGGCAGTGAGCGGCCCTTCATGTGCAACTGGTCATATTGTGGAAAAGGTTTACCCAGAGAGCT
 ACTCTGACCCGGCACAACGCACACATACTGGCGAGAAGCCTTTCGCTTGCCCCGAATGTCCTAAG
 CGGTTTATGCAGCGCGCAACACTGCAGCGGCACATCAAAACCCATACAGGAAGCGAGAAGCCTTTC
 CAGTGCCGAATTTGTATGAGGAATTTTCCCAGAGGGCAACTCTGCAGCGACACATCAGGACTCAT
 ACCGGGGAACGGCCATTCGCCTGCGACATTTGTGGCAGAAAATTTGCACAGCGAGCTACTCTGCAG
 CGACACACCAAAATCCAC

Pépto represor Kox-1 y enlazador del extremo terminal C de ZF10xHunt (SEQ ID NO: 110):

LRQKDA PKKRRKV GGS
 LSPQHSVAVTQGS I IKNKEGMDAKSLTAWSR TLVTFKDV FVDF TREEWKLLD TAQQIVYRNVML EN
 YKNLVS LGLYQLTKPDVILRLEKGE EPWLVERE IHQETHPDSETAFEIKSSV*

Ácido nucleico represor Kox-1 y enlazador del extremo terminal C de ZF10xHunt (SEQ ID NO: 111):

CTGCGCCAGAAGGATGCTCCCAAGAAAAAGAGGAAAGTGGGCGGATCTCTGAGTCCTCAGCACTCC
 GCAGTCACCCAGGGATCTATCATCAAGAACAAGGAGGGGATGGACGCAAAGTCACTGACAGCCTGG
 AGCCGCACACTGGTGACTTTCAAAGACGTGTTTCGTCGACTTCACCAGGGAGGAATGGAAGCTGCTG
 GACTGCCCAGCAGATCGTGTACAGGAATGTCATGCTGGAAA ACTATAAGAATCTGGTGAGCCTG
 GGATACCAGCTGACCAAACCAGATGTCATTCTGAGACTGGAGAAGGGGGAGGAACCCTGGCTGGTG
 GAACGGGAGATTCATCAGGAAACCCACCCAGATTCAGAGACAGCATTTGAGATTAAGTCATCCGTC

Variantes de ZFxHunt

- 5 Para demostrar que la actividad de unión deseable para las secuencias diana de ácido nucleico de repetición de CAG no se limita únicamente a las secuencias de reconocimiento de aminoácidos de hélices α ejemplificadas anteriormente, se construyeron más variantes de secuencia de ZFxHunt y se ensayó la actividad de unión. Las mutaciones de las secuencias de ZFP de la invención descritas en los Ejemplos anteriores se enfocaron principalmente en las secuencias de reconocimiento de hélices α .
- 10 Se realizaron variaciones de secuencia funcionales y conservadoras en las secuencias de aminoácidos de varias hélices α de los ZFP, y se demostró que los ZFP resultantes se unían a secuencias de poli-CAG. Los ejemplos de secuencias de reconocimiento se muestran en la Tabla 5. En la siguiente tabla, las secuencias de reconocimiento originales de los ZFP se muestran alineadas con la secuencia de ácido nucleico diana (anterior) con ejemplos
- 15 secuencias de variantes conservadoras (a continuación). Como se muestra, hasta el 50% de la secuencia de reconocimiento puede variarse usando sustituciones conservadoras.

Tabla 4: Arriba - hélices de dedo de zinc se muestran en la dirección de la proteína del extremo terminal N - C, alineadas 3' - 5' con la cadena de reconocimiento de ADN primario. Arriba/mitad - las mutaciones funcionalmente conservadoras están subrayadas en las secuencias de reconocimiento (arriba y mitad). Abajo - secuencia genérica para unir las secuencias de repetición de CAG mostradas. Los dedos de zinc variantes se pueden combinar en cualquier número y orden y función en estructuras de dedo de zinc de diferentes longitudes, incluyendo ZF11xHunt.

Alineación de reconocimiento de aminoácido - ácido nucleico	
ZFxHunt wt	
QRATLQR QRATLQR QRATLQR QRATLQR QRATLQR QRATLQR ...etc (por ejemplo, 11 repeticiones)	
3'-a c g a c g a c g a c g a c g a c g -5' DNA	
QRATLSR <u>QL</u> ATLQR <u>QSSV</u> LQR <u>QSADL</u> TR QRATLQR <u>QSSEL</u> LQR ...etc (por ejemplo, 11 repeticiones)	
ZFxHunt variante	
Ejemplos de variantes de secuencias de reconocimiento de CAG	
QRATLQR	(SEQ ID NO: 1)
QRATLTR	(SEQ ID NO: 102)
QRATLSR	(SEQ ID NO: 103)
<u>QL</u> ATLQR	(SEQ ID NO: 104)
<u>QSSV</u> LQR	(SEQ ID NO: 105)
<u>QSADL</u> TR	(SEQ ID NO: 106)
<u>QSSEL</u> LQR	(SEQ ID NO: 107)
Secuencia de reconocimiento genérica de CAG	
Q(R/L/S)(A/S)(T/V/D/E)L(Q/T/S)R	(SEQ ID NO: 101)

Discusión

En estos Ejemplos, se ha descrito el diseño de péptidos de dedo de zinc capaces de reconocer y unir ambas cadenas de ADN de un tramo de repeticiones de CAG, mediante el reconocimiento tanto tripletes de poli-GCA como de poli-GCT; y se muestra que tales proteínas son capaces de inducir la represión de la transcripción de genes diana tanto *in vitro* como *in vivo*.

Recientemente, Mittelman et al. (2009), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (24): 9607-9612 emplearon un enfoque de ZFP diferente para explorar la inestabilidad del tramo de CAG, después de inducir roturas bicatenarias con fusiones de nucleasa de Fok-I de 3 dedos emparejadas. Se describieron dos proteínas ZFP, zFGCT (secuencia de reconocimiento helicoidal alfa: QSSDLTR; (SEQ ID NO: 96) y zFGCA (QSGDLTR, SEQ ID NO: 97), diseñadas para reconocer GCT y GCA, respectivamente. Se observaron eventos de escisión que inducen el acortamiento del tramo CAG en hasta 1 en 10⁴ colonias celulares.

También se probaron originalmente los péptidos de dedo de zinc de la invención, ZFxHunt (con la secuencia de reconocimiento, QRATLQR; SEQ ID NO: 1) como fusiones con FokI y se encontró que reducían la transcripción de poli-CAG-EGFP de una manera similar al ZFP desnudo (Figura 3). Este efecto es mucho más fuerte que un efecto de nucleasa puesto que GFP se reprime en aproximadamente un 85% de las células, según se evaluó mediante FACS de células transfectadas transitoriamente. Además, se cree que el efecto está en el nivel de ARN ya que tanto los niveles de ARN como de proteína se redujeron (Figura 3). Los plásmidos informadores se extrajeron de células transfectadas y se secuenciaron para buscar cambios de marco no homólogos de unión en el extremo que podrían explicar la represión de EGFP observada (es decir, hasta aproximadamente 85% de reducción). Sin embargo, no se pudo detectar ningún cambio de marco no homólogo de unión en el extremo en los 30 plásmidos que se extrajeron y secuenciaron. Esto sugiere que los efectos de represión transcripcional de los péptidos de dedo de zinc simplemente a través de la unión a sus secuencias diana es mucho más fuerte que cualquier posible efecto de nucleasa; e indica que el mecanismo de acción de los péptidos ZFxHunt de la invención es completamente diferente al mecanismo reportado por Mittelman et al.

También se ha demostrado que los péptidos de dedo de zinc desnudos (es decir, que carecen de dominios efectores adicionales) pueden ser inhibidores altamente eficaces de la expresión génica diana (la expresión de poliQ-EGFP se redujo hasta un 90%), particularmente cuando el número de repeticiones de CAG es igual o superior a 35. Este es un hallazgo significativo, ya que el número de repeticiones de CAG en los genes de tipo silvestre en el genoma humano (incluido el gen *htt*), es menor de 35. Sin estar vinculado por la teoría, es probable que el mecanismo de represión en estos casos se deba al impedimento estérico de la progresión del complejo de ARN polimerasa, según lo informado por Choo et al. Para un ZFP sintético contra el oncogén *Bcr-Abl* (Choo et al. (1994) Nature 372 (6507): 642-645).

Se encontró que la fusión del dominio de represión de Kox-1 a los péptidos de dedo de zinc de la invención reducía adicionalmente la expresión de genes diana. En estos experimentos, se demostró que la represión requería de la unión a las repeticiones de CAG, ya que los vectores de control que carecían de repeticiones de CAG no se vieron afectados. Sin embargo, en algunos casos también hubo un efecto represivo sobre un control del gen informador vecino, HcRed, especialmente para los objetivos más largos. Esta falta de especificidad, sin embargo, es probable que sea un efecto del dominio represor específico más que del péptido de dedo de zinc: se sabe que Kox-1 recluta al co-represor KAP-1 e induce una represión a largo plazo a través de la propagación de heterocromatina (Groner et al., PLoS Genet. 6 (3): e1000869).

Aunque se ha demostrado que la reducción parcial de la proteína htt más corta de tipo silvestre se tolera hasta 4 meses en modelos animales (Boudreau et al. (2009) Mol. Ther. 17 (6): 1053-1063), se considera generalmente que una terapia segura y eficaz para HD debe preferencialmente dirigirse al alelo de *htt* mutante. Usando un ensayo competitivo, se ha demostrado que los péptidos de dedo de zinc de la invención reprimen preferencialmente la expresión de genes informadores que contienen más de 35 repeticiones de CAG, lo que sugiere que son una promesa significativa para una estrategia terapéutica para reducir los niveles de proteína huntingtina mutante en pacientes heterocigotos.

Cabe señalar que existen algunas diferencias relevantes entre la represión cromosómica y plasmática, que presumiblemente reflejan el número de copias diana y la accesibilidad dentro de la cromatina. Episomalmente, se ha demostrado que los péptidos de 6 dedos solo son represores efectivos de los genes diana. Sin embargo, la represión de Kox-1 parece ser demasiado fuerte para la discriminación óptima de la longitud. Por el contrario, en los loci endógenos, las proteínas de fusión Kox-1 parecen ser mejores para la represión mutante, mientras se evita el alelo de tipo silvestre. En este caso, los constructos Kox-1 de 6 y 11 dedos son fuertes represores tanto de la expresión de proteína diana como de ARN. Después de 20 días de expresión estable de los péptidos de dedo de zinc, se encontró que la proteína de 11 dedos exhibía la represión más fuerte del alelo diana mutante. De hecho, cuando se fusionan con el dominio de represión Kox-1, los péptidos de dedo de zinc más activos de la invención fueron capaces de reducir dramáticamente los niveles de la proteína mutante endógena en un 95% y los niveles del ARNm mutante en aproximadamente un 80%, con un efecto insignificante sobre la expresión del alelo de tipo silvestre, o sobre cualquier otro gen que contenga un número de tipo silvestre de repeticiones de CAG. Por lo tanto, la expresión terapéutica sostenida es potencialmente factible.

La terapia génica es una estrategia terapéutica atractiva para diversas enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, se han utilizado vectores lentivirales para mediar la expresión generalizada y a largo plazo de transgenes en células que no se dividen, tales como neuronas maduras (Dreyer, Methods Mol. Biol. 614: 3-35). Un vector rAAV también fue utilizado por Rodriguez-Lebron et al. (2005) Mol. Ther. 12 (4): 618-633, para proporcionar los ARNph de Htt anti-mutantes en ratones modelo HD; reduciendo así los niveles de mHtt en el estriado y retardando la progresión del fenotipo de tipo HD. Además, como ARNi (Van Bilsen y otros (2008) Hum. Gene Ther. 19 (7): 710 - 719, Zhang y otros (2009) J. Neurochem 108 (1): 82 - 90, Pfister et al (2009) Curr. Biol. 19 (9): 774 - 778) y LNA (Hu et al (2009) Natl. Biotechnol. 27 (5): 478-484 y Hu et al (NY Acad. Sci. 1175: 24-31) han mostrado recientemente ser prometedores para el tratamiento de HD, es probable que los vehículos de administración adecuados se optimicen en los próximos años, y el enfoque complementario de ZFP descrito aquí probablemente se beneficiaría de tales avances.

Por consiguiente, se ha desarrollado y utilizado una línea celular modelo derivada de células estriatales de un modelo de ratón HD con introducción de ADN (Trettel et al (2000) Hum. Mol. Gen. 9 (19): 2799-2809) para demostrar los efectos de los péptidos de dedo de zinc de la invención bajo condiciones terapéuticas apropiadas (es decir, alelos de una sola copia en loci cromosómicos).

rAAV parece un sistema de administración prometedor, por lo que se usa para administrar el gen ZF11xHunt-Kox-1 al cuerpo estriado del ratón modelo R6/2 para HD. Inicialmente se produjo y probó AAV2/1 que expresa el ZFP en virtud de un promotor de CMV, pero observamos muy bajos niveles de expresión del ZFP y su ARNm, y no represión de *htt* mutante (datos no presentados). Los promotores de CMV pueden silenciarse rápidamente mediante metilación del ADN (Migliaccio et al. (2000) Gene, 3, 256 (1-2): 197-214), aunque se pueden conseguir niveles altos y persistentes de expresión en el sistema nervioso central con rAAV utilizando el promotor de CAG y un WPRE (revisado en Tenenbaum et al. (2004) J. Gene Med., 6 Suppl 1: S212-22). Por lo tanto, se produjo un nuevo rAAV utilizando estos elementos, y se notó una expresión significativamente mejor en comparación con rAAV-CMV. Con una mejor expresión, se observó una represión significativa del transgén *htt* mutante en estriado de cerebro de R6/2, en comparación con el estriado de control, mientras que la expresión del gen wt no se alteró. Sin embargo, incluso con el constructo de expresión rAAV mejorado, se observó la reducción de la expresión del ZFP con el tiempo, con una reducción concomitante en la represión de *htt* mutante. La disminución de la expresión del ZFP con el tiempo podría deberse al silenciamiento del promotor, como en el caso del promotor de CMV, o a la inestabilidad del ADN de ZFP que permanece como ADN extracromosómico en células estriadas quiescentes.

Coincidente con los niveles de expresión reducida de *htt* mutante a las 6-8 semanas de edad, los ratones mostraron un retraso en el inicio de muchos síntomas característicos de HD de la línea del modelo R6/2. Específicamente, se encuentra un retraso en el inicio del comportamiento de agarre, así como una atenuación de los déficits en la barra rotatoria con aceleración (Menalled et al., (2009) Neurobiol., Dis. 35: 319-336). Sin embargo, dado que la expresión del represor de ZFP se había reducido en las semanas 9 a 10, no se pudo demostrar, en estos estudios, una mejor fuerza

de agarre (que comienza a disminuir alrededor de la semana 9), parámetros de marcha y locomoción mejorados o un mejor tiempo de supervivencia y de peso corporal. Es probable que esto esté relacionado con la represión transitoria observada en nuestras muestras de cerebro, de modo que los efectos observados se deban a un efecto agudo del tratamiento y no a un fallo del ZFP para reprimir el gen diana *htt* mutante.

En general, los resultados presentados en este estudio establecen que los ZFP pueden reprimir *htt* mutante *in vivo* (vía inyección estriatal), de una manera dependiente de la dosis; y que, como resultado, hay algunas mejoras conductuales claras y reducción en los síntomas de la enfermedad de Huntington. Se cree que estos resultados y el tratamiento de la enfermedad de Huntington se mejoraría aún más mediante mayores niveles de expresión de los ZFP y/o mediante el mantenimiento de la expresión durante períodos más largos.

En conclusión, dado que la reducción de los niveles de proteína huntingtina mutante mejora las anomalías motoras y neuropatológicas, y también prolonga la longevidad en modelos de ratón HD (Rodriguez-Lebron et al., (2005) Mol. Ther. 12 (4): 618-633; (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (16): 5820-5825, Wang et al. (2005) Neurosci Res. 53 (3): 241-249 y Harper (2009) Arch Neurol. 66 (8): 933-938), las proteínas de dedo de zinc desarrolladas aquí son muy prometedoras para el tratamiento de enfermedades basadas en poliglutamina; así como otros trastornos genéticos asociados con secuencias repetidas, por ejemplo, repeticiones de trinucleótidos que tiene al menos 10 repeticiones.

Listado de secuencias

<110> Fundacio Privada Centre de Regulacio Genomica (CRG)

<120> Péptidos y Usos

<130> P25341WO

<150> EP10187818.9

<151> 2010-10-15

<160> 113

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

<400> 1

Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg
1 5

<210> 2

<211> 0

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura del péptido de dedo de zinc sintético

<400> 2

000

<210> 3

<211> 0

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura del péptido de dedo de zinc sintético

<400> 3

000
<210> 4
<211> 0
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Estructura del péptido de dedo de zinc sintético

10 <400> 4
000

<210> 5
<211> 0
<212> PRT
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Estructura del péptido de dedo de zinc sintético

20 <400> 5
000

<210> 6
<211> 108
25 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido de dedo de zinc sintético

30 <400> 6

ES 2 626 205 T3

Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu
 1 5 10 15

Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp
 20 25 30

Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr
 35 40 45

Lys Ile His Thr Gly Ser Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met
 50 55 60

Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His
 65 70 75 80

Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala
 85 90 95

Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His
 100 105

<210> 7
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de dedo de zinc sintético

<400> 7

ttccagtgcc gcatttgtat gcgcaacttt agccagcgcg cgaccctgca gcgtcatatt 60
 cgcacccata ccggtgaaaa accgtttgcg tgcgatattt gcggtcgtaa atttgcgcag 120
 cgtgcgaccc tgcagcgcca taccaaaatt cacaccggat ccgaacggcc gtttcagtgc 180
 aggatttgca tgcgtaattt ttcccagcgc gcgaccctgc agcgccatat tgcacccat 240
 actggtgaaa aaccgtttgc ctgcgatatt tgcggtcgta aatttgcgca gcgtgctacc 300
 ttacagcgcc ataccaaaat tcat 324

<210> 8
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 626 205 T3

<223> Péptido de dedo de zinc sintético

<400> 8

Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu
1 5 10 15

Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp
20 25 30

Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr
35 40 45

Lys Ile His Thr Gly Ser Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met
50 55 60

Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His
65 70 75 80

Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala
85 90 95

Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Glu
100 105 110

Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala
115 120 125

Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala
130 135 140

Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg
145 150 155 160

His Thr Lys Ile His
165

5

<210> 9

<211> 495

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

ES 2 626 205 T3

<220>

<223> Ácido nucleico que codifica el péptido de dedo de zinc sintético

<400> 9

5

```

ttccagtgcc gcatttgtat gcgcaacttt agccagcgcg cgaccctgca gcgatcatatt      60
cgcacccata ccggtgaaaa accgtttgcg tgcgatattt gcggtcgtaa atttgcgag      120
cgtgcgaccc tgcagcgcca taccaaaatt cacaccgat ccgaacggcc gtttcagtgc      180
cgtatttgca tgcgtaattt tagccagcgt gcgaccctgc agcgccatat tcgtacccat      240
accggtgaaa aaccgtttgc ctgcatattt tgtggccgta aatttgccca gcgcgcgacc      300
ctgcagcgcc ataccaaat tcataccggt tctgaacggc cgtttcagtg caggatttgc      360
atgcgtaatt tttcccagcg cgcgaccctg cagcgccata ttcgcacca tactggtgaa      420
aaaccgtttg cctgcatat ttgctgctgt aaatttgcgc agcgtgctac cttacagcgc      480
cataccaaaa ttcatt                                     495

```

<210> 10

<211> 331

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Péptido de dedo de zinc sintético

<400> 10

15

ES 2 626 205 T3

Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu
 1 5 10 15
 Gln Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Glu Arg Pro Phe Gln Cys
 20 25 30
 Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His
 35 40 45
 Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly
 50 55 60
 Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His
 65 70 75 80
 Thr Gly Ser Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
 85 90 95
 Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu
 100 105 110
 Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala
 115 120 125

Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly
 130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Leu Val
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
 165 170 175

Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu
 180 185 190

Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala
 195 200 205

Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Glu Arg Pro Phe
 210 215 220

Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln
 225 230 235 240

Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile
 245 250 255

Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys
 260 265 270

Ile His Thr Gly Ser Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg
 275 280 285

Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr
 290 295 300

Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln
 305 310 315 320

Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His
 325 330

ES 2 626 205 T3

<210> 11
 <211> 993
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico que codifica el péptido de dedo de zinc sintético

 10 <400> 11

 ttccagtgcc gcatttgtat gcgcaacttt agccagcgcg cgaccctgca gcgccatacc 60
 aaaattcaca ccggatccga acggccggtt cagtgcgta tttgcatgcg taatttttagc 120
 cagcgtgcca ccctgcagcg ccatattcgt acccataccg gtgaaaaacc gtttgcctgc 180
 gatatttgtg gccgtaaatt tgcccagcgc gcgaccctgc agcgccatac caaaattcat 240
 accggttctg aacggccggt tcagtgcaag atttgcattg gtaatttttc ccagcgcgcg 300
 accctgcagc gccatattcg caccatact ggtgaaaaac cgtttgcctg cgatatttgc 360
 ggtcgtaaat ttgocgagcg tgctacctta cagcgcata ccaaaattca tctgcgccag 420
 aaagatggtg gcggcggctc aggtggcggc ggtagtggcg gcggcggctc acaactagtc 480
 ggtaccgccg agcgcgccct ccagtgccgc atttgtatgc gcaacttttag ccagcgcgcg 540
 accctgcagc gtcattattcg caccatacc ggtgaaaaac cgtttgcctg cgatatttgc 600
 ggtcgtaaat ttgocgagcg tgccaccctg cagcgcata ccaaaattca caccgatcc 660
 gaacggccgt tcagtgccg tatttgcattg cgtaatttta gccagcgtgc gaccctgcag 720
 cgccatattc gtaccatac cggtgaaaaa ccgtttgcct gcgatatttg tggccgtaaa 780
 tttgccagc gcgcgaccct gcagcgcatt accaaaattc ataccggttc tgaacggccg 840
 tttcagtgca ggatttgcatt gcgtaatttt tcccagcgcg cgaccctgca gcgccatatt 900
 cgcaccata ctggtgaaaa accgtttgcg tcgatattt gcggtcgtaa atttgcgag 960
 cgtgctacct tacagcgcca taccaaaatt cat 993

 15 <210> 12
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Péptido de dedo de zinc sintético

 <400> 12

ES 2 626 205 T3

Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala
 85 90 95
 Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Glu
 100 105 110
 Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala
 115 120 125
 Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala
 130 135 140
 Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg
 145 150 155 160
 His Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 165 170 175
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Leu Val Gly Thr Ala Glu
 180 185 190
 Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala
 195 200 205
 Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala
 210 215 220
 Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg
 225 230 235 240
 His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile
 245 250 255
 Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg
 260 265 270
 Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys
 275 280 285
 Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly
 290 295 300
 Ser Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln
 305 310 315 320
 Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro

ES 2 626 205 T3

325

330

335

Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu
 340 345 350

Gln Arg His Thr Lys Ile His
 355

<210> 13
 <211> 1077
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico que codifica el péptido de dedo de zinc sintético

<400> 13

ttccagtgcc gcatttgtat gcgcaacttt agccagcgcg cgaccctgca gcgtcatatt 60
 cgcaccata ccggtgaaaa accgtttgcg tgcgatattt gcggtcgtaa atttgcgcag 120
 cgtgcgaccc tgcagcgcca taccaaaatt cacaccgat ccgaacggcc gtttcagtgc 180
 cgtatttgca tgcgtaattt tagccagcgt gcgaccctgc agcgccatat tcgtacccat 240
 accggtgaaa aaccgtttgc ctgcatattt tgtggccgta aatttgccca gcgcgcgacc 300
 ctgcagcgcc ataccaaat tcataccggt tctgaacggc cgtttcagtg caggatttgc 360
 atgcgtaatt tttcccagcg cgcgaccctg cagcgccata ttcgcacca tactggtgaa 420
 aaaccgtttg cctgcgatat ttgcggtcgt aaatttgcgc agcgtgctac cttacagcgc 480
 catacaaaa ttcattctgcg ccagaaagat ggtggcggcg gctcaggtgg cggcggtagt 540
 ggtggcggcg gctcacaact agtcggtacc gccgagcgcc ctttcagtg ccgcatttgt 600
 atgcgcaact ttagccagcg cgcgaccctg cagcgtcata ttcgcacca taccggtgaa 660
 aaaccgtttg cgtgcgatat ttgcggtcgt aaatttgcgc agcgtgcgac cctgcagcgc 720
 catacaaaa ttcacaccgg atccgaacgg ccgtttcagt gccgtatttg catgcgtaat 780
 tttagccagc gtgcgaccct gcagcgccat attcgtacct ataccggtga aaaaccgttt 840
 gcctgcgata tttgtggccg taaatttgcc cagcgcgcga ccctgcagcg ccatcaaaa 900
 attcataccg gttctgaacg gccgtttcag tgcaggattt gcatgcgtaa tttttcccag 960
 cgcgcgaccc tgcagcgcca tattcgcacc cactactggtg aaaaaccggt tgcctgcgat 1020
 atttgcggtc gtaaatttgc gcagcgtgct accttacagc gccatacaaa aattcat 1077

<210> 14
 <211> 528
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de dedo de zinc sintético

5

<400> 14

ES 2 626 205 T3

Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu
 1 5 10 15
 Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp
 20 25 30
 Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr
 35 40 45
 Lys Ile His Thr Gly Ser Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met
 50 55 60
 Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His
 65 70 75 80
 Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala
 85 90 95
 Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Glu
 100 105 110
 Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala
 115 120 125
 Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala
 130 135 140
 Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg
 145 150 155 160
 His Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gln Leu
 165 170 175
 Val Gly Thr Ala Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn
 180 185 190
 Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly
 195 200 205
 Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg
 210 215 220
 Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Glu Arg Pro
 225 230 235 240

ES 2 626 205 T3

Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu
 245 250 255
 Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp
 260 265 270
 Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr
 275 280 285
 Lys Ile His Thr Gly Ser Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met
 290 295 300
 Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His
 305 310 315 320
 Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala
 325 330 335
 Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys
 340 345 350
 Asp Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ala Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile
 355 360 365
 Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg
 370 375 380
 Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys
 385 390 395 400
 Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly
 405 410 415
 Ser Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln
 420 425 430
 Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro
 435 440 445
 Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu
 450 455 460
 Gln Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Glu Arg Pro Phe Gln Cys
 465 470 475 480
 Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His
 485 490 495

ES 2 626 205 T3

Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly
500 505 510

Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His Thr Lys Ile His
515 520 525

<210> 15

<211> 1584

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico que codifica el péptido de dedo de zinc sintético

<400> 15

ES 2 626 205 T3

ttccagtgcc gcatttgtat gcgcaacttt agccagcgcg cgaccctgca gcgtcatatt 60
 cgcacccata ccggtgaaaa accgtttgcg tgcgatattt gcggtcgtaa atttgcgag 120
 cgtgcgaccc tgcagcgcca taccaaaatt cacaccgat ccgaacggcc gtttcagtgc 180
 cgtatttgca tgcgtaattt tagccagcgt gcgaccctgc agcgccatat tcgtaacct 240
 accggtgaaa aaccgtttgc ctgcatatatt tgtggccgta aatttgccca gcgcgcgacc 300
 ctgcatgccc ataccaaaat tcataccggt tctgaacggc cgtttcagtgc caggatttgc 360
 atgcatgtaatt tttcccagcg cgcgaccctg cagcgccata ttcgcaccca tactggtgaa 420
 aaaccgtttg cctgcatat ttgcatgctg aaatttgcgc agcgtgctac cttacagcgc 480
 catacaaaa ttcattctgcg ccagaaagat ggtggcggct cacaactagt cggtaaccgcc 540
 gagcgcacct tccagtgccg catttgtatg cgcaacttta gccagcgcgc gaccctgcag 600
 cgtcatattc gcaccatac ccggtgaaaa ccgtttgcgt gcgatatttg cggtcgtaaa 660
 tttgcgagc gtgcatcct gcagcgccat accaaaattc acaccgatc cgaacggccg 720
 tttcagtgcc gtatttgcatt gcgtaatttt agccagcgtg cgaccctgca gcgcatatt 780
 cgtaccata ccggtgaaaa accgtttgcc tgcgatattt gtggccgtaa atttgcccag 840
 cgcgaccc tgcagcgcca taccaaaatt cataccggtt ctgaacggcc gtttcagtgc 900
 aggatttgca tgcgtaattt tcccagcgc gcgaccctgc agcgccatat tgcacccat 960
 actggtgaaa aaccgtttgc ctgcatatatt tgcggtcgta aatttgcgca gcgtgctacc 1020
 ttacagcgc ataccaaaat tcattctgcg cagaaagatg gtggcggctc aggtaccgcc 1080
 gagcgcacct tccagtgccg catttgtatg cgcaacttta gccagcgcgc gaccctgcag 1140
 cgtcatattc gcaccatac ccggtgaaaa ccgtttgcgt gcgatatttg cggtcgtaaa 1200
 tttgcgagc gtgcatcct gcagcgccat accaaaattc acaccgatc cgaacggccg 1260
 tttcagtgcc gtatttgcatt gcgtaatttt agccagcgtg cgaccctgca gcgcatatt 1320
 cgtaccata ccggtgaaaa accgtttgcc tgcgatattt gtggccgtaa atttgcccag 1380
 cgcgaccc tgcagcgcca taccaaaatt cataccggtt ctgaacggcc gtttcagtgc 1440
 aggatttgca tgcgtaattt tcccagcgc gcgaccctgc agcgccatat tgcacccat 1500
 actggtgaaa aaccgtttgc ctgcatatatt tgcggtcgta aatttgcgca gcgtgctacc 1560
 ttacagcgc ataccaaaat tcat 1584

5 <210> 16
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humana

ES 2 626 205 T3

<400> 16

Ser Ser Leu Ser Pro Gln His Ser Ala Val Thr Gln Gly Ser Ile Ile
 1 5 10 15

Lys Asn Lys Glu Gly Met Asp Ala Lys Ser Leu Thr Ala Trp Ser Arg
 20 25 30

Thr Leu Val Thr Phe Lys Asp Val Phe Val Asp Phe Thr Arg Glu Glu
 35 40 45

Trp Lys Leu Leu Asp Thr Ala Gln Gln Ile Val Tyr Arg Asn Val Met
 50 55 60

Leu Glu Asn Tyr Lys Asn Leu Val Ser Leu Gly Tyr Gln Leu Thr Lys
 65 70 75 80

Pro Asp Val Ile Leu Arg Leu Glu Lys Gly Glu Glu Pro Trp Leu Val
 85 90 95

Glu Arg Glu Ile His Gln Glu Thr His Pro Asp Ser Glu Thr Ala Phe
 100 105 110

Glu Ile Lys Ser Ser Val
 115

5

<210> 17
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Humana

10

<400> 17

tctagtttgt ctctcagca ctctgctgtc actcaaggaa gtatcatcaa gaacaaggag 60
 ggcattggatg ctaagtcact aactgcctgg tcccggacac tgggtgacctt caaggatgta 120
 tttgtggact tcaccaggga ggagtggaag ctgctggaca ctgctcagca gatcgtgtac 180
 agaaatgtga tgctggagaa ctataagaac ctggtttcct tggggttatca gcttactaag 240
 ccagatgtga tcctccggtt ggagaaggga gaagagccct ggctggtgga gagagaaatt 300
 caccaagaga cccatcctga ttcagagact gcatttgaaa tcaaatcatc agtt 354

15

<210> 18

<211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Péptido Sintético

<400> 18

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gln Leu Val
 20

10

<210> 19
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Ácido nucleico que codifica el péptido Sintético

20

<400> 19

ctgcgccaga aagatgggtgg cggcggctca ggtggcggcg gtagtgggtgg cggcggctca 60

caactagtc 69

25

<210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> ENLAZADOR

<400> 20

Thr Gly Glu Lys Pro
 1 5

35

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> ENLAZADOR

45

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA NUEVA
 <222> (3)..(3)
 <223> X puede ser E o Q

50

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA NUEVA
 <222> (4)..(4)
 <223> X puede ser K o R

55

<400> 21

Thr Gly Xaa Xaa Pro
1 5

5 <210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> ENLAZADOR

15 <220>
<221> CARACTERÍSTICA NUEVA
<222> (3)..(3)
<223> X puede ser G o S

20 <220>
<221> CARACTERÍSTICA NUEVA
<222> (4)..(4)
<223> X puede ser E o Q

25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA NUEVA
<222> (5)..(5)
<223> X puede ser K o R

<400> 22

Thr Gly Xaa Xaa Xaa Pro
1 5

30 <210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> ENLAZADOR

<400> 23

Thr Gly Gly Glu Arg Pro
1 5

40 <210> 24
<211> 6
<212> PRT
45 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> ENLAZADOR

<400> 24

Thr Gly Ser Glu Arg Pro
1 5

55 <210> 25
<211> 6
<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ENLAZADOR
 <400> 25

Thr Gly Gly Gln Arg Pro
 1 5

10 <210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> ENLAZADOR
 <400> 26

Thr Gly Ser Gln Arg Pro
 1 5

20 <210> 27
 <211> 6
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ENLAZADOR
 30 <400> 27

Thr Gly Gly Glu Lys Pro
 1 5

35 <210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> ENLAZADOR
 <400> 28

Thr Gly Ser Glu Lys Pro
 1 5

45 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> ENLAZADOR
 55 <400> 29

Thr Gly Gly Gln Lys Pro
1 5

5 <210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> ENLAZADOR
<400> 30

Thr Gly Ser Gln Lys Pro
1 5

15 <210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> ENLAZADOR

25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA NUEVA
<222> (3)..(5)
<223> X es G o S

30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA NUEVA
<222> (6)..(6)
<223> X es E o Q

35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA NUEVA
<222> (7)..(7)
<223> X es K o R

<400> 31

Thr Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro
1 5

40
45 <210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ENLAZADOR

50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA NUEVA
<222> (2)..(4)
<223> X es G o S

55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA NUEVA
<222> (6)..(6)
<223> X es E o Q

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA NUEVA
 <222> (7)..(7)
 <223> X es K o R
 <400> 32

Thr Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Pro
 1 5

10 <210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> ENLAZADOR

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA NUEVA
 <222> (3)..(4)
 <223> X está ausente o G o S

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA NUEVA
 <222> (5)..(5)
 <223> X es E o Q

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA NUEVA
 <222> (6)..(6)
 <223> X es K o R
 <400> 33

Thr Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Pro
 1 5

35 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> ENLAZADOR

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA NUEVA
 <222> (2)..(3)
 <223> X está ausente o G o S

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA NUEVA
 <222> (5)..(5)
 <223> X es E o Q

55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA NUEVA
 <222> (6)..(6)
 <223> X es K o R

60 <400> 34

Thr Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Pro
 1 5

5 <210> 35
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> ENLAZADOR
 <400> 35

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gln Leu Val Gly Thr Ala
 1 5 10 15

Glu Arg Pro

15 <210> 36
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> ENLAZADOR
 <400> 36

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 1 5 10 15

Leu Val Gly Thr Ala Glu Arg Pro
 20

25 <210> 37
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> ENLAZADOR
 <400> 37

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gln Leu Val Gly Thr Ala Glu Arg Pro
 20 25

35 <210> 38
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> ENLAZADOR

<400> 38

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gln Leu Val Gly Thr Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Pro

5 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> ENLAZADOR

<400> 39

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ala Glu Arg Pro
 1 5 10 15

15 <210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> SECUENCIA DE DIRECCIONAMIENTO

25 <400> 40

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5

30 <210> 41
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> SECUENCIA GUÍA

<400> 41

Met Ala Glu Arg Pro
 1 5

40 <210> 42
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> SECUENCIA GUÍA

50 <400> 42

Met Ala Glu Glu Arg Pro
1 5

5 <210> 43
<211> 12
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> unidad repetida
<222> (1)..(12)

<400> 43
ccccgccccg cg 12

15 <210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO

<400> 44

Gln Ala Ala Thr Leu Gln Arg
1 5

25 <210> 45
<211> 7
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO
35 <400> 45

Gln Ala Gln Thr Leu Gln Arg
1 5

40 <210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
45 <223> SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO

<400> 46

Gln Arg Ala Ser Arg Lys Arg
1 5

50 <210> 47
<211> 22
<212> PRT
55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> SECUENCIA DE FLAG

5 <400> 47

Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
 1 5 10 15

Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 20

10 <210> 48
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> ENLAZADOR

<400> 48

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

20 <210> 49
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> SONDA

30 <220>
 <221> región de repetición
 <222> (9)..(11)
 <223> unidad de repetición de cag

35 <400> 49
 acgtaccagt cacagtcagt ccacacgtc 29

40 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> CEBADOR

50 <400> 50
 cctgaagttc atctgcacca 20

55 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CEBADOR

55 <400> 51
 aagtcgtgct gcttcagtg 20

5 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 10 <400> 52
 agatgctgcg gaagaagaag 20
 <210> 53
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 20 <400> 53
 ggtaccgtcg actgcagaa 19
 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 30 <400> 54
 ctttgcttc cttggcagg 20
 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 40 <400> 55
 tatccaacac ttcgtgggt 20
 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 50 <400> 56
 gtctccctcc gatctggata 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 60 <400> 57
 cacactcca gggctgtaga 20

5 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 10 <400> 58
 ccagcaccgt agagaggatt 20
 <210> 59
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 20 <400> 59
 agccctgtcc aaacacaaa 19
 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 30 <400> 60
 gacgcagctg agcaagttag 20
 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 40 <400> 61
 gaaggaacgt gggttgaact 20
 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 50 <400> 62
 agagcttcgg aagagacgag 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 60 <400> 63
 actccaagt gctcctgaac 20

5 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 10 <400> 64
 aactgtgtgg ctcactctgg 20
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 20 <400> 65
 tgggaagatg ttaccgttga 20
 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 30 <400> 66
 gggaactaca ccctcctgaa 20
 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 40 <400> 67
 cgctgcttct tcttctctt 20
 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 50 <400> 68
 acgccgaata taatccaag 20
 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 60 <400> 69
 cttcactctt ggctcctgtg 20

5 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 10 <400> 70
 cagatgtcag aatggtggct 20
 <210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 20 <400> 71
 gccttgaag attagaatcc a 21
 <210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 30 <400> 72
 cacctgcctc cacctcatgg c 21
 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 40 <400> 73
 atgctccttg ggggccctgg 20
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 50 <400> 74
 tgtggagaga atcgaggaga 20
 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 60 <400> 75
 cagcctgtc caaatacaaa 20

5 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 10 <400> 76
 atcccaatgc aaaggagttc 20
 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 20 <400> 77
 ctgctgatga cccaccatag 20
 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 30 <400> 78
 acctcgact attcttggt 20
 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 40 <400> 79
 tgcacatggt ggacctgat 20
 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 50 <400> 80
 tgcccgtggt cctcaccgga 20
 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 60 <400> 81
 gcgcggagac agtggttgct 20

5 <210> 82
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 10 <400> 82
 cactggcaat agcaaaggaa 20
 <210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 20 <400> 83
 ttctgagcg agttcaccac 20
 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 30 <400> 84
 actctgtgca agaatgctg 20
 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 40 <400> 85
 gctcatagct cttggctct 20
 <210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 50 <400> 86
 tcctggcttt gaggagccga 20
 <210> 87
 <211> 22
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 60 <400> 87
 ccacagcaca gctctgcagc at 22

5 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 10 <400> 88
 gggggctcaa gcaggcatgg 20
 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 20 <400> 89
 gggagccagc ctccgagtca 20
 <210> 90
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 30 <400> 90
 cagatgtcag aatggtggct 20
 <210> 91
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 40 <400> 91
 gccttgaag attagaatcc a 21
 45 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> CEBADOR
 <400> 92
 55 ggtaagcag tacagccca 20
 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> CEBADOR
 <400> 93
 65 agagtcctt ttaccagca 20

5 <210> 94
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 10 <400> 94
 gtaaaacgac ggccag 16
 <210> 95
 <211> 17
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR
 20 <400> 95
 caggaaacag ctatgac 17
 <210> 96
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO
 30 <400> 96

 Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg
 1 5
 35 <210> 97
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO
 <400> 97

 Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
 1 5
 45 <210> 98
 <211> 18
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 55 <400> 98
 gcagcagcag cagcagca 18
 <210> 99
 <211> 18
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

ES 2 626 205 T3

<220>
 <223> Sonda
 5 <400> 99
 gcagctgcag ctgcagct 18
 <210> 100
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 15 <400> 100
 cagcagcagc agcagcagca g 21
 <210> 101
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de reconocimiento genérica de CAG
 25 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2) .. (2)
 30 <223> Xaa se selecciona de entre Arg, Leu y Ser
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (3)..(3)
 35 <223> Xaa se selecciona de entre Ala y Ser
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (4)..(4)
 40 <223> Xaa se selecciona de entre Thr, Val, Asp y Glu
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (6)..(6)
 45 <223> Xaa se selecciona de entre Gln, Thr y Ser
 <400> 101
 Gln Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Arg
 1 5
 50 <210> 102
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> secuencia de reconocimiento de CAG
 <400> 102
 60 Gln Arg Ala Thr Leu Thr Arg
 1 5

ES 2 626 205 T3

5 <210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de reconocimiento de CAG

10 <400> 103

Gln Arg Ala Thr Leu Ser Arg
1 5

15 <210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de reconocimiento de CAG

20 <400> 104

Gln Leu Ala Thr Leu Gln Arg
1 5

25 <210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de reconocimiento de CAG

30 <400> 105

Gln Ser Ser Val Leu Gln Arg
1 5

35 <210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de reconocimiento de CAG

40 <400> 106

Gln Ser Ala Asp Leu Thr Arg
1 5

45 <210> 107
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>

55 <220>

<223> secuencia de reconocimiento de CAG

<400> 107

Gln Ser Ser Glu Leu Gln Arg
1 5

5

<210> 108

<211> 292

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del péptido ZF10xHunt

15 <400> 108

Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Gln Arg Ala
1 5 10 15

Thr Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe Gln

ES 2 626 205 T3

			20						25							30
Cys	Arg	Ile	Cys	Met	Arg	Asn	Phe	Ser	Gln	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Arg	
		35					40					45				
His	Ile	Arg	Thr	His	Gln	Asn	Lys	Lys	Gly	Ser	His	Ile	Cys	His	Ile	
	50					55					60					
Gln	Gly	Cys	Gly	Lys	Val	Tyr	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Leu	Gln	Arg	His	
65					70					75					80	
Leu	Arg	Trp	His	Thr	Gly	Glu	Arg	Pro	Phe	Met	Cys	Thr	Trp	Ser	Tyr	
				85					90					95		
Cys	Gly	Lys	Arg	Phe	Thr	Gln	Arg	Ala	Thr	Leu	Gln	Arg	His	Lys	Arg	
			100					105					110			
Thr	His	Leu	Arg	Gln	Lys	Asp	Gly	Glu	Arg	Pro	Tyr	Ala	Cys	Pro	Val	
		115					120					125				
Glu	Ser	Cys	Asp	Arg	Arg	Phe	Ser	Gln	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Arg	His	
	130					135						140				
Ile	Arg	Ile	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Lys	Cys	Pro	Glu	Cys	Gly	
145					150					155					160	
Lys	Ser	Phe	Ser	Gln	Arg	Ala	Thr	Leu	Gln	Arg	His	Gln	Arg	Thr	His	
				165					170					175		
Thr	Gly	Ser	Glu	Arg	Pro	Phe	Met	Cys	Asn	Trp	Ser	Tyr	Cys	Gly	Lys	
			180					185					190			
Arg	Phe	Thr	Gln	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Arg	His	Lys	Arg	Thr	His	Thr	
		195					200					205				
Gly	Glu	Lys	Pro	Phe	Ala	Cys	Pro	Glu	Cys	Pro	Lys	Arg	Phe	Met	Gln	
	210					215					220					
Arg	Ala	Thr	Leu	Gln	Arg	His	Ile	Lys	Thr	His	Thr	Gly	Ser	Glu	Lys	
225					230					235					240	
Pro	Phe	Gln	Cys	Arg	Ile	Cys	Met	Arg	Asn	Phe	Ser	Gln	Arg	Ala	Thr	
				245					250					255		
Leu	Gln	Arg	His	Ile	Arg	Thr	His	Thr	Gly	Glu	Arg	Pro	Phe	Ala	Cys	
			260					265					270			

ES 2 626 205 T3

Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ala Thr Leu Gln Arg His
 275 280 285

Thr Lys Ile His
 290

5 <210> 109
 <211> 876
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ácido nucleico que codifica al péptido ZF10xHunt

<400> 109

tacgcctgcc ctgtggagtc ctgcgataga agatthtccc agagagcaac cctgaccaga 60
 catattcggg ttcacaccgg ccagaagcca ttccagtgca gaatctgtat gcggaacttt 120
 tcccagagag ccacactgtc tcggcacatt cgcactcatc agaataagaa agggctctcac 180
 atctgccata ttcaggggtg tggcaaagtg tatggacagc gagccaccct gcagcgacac 240
 ctgaggtggc ataccggaga gaggcccttc atgtgcacat ggagttactg tggcaagagg 300
 ttcaccagc gagctacact gcagagacac aacggacac atctgcgaca gaaggacgga 360
 gagcgacat atgcatgcc agtcgaaagt tgtgatagga gattctcaca gcgcgctact 420
 ctgagccgcc acatccgaat tcataccggc gagaaacctt acaagtgcc agaatgtgga 480
 aagagctttt cccagagagc aactctgcag aggcaccaga gaaccatac aggcagtgag 540
 cggcccttca tgtgcaactg gtcatattgt ggaaaaggt ttaccagag agctactctg 600
 acccggcaca aacgcacaca tactggcgag aagcctttcg cttgccccga atgtcctaag 660
 cggtttatgc agcgcgcaac actgcagcgg cacatcaaaa cccatacag aagcgagaag 720
 cctttccagt gccgaatttg tatgaggaat ttttcccaga gggcaactct gcagcgacac 780
 atcaggactc ataccgggga acggccattc gcctgcgaca tttgtggcag aaaatttgca 840
 cagcgagcta ctctgcagcg acacacaaaa atccac 876

15 <210> 110
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Enlazador del extremo terminal C de ZF10xHunt y péptido represor de kox-1

<400> 110

ES 2 626 205 T3

Leu Arg Gln Lys Asp Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Ser Pro Gln His Ser Ala Val Thr Gln Gly Ser Ile Ile Lys Asn
 20 25 30

Lys Glu Gly Met Asp Ala Lys Ser Leu Thr Ala Trp Ser Arg Thr Leu
 35 40 45

Val Thr Phe Lys Asp Val Phe Val Asp Phe Thr Arg Glu Glu Trp Lys
 50 55 60

Leu Leu Asp Thr Ala Gln Gln Ile Val Tyr Arg Asn Val Met Leu Glu
 65 70 75 80

Asn Tyr Lys Asn Leu Val Ser Leu Gly Tyr Gln Leu Thr Lys Pro Asp
 85 90 95

Val Ile Leu Arg Leu Glu Lys Gly Glu Glu Pro Trp Leu Val Glu Arg
 100 105 110

Glu Ile His Gln Glu Thr His Pro Asp Ser Glu Thr Ala Phe Glu Ile
 115 120 125

Lys Ser Ser Val
 130

- 5 <210> 111
- <211> 396
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> Ácido nucleico que codifica al enlazador del extremo terminal C de ZF10xHunt y represor de kox-1
- <400> 111

ctgCGCCAGA aggatgctcc caagaaaaag aggaaagtgg gcggatctct gagtcctcag 60
 cactccgcag tcaccaggg atctatcatc aagaacaagg aggggatgga cgcaaagtca 120
 ctgacagcct ggagccgcac actggtgact ttcaaagacg tgttcgtcga cttcaccagg 180
 gaggaatgga agctgctgga cactgcccag cagatcgtgt acaggaatgt catgctggaa 240
 aactataaga atctggtgag cctgggatac cagctgacca aaccagatgt cattctgaga 300
 ctggagaagg gggaggaacc ctggctggtg gaacgggaga ttcatacagga aaccaccca 360
 gattcagaga cagcatttga gattaagtca tccgtc 396

- 5 <210> 112
- <211> 27
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Estructura del dominio de dedo de zinc de Fórmula 4

- 15 <220>
- <221> Xaa
- <222> (1)..(2)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 20 <220>
- <221> Xaa
- <222> (4)..(5)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 25 <220>
- <221> Xaa
- <222> (6)..(7)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido o ambos están ausentes

- 30 <220>
- <221> Xaa
- <222> (9)..(13)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 35 <220>
- <221> Xaa
- <222> (14)..(20)
- <223> Secuencia de reconocimiento: Xaa representa cualquier aminoácido a menos que se defina otra cosa

- 40 <220>
- <221> Xaa
- <222> (22)..(24)
- <223> Xaa representa cualquier aminoácido

- 45 <220>
- <221> Xaa
- <222> (25) .. (25)
- <223> Xaa representa cualquier aminoácido o está ausente

- 50 <220>
- <221> Xaa

<222> (27) .. (27)

<223> Xaa representa His o Cys

<400> 112

5

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25

<210> 113

<211> 23

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Estructura del dominio de dedo de zinc de Fórmula 6

<220>

<221> Xaa

<222> (1)..(2)

20

<223> Xaa representa cualquier aminoácido

<220>

<221> Xaa

<222> (4)..(5)

25

<223> Xaa representa cualquier aminoácido

<220>

<221> Xaa

<222> (7)..(11)

30

<223> Xaa representa cualquier aminoácido

<220>

<221> Xaa

<222> (12)..(18)

35

<223> Secuencia de reconocimiento: Xaa representa cualquier aminoácido a menos que se defina otra cosa

<220>

<221> Xaa

<222> (20)..(22)

40

<223> Xaa representa cualquier aminoácido

<400> 113

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa His
20

45

Reivindicaciones

1. Un péptido de dedo de zinc que comprende la secuencia:

5 N'-[(Fórmula 2)-X₆]_{n0}-{[(Fórmula 2)-X₅-(Fórmula 2)-X₆]_{n1}-[(Fórmula 2)-X₅-(Fórmula 2)-X_L]_{n2}-[(Fórmula 2)-X₅-(Fórmula 2)-X₆]_{n3}-[(Fórmula 2) - X₅ - (Fórmula 2)]-[X₆-(Fórmula 2)]_{n4}-C',

10 en donde n₀ es 0 o 1, n₁ es de 1 a 4, n₂ es 1 o 2, n₃ es de 1 a 4, n₄ es 0 o 1, X₅ es una secuencia enlazadora de 5 aminoácidos que tiene la secuencia -TG^{E/Q}/R^KP-, X₆ es una secuencia enlazadora de 6 o 7 aminoácidos que tiene la secuencia -TG^(G/S)₁₋₂E^{E/Q}/R^KP- o -T^(G/S)₁₋₂G^{E/Q}/R^KP-, y X_L es una secuencia enlazadora de al menos 8 aminoácidos; y la Fórmula 2 es un dominio de dedo de zinc de la secuencia -X₀₋₂ C X₁₋₅ C X₂₋₇ X⁻¹ X⁺¹ X⁺² X⁺³ X⁺⁴ X⁺⁵ X⁺⁶ H X₃₋₆^{H/C}-, en la que X es cualquier aminoácido, los números en subíndice indican los posibles números de residuos representados por X en esa posición, y el número en superíndice indica la posición del aminoácido en la secuencia de reconocimiento del dominio de dedo de zinc; y

15 en donde el péptido de dedo de zinc comprende de 8 a 32 dominios de dedo de zinc, y en donde al menos un dominio de dedo de zinc tiene una secuencia de reconocimiento X⁻¹ X⁺¹ X⁺² X⁺³ X⁺⁴ X⁺⁵ X⁺⁶ de acuerdo con la SEQ ID NO: 101.

20 2. El péptido de dedo de zinc de la reivindicación 1, que comprende la secuencia:

25 N'- [(Fórmula 4)-L3]_{n0}- {[(Fórmula 4)-L2-(Fórmula 4)-L3]_{n1}-[(Fórmula 4)-L2-(Fórmula 4)-X_L]_{n2}-[(Fórmula 4)-L2-(Fórmula 4)-L3]_{n3}-[(Fórmula 4)-L2-(Fórmula 4)]-[L3-(Fórmula 4)]_{n4}-C',

25 en donde n₀ es 0 o 1, n₁ es 1 a 2, n₂ es 1 o 2, n₃ es 2, n₄ es 0, X_L es 11 a 40 aminoácidos, L2 tiene la secuencia -TG^{E/Q}/R^KP-, L3 tiene la secuencia -TG^{G/S}E^{E/Q}/R^KP- y la Fórmula 4 tiene la secuencia - X₂ C X_{2,4} C X₅ X⁻¹ X⁺¹ X⁺² X⁺³ X⁺⁴ X⁺⁵ X⁺⁶ H X_{3,4,5} H H - (SEQ ID NO: 112), en donde X es cualquier aminoácido; y en donde el péptido de dedo de zinc comprende de 10 a 19 dominios de dedo de zinc.

30 3. El péptido de dedo de zinc de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende la secuencia:

35 N'- [(Fórmula 6)-L3]_{n0}- {[(Fórmula 6)-L2-(Fórmula 6)-L3]_{n1}-[(Fórmula 6)-L2-(Fórmula 6)-X_L]_{n2}-[(Fórmula 6)-L2-(Fórmula 6)-L3]_{n3}-[(Fórmula 6)-L2-(Fórmula 6)]-[L3-(Fórmula 6)]_{n4}-C',

35 en donde n₀ es 0 o 1, n₁ es 1 a 2, n₂ es 1 o 2, n₃ es 2, n₄ es 0, X_L es 11 a 40 aminoácidos, L2 tiene la secuencia -TG^{E/Q}/R^KP-, L3 tiene la secuencia -TG^{G/S}E^{E/Q}/R^KP- y la Fórmula 6 tiene la secuencia - X₂ C X₂ C X₅ X⁻¹ X⁺¹ X⁺² X⁺³ X⁺⁴ X⁺⁵ X⁺⁶ H X₃ H - (SEQ ID NO: 113), en donde X es cualquier aminoácido.

40 4. El péptido de dedo de cinc de cualquier reivindicación precedente, que comprende al menos 8 dominios de dedo de cinc de la SEQ ID NO: 113, en donde cada X⁻¹ X⁺¹ X⁺² X⁺³ X⁺⁴ X⁺⁵ X⁺⁶ se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107 o combinaciones de las mismas.

5. El péptido de dedo de zinc de cualquier reivindicación precedente, que comprende 10, 11, 12 o 18 dominios de dedo de zinc.

45 6. El péptido de dedo de zinc de cualquier reivindicación precedente, en el que al menos una secuencia X⁻¹ X⁺¹ X⁺² X⁺³ X⁺⁴ X⁺⁵ X⁺⁶ es la secuencia de aminoácidos QRATLQR (SEQ ID NO: 1).

50 7. El péptido de dedo de zinc de cualquier reivindicación precedente, en el que al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 11, al menos 12 o al menos 18 secuencias X⁻¹ X⁺¹ X⁺² X⁺³ X⁺⁴ X⁺⁵ X⁺⁶ son la secuencia QRATLQR (SEQ ID NO: 1).

8. El péptido de dedo de cinc de cualquier reivindicación precedente, que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 108.

55 9. Una proteína de fusión que comprende el péptido de dedo de zinc de cualquier reivindicación precedente, y al menos un dominio efector, seleccionado a partir de dominios represores transcripcionales, dominios activadores transcripcionales, dominios aisladores transcripcionales, remodelación de cromatina, dominios de condensación o descondensación, dominios de escisión de ácidos nucleicos o proteínas, dominios de dimerización, dominios enzimáticos, secuencias o dominios de señalización / direccionamiento; preferiblemente que comprende un dominio represor de transcripción Kox-1.

60 10. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

65 11. Un vector de virus adeno-asociado (AAV) que comprende el polinucleótido de la reivindicación 10.

12. El péptido de dedo de zinc de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el polinucleótido de la reivindicación 10 o la reivindicación 11 para uso en la modulación de la expresión de un gen diana en una célula, y en el que el uso es en medicina o para fines no médicos.
- 5 13. El péptido o polinucleótido de dedo de zinc para el uso de la reivindicación 12, en el que el gen diana está asociado con o comprende al menos 10, al menos 22 o al menos 35 repeticiones de trinucleótidos contiguas; y preferiblemente en el que las repeticiones de trinucleótidos son repeticiones de CAG, repeticiones de CTG o repeticiones de CAGCTG.
- 10 14. El péptido o polinucleótido de dedo de zinc de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el péptido de dedo de zinc reprime la expresión del gen diana, y el uso es para tratar:
- (i) una enfermedad o condición de poliglutamina; o
- 15 (ii) una enfermedad o condición de poliglutamina seleccionada entre la enfermedad de Huntington (HD), las ataxias espinocerebelares, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana y epilepsia mioclónica juvenil.
- 15 15. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el polinucleótido de la reivindicación 10 o la reivindicación 11.
- 20 16. Un método *in vitro* para modular la actividad de un gen diana asociado con o que comprende al menos 10, al menos 22, al menos 35 o al menos 63 repeticiones de trinucleótidos contiguas, comprendiendo el método poner en contacto el gen diana con un péptido de dedo de zinc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

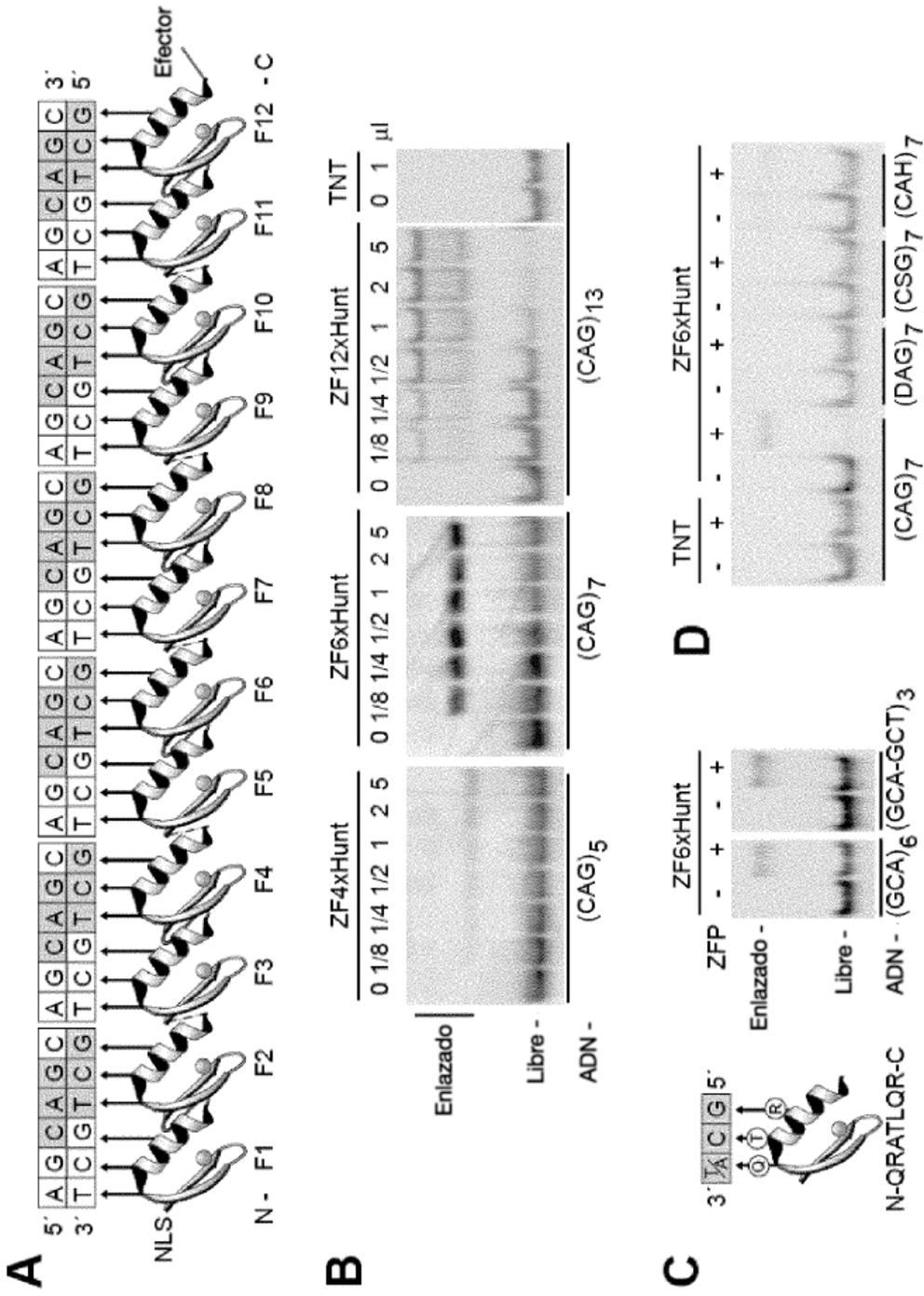
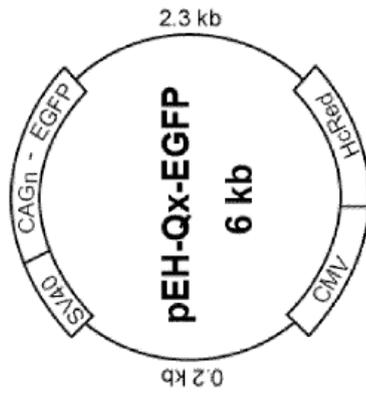


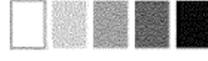
Figura 1

A

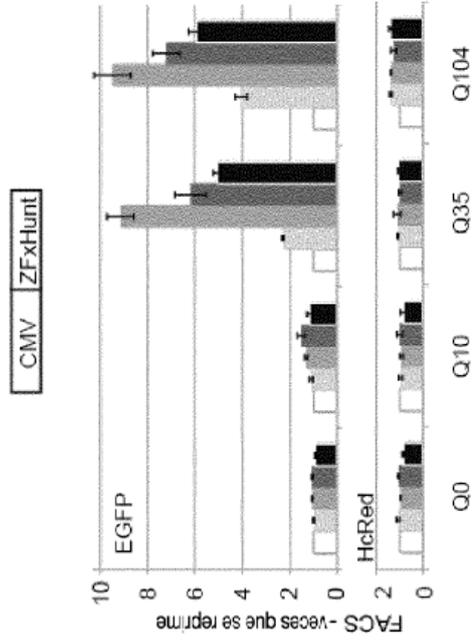


Clave

- No ZFxHunt
- ZF4xHunt
- ZF6xHunt
- ZF11xHunt
- ZF18xHunt



B



E

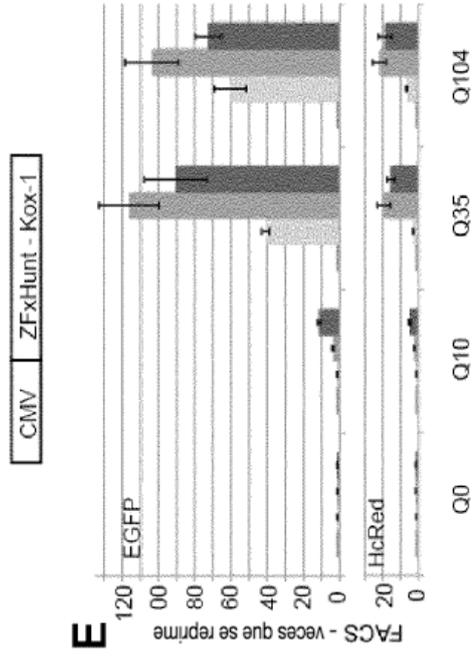


Figura 2

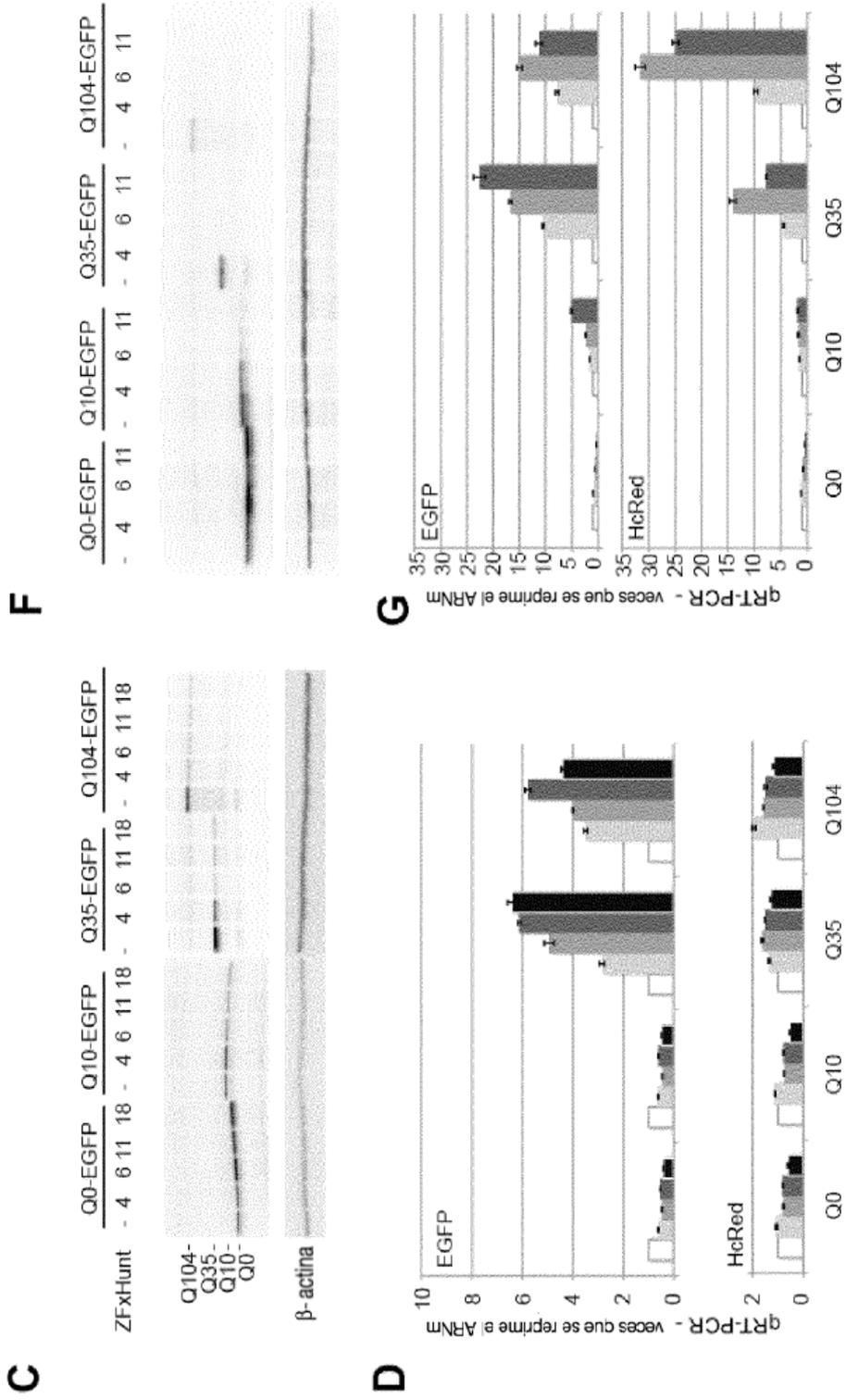


Figura 2 - continuación

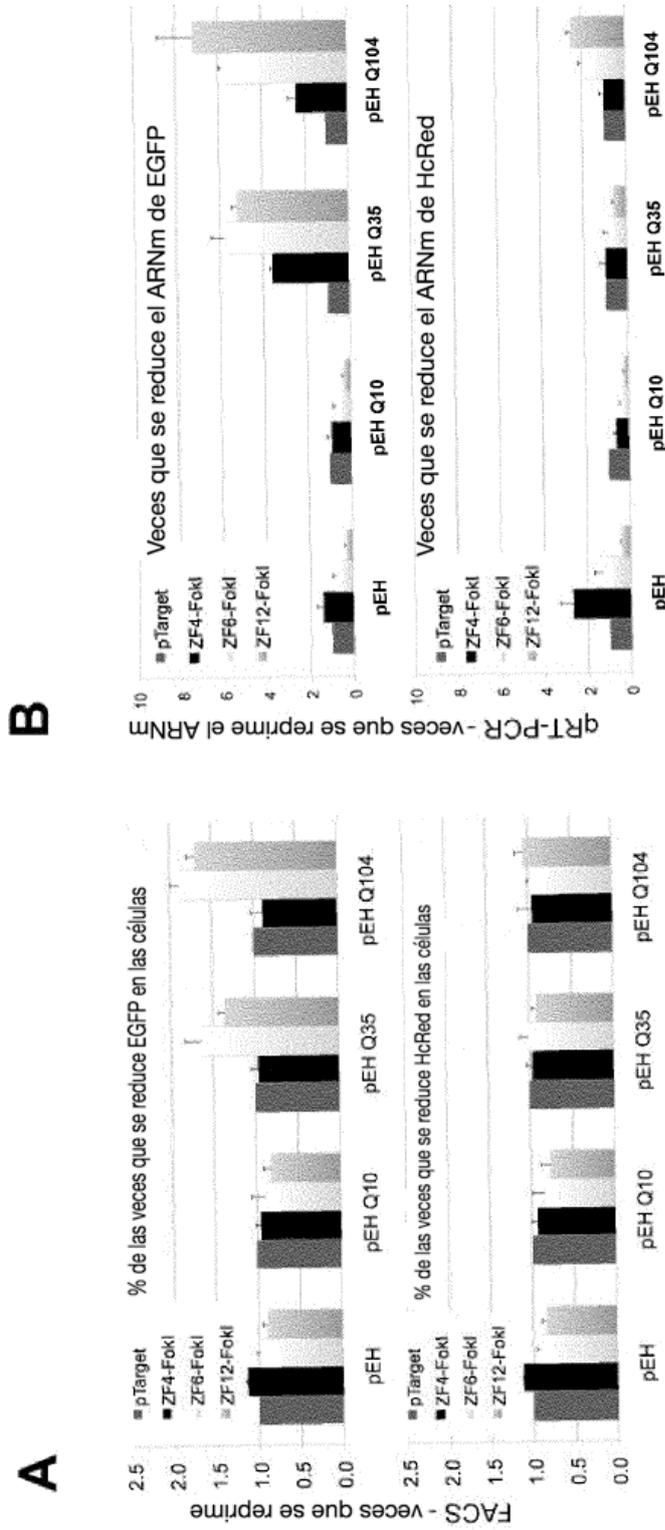


Figura 3

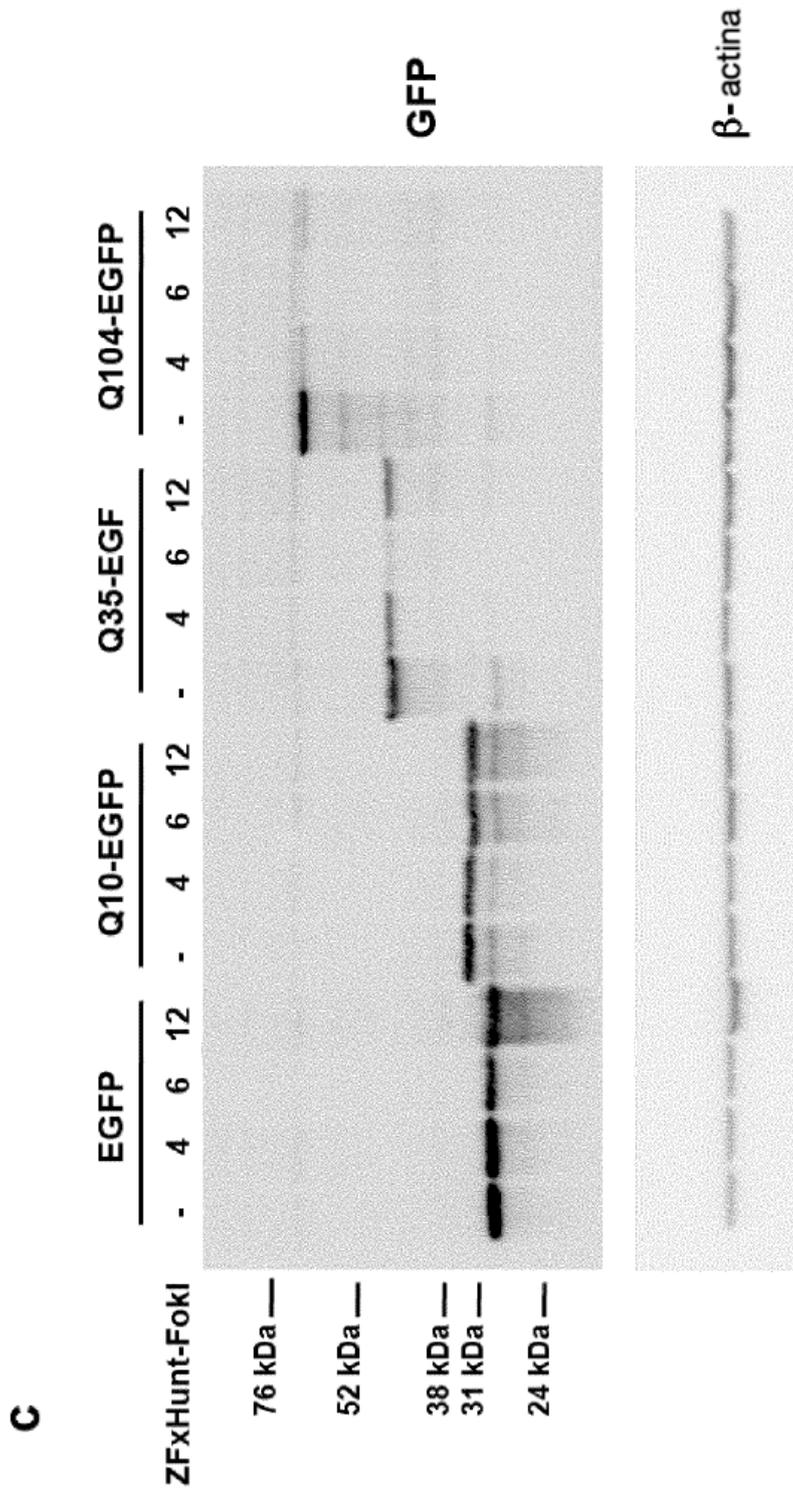


Figura 3. continuación

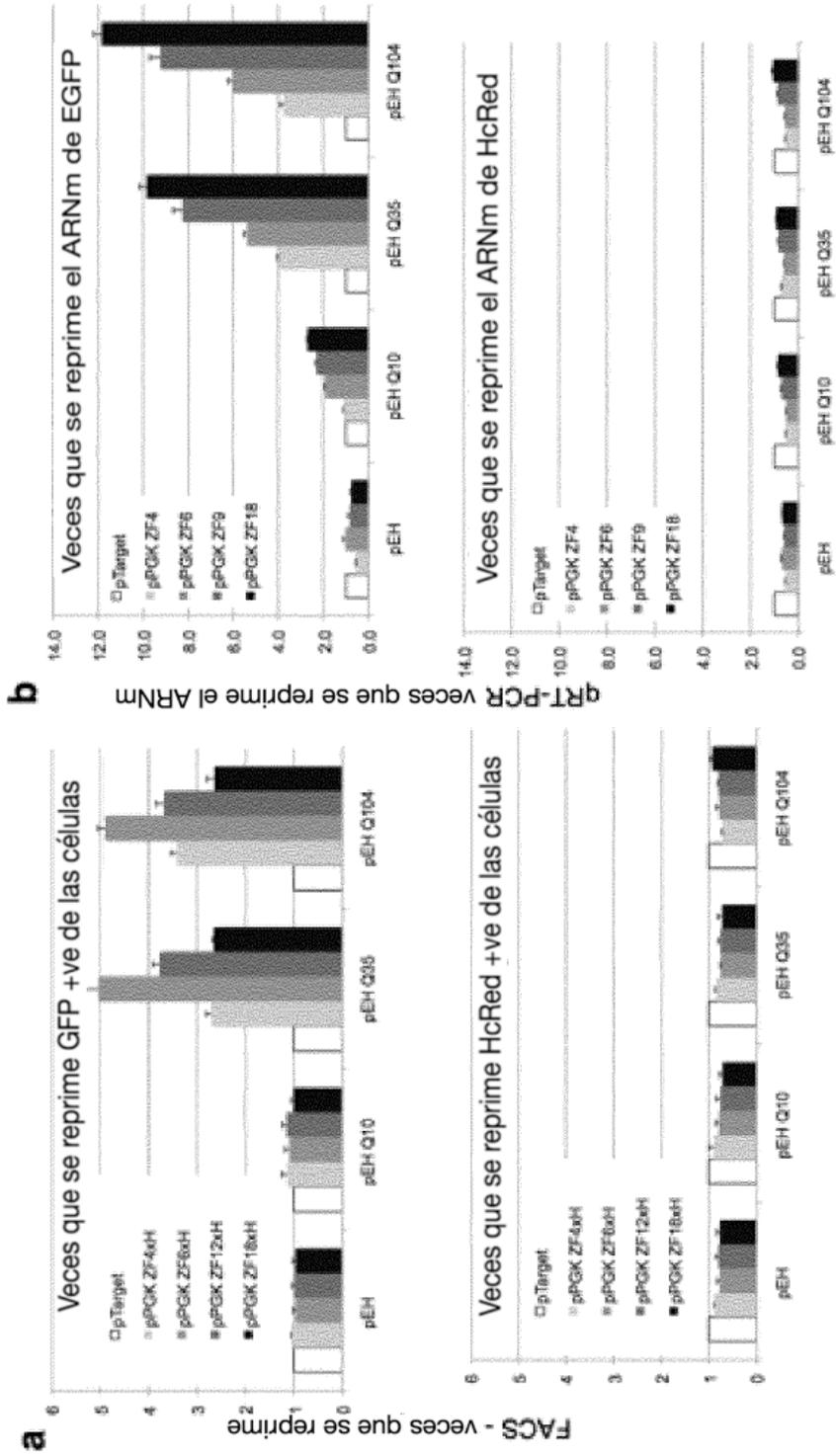


Figura 4

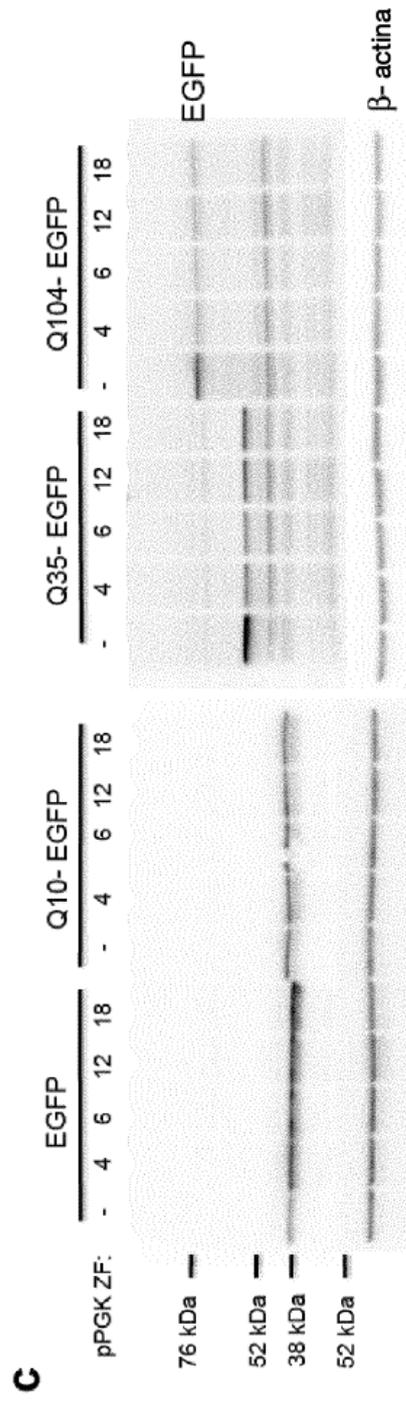


Figura 4 continuación

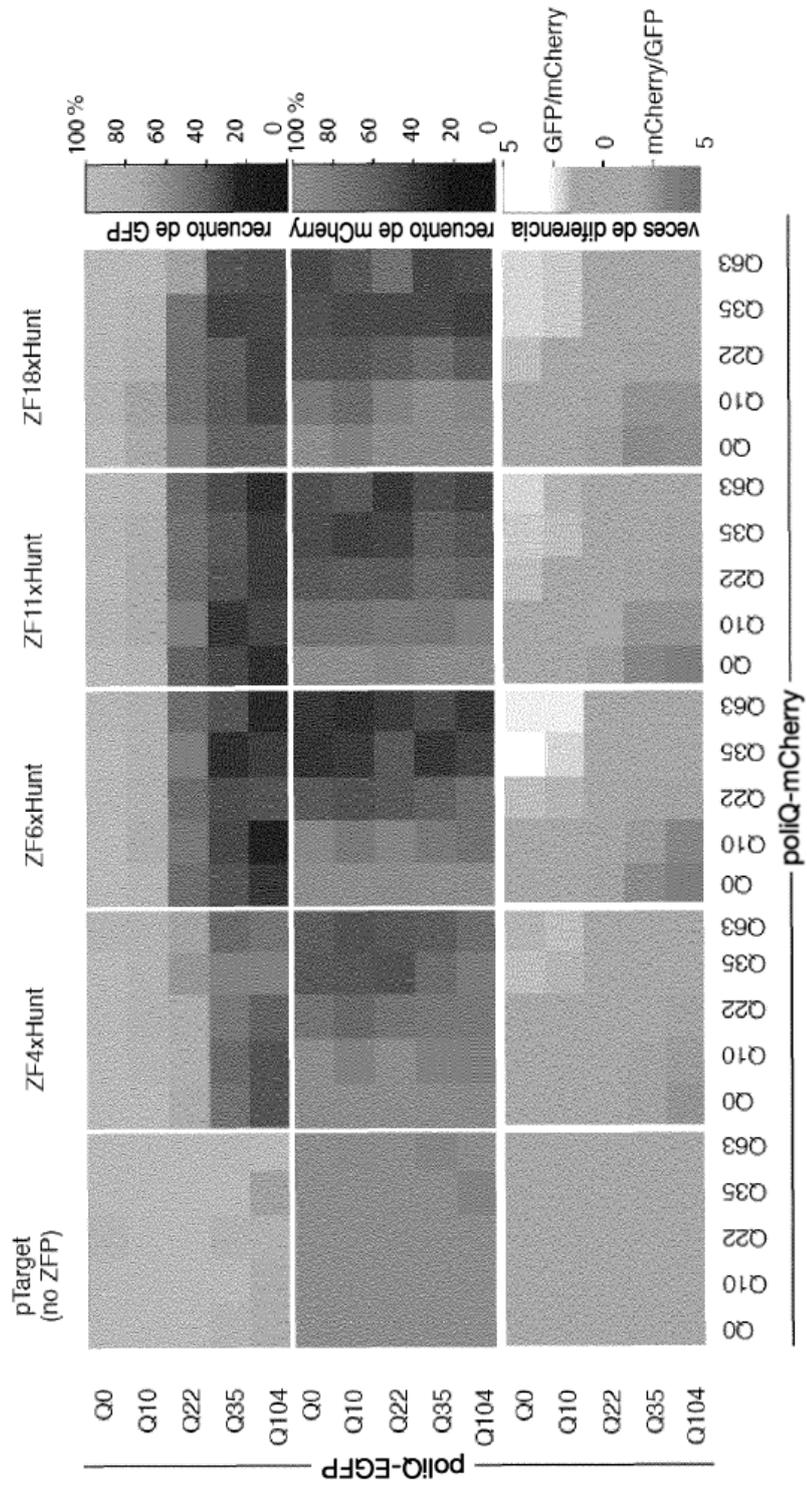


Figura 5

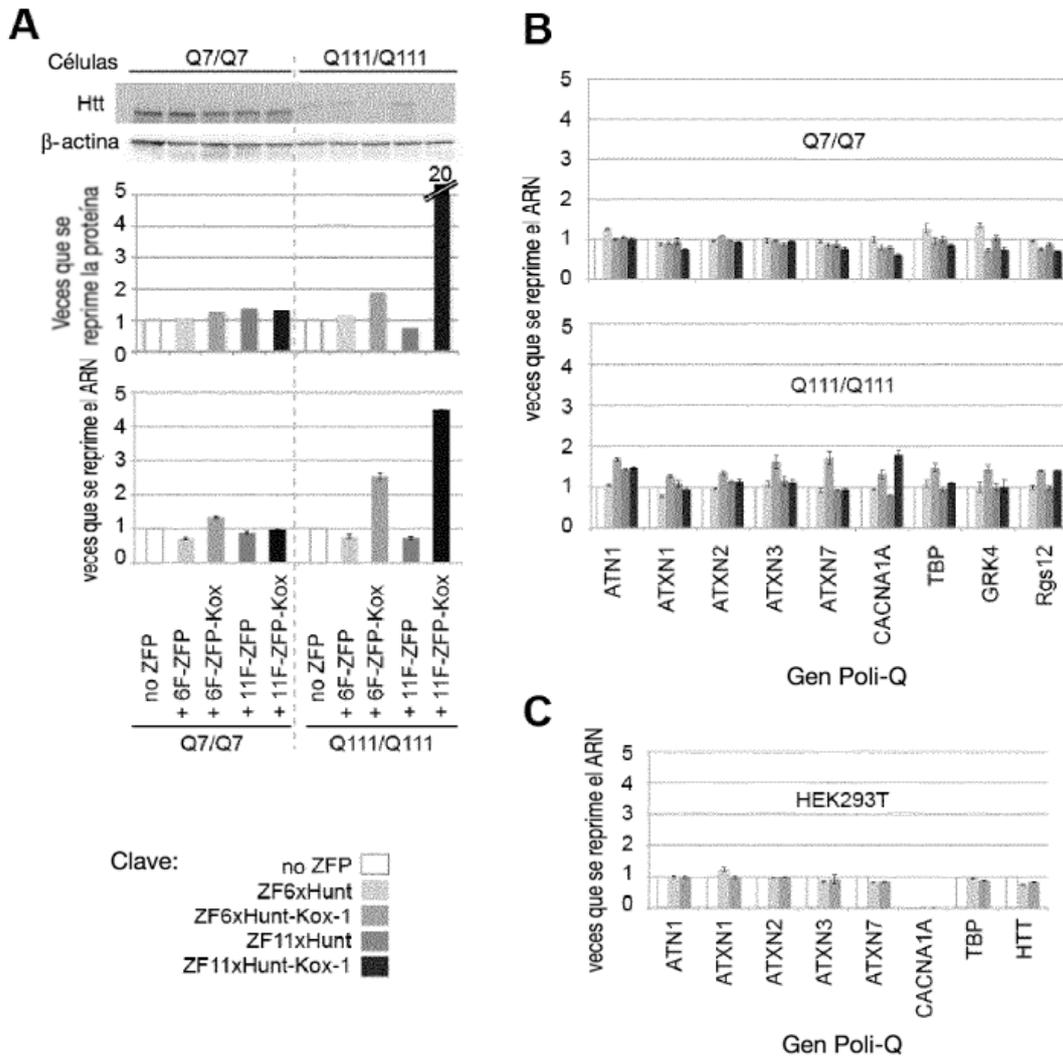


Figura 6

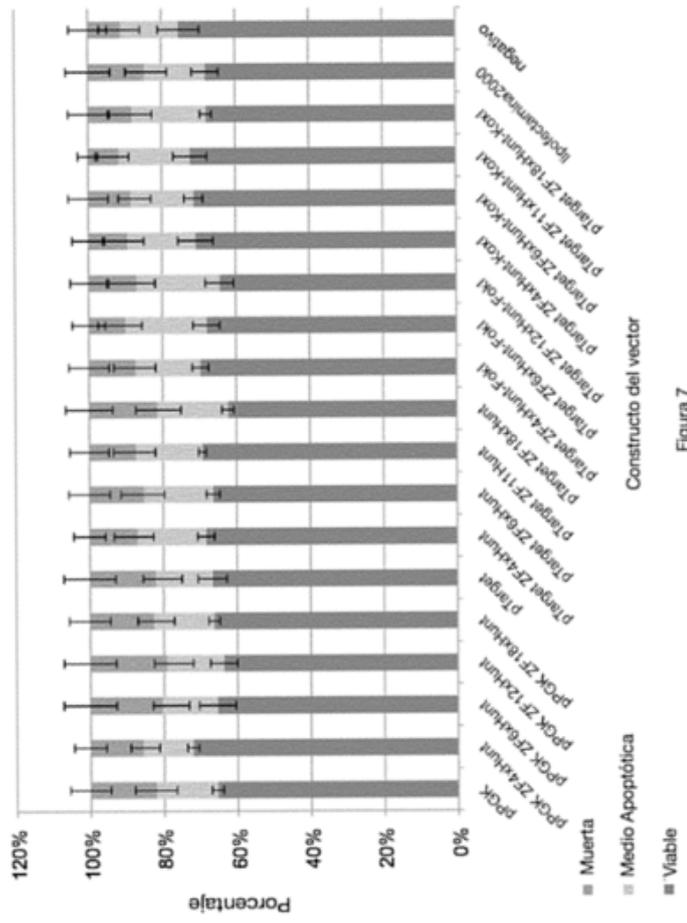
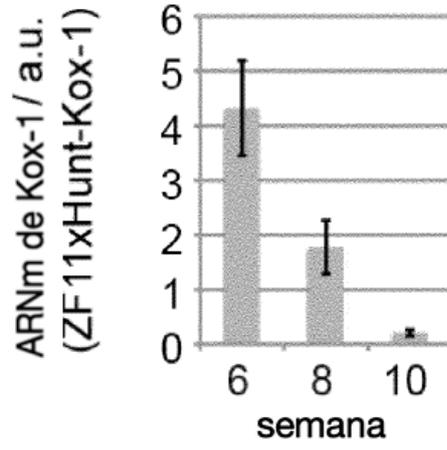
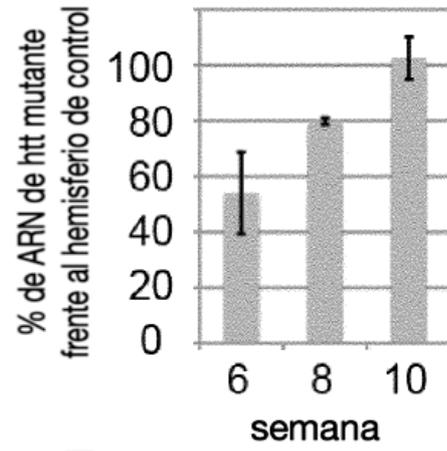


Figura 7

A



B



C

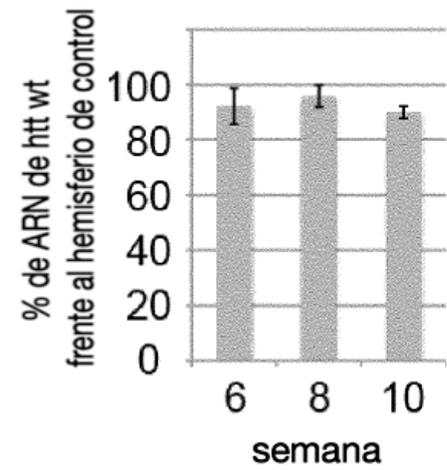


Figura 8

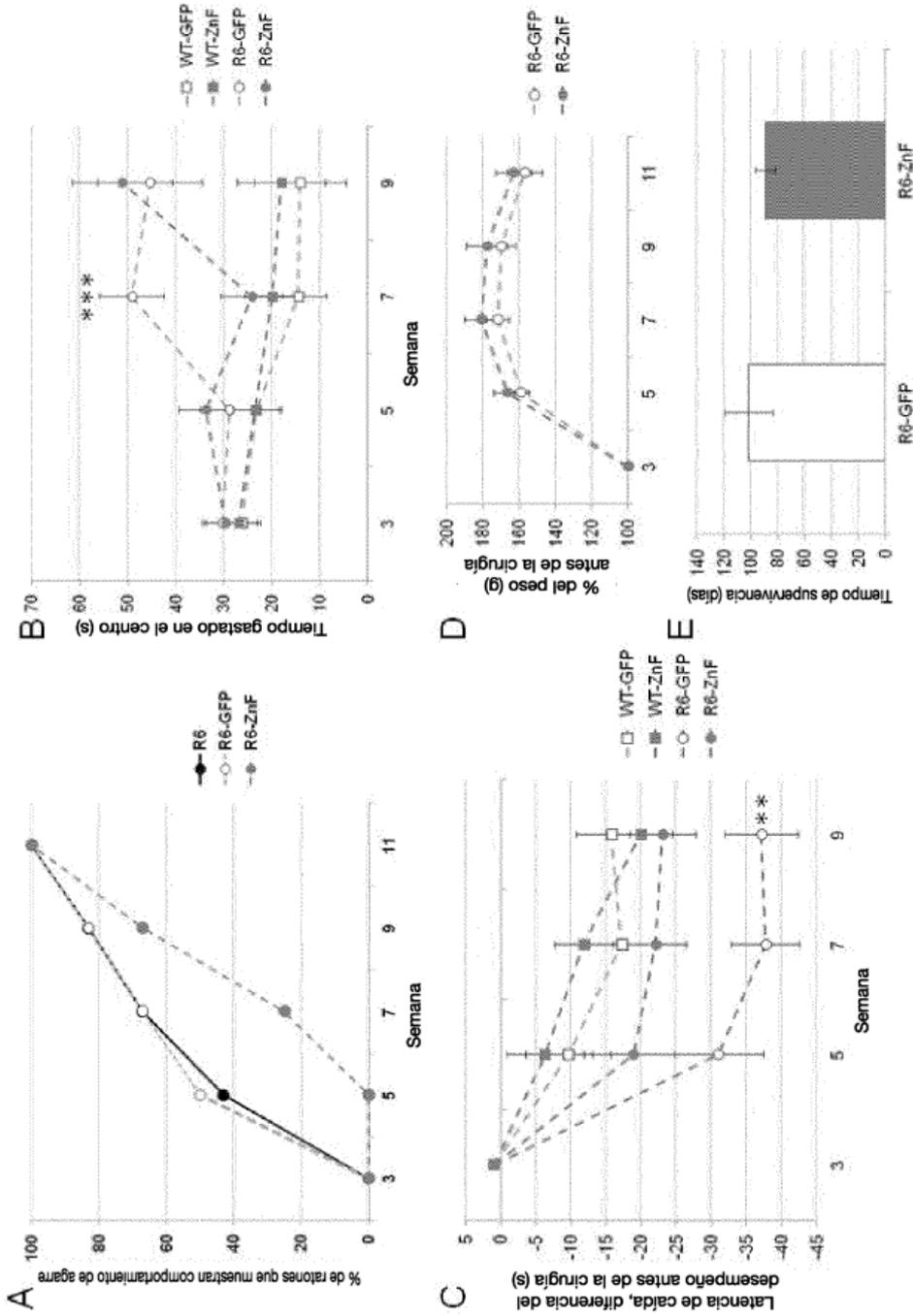


Figura 9

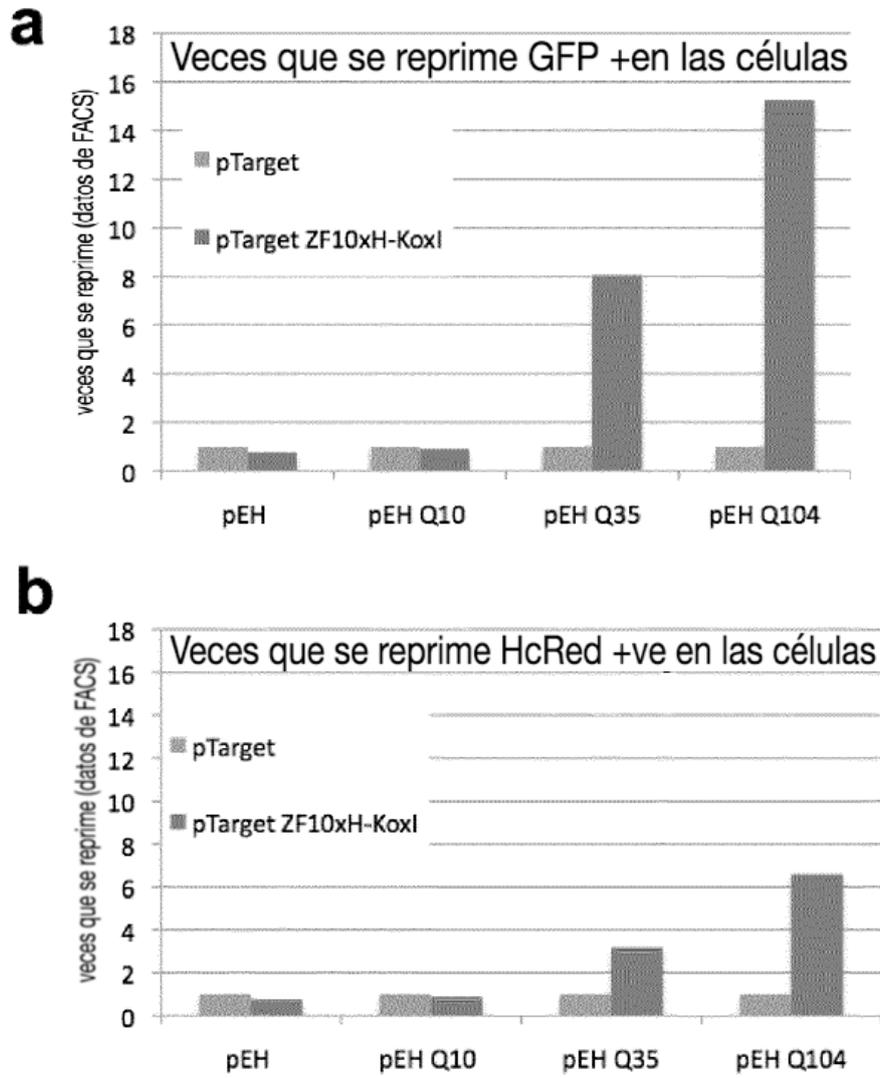


Figura 10