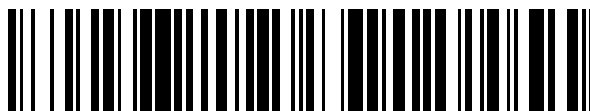


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 691**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2011 PCT/US2011/061201**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12068380**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2011 E 11840913 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2640399**

54 Título: **Métodos y composiciones para modular PD1**

30 Prioridad:

17.11.2010 US 927557

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2018

73 Titular/es:

SANGAMO THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
Point Richmond Tech Center, 501 Canal Blvd.,
Suite A100
Richmond, CA 94804, US

72 Inventor/es:

GREGORY, PHILIP D.;
HOLMES, MICHAEL C.;
MENDEL, MATTHEW C.;
MENG, XIANGDONG;
PASCHON, DAVID;
REIK, ANDREAS y
URNOV, FYODOR

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 658 691 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para modular PD1

Campo técnico

5 La presente descripción tiene que ver con los campos de la modificación genética del genoma y la identificación de nucleasas.

Antecedentes

10 Se ha demostrado que las nucleasas, incluidas las nucleasas de dedo de cinc y las endonucleasas de asentamiento ("homing") tales como Scel, diseñadas para unirse específicamente a los sitios diana, son útiles en la modificación genética del genoma. Por ejemplo, las nucleasas de dedo de cinc (ZFN) son proteínas que comprenden dedos de cinc específicos del sitio modificados genéticamente fusionados a un dominio de nucleasa. Tales ZFN se han utilizado con éxito para la modificación del genoma en una variedad de especies diferentes. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; y la Publicación Internacional WO 07/014275. Tales ZFN se pueden utilizar para crear una rotura de la doble hebra (DSB, por sus siglas en inglés) en una secuencia de nucleótidos diana, lo que aumenta la frecuencia de recombinación homóloga en el locus elegido como diana más de 1000 veces. Adicionalmente, la reparación imprecisa de una DSB específica del sitio por medio de una unión de extremos no homólogos (NHEJ) también puede dar como resultado una desorganización genética. La creación de dos de tales DSB da como resultado la eliminación de regiones arbitrariamente grandes.

20 Se ha demostrado que el receptor de muerte programada (PD1, también conocido como PDCD1) está implicado en la regulación del equilibrio entre la activación de las células T y la tolerancia de las células T en respuesta a los antígenos crónicos. Durante la infección por VIH1, se ha encontrado que la expresión de PD1 aumenta en células T CD4+. Se cree que la regulación al alza de PD1 está de algún modo vinculada al agotamiento de las células T (definido como una pérdida progresiva de funciones efectoras clave) cuando se observa disfunción de células T en presencia de exposición crónica al antígeno, como es el caso en la infección por VIH. La regulación al alza de PD1 también puede estar asociada con aumento de la apoptosis en estos mismos conjuntos de células durante la infección viral crónica (véase Petrovas et al., (2009) *J Immunol.* 183(2):1120-32). PD1 también puede desempeñar un papel en el escape específico del tumor de la vigilancia inmunológica. Se ha demostrado que PD1 está altamente expresado en linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de tumores tanto en la leucemia mielógena crónica (LMC) como en la leucemia mieloide aguda (LMA). PD1 también está regulado al alza en los linfocitos T infiltrantes de melanoma (TIL) (véase Dotti (2009) *Blood* 114 (8):1457-58) Se ha descubierto que los tumores expresan el ligando de PD1 (PDL) que, cuando se combina con la regulación al alza de PD1 en los CTL, puede ser un factor contribuyente a la pérdida en la funcionalidad de las células T y la incapacidad de los CTL para mediar en un respuesta antitumoral eficaz.

35 Los investigadores han demostrado que en los ratones infectados crónicamente con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), la administración de anticuerpos anti-PD1 bloqueaba la interacción PD1-PDL y era capaz de restablecer la funcionalidad de algunas células T (proliferación y secreción de citocinas), y conducir a una disminución de la carga viral (Barber et al., (2006) *Nature* 439(9): 682-687). La desregulación de PD1 también puede desempeñar un papel en la enfermedad autoinmunitaria. Los SNP de PD1 (en particular, PD 1.3) también se han asociado con un mayor riesgo de lupus eritematoso sistémico (LES). Se ha demostrado que los pacientes con LES tienen una mayor frecuencia del alelo PD 1.3 de PD1 y que estos pacientes muestran una expresión reducida de PD1 en sus células T CD4+ activadas (véase Bertsias et al., (2009) *Arthritis Rheum.* 60(1):207-18).

40 La Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2009/0111119 A1 está destinada a la identificación de nucleasas funcionales en levadura que se unen a diferentes sitios diana. Más concretamente, se describen diversos análisis para escrutar e identificar rápidamente nucleasas modificadas genéticamente biológicamente activas, tales como ZFN en el sistema de levadura y en particular que una proteína de dedo de cinc se une a un sitio diana en un gen de PD-1 humano (véase el Ejemplo 5).

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de moduladores adicionales dirigidos a PD1, por ejemplo nucleasas dirigidas a PD1 o factores de transcripción que se puedan utilizar en investigación y aplicaciones terapéuticas.

Compendio

50 La presente descripción se refiere al desarrollo de nucleasas dirigidas a PD1, por ejemplo, meganucleasas y nucleasa de dedo de cinc (ZFN) modificadas genéticamente.

55 La presente descripción demuestra proteínas activas de dedo de cinc específicas para PD1 de seres humanos y roedores y proteínas de fusión, que incluyen factores de transcripción de proteínas de dedo de cinc (ZFP-TF) o nucleasas de dedo de cinc (ZFN), que comprenden estas proteínas de dedo de cinc específicas de PD1. Las proteínas que comprenden proteínas de dedo de cinc específicas de PD1 de la invención se pueden utilizar con propósitos terapéuticos y de investigación, incluso para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno en los

5 que PD1 se expresa de manera aberrante, o cuando la ruta PD1 se utiliza de manera aberrante debido a la expresión en exceso de un ligando de PD1. Por ejemplo, la elección como diana de la nucleasa de dedo de cinc del locus PD1 en células T se puede utilizar para bloquear la supresión inmunitaria dependiente de PD1 tanto en enfermedades infecciosas crónicas como en neoplasias malignas. Alternativamente, un locus de PD1 defectuoso se puede remediar utilizando la inserción dirigida dependiente de ZFN de secuencias de tipo salvaje, o se puede utilizar un factor de transcripción de proteína de dedo de cinc (ZFP TF) para modular (p.ej., regular al alza o regular a la baja) la expresión defectuosa de PD1. Adicionalmente, se puede utilizar un ZFP TF dirigido al locus de PD1 para modular un gen PD1 de tipo salvaje.

10 Una realización preferida es una proteína de dedo de cinc que se une a un sitio diana en un gen de PD1, que comprende cinco o seis regiones de reconocimiento de dedos de cinc ordenadas de F1 a F5 o de F1 a F6, desde el extremo N al extremo C, y en donde las regiones de reconocimiento comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos:

- (i) F1: RSSALSR (SEQ ID NO: 23);
F2: RPLALKH (SEQ ID NO: 24);
15 F3: RNDHRKN (SEQ ID NO: 12);
F4: TRPVLKR (SEQ ID NO: 25); y
F5: DRSLAR (SEQ ID NO: 9), en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana mostrado en el SEQ ID NO: 60;
- (ii) F1: RPSTLHR (SEQ ID NO: 27);
20 F2: RSDDELTR (SEQ ID NO: 28);
F3: RNNLRT (SEQ ID NO: 29) o TNWHLRT (SEQ ID NO: 30) o RTPHLTL (SEQ ID NO: 31) o RSAQLAT (SEQ ID NO: 32) o RCTHLYL (SEQ ID NO: 33) o RPTQRYS (SEQ ID NO: 34) o RANHREC (SEQ ID NO: 35) o RMGRLST (SEQ ID NO: 39) o RANHRVC (SEQ ID NO: 42) o RSTHLLG (SEQ ID NO: 43);
25 F4: TRPVLKR (SEQ ID NO: 25); y
F5: DRSLAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana mostrado en el SEQ ID NO: 60;
- (iii) F1: RPSTLHR (SEQ ID NO: 27);
F2: RSDDELTR (SEQ ID NO: 28);
30 F3: RHSRLTT (SEQ ID NO: 40);
F4: TRPVLMR (SEQ ID NO: 41); y
F5: DRSLAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana mostrado en el SEQ ID NO: 60;
- (iv) F1: RNAALTS (SEQ ID NO: 45);
35 F2: RSDDELTR (SEQ ID NO: 28);
F3: RSCGLWS (SEQ ID NO: 44) o RPMHLTN (SEQ ID NO: 49) o RSPHLYH (SEQ ID NO: 50) o RLPALLS (SEQ ID NO: 53);
F4: TRPVLKR (SEQ ID NO: 25); y
40 F5: DRSLAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana mostrado en el SEQ ID NO: 60;
- (i) F1: CNAALTR (SEQ ID NO: 46);
F2: RSDDELTR (SEQ ID NO: 28);
F3: REEHRAT (SEQ ID NO: 47);
F4: TRPVLKR (SEQ ID NO: 25);
45 F5: DRSLAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana

mostrado en el SEQ ID NO: 60;

(ii) F1: RNAALTR (SEQ ID NO: 45);

F2: RSDDELTR (SEQ ID NO: 28);

F3: RCEALHH (SEQ ID NO: 51);

5 F4: TRPVVKR (SEQ ID NO: 25); y

F5: DRSAQAR (SEQ ID NO: 52) o DRSAAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana mostrado en el SEQ ID NO: 60; o

(iii) F1: HNAALTR (SEQ ID NO: 54);

F2: RSDDELTR (SEQ ID NO: 28);

10 F3: RTYNRTQ (SEQ ID NO: 55);

F4: TRPVVKR (SEQ ID NO: 25); y

F5: DRSAAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana mostrado en el SEQ ID NO: 60.

15 En otra realización preferida, se proporciona en la presente memoria una proteína de fusión que comprende una proteína de dedo de cinc de acuerdo con la invención y un dominio funcional, que comprende un dominio de escisión o un semidominio de escisión o un dominio regulador de la transcripción. El dominio regulador de la transcripción es un dominio de activación o un dominio de represión.

20 En otro aspecto de la descripción, las proteínas de fusión comprenden nucleasas de dedo de cinc (ZFN) que son específicas para el gen de PD1 humano. En ciertos aspectos, los dominios de dedo de cinc de las proteínas de fusión de nucleasa comprenden las hélices de reconocimiento que se producen de forma no natural que se muestran en la Tabla 1 y/o se unen a los sitios diana mostrados en la Tabla 2.

25 En otro aspecto más, se proporcionan en la presente memoria ZFP-TF capaces de modular la expresión de un gen de PD1. En ciertos aspectos, los dominios de dedo de cinc de los ZFP-TF comprenden las hélices de reconocimiento que se producen de forma no natural que se muestran en las Tablas 1 ó 5 y/o se unen a los sitios diana mostrados en las Tablas 2 ó 6.

En una realización preferida, se proporciona en la presente memoria un polinucleótido que comprende una proteína de dedo de cinc de acuerdo con la invención o una proteína de fusión de acuerdo con la invención.

30 En otra realización preferida, se proporciona en la presente memoria un método *ex vivo* de modulación de la expresión de un gen de PD1 en una célula, comprendiendo el método la introducción en la célula de al menos un polinucleótido de acuerdo con la invención, en condiciones tales que la expresión del gen de PD1 sea modulada. La modulación comprende la activación, represión o inactivación por escisión del gen de PD1. La inactivación se produce a través de unión de extremos no homólogos (NHEJ) después de la escisión del gen de PD1. En otra realización preferida, la modulación comprende la inactivación por escisión y el método comprende adicionalmente la introducción de una secuencia exógena flanqueada por secuencias que tienen homología con el gen de PD1 en la

35 célula, en donde la secuencia exógena se integra en el gen de PD1 mediante recombinación homóloga.

40 En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria métodos y composiciones para la regulación del gen de PD1. En ciertos aspectos, los métodos comprenden la introducción de una proteína de fusión que comprende una proteína de dedo de cinc que está modificada genéticamente para que se una a un sitio diana en un gen de PD1 (o polinucleótido que codifica una proteína de fusión) en células de un paciente con una enfermedad o trastorno en los que la enfermedad o trastorno se caracterizan por la expresión aberrante de PD1 y/o el uso indeseable de la ruta de PD1, causado por expresión en exceso de los ligandos de PD1. Los métodos pueden ser utilizados en el tratamiento y/o la prevención de infecciones crónicas tales como el VIH y el VHC. De forma similar, los métodos y composiciones se pueden utilizar en el tratamiento y/o la prevención del cáncer y enfermedades malignas. Los ejemplos no limitantes de los cánceres que se pueden tratar y/o prevenir incluyen carcinomas de pulmón, cánceres de páncreas, cánceres de hígado, cánceres de hueso, cánceres de mama, cánceres colorrectales, leucemias, cánceres de ovario, linfomas, cánceres de cerebro y similares.

45 Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria se pueden utilizar como un tratamiento independiente, o se pueden utilizar combinados con otras terapias antivirales o contra el cáncer. Estos métodos y composiciones se pueden proporcionar con terapias antivirales o contra el cáncer de forma secuencial, o se pueden administrar simultáneamente. Los métodos y composiciones proporcionados también se pueden utilizar para modular la expresión de PD1 en un paciente aquejado de una enfermedad autoinmunitaria o se pueden utilizar para tratar a un paciente mediante la integración en un alelo de PD1 de tipo salvaje o un alelo de PD1 con características

alteradas si este paciente portaba un alelo defectuoso o indeseable. Se pueden construir líneas celulares para alterar específicamente esa secuencia del gen de PD1 para crear sistemas de escrutinio de compuestos terapéuticos que pueden alterar la regulación o funcionalidad de un gen de PD1.

5 En una realización preferida, se proporciona en la presente memoria un polinucleótido de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno caracterizados por la expresión o regulación aberrantes de un gen de PD1, de manera que la enfermedad o trastorno se traten modulando la expresión del gen de PD1 de acuerdo con el método de la invención. Siendo la enfermedad o trastorno un cáncer, una infección viral o una enfermedad autoinmunitaria, que se pueden tratar adicionalmente administrando terapias anti-virales o contra el cáncer adicionales al sujeto.

10 Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es un gráfico que muestra la desorganización del gen de PD1 en PBMC humanas utilizando nucleasas de dedo de cinc específicas de PD1, según lo determinado por el análisis SURVEYOR™ Nuclease basado en Cel-1 que mide el porcentaje de mutaciones insertadas por unión de extremos no homólogos (NHEJ) que es inducida cuando se introducen las ZFN indicadas en estas células. Las células se trataron con pares de ZFN que combinaban cada uno la ZFN 12942 con una variante de ZFN diferente que se unió a la hebra opuesta de ADN y formaba una nucleasa funcional tras la unión al locus diana con 12942. El número de SBS para la segunda ZFN del par se indica debajo de cada gráfico. La barra más a la izquierda de cada par muestra los porcentajes de NHEJ tres días después de la nucleofección para las células incubadas a 37°C. La barra en segundo lugar desde la izquierda en cada par indicado muestra los porcentajes de NHEJ diez días después de la nucleofección para las células incubadas a 37°C. La barra en segundo lugar desde la derecha en cada par indicado muestra los porcentajes de NHEJ tres días después de la nucleofección para las células incubadas a 30°C y la barra más a la derecha de cada par indicado muestra los porcentajes de NHEJ diez días después de la nucleofección para las células incubadas a 30°C.

La **Figura 2** describe los resultados de un análisis para determinar la secuencia del locus de PD1 en células T CD8+ después del tratamiento con el par de ZFN específico de PD1 12942 y 12947 que se dirige al exón 1. Las inserciones se representan en letra mayúscula en negrita. Las deleciones se indican con un (-). Como se puede ver en la figura, se observaron varias inserciones y deleciones cerca del sitio de corte de la ZFN como resultado de la reparación de DSB a través de NHEJ.

La **Figura 3** describe los resultados después de la transfección de esplenocitos derivados de ratones Pmel TCR transgénicos/Rag1-/- con ZFN específicas de PD1 murino. Las células se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y después se tiñeron para determinar PD1. Las gráficas muestran el porcentaje de células CD3+CD8+ positivas para PD1 en cada grupo y la mediana de la fluorescencia PD1 para cada grupo, y los datos se representan en formato de tabla a continuación. Como se puede ver en la figura, la expresión de PD1 disminuye en las células que recibieron las ZFN específicas de PD1, incluso en presencia de estimulación de CD3.

La **Figura 4** demuestra que la reducción en la expresión de PD1 era evidente en los momentos posteriores. Las células también se recogieron 72 horas después de la estimulación de CD3, y se tiñeron para determinar PD1. Los histogramas superiores muestran el porcentaje de células CD3+CD8+ positivas para PD1 en cada grupo y la mediana de la fluorescencia de PD1 para cada grupo. Las gráficas inferiores muestran la frecuencia de las células que expresan PD1/CFSE. Esta figura demuestra que la expresión de PD1 todavía está reducida en las células tratadas con ZFN específicas de PD1 incluso 72 horas después de la estimulación de CD3.

La **Figura 5** describe los resultados para los pares de ZFN específicas de PD1 sometidos a ensayo en células T CD4+ y analizados utilizando el análisis Cel-I para determinar la actividad de edición del genoma. En estas células, se observó hasta 44% de edición con algunos pares.

La **Figura 6** describe la purificación de células PD1(-) después del tratamiento con los pares de ZFN específicas de PD1 en células T CD4+. El porcentaje de edición o NHEJ se midió mediante el análisis Cel-I como se describió anteriormente, y se observó 44% de edición con algunos de los pares de ZFN específicas de PD1. Después del tratamiento, las células se estimularon con una primera exposición a esferas anti-CD3/CD8 para inducir los transgenes de ZFN y a continuación se reestimularon y se sometieron a un procedimiento de purificación, bien por medio de FACS o por medio de cromatografía de afinidad. Las células se recogieron y analizaron para determinar la edición de PD1 mediante el análisis Cel-I (descrito anteriormente), (i) después de la primera estimulación, (ii) después de la segunda estimulación pero antes de cualquier purificación, (iii) después de la clasificación celular para CD25+ (un marcador de activación), PD1(-) o (iv) después de la cromatografía de afinidad. Como se muestra, utilizando la técnica de clasificación celular, se encontró que hasta 56% de las células recuperadas estaban modificadas. Las células PD1(-) purificadas por cromatografía de afinidad mostraron una modificación global de PD1 de hasta 42% según se analizó mediante el análisis Cel-1.

La **Figura 7** es un gráfico que muestra los resultados para las ZFN específicas de PD1 sometidas a ensayo en células T CD8+. En este experimento, los ARNm que codificaban las ZFN específicas de PD1 se transdujeron a células T CD8+ y el porcentaje de modificación de PD1 se analizó mediante el análisis Cel I. La cantidad de modificación observada estuvo relacionada con la cantidad de ARNm utilizado, menores cantidades de ARNm de

entrada daban como resultado menores porcentajes de modificación de la diana. Estos resultados demuestran que las ZFN específicas de PD1 descritas en la presente memoria son capaces de modificar el locus de PD1 en líneas celulares y en células T primarias.

Descripción detallada

5 Se describen en la presente memoria composiciones y métodos para sistemas de escrutinio *in vivo* de alto rendimiento para identificar nucleasas funcionales. En particular, los análisis utilizan un sistema informador para controlar la capacidad de una nucleasa para inducir una rotura de doble hebra en su sitio diana. Además, los análisis se pueden utilizar para determinar el efecto de la nucleasa sobre el crecimiento celular (toxicidad).

10 La tecnología de las nucleasas modificadas genéticamente se basa en la modificación genética de las proteínas de unión a ADN de origen natural. Por ejemplo, se ha descrito la modificación genética de endonucleasas de asentamiento con especificidades de unión a ADN personalizadas. Chames et al. (2005) *Nucleic Acids Res* 33(20): e178; Arnould et al. (2006) *J. Mol. Biol.* 355:443-458. Además, también se ha descrito la modificación genética de ZFP. Véanse, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núm. 6.534.261; 6.607.882; 6.824.978; 6.979.539; 6.933.113; 7.163.824; y 7.013.219.

15 Además, las ZFP se han unido a dominios de nucleasa para crear ZFN, una entidad funcional que puede reconocer su gen diana deseado a través de su dominio de unión a ADN modificado genéticamente (ZFP) y la nucleasa hace que el gen se corte cerca del sitio de unión a ZFP. Véase, p.ej., Kim et al. (1996) *Proc Nat'l Acad Sci USA* 93(3):1156-1160. Más recientemente, las ZFN se han utilizado para la modificación del genoma en una variedad de organismos. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; y la Publicación Internacional WO 07/014275.

25 Aunque las reglas que permiten que la modificación genética de las ZFP para que se unan a secuencias de ADN específicas están bien caracterizadas e identifican con precisión las ZFP específicas, estas mismas ZFP pueden no unirse con igual afinidad y/o especificidad cuando se incorporan a una ZFN. Por ejemplo, es probable que el sustrato cromosómico pueda afectar a la dimerización precisa de los dominios de nucleasa en las células vivas, disminuyendo consecuentemente el potencial de escisión, y que la arquitectura precisa de la cromatina sobre un locus genómico determinado afectará diferencialmente a la capacidad de las ZFN para unirse y escindir su secuencia diana deseada. Adicionalmente, es difícil, si no imposible, para los análisis *in vitro* imitar los parámetros de búsqueda a los que se somete un dominio de unión al ADN diseñado cuando se presenta con un genoma celular en forma cromatinizada. Como resultado, es esencial someter a ensayo numerosas variantes en el organismo relevante, o linaje celular, para identificar una ZFN que muestre las características óptimas para la modificación genética.

35 Además, ya que cada sistema *in vivo* tiene sus propias peculiaridades, es necesario desarrollar análisis de detección específicos para determinar la acción de las ZFN. Por lo tanto, a diferencia de los métodos de escrutinio *in vivo* descritos anteriormente que escrutan endonucleasas de asentamiento con especificidad de unión diferente de la de la endonucleasa de asentamiento natural, los métodos descritos en la presente memoria proporcionan una forma rápida y eficaz de clasificar las nucleasas que ya se sabe que se unen a un sitio diana particular mediante la predicción de su funcionalidad *in vivo*, así como de la toxicidad de una nucleasa para la célula anfitriona.

40 Por lo tanto, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria proporcionan métodos altamente eficientes y rápidos para identificar nucleasas que son biológicamente activas *in vivo*. Además de predecir con precisión la funcionalidad *in vivo* de las nucleasas, los análisis descritos en la presente memoria también se pueden utilizar para determinar la toxicidad de la nucleasa, lo que permite la identificación de las proteínas más seguras y funcionalmente más activas.

General

45 La práctica de los métodos, así como la preparación y el uso de las composiciones descritas en la presente memoria, emplean, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales en la biología molecular, la bioquímica, la estructura y el análisis de la cromatina, la química computacional, el cultivo celular, el ADN recombinante y campos relacionados que están dentro del conocimiento práctico de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 y Tercera edición, 2001; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; las series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Tercera edición, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman y A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; y 50 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

Definiciones

- Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se utilizan indistintamente y se refieren a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido, en conformación lineal o circular, y en forma de una o dos hebras. Para los propósitos de la presente descripción, estos términos no deben interpretarse como limitantes con respecto a la longitud de un polímero. Los términos pueden abarcar análogos conocidos de nucleótidos naturales, así como nucleótidos que están modificados en la base, el azúcar y/o los radicales fosfato (*p.ej.*, cadenas principales de fosforotioato). En general, un análogo de un nucleótido particular tiene la misma especificidad de apareamiento de bases; es *decir*, un análogo de A experimentará emparejamiento de bases con T.
- Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. El término también se aplica a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más aminoácidos son análogos químicos o derivados modificados de los correspondientes aminoácidos naturales.
- "Unión" se refiere a una interacción no covalente, específica de secuencia, entre macromoléculas (*p.ej.*, entre una proteína y un ácido nucleico). No todos los componentes de una interacción de unión deben ser específicos de la secuencia (*p.ej.*, los contactos con residuos de fosfato en una cadena principal de ADN), siempre que la interacción en su conjunto sea específica de la secuencia. Tales interacciones generalmente se caracterizan por una constante de disociación (K_d) de 10^{-6} M^{-1} o inferior. "Afinidad" se refiere a la fuerza de unión: la mayor afinidad de unión se correlaciona con una K_d más baja.
- Una "proteína de unión" es una proteína que se puede unir de forma no covalente a otra molécula. Una proteína de unión se puede unir, por ejemplo, a una molécula de ADN (una proteína de unión a ADN), una molécula de ARN (una proteína de unión a ARN) y/o una molécula de proteína (una proteína de unión a proteína). En el caso de una proteína de unión a proteínas, se puede unir a sí misma (para formar homodímeros, homotrímeros, *etc.*) y/o se puede unir a una o más moléculas de una proteína o proteínas diferentes. Una proteína de unión puede tener más de un tipo de actividad de unión. Por ejemplo, las proteínas de dedo de cinc tienen actividad de unión a ADN, de unión a ARN y de unión a proteínas.
- Una "proteína de unión a ADN de dedo de cinc" (o dominio de unión) es una proteína, o un dominio dentro de una proteína más grande, que se une al ADN de una manera específica de secuencia a través de uno o más dedos de cinc, que son regiones de secuencia de aminoácidos dentro del dominio de unión cuya estructura se estabiliza a través de la coordinación de un ion de cinc. El término proteína de unión a ADN de dedo de cinc a menudo se abrevia como proteína de dedo de cinc o ZFP.
- Los dominios de unión de dedo de cinc se pueden "modificar genéticamente" para que se unan a una secuencia de nucleótidos predeterminada. Los ejemplos no limitantes de métodos para la modificación genética de proteínas de dedo de cinc son el diseño y la selección. Una proteína de dedo de cinc diseñada es una proteína que no se encuentra en la naturaleza, cuyo diseño/composición provienen principalmente de criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computarizados para procesar información en una base de datos que almacena información de los diseños de ZFP existentes y datos vinculantes. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos 6.140.081; 6.453.242; y 6.534.261; véanse también los documentos WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496.
- Una proteína de dedo de cinc "seleccionada" es una proteína que no se encuentra en la naturaleza, cuya producción proviene principalmente de un proceso empírico tal como la presentación en fagos, la trampa de interacción o la selección híbrida. Véanse *p.ej.*, los documentos US 5.789.538; US 5.925.523; US 6.007.988; US 6.013.453; US 6.200.759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197 y WO 02/099084.
- "Escisión" se refiere a la rotura de la cadena principal covalente de una molécula de ADN. La escisión se puede iniciar mediante una variedad de métodos que incluyen, pero no limitados a, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Tanto la escisión de la hebra sencilla como la escisión de la doble hebra son posibles, y la escisión de la doble hebra se puede producir como resultado de dos eventos distintos de escisión de hebra sencilla. La escisión del ADN puede dar como resultado la producción de extremos romos o de extremos escalonados. En ciertas realizaciones, se utilizan polipéptidos de fusión para la escisión de ADN de doble hebra dirigida.
- Un "semidominio de escisión" es una secuencia polipeptídica que, junto con un segundo polipéptido (ya sea idéntico o diferente) forma un complejo que tiene actividad de escisión (preferiblemente actividad de escisión de doble hebra). Los términos "primer y segundo semidominios de escisión"; "semidominios de escisión + y -" y "semidominios de escisión derecho e izquierdo" se utilizan indistintamente para referirse a pares de semidominios de escisión que se dimerizan.
- Un "semidominio de escisión modificado genéticamente" es un semidominio de escisión que se ha modificado para formar heterodímeros obligados con otro semidominio de escisión (*p.ej.*, otro semidominio de escisión modificado genéticamente). Véanse también, las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Núm. 10/912.932 y 11/304981 y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 60/808.486 (presentada el 25 de mayo de 2006).

El término "secuencia" se refiere a una secuencia de nucleótidos de cualquier longitud, que puede ser ADN o ARN; puede ser lineal, circular o ramificada y puede ser de hebra sencilla o de doble hebra. El término "secuencia donadora" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se inserta en un genoma. Una secuencia donadora puede tener cualquier longitud, por ejemplo, entre 2 y 10000 nucleótidos de longitud (o cualquier valor entero entre ellos o superior), preferiblemente entre aproximadamente 100 y 1.000 nucleótidos de longitud (o cualquier número entero entre ellos), más preferiblemente entre aproximadamente 200 y 500 nucleótidos de longitud. La "cromatina" es la estructura de la nucleoproteína que comprende el genoma celular. La cromatina celular comprende ácido nucleico, principalmente ADN y proteína, que incluye histonas y proteínas cromosómicas no histónicas. La mayoría de la cromatina celular eucariótica existe en forma de nucleosomas, en donde un núcleo nucleosómico comprende aproximadamente 150 pares de bases de ADN asociadas con un octámero que comprende dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4; y el ADN conector (de longitud variable dependiendo del organismo) se extiende entre los núcleos nucleosómicos. Una molécula de histona H1 generalmente está asociada con el ADN conector. Para los propósitos de la presente descripción, se pretende que el término "cromatina" abarque todos los tipos de nucleoproteínas celulares, tanto procarióticas como eucarióticas. La cromatina celular incluye cromatina tanto cromosómica como episómica.

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

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

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

Una "enfermedad infecciosa crónica" es una enfermedad causada por un agente infeccioso en donde la infección ha persistido. Dicha enfermedad puede incluir hepatitis (A, B o C), virus del herpes (por ejemplo, VZV, HSV-1, HSV-6, HSV-II, CMV y EBV) y VIH/SIDA. Los ejemplos no virales pueden incluir enfermedades fúngicas crónicas tales como Aspergilosis, Candidiasis, Coccidioidomycosis y enfermedades asociadas con *Cryptococcus* e Histoplasmosis. Los ejemplos no limitantes de agentes infecciosos bacterianos crónicos pueden ser *Chlamydia pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, y *Mycobacterium tuberculosis*. El término "cáncer" se refiere a cualquier enfermedad en la que exista una proliferación desenfrenada de células, dentro de un órgano o tejido corporal. Por lo tanto, el término incluye cualquier tipo de cáncer o neoplasia maligna, incluyendo, pero no limitados a, cáncer de ovario, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal/de colon, cáncer de SNC, melanoma, carcinoma de células renales, plasmacitoma/mieloma, cáncer de próstata, cáncer de mama, y similares. Según se utiliza en la presente memoria, el término "tumor" se refiere a un crecimiento anormal de células o tejidos del tipo maligno, a menos que se indique específicamente de otro modo y no incluye un tejido de tipo benigno. El término "inhibe o inhibir" según se utiliza en la presente memoria significa reducir el crecimiento/replicación.

El término "enfermedad autoinmunitaria" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno en el que el sujeto monta una respuesta inmunitaria destructiva contra sus propios tejidos. Los trastornos autoinmunitarios pueden afectar a casi todos los sistemas de órganos en el sujeto (p.ej., humano), incluidos, pero no limitados a, enfermedades de los sistemas nervioso, gastrointestinal y endocrino, así como de la piel y otros tejidos conectivos, ojos, sangre y vasos sanguíneos. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no están limitadas, la tiroiditis de Hashimoto, el lupus eritematoso sistémico, el síndrome de Sjögren, la enfermedad de Graves, la esclerodermia, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la miastenia gravis y la diabetes.

Una molécula "exógena" es una molécula que normalmente no está presente en una célula, pero que puede ser introducida en una célula por uno o más métodos genéticos, bioquímicos u otros. La "presencia normal en la célula" se determina con respecto a la etapa de desarrollo particular y las condiciones ambientales de la célula. Por lo tanto, por ejemplo, una molécula que está presente solo durante el desarrollo embrionario del músculo es una molécula exógena con respecto a una célula muscular adulta. De manera similar, una molécula inducida por choque térmico es una molécula exógena con respecto a una célula que no ha sido sometida a choque térmico. Una molécula exógena puede comprender, por ejemplo, una versión funcional de una molécula endógena defectuosa o una versión defectuosa de una molécula endógena que funciona normalmente.

Una molécula exógena puede ser, entre otras cosas, una molécula pequeña, tal como se genera mediante un proceso de química combinatoria, o una macromolécula tal como una proteína, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, glicoproteína, lipoproteína, polisacárido, cualquier derivado modificado de las moléculas anteriores o cualquier complejo que comprenda una o más de las moléculas anteriores. Los ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN, pueden ser de hebra sencilla o de doble hebra; pueden ser lineales, ramificados o circulares; y pueden tener cualquier longitud. Los ácidos nucleicos incluyen aquellos capaces de formar dúplex, así como ácidos nucleicos formadores de triplex. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.176.996 y 5.422.251. Las proteínas incluyen, pero no se limitan a, proteínas de unión a ADN, factores de transcripción, factores de remodelación de la

cromatina, proteínas de unión a ADN metilado, polimerasas, metilasas, desmetilasas, acetilasas, desacetilasas, quinasas, fosfatasas, integrasas, recombinasas, ligasas, topoisomerasas, girasas y helicasas.

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

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

15 Una molécula de "fusión" es una molécula en la que dos o más moléculas de la subunidad están unidas, preferiblemente de manera covalente. Las moléculas de la subunidad pueden ser del mismo tipo químico de molécula, o pueden ser diferentes tipos químicos de moléculas. Los ejemplos del primer tipo de molécula de fusión incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (por ejemplo, una fusión entre un dominio de unión al ADN de ZFP y un dominio de escisión) y ácidos nucleicos de fusión (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión descrita más arriba). Los ejemplos del segundo tipo de molécula de fusión incluyen, pero no se limitan a, una fusión entre un ácido nucleico formador de triplex y un polipéptido, y una fusión entre un ligando de unión al surco menor y un ácido nucleico.

25 La expresión de una proteína de fusión en una célula puede ser el resultado del suministro de la proteína de fusión a la célula o el suministro de un polinucleótido que codifica la proteína de fusión a una célula, en donde el polinucleótido se transcribe y el transcrito se traduce para generar la proteína de fusión. El empalme en trans, la escisión de polipéptidos y la ligación de polipéptidos también pueden estar implicados en la expresión de una proteína en una célula. Los métodos para el suministro de polinucleótidos y polipéptidos a células se presentan en otra parte en esta descripción.

30 Un "gen", para los fines de la presente descripción, incluye una región de ADN que codifica un producto génico (véase más abajo), así como también todas las regiones de ADN que regulan la producción del producto génico, independientemente de que dichas secuencias reguladoras sean adyacentes a secuencias codificantes y/o transcritas. De acuerdo con esto, un gen incluye, pero no está necesariamente limitado a, secuencias promotoras, terminadores, secuencias reguladoras de la traducción tales como sitios de unión al ribosoma y sitios internos de entrada al ribosoma, potenciadores, silenciadores, aisladores, elementos limítrofes, orígenes de replicación, sitios de anclaje a la matriz y regiones de control de locus.

35 "Expresión genética" se refiere a la conversión de la información, contenida en un gen, en un producto génico. Un producto génico puede ser el producto transcripcional directo de un gen (p.ej., ARNm, ARNt, ARNr, ARN antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína producida por traducción de un ARNm. Los productos génicos también incluyen ARN que se modifican, por procesos tales como protección terminal, poliadenilación, metilación y edición, y proteínas modificadas, por ejemplo, mediante metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ribosilación de ADP, miristilación y glicosilación.

40 La "modulación" de la expresión génica se refiere a un cambio en el nivel de expresión de un gen. La modulación de la expresión puede incluir, pero no se limita a, la activación génica y la represión génica. La modulación también se puede completar, es decir en donde la expresión génica está totalmente inactivada o se activa en niveles de tipo salvaje o más allá; o puede ser parcial, en donde la expresión génica se reduce parcialmente, o se activa parcialmente a una fracción de los niveles de tipo salvaje. Las células "eucariotas" incluyen, pero no se limitan a, células fúngicas (tales como levaduras), células vegetales, células animales, células de mamíferos y células humanas (p.ej., células T).

45 Los términos "conexión operativa" y "conectado operativamente" (o "conectado operablemente") se utilizan indistintamente con referencia a una yuxtaposición de dos o más componentes (tales como elementos de secuencia), en la que los componentes están dispuestos de manera que ambos componentes funcionan normalmente y permiten la posibilidad de que al menos uno de los componentes pueda mediar una función que se ejerce sobre al menos uno de los otros componentes. A modo de ilustración, una secuencia reguladora de la transcripción, tal como un promotor, está conectada operativamente a una secuencia codificante si la secuencia reguladora de la transcripción controla el nivel de transcripción de la secuencia codificante en respuesta a la presencia o ausencia de uno o más factores reguladores de la transcripción. Una secuencia reguladora de la transcripción generalmente está conectada operativamente en *cis* con una secuencia codificante, pero no es necesario que esté directamente adyacente a ella. Por ejemplo, un potenciador es una secuencia reguladora de la transcripción que está conectada operativamente a una secuencia codificante, aunque no sean contiguas.

Con respecto a los polipéptidos de fusión, el término "conectado operativamente" puede referirse al hecho de que cada uno de los componentes realiza la misma función en la conexión con el otro componente que si no estuvieran conectados. Por ejemplo, con respecto a un polipéptido de fusión en el que un dominio de unión al ADN de ZFP se fusiona a un dominio de escisión, el dominio de unión al ADN de ZFP y el dominio de escisión están en conexión operativa si, en el polipéptido de fusión, la porción del dominio de unión al ADN de ZFP es capaz de unirse a su sitio diana y/o su sitio de unión, mientras que el dominio de escisión es capaz de escindir el ADN en la vecindad del sitio diana. De manera similar, con respecto a un polipéptido de fusión en el que un dominio de unión al ADN de ZFP se fusiona con un dominio de activación o represión, el dominio de unión al ADN de ZFP y el dominio de activación o represión están en conexión operativa si, en el polipéptido de fusión, la porción del dominio de unión al ADN de ZFP es capaz de unirse a su sitio diana y/o su sitio de unión, mientras que el dominio de activación es capaz de regular al alza la expresión génica o el dominio de represión es capaz de regular a la baja la expresión génica.

Un "fragmento funcional" de una proteína, polipéptido o ácido nucleico es una proteína, polipéptido o ácido nucleico cuya secuencia no es idéntica a la de la proteína, polipéptido o ácido nucleico completos, pero conserva la misma función que la proteína, polipéptido o ácido nucleico completos. Un fragmento funcional puede poseer más, menos o el mismo número de residuos que la molécula nativa correspondiente y/o puede contener una o más sustituciones de aminoácidos o nucleótidos. Los métodos para determinar la función de un ácido nucleico (p.ej., función codificante, capacidad para hibridar con otro ácido nucleico) son bien conocidos en la técnica. De manera similar, los métodos para determinar la función de la proteína son bien conocidos. Por ejemplo, la función de unión al ADN de un polipéptido se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis de unión al filtro, desplazamiento de movilidad electroforética o inmunoprecipitación. La escisión de ADN se puede analizar mediante electroforesis en gel. Véase Ausubel *et al.*, más arriba. La capacidad de una proteína para interactuar con otra proteína se puede determinar, por ejemplo, mediante co-inmunoprecipitación, análisis de dos híbridos o complementación, tanto genética como bioquímica. Véanse, por ejemplo, Fields *et al.* (1989) *Nature* 340:245-246; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.585.245 y documento PCT WO 98/44350.

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

Un "gen informador" o "secuencia informadora" se refieren a cualquier secuencia que produce un producto proteico que se mide fácilmente, preferiblemente aunque no necesariamente en un análisis de rutina. Los genes informadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, secuencias que codifican proteínas que median la resistencia a antibióticos (p.ej., resistencia a ampicilina, resistencia a neomicina, resistencia a G418, resistencia a puromicina), secuencias que codifican proteínas coloreadas o fluorescentes o luminiscentes (p.ej., proteína fluorescente verde, proteína fluorescente verde potenciada, proteína fluorescente roja, luciferasa) y proteínas que median el crecimiento celular potenciado y/o la amplificación de genes (p.ej., dihidrofolato reductasa). Las etiquetas epitópicas incluyen, por ejemplo, una o más copias de FLAG, His, myc, Tap, HA o cualquier secuencia de aminoácidos detectable. Las "etiquetas de expresión" incluyen secuencias que codifican informadores que pueden estar conectadas operablemente a una secuencia génica deseada para controlar la expresión del gen de interés.

Visión de conjunto

En la presente memoria se describen factores de transcripción de proteína de dedo de cinc (ZFP-TF) y/o nucleasas (p.ej., ZFN) dirigidos al gen de PD1, así como composiciones que comprenden y métodos de uso de estos ZFP-TF y/o nucleasas para el tratamiento de enfermedades o trastornos en los que PD1 se expresa aberrante o indeseablemente, o en donde la ruta PD1 se utiliza aberrante o indeseablemente debido a la expresión en exceso de un ligando de PD1, incluyendo, por ejemplo, el tratamiento de enfermedades infecciosas crónicas, cánceres y/o enfermedades autoinmunitarias. Para el tratamiento de un sujeto con una enfermedad o trastorno que se mejora mediante la modulación de la expresión de PD1, los ZFP-TF y/o nucleasas descritos en la presente memoria se pueden introducir *in vivo* o *ex vivo* en células (p.ej., células primarias aisladas de un paciente aquejado de dicha enfermedad). Después del tratamiento con ZFP-TF y/o ZFN, las células pueden reintroducirse en el paciente para su uso como medicamento en el tratamiento de una enfermedad infecciosa crónica o cáncer. De forma similar, se pueden usar células madre que han sido tratadas con ZFN y/o ZFP-TF específicos de PD1. Estas células se pueden infundir en un paciente afectado para el tratamiento de tal afección médica.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria permiten la modulación de un gen de PD1. La expresión de PD1 puede eliminarse, reducirse, regularse al alza o regularse a la baja utilizando ZFP TF o ZFN específicos de PD1, dependiendo de la necesidad. La expresión de PD1 puede ser regulada a la baja con ZFP-TF o uno o más ZFN específicos de PD1, por ejemplo, en pacientes aquejados de enfermedades infecciosas crónicas o cánceres, y pueden regularse al alza en pacientes, por ejemplo, pacientes con enfermedad autoinmunitaria. Los métodos y composiciones de la invención también proporcionan agentes terapéuticos que comprenden un polinucleótido que codifica los TF y/o nucleasas de ZFP específicos de PD1, en donde el polinucleótido se administra directamente al paciente. Además, la invención proporciona métodos y composiciones en los que el polinucleótido que codifica los ZFP TF y/o nucleasas se puede incorporarse a un vector tal como un vehículo de suministro viral para la administración sistémica como un agente terapéutico para un paciente afectado.

Dominios de unión al ADN

En la presente memoria se describen composiciones que comprenden un dominio de unión al ADN que se une específicamente a un sitio diana en un gen de PD1. Se puede usar cualquier dominio de unión al ADN en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, que incluyen, pero no se limitan a, un dominio de unión a ADN de dedo de cinc o un dominio de unión al ADN de una meganucleasa.

En ciertas realizaciones, el dominio de unión al ADN comprende una proteína de dedo de cinc. Preferiblemente, la proteína de dedo de cinc se produce de forma no natural porque está diseñada para unirse a un sitio diana elegido. Véanse, por ejemplo, Beerli *et al.* (2002) *Nature Biotechnol.* **20**:135-141; Pabo *et al.* (2001) *Ann. Rev. Biochem.* **70**:313-340; Isalan *et al.* (2001) *Nature Biotechnol.* **19**:656-660; Segal *et al.* (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**:632-637; Choo *et al.* (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**:411-416; Patentes de Estados Unidos Núm. 6.453.242; 6.534.261; 6.599.692; 6.503.717; 6.689.558; 7.030.215; 6.794.136; 7.067.317; 7.262.054; 7.070.934; 7.361.635; 7.253.273; y Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061.

Un dominio de unión a dedos de cinc modificado genéticamente puede tener una nueva especificidad de unión, en comparación con una proteína de dedo de cinc de origen natural. Los métodos de modificación genética ingeniería incluyen, entre otros, diseño racional y varios tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, el uso de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos triplete (o cuatriplete) y secuencias de aminoácidos individuales de dedos de cinc, en las que cada secuencia de nucleótidos triplete o cuatriplete se asocia con una o más secuencias de aminoácidos de dedos de cinc que se unen a la secuencia triplete o cuatriplete concreta. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.453.242 y 6.534.261 de propiedad compartida.

Los métodos de selección ilustrativos, que incluyen la presentación de fagos y los sistemas de dos híbridos, se describen en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.410.248; 6.140.466; 6.200.759; y 6.242.568; así como los documentos WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 y GB 2.338.237. Además, la mejora de la especificidad de unión para dominios de unión de dedos de cinc se ha descrito, por ejemplo, el documento WO 02/077227 de propiedad compartida.

Además, como se describe en estas y otras referencias, los dominios de dedos de cinc y/o proteínas de dedos de cinc de dedos múltiples pueden conectarse entre sí usando cualquier secuencia conectora adecuada, que incluye, por ejemplo, conectores de 5 o más aminoácidos de longitud. Véase también, las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para secuencias conectoras ilustrativas de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en la presente memoria pueden incluir cualquier combinación de conectores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína. Además, la mejora de la especificidad de unión para los dominios de unión de dedos de cinc se ha descrito, por ejemplo, en el documento WO 02/077227 de propiedad compartida.

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

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

Alternativamente, el dominio de unión a ADN puede derivarse de una nucleasa. Por ejemplo, se conocen las secuencias de reconocimiento de endonucleasas de asentamiento y meganucleasas tales como I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-Scell, I-Ppol, I-ScellI, I-Crel, I-TevI, I-TevII y I-TevIII. Véanse también la Patente de Estados Unidos Núm. 5,420,032; la Patente de Estados Unidos Núm. 6,833,252; Belfort *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**:3379-3388; Dujon *et al.* (1989) *Gene* **82**:115-118; Perler *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* **12**:224-228; Gimble *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* **263**:163-180; Argast *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* **280**:345-353 y el catálogo de New England Biolabs. Además, la especificidad de unión a ADN de las endonucleasas de asentamiento y las meganucleasas puede modificarse genéticamente para unirse a sitios diana no naturales. Véanse, por ejemplo, Chevalier *et al.* (2002) *Molec. Cell* **10**:895-905; Epinat *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**:2952-2962; Ashworth *et al.* (2006) *Nature* **441**:656-659; Paques *et al.* (2007) *Current Gene Therapy* **7**:49-66; Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20070117128.

En ciertas realizaciones, el dominio de unión a ADN es una proteína de dedo de cinc modificada genéticamente que se une (de una manera específica de la secuencia) a un sitio diana en un gen de PD1 y modula la expresión de PD1. Los ZFP pueden unirse selectivamente a un alelo de PD1 mutante o a una secuencia de PD1 de tipo salvaje. Los sitios diana de PD1 incluyen típicamente al menos un dedo de cinc pero pueden incluir una pluralidad de dedos de

cinc (p.ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más dedos). Por lo general, los ZFP incluyen al menos tres dedos. Algunos de los ZFP incluyen cuatro, cinco o seis dedos. Los ZFP que incluyen tres dedos típicamente reconocen un sitio diana que incluye 9 o 10 nucleótidos; los ZFP que incluyen cuatro dedos típicamente reconocen un sitio diana que incluye de 12 a 14 nucleótidos; mientras que los ZFP que tienen seis dedos pueden reconocer sitios diana que incluyen de 18 a 21 nucleótidos. Los ZFP también pueden ser proteínas de fusión que incluyen uno o más dominios reguladores, en donde estos dominios reguladores pueden ser dominios de activación o represión transcripcional.

Proteínas de fusión

También se proporcionan proteínas de fusión que comprenden proteínas de unión a ADN (p.ej., ZFP) como se describe en la presente memoria y un dominio regulador (funcional) heterólogo (o un fragmento funcional del mismo). Los dominios comunes incluyen, p.ej., dominios del factor de transcripción (activadores, represores, co-activadores, co-represores), silenciadores, oncogenes (p.ej., miembros de la familia myc, jun, fos, myb, max, mad, rel, ets, bcl, myb, mos, etc.); enzimas de reparación de ADN y sus factores y modificadores asociados; enzimas de reordenamiento de ADN y sus factores y modificadores asociados; proteínas asociadas a la cromatina y sus modificadores (p.ej. quinasas, acetilasas y desacetilasas); y enzimas modificadoras del ADN (p.ej., metiltransferasas, topoisomerasas, helicasas, ligasas, quinasas, fosfatasa, polimerasas, endonucleasas) y sus factores y modificadores asociados. Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20050064474; 20060188987 y 2007/0218528 para detalles concernientes a las fusiones de dominios de unión a ADN y dominios de escisión de nucleasa.

Los dominios adecuados para lograr la activación incluyen el dominio de activación VP16 de HSV (véase, p.ej., Hagmann *et al.*, *J. Virol.* 71, 5952-5962 (1997)) receptores de hormonas nucleares (véase, p.ej., Torchia *et al.*, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:373-383 (1998)); la subunidad p65 del factor nuclear kappa B (Bitko y Barik, *J. Virol.* 72:5610-5618 (1998) y Doyle y Hunt, *Neuroreport* 8:2937-2942 (1997)); Liu *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 5:3-28 (1998)), o dominios funcionales quiméricos artificiales tales como VP64 (Beerli *et al.*, (1998) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 95:14623-33) y degron (Molinari *et al.*, (1999) *EMBO J.* 18, 6439-6447). Los dominios de activación ilustrativos adicionales incluyen, Oct 1, Oct-2A, Sp1, AP-2 y CTF1 (Seipel *et al.*, *EMBO J.* 11, 4961-4968 (1992), así como p300, CBP, PCAF, SRC1 PvALF, AtHD2A y ERF-2. Véanse, por ejemplo, Robyr *et al.* (2000) *Mol. Endocrinol* 14: 329-347; Collingwood *et al.* (1999) *J. Mol. Endocrinol* 23:255-275; Leo *et al.* (2000) *Gene* 245:1-11; Manteuffel-Cymborowska (1999) *Acta Biochim. Pol.* 46: 77-89; McKenna *et al.* (1999) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69:3-12; Malik *et al.* (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25:277-283; y Lemon *et al.* (1999) *Curr. Opinión Genet. Dev.* 9:499-504. Otros dominios de activación ilustrativos incluyen, pero se limitan a, OsGAL, HALF-1, C1, AP1, ARF-5, -6, -7 y -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP y TRAB1. Véanse, por ejemplo, Ogawa *et al.* (2000) *Gene* 245:21-29; Okanami *et al.* (1996) *Genes Cells* 1:87-99; Goff *et al.* (1991) *Genes Dev.* 5:298-309; Cho *et al.* (1999) *Plant Mol. Biol.* 40:419-429; Ulmason *et al.* (1999) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 96:5844-5849; Sprenger-Haussels *et al.* (2000) *Plant J.* 22:1-8; Gong *et al.* (1999) *Plant Mol. Biol.* 41:33-44; y Hobo *et al.* (1999) *Proc. Natl Acad. Sci USA.* 96:15.348-15.353.

Resultará evidente para los expertos en la técnica que, en la formación de una proteína de fusión (o un ácido nucleico que lo codifica) entre un dominio de unión al ADN y un dominio funcional, son adecuados como dominio funcional ya sea un dominio de activación o una molécula que interactúa con un dominio de activación. Esencialmente cualquier molécula capaz de reclutar un complejo activador y/o actividad activadora (tal como, por ejemplo, acetilación de histonas) al gen diana es útil como dominio activador de una proteína de fusión. Los dominios aislantes, dominios de localización y proteínas de remodelación de cromatina tales como dominios que contienen ISWI y/o proteínas de dominio de unión a metilo adecuados para su uso como dominios funcionales en moléculas de fusión se describen, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 2002/0115215 y 2003/0082552 de propiedad compartida y en el documento WO 02/44376 de propiedad compartida.

Los dominios de represión ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, KRAB A/B, KOX, gen temprano inducible por TGF-beta (TIEG), v-erbA, SID, MBD2, MBD3, miembros de la familia DNMT (p.ej., DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), Rb y MeCP2. Véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1999) *Cell* 99:451-454; Tyler *et al.* (1999) *Cell* 99:443-446; Knoepfler *et al.* (1999) *Cell* 99:447-450; y Robertson *et al.* (2000) *Nature Genet.* 25:338-342. Otros dominios de represión ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, ROM2 y AtHD2A. Véanse, por ejemplo, Chem *et al.* (1996) *Plant Cell* 8:305-321; y Wu *et al.* (2000) *Plant J.* 22:19-27.

Las moléculas de fusión se construyen mediante métodos de clonación y conjugación bioquímica que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las moléculas de fusión comprenden un dominio de unión al ADN y un dominio funcional (p.ej., un dominio de represión o activación transcripcional). Las moléculas de fusión también comprenden opcionalmente señales de localización nuclear (tales como, por ejemplo, las del antígeno T medio de SV40) y etiquetas epitópicas (tales como, por ejemplo, FLAG y hemaglutinina). Las proteínas de fusión (y los ácidos nucleicos que las codifican) están diseñadas de tal manera que el marco de lectura traduccional se conserva entre los componentes de la fusión.

Las fusiones entre un componente polipeptídico de un dominio funcional (o un fragmento funcional del mismo), por un lado, y un dominio de unión al ADN no proteico (p.ej., antibiótico, intercalador, ligandos de unión al surco menor, ácido nucleico) por el otro, se construyen mediante métodos de conjugación bioquímica conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, el Catálogo Pierce Chemical Company (Rockford, IL). Se han descrito métodos y

composiciones para realizar fusiones entre un ligando de unión a la ranura menor y un polipéptido. Mapp *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3930-3935.

En ciertas realizaciones, el sitio diana unido por la proteína del dedo de cinc está presente en una región accesible de la cromatina celular. Las regiones accesibles se pueden determinar como se describe, por ejemplo, en la publicación internacionales WO 01/83732 de propiedad compartida. Si el sitio diana no está presente en una región accesible de la cromatina celular, se pueden generar una o más regiones accesibles como se describe en el documento WO 01/83793 de propiedad compartida. En aspectos adicionales, el dominio de unión al ADN de una molécula de fusión es susceptible de unirse a la cromatina celular independientemente de si su sitio diana está en una región accesible o no. Por ejemplo, tales dominios de unión al ADN son capaces de unirse al ADN del conector y/o al ADN nucleosomal. Los ejemplos de este tipo de dominio de unión al ADN "pionero" se encuentran en ciertos receptores de esteroides y en el factor nuclear de hepatocitos 3 (HNF3). Cordingley *et al.* (1987) *Cell* 48:261-270; Pina *et al.* (1990) *Cell* 60:719-731; y Cirillo *et al.* (1998) *EMBO J.* 17:244-254.

La molécula de fusión se puede formular con un portador farmacéuticamente aceptable, como es conocido por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., 1985; y el documento WO 00/42219 de propiedad compartida.

El componente/dominio funcional de una molécula de fusión se puede seleccionar de cualquiera de una variedad de componentes diferentes capaces de influir en la transcripción de un gen una vez que la molécula de fusión se une a una secuencia diana a través de su dominio de unión al ADN. Por lo tanto, el componente funcional puede incluir, pero no se limita a, varios dominios de factores de transcripción, tales como activadores, represores, co-activadores, co-represores y silenciadores.

Se describen dominios funcionales ilustrativos adicionales, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.534.261 de propiedad compartida y la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2002/0160940.

También se pueden seleccionar dominios funcionales que están regulados por pequeñas moléculas o ligandos exógenos. Por ejemplo, se puede emplear la tecnología RheoSwitch® en donde un dominio funcional solo asume su conformación activa en presencia del ligando externo RheoChem™ (véase por ejemplo el documento US 20090136465). Por lo tanto, la ZFP puede estar conectada operativamente al dominio funcional regulable en donde la actividad resultante del ZFP-TF está controlada por el ligando externo. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión comprende un dominio de unión y dominio de escisión (nucleasa). Como tal, la modificación genética se puede lograr usando una nucleasa, por ejemplo, una nucleasa modificada genéticamente. La tecnología de nucleasas modificadas genéticamente se basa en la modificación mediante ingeniería genética de proteínas de unión a ADN de origen natural. Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son ampliamente aplicables y pueden implicar cualquier nucleasa de interés. Los ejemplos no limitantes de nucleasas incluyen meganucleasas y nucleasas de dedo de cinc. La nucleasa puede comprender dominios heterólogos de unión y escisión de ADN (p.ej., nucleasas de dedo de cinc; dominios de unión a ADN de meganucleasa con dominios de escisión heterólogos) o, alternativamente, el dominio de unión al ADN de una nucleasa natural se puede alterar para unirse a un sitio diana seleccionado (p.ej., una meganucleasa que se ha diseñado para unirse al sitio diferente del sitio de unión cognado). Por ejemplo, se ha descrito la modificación mediante ingeniería genética de endonucleasas de asentamiento con especificidades de unión a ADN adaptadas, véanse Chames *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res* 33(20):e178; Arnould *et al.* (2006) *J. Mol. Biol.* 355:443-458 y Grizot *et al.*, (2009) *Nucleic Acids Res* 7 de julio publicación e. Además, también se ha descrito la modificación mediante ingeniería genética de ZFP. Véanse, p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.534.261; 6.607.882; 6.824.978; 6.979.539; 6.933.113; 7.163.824; y 7.013.219.

En cierto aspecto, la nucleasa es una meganucleasa (endonucleasa de asentamiento). Las meganucleasas de origen natural reconocen 15-40 sitios de escisión de pares de bases y se agrupan comúnmente en cuatro familias: la familia LAGLIDADG, la familia GTY-YIG, la familia de cajas His-Cyst y la familia HNH. Las endonucleasas de asentamiento ilustrativas incluyen I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-Csml, I-PanI, I-Scell, I-Ppol, I-ScellI, I-Crel, I-TevI, I-TevII y I-TevIII. Sus secuencias de reconocimiento son conocidas. Véanse también la Patente de Estados Unidos Núm. 5.420.032; la Patente de Estados Unidos Núm. 6.833.252; Belfort *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon *et al.* (1989) *Gene* 82:115-118; Perler *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 y el catálogo de New England Biolabs.

Los dominios de unión al ADN de las meganucleasas de origen natural, principalmente de la familia LAGLIDADG, se han utilizado para promover la modificación del genoma específica del sitio en vegetales, levaduras, *Drosophila*, células de mamíferos y ratones, pero este enfoque se ha limitado a la modificación de genes homólogos que conservan la secuencia de reconocimiento de la meganucleasa (Monet *et al.* (1999), *Biochem. Biophys. Res. Common.* 255:88-93) o de genomas pre-modificados genéticamente en los que se ha introducido una secuencia de reconocimiento (Route *et al.* (1994), *Mol. Celda. Biol.* 14:8096-106; Chilton *et al.* (2003), *Plant Physiology.* 133:956-65; Puchta *et al.* (1996), *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93:5055-60; Rong *et al.* (2002), *Genes Dev.* 16:1568-81; Gouble *et al.* (2006), *J. Gene Med.* 8(5):616-622). En consecuencia, se han realizado intentos para diseñar meganucleasas

que exhiban una nueva especificidad de unión en sitios relevantes desde el punto de vista médico o biotecnológico (Porteus *et al.* (2005), *Nat. Biotechnol.* 23:967-73; Sussman *et al.* (2004), *J. Mol. Biol.* 342:31-41; Epinat *et al.* (2003), *Nucleic Acids Res.* 31:2952-62; Chevalier *et al.* (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth *et al.* (2006) *Nature* 441:656-659; Paques *et al.* (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20070117128; 20060206949; 20060153826; 20060078552; y 20040002092). Además, los dominios de unión al ADN de origen natural o modificados mediante ingeniería genética a partir de meganucleasas también se han conectado operativamente con un dominio de escisión de una nucleasa heteróloga (p.ej., FokI).

En otros aspectos, la nucleasa es una nucleasa de dedo de cinc (ZFN). Las ZFN comprenden una proteína de dedo de cinc que se ha modificado genéticamente para unirse a un sitio diana en un gen de elección y dominio de escisión o un semidominio de escisión.

Como se señaló anteriormente, los dominios de unión de dedos de cinc pueden modificarse genéticamente para unirse a una secuencia de elección. Véanse, por ejemplo, Beerli *et al.* (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo *et al.* (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan *et al.* (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal *et al.* (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo *et al.* (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416. Un dominio de unión de dedo de cinc modificado genéticamente puede tener una nueva especificidad de unión, en comparación con una proteína de dedo de cinc natural. Los métodos de modificación mediante ingeniería genética incluyen, entre otros, diseño racional y varios tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, el uso de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos triplete (o cuatriplete) y secuencias de aminoácidos individuales de dedos de cinc, en las que cada secuencia de nucleótidos triplete o cuatriplete se asocia con una o más secuencias de aminoácidos de dedos de cinc que se unen a la secuencia triplete o cuatriplete concreta. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.453.242 y 6.534.261 de propiedad compartida.

Los métodos de selección ilustrativos, que incluyen la presentación de fagos y sistemas de dos híbridos, se describen en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.410.248; 6.140.466; 6.200.759; y 6.242.568; así como los documentos WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 y GB 2.338.237. Además, la mejora de la especificidad de unión para los dominios de unión de dedos de cinc se ha descrito, por ejemplo, en el documento WO 02/077227 de propiedad compartida.

Selección de sitios diana; las ZFN y los métodos para el diseño y la construcción de proteínas de fusión (y polinucleótidos que codifican los mismos) son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en detalle en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20050064474 y 20060188987.

Además, como se describe en estas y otras referencias, los dominios de dedos de cinc y/o proteínas de dedos de cinc de dedos múltiples pueden unirse entre sí usando cualquier secuencia conectora adecuada, que incluye, por ejemplo, conectores de 5 o más aminoácidos de longitud. Véanse, p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para las secuencias conectoras ilustrativas de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en la presente memoria pueden incluir cualquier combinación de conectores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína.

Las nucleasas tales como las ZFN y/o meganucleasas también comprenden una nucleasa (dominio de escisión, semidominio de escisión). Como se señaló anteriormente, el dominio de escisión puede ser heterólogo con respecto al dominio de unión a ADN, por ejemplo, un dominio de unión a ADN de dedo de cinc y un dominio de escisión de una nucleasa o un dominio de unión a ADN de meganucleasa y dominio de escisión de una nucleasa diferente. Los dominios de escisión heterólogos se pueden obtener a partir de cualquier endonucleasa o exonucleasa. Las endonucleasas ilustrativas a partir de las cuales se puede obtener un dominio de escisión incluyen, pero no se limitan a, endonucleasas de restricción y endonucleasas de asentamiento. Véanse, por ejemplo, el Catálogo 2002-2003, New England Biolabs, Beverly, MA; y Belfort *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388. Se conocen enzimas adicionales que escinden el ADN (p.ej., Nucleasa S1; nucleasa de judía mung; ADNasa I pancreática; nucleasa microcócica; endonucleasa HO de levadura; véase también Linn *et al.* (eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Se pueden utilizar una o más de estas enzimas (o fragmentos funcionales de las mismas) como fuente de dominios de escisión y semidominios de escisión.

De manera similar, se puede obtener un semidominio de escisión de cualquier nucleasa o porción de la misma, como se ha expuesto anteriormente, que requiere dimerización para la actividad de escisión. En general, se requieren dos proteínas de fusión para la escisión si las proteínas de fusión comprenden semidominios de escisión. Alternativamente, se puede usar una única proteína que comprende dos semidominios de escisión. Los dos semidominios de escisión se pueden obtener de la misma endonucleasa (o fragmentos funcionales de la misma), o cada semidominio de escisión se puede obtener de una endonucleasa diferente (o fragmentos funcionales de la misma). Además, los sitios diana para las dos proteínas de fusión están dispuestos preferiblemente, uno respecto del otro, de manera que la unión de las dos proteínas de fusión a sus respectivos sitios diana coloca los semidominios de división en una orientación espacial entre sí que permite que los semidominios de escisión formen un dominio de escisión funcional, p.ej., mediante dimerización. Por lo tanto, en ciertos aspectos, los márgenes cercanos de los sitios diana están separados por 5-8 nucleótidos o por 15-18 nucleótidos. Sin embargo, puede intervenir cualquier número entero de nucleótidos o pares de nucleótidos entre dos sitios diana (p.ej., de 2 a 50

pares de nucleótidos o más). En general, el sitio de escisión se encuentra entre los sitios diana.

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

Una enzima de restricción Tipo IIS ilustrativa, cuyo dominio de escisión es separable del dominio de unión, es *Fok I*. Esta enzima en particular está activa en forma de dímero. Bitinaite *et al.* (1998) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95:10.570-10.575. Por consiguiente, para los fines de la presente descripción, la porción de la enzima *Fok I* utilizada en las proteínas de fusión descritas se considera un semidominio de escisión. Por lo tanto, para la escisión de la doble hebra elegida como diana y/o el reemplazo dirigido de secuencias celulares usando fusiones *Fok I* de dedo de cinc, se pueden utilizar dos proteínas de fusión, cada una de las cuales comprende un semidominio de escisión *FokI*, para reconstituir un dominio de escisión catalíticamente activo. Alternativamente, también se pueden utilizar una única molécula de polipéptido que contiene un dominio de unión de dedos de cinc y dos semidominios de escisión *FokI*. Los parámetros para la escisión dirigida y la alteración de la secuencia elegida como diana utilizando fusiones de dedo de cinc-*Fok I* se proporcionan en otra parte de esta descripción.

Un dominio de escisión o semidominio de escisión puede ser cualquier porción de una proteína que conserva la actividad de escisión, o que conserva la capacidad de multimerización (p.ej., dimerización) para formar un dominio de escisión funcional.

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

En ciertos aspectos, el dominio de escisión comprende uno o más semidominios de escisión modificados genéticamente (también denominados mutantes del dominio de dimerización) que minimizan o previenen la homodimerización, como se describe, por ejemplo, en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 20050064474 y 20060188987 y en la Solicitud de Estados Unidos Núm. 11/805.850 (presentada el 23 de mayo de 2007). Los residuos de aminoácidos en las posiciones 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537 y 538 de *Fok I* son todos dianas para influir en la dimerización de los semidominios de escisión de *Fok I*.

Los semidominios de escisión de *Fok I* modificados genéticamente que forman heterodímeros obligados incluyen un par en el que un primer semidominio de escisión incluye mutaciones en los residuos de aminoácidos en las posiciones 490 y 538 de *Fok I* y un segundo semidominio de escisión incluye mutaciones en los residuos de aminoácidos 486 y 499.

Por lo tanto, en un aspecto, una mutación en 490 reemplaza Glu (E) por Lys (K); la mutación en 538 reemplaza Iso (I) por Lys (K); la mutación en 486 reemplaza a Gln (Q) por Glu (E); y la mutación en la posición 499 reemplaza Iso (I) por Lys (K). Específicamente, los semidominios de división modificados genéticamente descritos en la presente memoria se prepararon mutando las posiciones 490 (E → K) y 538 (I → K) en un semidominio de escisión para producir un semidominio de escisión denominado "E490K:I538K" y mutando las posiciones 486 (Q → E) y 499 (I → L) en otro semidominio de escisión para producir un semidominio de escisión denominado "Q486E:I499L". Los semidominios de escisión modificados genéticamente descritos en la presente memoria son mutantes de heterodímeros obligados en los que se minimiza o se suprime la escisión aberrante. Véase, p.ej., el Ejemplo 1 de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Núm. 60/808.486 (presentada el 25 de mayo de 2006).

Los semidominios de escisión modificados genéticamente descritos en la presente memoria se pueden preparar utilizando cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio de semidominios de escisión de tipo salvaje (*Fok I*) como se describe en el Ejemplo 5 de la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20050064474 y el Ejemplo 38 de las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos Núm. 2007/0305346 y 2008/0131962 y las Solicitudes de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. 61/337.769, presentada en 8 de febrero de 2010 y 61/403.916, presentada el 23 de septiembre de 2010.

Los constructos de expresión de nucleasas se pueden diseñar fácilmente usando métodos conocidos en la técnica. Véanse, p.ej., las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos Núm. 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; y la Publicación Internacional WO 07/014275. En ciertos aspectos, la expresión de la nucleasa está bajo el control de un promotor inducible, por ejemplo el promotor de galactoquinasa

que se activa (desreprime) en presencia de rafinosa y/o galactosa y se reprime en presencia de glucosa. En particular, el promotor de la galactoquinasa se induce y las nucleasas se expresan después de sucesivos cambios de la fuente de carbono (p.ej., de glucosa a rafinosa a galactosa). Otros ejemplos no limitantes de promotores inducibles incluyen *CUP1*, *MET15*, *PHO5*, y promotores sensibles a tet.

5 Suministro

Las proteínas (p.ej., las ZFP), los polinucleótidos que las codifican y las composiciones que comprenden las proteínas y/o los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden administrarse a una célula diana mediante cualquier medio adecuado. Las células adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células y/o líneas celulares eucariotas y procariontas. Los ejemplos no limitantes de tales células o líneas celulares generadas a partir de tales células incluyen COS, CHO (p.ej., CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (p.ej., HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), y células perC6, así como células de insecto tales como *Spodoptera fugiperda* (Sf) o células fúngicas tales como *Saccharomyces*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*. En ciertos aspectos, la línea celular es una línea celular CHO-K1, MDCK o HEK293. Las células primarias adecuadas incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y otros subconjuntos de células sanguíneas tales como, pero sin limitación, células T CD4+ o células T CD8+. Las células adecuadas también incluyen células madre tales como, a modo de ejemplo, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre hematopoyéticas, células madre neuronales y células madre mesenquimatosas.

Los métodos de suministro de proteínas que comprenden proteínas de dedos de cinc como se describe en la presente memoria se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.453.242; 6.503.717; 6.534.261; 6.599.692; 6.607.882; 6.689.558; 6.824.978; 6.933.113; 6.979.539; 7.013.219; y 7.163.824.

Las proteínas de dedo de cinc como se describe en la presente memoria también pueden suministrarse utilizando vectores que contienen secuencias que codifican una o más proteína de dedo de cinc. Se pueden usar sistemas de vectores cualesquiera que incluyen, pero no se limitan a, vectores plasmídicos, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales, vectores poxvirales; vectores de herpesvirus y vectores de virus adenoasociados, etc. Véanse, *asimismo*, las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.534.261; 6.607.882; 6.824.978; 6.933.113; 6.979.539; 7.013.219; y 7.163.824. Además, resultará evidente que cualquiera de estos vectores puede comprender una o más secuencias que codifican proteínas de dedos de cinc. Por lo tanto, cuando se introducen una o más ZFP en la célula, las ZFP pueden ser portadas en el mismo vector o en vectores diferentes. Cuando se utilizan vectores múltiples, cada vector puede comprender una secuencia que codifica una o varias ZFP.

Los métodos convencionales de transferencia de genes virales y no virales pueden usarse para introducir ácidos nucleicos que codifican las ZFP modificadas genéticamente en las células (p.ej., células de mamíferos) y tejidos diana. Tales métodos también pueden usarse para administrar ácidos nucleicos que codifican ZFP a células *in vitro*. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican ZFP se administran para usos de terapia génica *in vivo* o *ex vivo*. Los sistemas de administración de vectores no virales incluyen plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo y ácido nucleico en complejo con un vehículo de suministro tal como un liposoma o poloxámero. Los sistemas de suministro de vectores virales incluyen virus de ADN y ARN, que tienen genomas episómicos o integrados después de su administración a la célula. Para una revisión de los procedimientos de terapia génica, véanse Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); Nabel y Felgner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993); Mitani y Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11:167-175 (1993); Miller, *Nature* 357:455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995); Kremer y Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995); Haddada *et al.*, en *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler y Böhm (eds.) (1995); y Yu *et al.*, *Gene Therapy* 1:13-26 (1994).

Los métodos de administración no viral de ácidos nucleicos incluyen electroporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, policonjugados o productos conjugados de lípidos:ácidos nucleicos, ADN desnudo, viriones artificiales y absorción de ADN potenciada por agentes. Sonoporación utilizando, p.ej., el sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) también se puede usar para el suministro de ácidos nucleicos.

Los sistemas de suministro de ácido nucleico ilustrativos adicionales incluyen los proporcionados por Amaxa® Biosystems (Colonia, Alemania), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) y Copernicus Therapeutics Inc. (véase por ejemplo el documento US6008336). La lipofección se describe, p.ej., en los documento US 5.049.386, US 4.946.787; y US 4.897.355) y los reactivos de lipofección se están disponibles comercialmente (p.ej., Transfectam™ y Lipofectin™). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para la lipofección eficiente de reconocimiento de receptores de polinucleótidos incluyen los de Felgner, documento WO 91/17424, documento WO 91/16024. El suministro puede ser a células (administración *ex vivo*) o tejidos diana (administración *in vivo*).

La preparación de complejos de lípido:ácido nucleico, incluyendo liposomas dirigidos tales como complejos de inmunolípidos, es bien conocida por los expertos en la técnica (véase, p.ej., Crystal, *Science* 270:404-410 (1995); Blaese *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995); Behr *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2:710-722 (1995); Ahmad *et al.*, *Cancer Res.*

52:4817-4820 (1992)); Patentes de Estados Unidos Núm. 4.186.183. 4.217.344. 4.235.871. 4.261.975. 4.485.054. 4.501.728. 4.774.085. 4.837.028y 4.946.787).

Los métodos adicionales de suministro incluyen el uso de empaquetamiento de los ácidos nucleicos que se van a suministrar a los vehículos de suministro EnGeneC (EDV). Estos EDV se suministran específicamente a los tejidos diana utilizando anticuerpos biespecíficos donde un brazo del anticuerpo tiene especificidad por el tejido diana y el otro tiene especificidad por el EDV. El anticuerpo porta lleva los EDV a la superficie de la célula diana y a continuación el EDV se lleva a la célula por medio de endocitosis. Una vez en la célula, se libera el contenido. (véase MacDiarmid et al (2009) Nature Biotechnology vol 27(7) pág. 643).

El uso de sistemas basados en virus de ARN o ADN para el suministro de ácidos nucleicos que codifican ZFP manipuladas aprovecha procesos altamente evolucionados para dirigir un virus a células específicas del organismo y para el tráfico de la carga viral al núcleo. Los vectores virales se pueden administrar directamente a los pacientes (*en vivo*) o se pueden utilizar para tratar células *in vitro* y las células modificadas se administran a los pacientes (*ex vivo*). Los sistemas convencionales basados en virus para el suministro de ZFP incluyen, pero no se limitan a, vectores de virus retrovirales, lentivirus, adenovirales, adenoasociados, vaccinia y herpes simple para la transferencia génica. La integración en el genoma del anfitrión es posible con los métodos de transferencia de genes de retrovirus, lentivirus y virus adenoasociados, lo que a menudo da como resultado la expresión a largo plazo del transgén insertado. Además, se han observado altas eficacias de transducción en muchos tipos diferentes de células y tejidos diana.

El tropismo de un retrovirus puede alterarse incorporando proteínas de la envoltura foráneas, ampliando la población diana potencial de las células diana. Los vectores lentivirales son vectores retrovirales que pueden transducir o infectar células que no se dividen y típicamente producen altos títulos virales. La selección de un sistema de transferencia de genes retrovirales depende del tejido diana. Los vectores retrovirales se componen de repeticiones terminales largas que actúan en *cis* con capacidad de empaquetamiento de hasta 6-10 kb de secuencia foránea. Las LTR que actúan en *cis* mínimas son suficientes para la replicación y el empaquetamiento de los vectores, que a continuación se utilizan para integrar el gen terapéutico en la célula diana para proporcionar una expresión transgénica permanente. Los vectores retrovirales ampliamente utilizados incluyen los basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), el virus de la leucemia de simio de gibón (GaLV), el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y sus combinaciones (véanse, p.ej., Buchscher *et al.*, *J. Virol.* 66:2731-2739 (1992)); Johann *et al.*, *J. Virol.* 66:1635-1640 (1992)); Sommerfelt *et al.*, *Virol.* 176:58-59 (1990); Wilson *et al.*, *J. Virol.* 63:2374-2378 (1989); Miller *et al.*, *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700).

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

Actualmente, están disponibles al menos seis enfoques de vectores virales para la transferencia de genes en pruebas clínicas, que utilizan enfoques que implican la complementación de vectores defectuosos mediante genes insertados en líneas celulares auxiliares para generar el agente transductor.

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

Los vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) son prometedores sistemas alternativos de suministro génico basados en el virus adeno-asociado tipo 2 de parvovirus defectuoso y no patógeno. Todos los vectores derivan de un plásmido que conserva solo las repeticiones terminales invertidas AAV de 145 pb que flanquean el casete de expresión de los transgenes. La transferencia eficiente de genes y la administración estable de transgenes debida a la integración en los genomas de la célula transducida son características clave para este sistema de vectores. (Wagner *et al.*, *Lancet* 351:9117 1702-3 (1998), Kearns *et al.*, *Gene Ther.* 9:748-55 (1996)). También se pueden utilizar otros serotipos de AAV, que incluyen AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 y AAV8, de acuerdo con la presente invención.

Se pueden producir vectores adenovirales (Ad) recombinantes de replicación defectuosa con un título elevado e infectar fácilmente varios tipos de células diferentes. La mayoría de los vectores de adenovirus están modificados genéticamente de forma que un transgén reemplaza a los genes Ad Ela, E1b y/o E3; posteriormente, el vector de

replicación defectuosa se propaga en células humanas 293 que suministran la función del gen suprimida en *trans*. Los vectores publicitarios pueden transducir múltiples tipos de tejidos *in vivo*, incluyendo células diferenciadas que no están en división tales como las que se encuentran en el hígado, el riñón y el músculo. Los vectores de Ad convencionales tienen una gran capacidad de carga. Un ejemplo del uso de un vector Ad en una prueba clínica implicó la terapia de polinucleótidos para la inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Sterman et al., *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9 (1998)). Los ejemplos adicionales del uso de vectores de adenovirus para la transferencia de genes en ensayos clínicos incluyen Rosenecker et al., *Infection* 24:1 5-10 (1996); Sterman et al., *Hum. Gene Ther.* 9:7 1083-1089 (1998); Welsh et al., *Hum. Gene Ther.* 2:205-18 (1995); Alvarez et al., *Hum. Gene Ther.* 5:597-613 (1997); Topf et al., *Gene Ther.* 5:507-513 (1998); Sterman et al., *Hum. Gene Ther.* 7:1083-1089 (1998).

Las células de empaquetamiento se utilizan para formar partículas de virus que son capaces de infectar una célula anfitriona. Tales células incluyen células 293, que empaquetan adenovirus, y células ψ 2 o células PA317, que empaquetan retrovirus. Los vectores virales utilizados en la terapia génica generalmente son generados por una línea celular productora que empaqueta un vector de ácido nucleico en una partícula viral. Los vectores típicamente contienen las secuencias víricas mínimas requeridas para el empaquetamiento y la posterior integración en un anfitrión (si fuera aplicable), reemplazándose otras secuencias víricas por un casete de expresión que codifica la proteína que se debe expresar. Las funciones virales que faltan son suministradas en *trans* por la línea celular de empaquetamiento. Por ejemplo, los vectores AAV utilizados en la terapia génica típicamente poseen sólo secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del genoma de AAV que se requieren para el empaquetamiento y la integración en el genoma del anfitrión. El ADN viral se empaqueta en una línea celular, que contiene un plásmido auxiliar que codifica los otros genes de AAV, a saber *rep* y *cap*, pero carece de secuencias ITR. La línea celular también está infectada con adenovirus como auxiliar. El virus auxiliar promueve la replicación del vector AAV y la expresión de genes de AAV del plásmido auxiliar. El plásmido auxiliar no está empaquetado en cantidades significativas debido a la falta de secuencias de ITR. La contaminación con adenovirus se puede reducir, p.ej., mediante tratamiento térmico al cual el adenovirus es más sensible que el AAV.

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

Los vectores de la terapia génica pueden ser suministrados *in vivo* mediante administración a un paciente individual, típicamente mediante administración sistémica (p.ej., infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o aplicación tópica, como se describe a continuación. Alternativamente, los vectores pueden ser suministrados a las células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (p.ej., linfocitos, productos aspirados de médula ósea, biopsia de tejido) o células madre hematopoyéticas de donantes universales, seguido de la reimplantación de las células en un paciente, generalmente después de la selección de las células que han incorporado el vector.

La transfección *ex vivo* de células para diagnóstico, investigación o para terapia génica. (p.ej., mediante la reinfusión de las células transfectadas en el organismo anfitrión) es bien conocida por los expertos en la técnica. En un aspecto preferido, las células se aíslan del organismo sujeto, se transfectan con un ácido nucleico de ZFP (gen o ADNc) y se vuelven a infundir nuevamente en el organismo sujeto (p.ej., el paciente). Son bien conocidos por los expertos en la técnica diversos tipos de células adecuados para la transfección *ex vivo* (véase, p.ej., Freshney et al., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (3ª ed. 1994)) y las referencias citadas allí para una discusión sobre cómo aislar y cultivar células de pacientes).

Las células adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células y/o líneas celulares eucariotas y procariotas. Los ejemplos no limitantes de tales células o líneas celulares generadas a partir de tales células incluyen COS, CHO (p.ej., CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DLTXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (p. ej., HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T) y células perC6 así como células de insecto tales como *Spodoptera fugiperda* (Sf) o células fúngicas tales como *Saccharomyces*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*. En ciertos aspectos, la línea celular es una línea celular CHO-K1, MDCK o HEK293. Además, las células primarias pueden aislarse y utilizarse *ex vivo* para la reintroducción en el sujeto que se debe tratar después del tratamiento con las ZFN. Las células primarias adecuadas incluyen células

mononucleares de sangre periférica (PBMC) y otros subconjuntos de células sanguíneas tales como, pero sin limitarse a, células T CD4 + o células T CD8 +. Las células adecuadas también incluyen células madre tales como, a modo de ejemplo, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre hematopoyéticas, células madre neuronales y células madre mesenquimatosas.

- 5 En un aspecto, se utilizan células madre en procedimientos para transfección celular y terapia génica *ex vivo*. La ventaja de usar células madre es que pueden diferenciarse a otros tipos de células *in vitro*, o pueden introducirse en un mamífero (tal como el donante de las células) donde se injertarán en la médula ósea. Los Se conocen métodos para diferenciar las células CD34+ *in vitro* en tipos de células inmunológicas clínicamente importantes usando citocinas tales como GM-CSF, IFN- γ y TNF- α (véase Inaba *et al.*, *J. Exp. Medicina* 176:1693-1702 (1992)).
- 10 Las células madre se aíslan para la transducción y la diferenciación usando métodos conocidos. Por ejemplo, las células madre se aíslan de las células de la médula ósea mediante el lavado de las células de la médula ósea con anticuerpos que se unen a células no deseadas, tales como CD4+ y CD8+ (células T), CD45+ (células panB), GR-1 (granulocitos) y Iad (células presentadoras de antígeno diferenciadas) (véase Inaba *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1693-1702 (1992)).
- 15 Las células madre que han sido modificadas también se pueden utilizar. Por ejemplo, las células madre que se han hecho resistentes a la apoptosis pueden usarse como composiciones terapéuticas en las que las células madre también contienen los ZFP TF de la invención. La resistencia a la apoptosis puede producirse, por ejemplo, eliminando BAX y/o BAK utilizando ZFN específicos de BAX o BAK (véase, La Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 12/456.043) en las células madre, o aquellas que se alteran en una caspasa, nuevamente usando ZFN específicas de caspasa-6, por ejemplo. Estas células pueden transfectarse con los ZFP TF que se sabe que regulan PD1 mutante o de tipo salvaje.

Los vectores (p.ej., retrovirus, adenovirus, liposomas, etc.) que contienen ácidos nucleicos de ZFP terapéuticos también se pueden administrar directamente a un organismo para la transducción de células *in vivo*. Alternativamente, se puede administrar ADN desnudo. La administración se realiza mediante cualquiera de las rutas normalmente utilizadas para introducir una molécula en íntimo contacto con células sanguíneas o de tejido, que incluyen, pero no se limitan a, inyección, infusión, aplicación tópica y electroporación. Los métodos adecuados para administrar tales ácidos nucleicos están disponibles y son bien conocidos por los expertos en la técnica, y aunque se puede usar más de una vía para administrar una composición particular, una vía concreta a menudo puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra vía.

- 25
- 30 Los métodos para la introducción de ADN en células madre hematopoyéticas se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.928.638. Los vectores útiles para la introducción de transgenes en células madre hematopoyéticas, p.ej., células CD34⁺ incluyen adenovirus Tipo 35.

Los vectores adecuados para la introducción de transgenes en células inmunitarias (p.ej., células T) incluyen vectores de lentivirus no integrantes. Véanse, por ejemplo, Ory *et al.* (1996) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93:11382-11388; Dull *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:8463-8471; Zuffery *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:9873-9880; Follenzi *et al.* (2000) *Nature Genetics* 25:217-222.

- 35
- 40 Los portadores farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el método particular utilizado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas disponibles, como se describe a continuación (véase, p.ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., 1989).

Aplicaciones

- Las composiciones y métodos descritos se pueden usar para cualquier aplicación en la que se desee modular la expresión de uno o más genes de PD1. En particular, estos métodos y composiciones pueden usarse donde se desea la modulación de un alelo de PD1, incluyendo, pero sin limitarse a, aplicaciones terapéuticas y de investigación. Los métodos y composiciones se pueden utilizar para tratar enfermedades infecciosas crónicas tales como VIH/SIDA y VHC. Además, los métodos y composiciones se pueden utilizar para tratar cánceres tales como melanoma, cáncer de ovario, cáncer colorrectal/de colon, carcinoma de células renales, plasmacitoma/mieloma, cáncer de mama y cáncer de pulmón.

- 45
- 50 Las enfermedades y afecciones en las que se pueden utilizar ZFP TF o ZFN que reprimen PD1 como agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades infecciosas crónicas y cáncer. Las enfermedades y afecciones en las que la activación de un gen de PD1 puede ser útil como tratamiento terapéutico incluyen enfermedades autoinmunitarias tales como el lupus eritematoso sistémico (LES). Los polinucleótidos que codifican ZFP TF o ZFN se pueden utilizar como agentes terapéuticos, o se pueden incorporar en vectores para su suministro.

- 55 Los métodos y composiciones que comprenden ZFP-TF que reprimen un alelo de PD1 y/o ZFN específicas de PD1 también pueden usarse junto con otros agentes terapéuticos diseñados para tratar una enfermedad infecciosa crónica o cáncer. Estas ZFP o ZFN (o polinucleótidos que codifican estas ZFP o ZFN) se pueden administrar simultáneamente (p.ej., en las mismas composiciones farmacéuticas) o pueden administrarse secuencialmente en

cualquier orden. Se puede tratar cualquier tipo de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinomas de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, leucemias, linfomas, cáncer de cerebro y similares. De forma similar, los ZFP TF diseñados para activar un alelo de PD1 se pueden usar con otros tratamientos diseñados para tratar una enfermedad autoinmunitaria.

- 5 Los métodos y composiciones para el tratamiento también incluyen composiciones celulares en las que una copia mutante del alelo de PD1 dentro de células aisladas de un paciente se ha modificado a un alelo de PD1 de tipo salvaje usando una ZFN específica de PD1. Estas células modificadas *ex vivo* son reintroducidas en el paciente. Además, también se contemplan métodos y composiciones que comprenden células madre modificadas. Por ejemplo, las composiciones de células madre en las que una copia mutante del alelo PD1 dentro de las células madre se ha modificado a un alelo PD1 de tipo salvaje usando una ZFN específica de PD1. En otros aspectos, se proporcionan composiciones de células madre en las que un alelo PD1 de tipo salvaje dentro de las células madre se ha modificado usando ZFN específicas de PD1. Estas composiciones se pueden usar junto con otros agentes terapéuticos. Estas composiciones pueden administrarse simultáneamente (p.ej., en las mismas composiciones farmacéuticas) o pueden administrarse secuencialmente en cualquier orden.
- 10
- 15 Los métodos y composiciones de la invención también son útiles para el diseño y la implementación de modelos *in vitro* y *en vivo*, por ejemplo, modelos animales de infección crónica, cáncer o autoinmunidad, que permiten el estudio de estos trastornos y el descubrimiento adicional de agentes terapéuticos útiles.

Los siguientes ejemplos se refieren a aspectos ilustrativos de la presente descripción en las que la nucleasa comprende una ZFN. Se apreciará que esto solo tiene fines ilustrativos y que se pueden usar otras nucleasas, por ejemplo, endonucleasas de referencia (meganucleasas) con dominios de unión al ADN modificados genéticamente y/o fusiones de origen natural de dominios de unión a ADN de endonucleasas de asentamiento (meganucleasas) modificadas genéticamente y dominios de escisión heterólogos.

20

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de ZFN específicas de PD1 biológicamente activas persistentemente

- 25 Las ZFN se ensamblaron contra el gen de PD1 humano y se sometieron a ensayo mediante análisis ELISA y CEL1 como describen Miller et al. (2007) en Nat. Biotechnol. 25: 778-785 y la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20050064474 y publicación internacional de patentes WO2005/014791

Los ejemplos específicos de las ZFP se describen en la Tabla 1. La primera columna de esta tabla es un nombre de referencia interno (número) para una ZFP. La Tabla 2 enumera los sitios de unión a la diana en PD1. "F" se refiere al dedo y el número que sigue a "F" se refiere a qué dedo de cinc (p.ej., "F1" se refiere al dedo 1).

30

Tabla 1: Proteínas de dedos de cinc dirigidas a PD1 humana

| Núm. SBS | Diseño | | | | | |
|----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
| 12942 | QSGHLSR (SEQ ID NO: 1) | RSDSLSV (SEQ ID NO: 2) | HNDSRKN (SEQ ID NO:3) | RSDDLTR (SEQ ID NO: 4) | RSDHLTQ (SEQ ID NO: 5) | N/A |
| 12946 | RSAALSR (SEQ ID NO: 6) | RSDDLTR (SEQ ID NO: 4) | RSDHLTT (SEQ ID NO: 7) | DRSALSR (SEQ ID NO:8) | DRSALAR (SEQ ID NO: 9) | N/A |
| 12947 | RSAALAR (SEQ ID NO:10) | RSDDLK (SEQ ID NO:11) | RNDHRKN (SEQ ID NO:12) | DRSALSR (SEQ ID NO:8) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 12934 | RSDHLSE (SEQ ID NO:13) | TSSDRTK (SEQ ID NO:14) | RSDHLSE (SEQ ID NO:13) | QSASRKN (SEQ ID NO:15) | N/A | N/A |
| 12971 | RSDVLSE (SEQ ID NO:16) | RSANLTR (SEQ ID NO:17) | RSDHLSQ (SEQ ID NO:18) | TSSNRKT (SEQ ID NO: 19) | DRSNLSR (SEQ ID NO:20) | RSDALAR (SEQ ID NO:21) |

ES 2 658 691 T3

| Núm. SBS | Diseño | | | | | |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
| 12972 | DDWNLSQ (SEQ ID NO:22) | RSANLTR (SEQ ID NO:17) | RSDHLSQ (SEQ ID NO:18) | TSSNRKT (SEQ ID NO:19) | DRSNLSR (SEQ ID NO:20) | RSDALAR (SEQ ID NO:21) |
| 18759 | RSSALSR (SEQ ID NO:23) | RPLALKH (SEQ ID NO:24) | RNDHRKN (SEQ ID NO:12) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 22237 | QSGHLSR (SEQ ID NO:1) | RSDSLSV (SEQ ID NO:2) | HNSDRKN (SEQ ID NO:3) | RANLLR (SEQ ID NO:26) | RSDHLTQ (SEQ ID NO:5) | N/A |
| 25005 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RNNLRT (SEQ ID NO:29) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25006 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | TNWHLRT (SEQ ID NO:30) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25010 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RTPHLTL (SEQ ID NO:31) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25011 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RSAQLAT (SEQ ID NO:32) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25012 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RCTHLYL (SEQ ID NO:33) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25013 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RPTQRYR (SEQ ID NO:34) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25014 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RANHREC (SEQ ID NO:35) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25015 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RANHREC (SEQ ID NO:35) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25016 | RKFARPS (SEQ ID NO:36) | RNFERSD (SEQ ID NO:37) | HPHHRMC (SEQ ID NO:38) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25017 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RMGRLST (SEQ ID NO:39) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25022 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RHSRLTT (SEQ ID NO:40) | TRPVLKR (SEQ ID NO:41) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |

ES 2 658 691 T3

| Núm. SBS | Diseño | | | | | |
|----------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
| 25023 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RANHRVC (SEQ ID NO:42) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25025 | RPSTLHR (SEQ ID NO:27) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RSTHLLG (SEQ ID NO:43) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25027 | RNAALTR (SEQ ID NO:45) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RSCGLWS (SEQ ID NO:44) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25028 | CNAALTR (SEQ ID NO:46) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | REEHRAT (SEQ ID NO:47) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25029 | RNAALTR (SEQ ID NO:45) | RSDELTR (SEQ ID NO: 28) | RHHHLAA (SEQ ID NO:48) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N /A |
| 25030 | RNAALTR (SEQ ID NO:45) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RPMHLTN (SEQ ID NO:49) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25031 | RNAALTR (SEQ ID NO:45) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RSPHLYH (SEQ ID NO:50) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25032 | RNAALTR (SEQ ID NO:45) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RCEALHH (SEQ ID NO:51) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSAQAR (SEQ ID NO:52) | N/A |
| 25034 | RNAALTR (SEQ ID NO:45) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RCEALHH (SEQ ID NO:51) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25036 | RNAALTR (SEQ ID NO:45) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RSPHLYH (SEQ ID NO:50) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25040 | RNAALTR (SEQ ID NO:45) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RLPALLS (SEQ ID NO:53) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |
| 25041 | HNAALTR (SEQ ID NO:54) | RSDELTR (SEQ ID NO:28) | RTYNRTQ (SEQ ID NO:55) | TRPVLKR (SEQ ID NO:25) | DRSALAR (SEQ ID NO:9) | N/A |

ES 2 658 691 T3

Tabla 2: Sitios diana de ZFN en el gen de PD1 humano

| Núm. SBS | Sitio diana |
|----------|--|
| 12942 | ccAGGGCGCCTGTGGGAAtctgcatgcct (SEQ ID NO:56) |
| 12946 | caGTCGTCTGGGCGGTGctacaactggg (SEQ ID NO:57) |
| 12947 | caGTCGTCTGGGCGGTGctacaactggg (SEQ ID NO:57) |
| 12934 | gaACACAGGCACGGctgaggggtcctcc (SEQ ID NO:58) |
| 12971 | ctGTGGACTATGGGGAGCTGgattcca (SEQ ID NO:59) |
| 12972 | ctGTGGACTATGGGGAGCTGgattcca (SEQ ID NO:59) |
| 18759 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 22237 | ccAGGGCGCCTGTGGGAAtctgcatgcct (SEQ ID NO:56) |
| 25005 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25006 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25010 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25011 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25012 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25013 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25014 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25015 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25016 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25017 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25022 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25023 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25025 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25027 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25028 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25029 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25030 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |

| Núm. SBS | Sitio diana |
|----------|------------------------------------|
| 25031 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25032 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25034 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25036 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25040 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |
| 25041 | caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60) |

5 Los análisis iniciales de actividad *in vitro* se realizaron en muestras de células nucleofectadas como se ha descrito anteriormente. Brevemente, el plásmido que codifica las fusiones ZFP-*Fok I* se introdujo en células K562 mediante transfección utilizando el kit Amaxa™ Nucleofection de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Para la transfección, se mezclaron dos millones células K562 con cantidades variables de cada plásmido de expresión de nucleasa de dedo de cinc y 100 µL de Solución V de Amaxa™. Las células se transfectaron en un Amaxa Nucleofector II™ utilizando el programa T-16. Inmediatamente después de la transfección, las células se dividieron en dos matraces diferentes y se cultivaron en medio RPMI (Invitrogen) con un suplemento de FBS al 10% en CO₂ al 5% a 30°C o 37°C durante cuatro días.

10 A partir de este escrutinio inicial *in vitro*, se identificaron dos pares principales de ZFN y se sometieron a elaboración para intentar mejorar su eficacia. Estos pares se dirigen a los exones 1 y 5 del gen de PD1, respectivamente. Las proteínas elaboradas (mejoradas) se volvieron a someter a ensayo en un experimento de transcurso de tiempo, esencialmente como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: NHEJ de PD1

| Diana | Par ZFN | % NHEJ | | |
|--------|-------------|--------|-------|-------|
| | | Día 3 | Día 7 | Día 9 |
| exón 1 | 12942/12946 | 8 | 7 | 5 |
| exón 1 | 12942/12947 | 10 | 6 | 6 |
| exón 5 | 12934/12971 | 11 | 6 | 1,5 |
| exón 5 | 12934/12972 | 11 | 7,5 | 2 |

15 Como se muestra en la Tabla 3, el tratamiento de las células con ZFN contra el exón 5 causa la pérdida de una mayor proporción de células editadas por el genoma de la población, mientras que la señal de edición del genoma en células tratadas con ZFN diseñadas contra el exón 1 es mucho más estable.

20 Para determinar la actividad de ZFN en el locus PD1, los análisis de Nucleasa SURVEYOR™ basados en Cel-1 se realizaron esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Trangenomic SURVEYOR™). Las células se recogieron y se preparó ADN cromosómico utilizando un kit Quickextract™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Epicentre®). La región apropiada del locus de PD1 se amplificó mediante PCR utilizando ADN polimerasa de alta fidelidad Accuprime™ (Invitrogen). Las reacciones de PCR se calentaron a 94°C y se enfriaron gradualmente a temperatura ambiente. Se mezclaron aproximadamente 200 ng del ADN recocido con 0,33 µl de enzima Cel-1 y se incubaron durante 20 minutos a 42°C. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en tampón Tris-borato-EDTA 1X.

25 Los constructos también se sometieron a ensayo en muestras primarias de PBMC que se habían mantenido a 30°C o 37°C durante 3 o 10 días (véase la Tabla 4). Brevemente, se obtuvieron PBMC de AICells y se cultivaron en RPMI + FBS al 10% + L-Glutamina al 1% (30 mg/ml) + IL-2 (1 ng/ml, Sigma) y se activaron con esferas anti-CD3/CD28 de

acuerdo con el protocolo del fabricante (Dynal). Las células se sembraron a 3E5 células/ml en un volumen de 1 ml en una placa de 24 pocillos.

5 Se construyeron vectores adenovirales que contenían los pares de ZFN de interés como se describe (véase la Publicación de patente de Estados Unidos Núm. 20080159996) y se añadieron dos días más tarde a una MOI de 10, 30 o 100 (MOI calculada en base al título infeccioso).

Las células se recogieron 3 o 10 días después de la exposición al virus y se determinó la eficacia de la modificación génica usando un análisis de Nucleasa SURVEYOR™ basado en Cel-1, realizado como se describe en la Publicación de Patente Internacional WO 07/014275. Véase, también, Oleykowski *et al.* (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:4597-4602; Qui *et al.* (2004) *BioTechniques* 36:702-707; Yeung *et al.* (2005) *BioTechniques* 38:749-758 .

10 Para los pares de ZFN que se muestran en la Tabla 4, cada ZFN se sometió a ensayo combinado con ZFN 12942. La actividad se mide mediante el porcentaje de actividad NHEJ medido mediante el análisis de Nucleasa SURVEYOR™ basado en Cel-1 descrito anteriormente.

15 Se analizaron también pares adicionales de ZFN específicos de PD1 para determinar la actividad en PBMC primarias como se describió anteriormente, y los resultados se muestran en la Tabla 4. En los datos mostrados en la Tabla 4, el monómero 12942 específico de PD1 siempre se emparejó con la segunda ZFN enumerada en la Tabla 4 para formar un par activo (es decir, ZFN 12942 se emparejó con cada uno de ZFN 12947 a 25041). Véase también, la Figura 1 (las muestras son las indicadas en la Tabla 4).

Tabla 4: Actividad de las ZFN de PD1

| | 37°C | 37°C | 30°C | 30°C | |
|--------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| 12942+ | Día 3 (Porcentaje de NHEJ) | Día 10 (Porcentaje de NHEJ) | Día 3 (Porcentaje de NHEJ) | Día 10 (Porcentaje de NHEJ) | Muestra en la Figura 1 |
| 12947 | 2,1 | 1,6 | 4,2 | 2,3 | 1 |
| 18759 | 4,7 | 2,2 | 4,9 | 4,3 | 2 |
| 25005 | 4,4 | 2,3 | 4,5 | 2,4 | 3 |
| 25006 | 2,9 | 8,1 | 5,2 | 9,9 | 4 |
| 25010 | 4,9 | 1,8 | 5,0 | 2,8 | 5 |
| 25011 | 3,1 | 9,2 | 3,1 | 12,8 | 6 |
| 25012 | 5,9 | 8,5 | 8,2 | 14,7 | 7 |
| 25013 | 3,7 | 0,6 | 4,0 | 1,8 | 8 |
| 25014 | 10,7 | 6,6 | 8,3 | 9,6 | 9 |
| 25015 | 3,9 | 3,9 | 5,3 | 7,3 | 10 |
| 25016 | 7,3 | 12,8 | 7,7 | 13,6 | 11 |
| 25017 | 7,7 | 9,6 | 6,1 | 15,0 | 12 |
| 25022 | 3,6 | 5,2 | 4,2 | 9,0 | 13 |
| 25023 | 3,1 | 8,3 | 7,1 | 7,8 | 14 |
| 25025 | 8,8 | 10,6 | 6,5 | 7,6 | 15 |

ES 2 658 691 T3

| | 37°C | 37°C | 30°C | 30°C | |
|--------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| 12942+ | Día 3 (Porcentaje de NHEJ) | Día 10 (Porcentaje de NHEJ) | Día 3 (Porcentaje de NHEJ) | Día 10 (Porcentaje de NHEJ) | Muestra en la Figura 1 |
| 25027 | 6,0 | 9,5 | 5,9 | 6,6 | 16 |
| 25028 | 4,3 | 5,2 | 4,8 | 6,2 | 17 |
| 25029 | 8,1 | 12,8 | 7,6 | 14,3 | 18 |
| 25030 | 7,6 | 9,6 | 5,4 | 10,7 | 19 |
| 25031 | 9,4 | 14,5 | 3,8 | 15,3 | 20 |
| 25032 | 6,7 | 4,2 | 6,6 | 6,0 | 21 |
| 25034 | 4,9 | 4,7 | 6,2 | 4,1 | 22 |
| 25036 | 8,3 | 4,2 | 6,9 | 9,7 | 23 |
| 25040 | 6,1 | 3,6 | 3,6 | 4,6 | 24 |
| 25041 | 7,9 | 11,2 | 5,2 | 4,5 | 25 |

5 Para analizar los efectos locales de la actividad NHEJ impulsada por ZFN a nivel molecular, las células CD8+ se trataron con el par de ZFN 12942 y 12947 específico del exón 1. Brevemente, se adquirieron células CD8+ de AICells y se cultivaron en RPMI + FBS al 10% + L-Glutamina al 1% (30 mg/ml) + IL-2 (30 µg/ml, Sigma) y se dejaron reposar durante 4-24 horas.

Se construyeron plásmidos que contenían los pares de ZFN de interés como se describió anteriormente y se usaron 1e6 células/nucleofección con el kit Amaxa™ Nucleofection de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las células se activaron 12-24 horas después de la nucleofección con esferas anti-CD3/CD28 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dyna).

10 Las células se recogieron 3 o 10 días después de la nucleofección y se determinó la eficacia de la modificación del gen usando un análisis de Nucleasa SURVEYOR™ basado en Cel-1, realizado como se describe en la Publicación de Patente Internacional WO 07/014275. Véanse, también, Oleykowski *et al.* (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:4597-4602; Qui *et al.* (2004) *BioTechniques* 36:702-707; Yeung *et al.* (2005) *BioTechniques* 38:749-758.

15 Los productos de PCR se clonaron y se transfetaron en *E. coli*. Se cultivaron subclones resistentes a los antibióticos, los plásmidos se aislaron y a continuación se sometieron a análisis de secuencia para observar cualquier alteración de secuencia que hubiera ocurrido como resultado de NHEJ (véase la Figura 2). Como se puede ver en la figura, se observaron una variedad de inserciones y deleciones en las proximidades del sitio de escisión de ZFN.

20 Estas ZFN también se sometieron a ensayo en el sistema de levadura como se describe en Publicación de Estados Unidos Núm. 20090111119 .

Ejemplo 2: Actividad *ex vivo* de ZFN específicas de PD1 en ratones.

25 Para someter a ensayo el concepto de supresión de PD1 *in vivo*, las ZFN específicas de PD1 de ratón se prepararon como se ha descrito anteriormente y a continuación se sometieron a ensayo *ex vivo*. Las características de secuencia de los dominios de dedos de cinc, así como sus especificidades de unión se muestran a continuación en las Tablas 5 y 6.

ES 2 658 691 T3

Tabla 5: Diseños de dedos de cinc específicos de PD1 murinos

| Núm. SBS | Diseño | | | | | |
|-------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
| 14534 | DDWNLSQ (SEQ ID NO:22) | RSANLTR (SEQ ID NO:17) | TSGSLSR (SEQ ID NO:61) | QSGDLTR (SEQ ID NO:62) | QSSDLRR (SEQ ID NO:63) | N/A |
| 14534- FokI KK | DDWNLSQ (SEQ ID NO:22) | RSANLTR (SEQ ID NO:17) | TSGSLSR (SEQ ID NO:61) | QSGDLTR (SEQ ID NO:62) | QSSDLRR (SEQ ID NO:63) | N/A |
| 14536 | QSSHLTR (SEQ ID NO:64) | RSDNLRE (SEQ ID NO:65) | DRSNLSR (SEQ ID NO:20) | TSSNRKT (SEQ ID NO:19) | RSDSLSK (SEQ ID NO:66) | QSANRTT (SEQ ID NO:80) |
| 14536- FokI EL | QSSHLTR (SEQ ID NO:64) | RSDNLRE (SEQ ID NO:65) | DRSNLSR (SEQ ID NO:20) | TSSNRKT (SEQ ID NO:19) | RSDSLSK (SEQ ID NO:66) | QSANRTT (SEQ ID NO:80) |
| 14545 | QSGDLTR (SEQ ID NO:62) | RSDNLSE (SEQ ID NO:67) | ERANRNS (SEQ ID NO:68) | DRSDLSR (SEQ ID NO:69) | QSSDLRR (SEQ ID NO:63) | N/A |
| 14545- FokI KK | QSGDLTR (SEQ ID NO:62) | RSDNLSE (SEQ ID NO:67) | ERANRNS (SEQ ID NO:68) | DRSDLSR (SEQ ID NO:69) | QSSDLRR (SEQ ID NO:63) | N/A |
| 14546 | DRSHLAR (SEQ ID NO:70) | RSDDLRSR (SEQ ID NO:71) | QSANRTK (SEQ ID NO:72) | RSDTLSE (SEQ ID NO:73) | ANSNRIK (SEQ ID NO:74) | N/A |
| 14546- FokI EL | DRSHLAR (SEQ ID NO:70) | RSDDLRSR (SEQ ID NO:71) | QSANRTK (SEQ ID NO:72) | RSDTLSE (SEQ ID NO:73) | ANSNRIK (SEQ ID NO:74) | N/A |

Tabla 6: Especificidades de unión para diseños de dedos de cinc específicos de PD1 murino

| Núm. SBS | Sitio diana |
|----------------|---|
| 14534 | gtGCTGCAGTTGAGCTGgcaatcagggt (SEQ ID NO:75) |
| 14534- FokI KK | gtGCTGCAGTTGAGCTGgcaatcagggt (SEQ ID NO:75) |
| 14536 | ccCAAGTGAATGACCAGGGTacctgccg (SEQ ID NO:76) |
| 14536-FokI EL | ccCAAGTGAATGACCAGGGTacctgccg (SEQ ID NO:76) |
| 14545 | caGCTGCCCAACAGGCAtgactccaca (SEQ ID NO:77) |
| 14545- FokI KK | caGCTGCCCAACAGGCAtgactccaca (SEQ ID NO:77) |

| Núm. SBS | Sitio diana |
|----------------|--|
| 14546 | atGATCTGGAAGCGGGCacctctggacgg (SEQ ID NO:78) |
| 14546- FokI EL | atGATCTGGAAGCGGGCacctctggacgg (SEQ ID NO:78) |

El día 1, los esplenocitos recogidos de ratones Pmel TCR transgénicos/Ragl -/- se procesaron en una suspensión de una sola célula y se resuspendieron en medio completo (RPMI-1640, suero bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM, 50 µg/ml de sulfato de gentamicina, 2-mercaptoetanol 50 µM) con 25 µl de Invitrogen Mouse T-Activator CD3/CD28 Dynabeads/10⁶ células. Las células se sembraron en placa de 24 pocillos a 2 x 10⁶ células/ml (2 ml/pocillo). El día 3, las células se cosecharon, se separaron de las esferas usando un imán y se contaron. La transfección de esplenocitos se realizó siguiendo el protocolo provisto con el kit Amaxa™ Nucleofection. Brevemente, 1x 10⁷ células viables se resuspendieron en 100 µl de Amaxa Nucleofector Solution y se transfectaron o bien con 4 µg de plásmido que contenía el par 14546 y 14545 de ZFN, o 4 µg de plásmido mut PD1 Fok1 que contenía el par 14546-FokI EL y 14545-FokI KK de ZFN, 2,5 µg de vector GFP pmax Amaxa, o sin control de ADN, utilizando Amaxa Nucleofector (programa X-01). Las células se cultivaron en 2 ml de medio Amaxa Mouse T Cell Nucleofector completamente complementado a 30°C después de la transfección. Al día siguiente, se retiró un ml de Amaxa Mouse T Cell Nucleofector y se reemplazó por un ml de medio completo con un suplemento de 10 U/ml de IL-2. Dos días después, las células se recogieron y se contaron. Dos millones de células de cada uno de los grupos se sembraron en placas recubiertas con anti-CD3 en una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, las células se recogieron y se tiñeron con PE anti-PD1; PE-Cy7 anti-CD3 y APC anti-CD8. Las células se analizaron en un BD FACSCalibur. Las gráficas muestran % de células CD3+CD8+ positivas para PD1 en cada grupo y la mediana de la fluorescencia de PD1 para cada grupo (véase la Figura 3). Los datos muestran que la expresión de PD1 disminuye en las células que recibieron las ZFN específicas de PD1, incluso en presencia de estimulación anti-CD3.

Para verificar que la reducción de la expresión de PD1 era evidente en puntos temporales posteriores, las células también se recogieron a 72 horas después de la estimulación anti-CD3, en lugar de a las 24 horas como se describió anteriormente. Las células se recogieron y se tiñeron con PE anti-PD1; PE-Cy7 anti-CD3 y APC anti-CD8. Las células se analizaron en un FACSCalibur BD. Los datos se presentan en la Figura 4. Los histogramas superiores muestran % de células CD3+CD8+ positivas para PD1 en cada grupo y la mediana de la fluorescencia de PD1 para cada grupo. Las gráficas inferiores muestran la frecuencia de las células que expresan PD1/CFSE. Es importante destacar que Fok1 PD1 mut y Fok1 PD1 wt muestran una mayor frecuencia de PD1^{neg} CFSE^{dim} (células en división) que los grupos de control, y demuestran que la expresión de PD1 aún disminuye en las células tratadas con las ZFN específicas de PD1 incluso 72 horas después de la estimulación anti-CD3.

30 Ejemplo 3: Actividad de ZFN específicas de PD1 humanos en TIL

Las ZFN humanas específicas de PD1 se sometieron a ensayo en linfocitos infiltrantes de tumores humanos (TIL) en presencia de tumores y se analizaron esencialmente como se describió anteriormente y utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Yoshino *et al.*, (1992) *Cancer Research* 52:775-781). Las ZFN específicas de PD1 se activaron utilizando anticuerpos anti-CD3 como se describió anteriormente, a continuación las células se transdujeron con adenovirus Ad5/F35 que expresan ZFN específicas de PD1. Las células se expandieron con IL2 y a continuación se reestimularon con anticuerpos anti-CD3 o con tumores y se analizaron 24 horas después de la estimulación. Los resultados se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Expresión y viabilidad de PD1 en TIL

| | Estimulación con CD3 | | | Extractos de tumores | | |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------|-------------|----------------------|-------------------|-------------|
| | GFP | 12942 EL/12947 KK | 12942/12947 | GFP | 12942 EL/12947 KK | 12942/12947 |
| Expresión de PD1 | 32,2% | 31,5% | 14,1% | 22,9% | 13,8% | 7,5% |
| % de viabilidad en TIL | 30,3% | 34,2% | 45,6% | 18% | 32% | 47,9% |
| % viabilidad de la celula tumoral | N/A | N/A | N/A | 45,7% | 33,1% | 19,6% |
| % PD1 + células | 1,6% | 0,9% | 0,3% | 1,1% | 0,3% | 0,1% |

| | Estimulación con CD3 | | | Extractos de tumores | | |
|---------------------------|----------------------|-------------------|-------------|----------------------|-------------------|-------------|
| | GFP | 12942 EL/12947 KK | 12942/12947 | GFP | 12942 EL/12947 KK | 12942/12947 |
| divididas | | | | | | |
| % PD1 - células divididas | 3,9% | 3,0% | 2,1% | 3,0% | 1,4% | 0,8% |

5 Los datos en la Tabla 7 demuestran que cuando las células son estimuladas por anticuerpos anti-CD3, la disminución de la expresión de PD1, a través de la acción de las ZFN específicas de PD1, conduce a un aumento de la viabilidad celular. Cuando las células transducidas se tratan con tumores, se observa el mismo fenómeno- la disminución mediada por ZFN en PD1 conduce a un aumento en la viabilidad en TIL. Además, los datos muestran que una disminución en la expresión de PD1 en los TIL transducidos conduce a una disminución en la viabilidad de las células tumorales.

Ejemplo 4: Purificación de células T humanas primarias editadas por PD1

10 Los pares de ZFN específicos de PD1 que se habían elaborado adicionalmente se sometieron a ensayo en células T CD4+ como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Como se ve en Figura 5, se observó una edición de hasta 44% con algunos pares. En este experimento, "Control Positivo" indica el corte utilizando el par ZFN 25025/12942 en células T CD8+ realizado anteriormente en diferentes condiciones experimentales.

15 Se eligió un par principal, 25029/12942 para uso adicional en el aislamiento de células con PD1 modificado. En resumen, en estos experimentos, las células T CD4+ se trataron con ARNm que codifica las ZFN específicas de PD1, se cultivaron en las condiciones de "30 grados" y a continuación se estimularon con una primera exposición a esferas anti-CD3/CD8 (Dyna) como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, que estimula la fuerte expresión de los genes en trans de ZFN y promueve la división en el locus de PD1 (véase la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20080311095). Después de esta primera estimulación, las células se reestimularon y se sometieron a un procedimiento de purificación, ya sea mediante FAC o mediante cromatografía de afinidad.

20 En resumen, las células T CD4 + se trataron con ZFN específicas de CCR5 (véase la publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20080159996) o las ZFN específicas de PD1. Las células se recogieron y analizaron para determinar la edición de PD1 mediante el análisis Cel-I (descrito anteriormente), i) después de la primera estimulación, ii) después de la segunda estimulación pero antes de cualquier purificación, iii) después de la clasificación celular para CD25+ (un marcador de activación), PD1(-) utilizando la metodología convencional, o iv) después de la cromatografía de afinidad utilizando una matriz elaborada con anticuerpo anti-PD1 o anticuerpo anti-CD25.

30 Como se muestra en Figura 6, utilizando la técnica de clasificación de células (donde se aislaron las células que eran positivas para CD25 pero negativas para PD1), se encontró que hasta 56% de las células recuperadas se modificaba según se analizó mediante el análisis Cel-I. Las células PD1(-) purificadas mediante la técnica de cromatografía de afinidad (donde las células se sometieron a matrices de afinidad preparadas utilizando anticuerpos anti-PD1, anticuerpos anti-CD25 o ambos) mostraron una modificación general de PC1 de hasta el 42% según lo probado mediante análisis Cel-1

35 Las células que se habían purificado mediante clasificación celular también se analizaron en su locus PD1 mediante secuenciación, y los resultados se presentan a continuación en la Tabla 8. Como se puede ver en la tabla, el porcentaje de modificación de la diana ('% NHEJ') pronosticado mediante análisis Cel-I es similar al encontrado mediante el análisis de secuencia. En esta tabla, la denominación 'Muestra' corresponde a la mostrada en la Figura 6.

Tabla 8: Porcentaje de modificación de PD1 en células CD25+

| Muestra | % NHEJ mediante Cel I | % NHEJ mediante secuenciación | Número de modificadas* | inserciones | delecciones |
|---------|-----------------------|-------------------------------|------------------------|-------------|-------------|
| 4 | 43 | 62 | 54 de 87 | 3 de 54 | 51 de 54 |
| 8 | 56 | 81 | 65 de 80 | 4 de 65 | 61 de 65 |

| Muestra | % NHEJ mediante Cel I | % NHEJ mediante secuenciación | Número de modificadas* | inserciones | deleciones |
|---------|-----------------------|-------------------------------|------------------------|-------------|------------|
| 13 | 42 | 59 | 43 de 73 | 1 de 43 | 42 de 43 |

*: 'Número de modificadas' indica el número de secuencias en el grupo de secuenciación que se observó que eran modificadas. Por ejemplo, en la muestra 4, se modificaron 54 secuencias de las 87 analizadas.

Las ZFN específicas de PD1 también se sometieron a ensayo en células T CD8+. En este experimento, se produjeron ARNm que codificaban las ZFN específicas de PD1 utilizando el kit Ribomax Large Scale RNA ProductionT7 (Promega), seguido del mini kit RNeasy (Qiagen), ambos de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se utilizaron cantidades variadas de ARNm para transducir las células usando el sistema de suministro Amaxa Nucleofection se ha descrito anteriormente, y el porcentaje de modificación de PD1 se analizó mediante el análisis Cel I.

Como se muestra en Figura 7, la cantidad de modificación observada, descrita como '% NHEJ', está relacionada con la cantidad de ARNm utilizado, con menores cantidades de ARNm de entrada que dan como resultado menores porcentajes de modificación de la diana.

Estos resultados demuestran que las ZFN específicas de PD1 descritas en la presente memoria son capaces de modificar el locus de PD1 en líneas celulares y en células T primarias.

Lista de secuencias

- <110> SANGAMO BIOSCIENCES, INC.
- <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA MODULAR PD1
- <130> 8325-0057.60
- <140> PCT/US2011/061201
- <141> 17-11-2011
- <150> 12/927.557
- <151> 17-11-2010
- <160> 110
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <400> 1
- Gln Ser Gly His Leu Ser Arg
- 1 5
- <210> 2
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <400> 2
- Arg Ser Asp Ser Leu Ser Val
- 1 5

<210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 3
 His Asn Asp Ser Arg Lys Asn
 1 5
 10
 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 4
 Arg Ser Asp Asp Leu Thr Arg
 1 5
 20
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 5
 Arg Ser Asp His Leu Thr Gln
 1 5
 30
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 6
 Arg Ser Ala Ala Leu Ser Arg
 1 5
 40
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 7
 Arg Ser Asp His Leu Thr Thr
 1 5
 50
 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 8
 Asp Arg Ser Ala Leu Ser Arg
 1 5

5 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 9
 Asp Arg Ser Ala Leu Ala Arg
 1 5

15 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 10
 Arg Ser Ala Ala Leu Ala Arg
 1 5

25 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 11
 Arg Ser Asp Asp Leu Ser Lys
 1 5

35 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 12
 Arg Asn Asp His Arg Lys Asn
 1 5

45 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

55 <400> 13
 Arg Ser Asp His Leu Ser Glu
 1 5

<210> 14

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 14
 Thr Ser Ser Asp Arg Thr Lys
 1 5

10 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 15
 Gln Ser Ala Ser Arg Lys Asn
 1 5

20 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 16
 Arg Ser Asp Val Leu Ser Glu
 1 5

30 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

40 <400> 17
 Arg Ser Ala Asn Leu Thr Arg
 1 5

45 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 18
 Arg Ser Asp His Leu Ser Gln
 1 5

55 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 5
 <400> 19
 Thr Ser Ser Asn Arg Lys Thr
 1 5

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

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 15
 <400> 20
 Asp Arg Ser Asn Leu Ser Arg
 1 5

 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 25
 <400> 21
 Arg Ser Asp Ala Leu Ala Arg
 1 5

 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 35
 <400> 22
 Asp Asp Trp Asn Leu Ser Gln
 1 5
 40

 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 23
 Arg Ser Ser Ala Leu Ser Arg
 1 5
 50

 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <400> 24
 Arg Pro Leu Ala Leu Lys His
 1 5

<210> 25
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <400> 25
 Thr Arg Pro Val Leu Lys Arg
 1 5

<210> 26
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

25 <400> 26
 Arg Ala Asn Ser Leu Leu Arg
 1 5

<210> 27
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

35 <400> 27
 Arg Pro Ser Thr Leu His Arg
 1 5

<210> 28
 <211> 7
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

45 <400> 28
 Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg
 1 5

<210> 29
 <211> 7
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 29
 Arg Asn Asn Asn Leu Arg Thr
 1 5
 5
 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 30
 Thr Asn Trp His Leu Arg Thr
 1 5
 15
 <210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 25
 <400> 31
 Arg Thr Pro His Leu Thr Leu
 1 5
 <210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 35
 <400> 32
 Arg Ser Ala Gln Leu Ala Thr
 1 5
 <210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 45
 <400> 33
 Arg Cys Thr His Leu Tyr Leu
 1 5
 50
 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 34
 Arg Pro Thr Gln Arg Tyr Ser
 1 5

5 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 35
 Arg Ala Asn His Arg Glu Cys
 1 5

15 <210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 36
 Arg Lys Phe Ala Arg Pro Ser
 1 5

25 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

35 <400> 37
 Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp
 1 5

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

45 <400> 38
 His Pro His His Arg Met Cys
 1 5

<210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

55 <400> 39

Arg Met Gly Arg Leu Ser Thr
 1 5

<210> 40
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <400> 40
 Arg His Ser Arg Leu Thr Thr
 1 5

<210> 41
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 41
 Thr Arg Pro Val Leu Met Arg
 1 5

<210> 42
 25 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 42
 Arg Ala Asn His Arg Val Cys
 1 5

<210> 43
 35 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 43 _ _
 Arg Ser Thr His Leu Leu Gly
 1 5

<210> 44
 45 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

55 <400> 44

Arg Ser Cys Gly Leu Trp Ser
 1 5

<210> 45
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <400> 45
 Arg Asn Ala Ala Leu Thr Arg
 1 5

<210> 46
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 46
 Cys Asn Ala Ala Leu Thr Arg
 1 5

<210> 47
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 47
 Arg Glu Glu His Arg Ala Thr
 1 5

<210> 48
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 48
 Arg His His His Leu Ala Ala
 1 5

<210> 49
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 49
 Arg Pro Met His Leu Thr Asn
 1 5

55

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 10 <400> 50
 Arg Ser Pro His Leu Tyr His
 1 5

 <210> 51
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 20 <400> 51
 Arg Cys Glu Ala Leu His His
 1 5

 <210> 52
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 52
 Asp Arg Ser Ala Gln Ala Arg
 1 5

 35 <210> 53
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 53
 Arg Leu Pro Ala Leu Leu Ser
 1 5

 45 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 54
 His Asn Ala Ala Leu Thr Arg
 1 5
 55 <210> 55

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 55
 Arg Thr Tyr Asn Arg Thr Gln
 1 5

10 <210> 56
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 56
 ccagggcgcc tgtgggatct gcatgcct , 28

<210> 57
 <211> 28
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens

<400> 57
 cagtcgtctg ggcggtgcta caactggg , 28

<210> 58
 <211> 28
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 gaacacaggc acggctgagg ggtcctcc , 28

<210> 59
 <211> 28
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 ctgtggacta tggggagctg gatttcca , 28

<210> 60
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 cagtcgtctg ggcggtgct , 19

40

<210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

50 <400> 61

Thr Ser Gly Ser Leu Ser Arg
 1 5

<210> 62
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <400> 62
 Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
 1 5

15 <210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 63
 Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg
 1 5

25 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 64
 Gln Ser Ser His Leu Thr Arg
 1 5

35 <210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 65
 Arg Ser Asp Asn Leu Arg Glu
 1 5

45 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

55 <400> 66

Arg Ser Asp Ser Leu Ser Lys
 1 5

<210> 67
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <400> 67
 Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu
 1 5

<210> 68
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 68
 Glu Arg Ala Asn Arg Asn Ser
 1 5

25 <210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 69
 Asp Arg Ser Asp Leu Ser Arg
 1 5

35 <210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 70
 Asp Arg Ser His Leu Ala Arg
 1 5

45 <210> 71
 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

55 <400> 71

Arg Ser Asp Asp Leu Ser Arg
 1 5

<210> 72
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <400> 72
 Gln Ser Ala Asn Arg Thr Lys
 1 5

15 <210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 73
 Arg Ser Asp Thr Leu Ser Glu
 1 5

25 <210> 74
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 74
 Ala Asn Ser Asn Arg Ile Lys
 1 5

35 <210> 75
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

40 <400> 75
 gtgctgcagt tgagctggca atcagggt , 28

<210> 76
 <211> 28
 <212> ADN
 45 <213> Mus musculus

<400> 76
 cccaagtgaa tgaccagggt acctgccg 28

28

50 <210> 77
 <211> 28

ES 2 658 691 T3

<212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 77
 cagctgcca acagggcatga cttccaca 28

5 <210> 78
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 78
 atgatctgga agcggggcatc ctggacgg 28

10 <210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

15 <220>
 <223> Descripción de Desconocido: Secuencia del motivo meganucleasa

<400> 79
 Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly
 1 5

20 <210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 80
 Gln Ser Ala Asn Arg Thr Thr
 1 5

30 <210> 81
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 81
 ggctgctcca ggcattgcaga tcccacaggc gccctggcca gtcgtctggg cgggtgctaca 60
 actgggctgg cggcc , 75

35 <210> 82
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 82
 ggctgctcca ggcattgcaga tcccacaggc gccctggccc agtcgtctgg gcggtgctac 60
 aactgggctg gcggc 75

40 <210> 83
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 658 691 T3

| | | | |
|----|---------------------------------|---|----|
| | <400> 83 | | |
| | | ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctgggcc agtcgtctgg gcggtgctac | 60 |
| | | aactgggctg gcggc | 75 |
| | <210> 84 | | |
| | <211> 75 | | |
| | <212> ADN | | |
| 5 | <213> Homo sapiens | | |
| | <400> 84 | | |
| | | ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctggcca agtcgtctgg gcggtgctac | 60 |
| | | aactgggctg gcggc | 75 |
| | <210> 85 | | |
| | <211> 75 | | |
| 10 | <212> ADN | | |
| | <213> Homo sapiens | | |
| | <400> 85 | | |
| | | ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctgggcc agtcgtctgg gcggtgctac | 60 |
| | | aactgggctg gcggc | 75 |
| | <210> 86 | | |
| | <211> 75 | | |
| 15 | <212> ADN | | |
| | <213> Homo sapiens | | |
| | <400> 86 | | |
| | | ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctggcca agtcgtctgg gcggtgctac | 60 |
| | | aactgggctg gcggc | 75 |
| | <210> 87 | | |
| | <211> 75 | | |
| 20 | <212> ADN | | |
| | <213> Homo sapiens | | |
| | <400> 87 | | |
| | | ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctggcca ggccagtcgt ctgggcggtg | 60 |
| | | ctacaactgg gctgg | 75 |
| 25 | <210> 88 | | |
| | <211> 75 | | |
| | <212> ADN | | |
| 30 | <213> Homo sapiens | | |
| | <400> 88 | | |
| | | ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctggcca gccagtcgtc tgggcggtgc | 60 |
| | | tacaactggg ctggc | 75 |
| | <210> 89 | | |
| | <211> 75 | | |
| 35 | <212> ADN | | |
| | <213> Homo sapiens | | |

ES 2 658 691 T3

<400> 89
 ggctgctcca ggc atgcaga tcccacaggc gccctggcca gccagtcgt ctgggcggtg ' 60
 ctacaactgg gctgg 75

 <210> 90
 <211> 75
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 90
 ggctgctcca ggc atgcaga tcccacaggc gccctgggcc cagtcgtctg ggcggtgcta 60
 caactgggct ggcgg 75

 <210> 91
 <211> 75
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 91
 ggctgctcca ggc atgcaga tcccacaggc gccctggcca agtcgtctgg gcggtgctac 60
 aactgggctg gcggc 75

 <210> 92
 <211> 75
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 92
 ggctgctcca ggc atgcaga tcccacaggc gccctggccc agtcgtctgg gcggtgctac 60
 aactgggctg gcggc 75

 <210> 93
 <211> 75
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 93
 ggctgctcca ggc atgcaga tcccacaggc gccctggccg gccagtcgtc tgggcggtgc 60
 tacaactggg ctggc 75

 <210> 94
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25
 30

 <400> 94
 ggctgctcca ggc atgcaga tcccacaggc gccctgggcc agtcgtctgg gcggtgctac 60
 aactgggctg gcggc 75

 <210> 95
 <211> 75
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens

ES 2 658 691 T3

| | | | |
|----|---|----|--|
| | <400> 95 | | |
| | ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctgggcc agtcgtctgg gcggtgctac | 60 | |
| | aactgggctg gcggc | 75 | |
| | <210> 96 | | |
| | <211> 68 | | |
| | <212> ADN | | |
| 5 | <213> Homo sapiens | | |
| | <400> 96 | | |
| | ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctcgtct gggcggtgct acaactgggc | 60 | |
| | tggcggcc | 68 | |
| | <210> 97 | | |
| | <211> 53 | | |
| 10 | <212> ADN | | |
| | <213> Homo sapiens | | |
| | <400> 97 | | |
| | ggctgctcca ggcatgcaga tgtctgggcg gtgctacaac tgggctggcg gcc | 53 | |
| | <210> 98 | | |
| 15 | <211> 62 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> Homo sapiens | | |
| | <400> 98 | | |
| | ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gtctgggcg tgctacaact gggctggcgg | 60 | |
| | cc | 62 | |
| 20 | <210> 99 | | |
| | <211> 25 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> Homo sapiens | | |
| 25 | <400> 99 | | |
| | ggctgctaca actgggctgg cggcc | 25 | |
| | <210> 100 | | |
| | <211> 56 | | |
| | <212> ADN | | |
| 30 | <213> Homo sapiens | | |
| | <400> 100 | | |
| | ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctgctac aactgggctg gcggcc | 56 | |
| | <210> 101 | | |
| | <211> 55 | | |
| 35 | <212> ADN | | |
| | <213> Homo sapiens | | |
| | <400> 101 | | |
| | ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggg cggtgctaca actgggctgg cggcc | 55 | |
| | <210> 102 | | |
| 40 | <211> 62 | | |
| | <212> ADN | | |

ES 2 658 691 T3

```

<213> Homo sapiens

<400> 102
ggctgctcca ggcatgcaga tcccacagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg      60
cc                                                                              62

<210> 103
<211> 62
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 103
ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg      60
cc                                                                              62

10 <210> 104
<211> 74
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 104
ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gcccgccag tcgtctgggc ggtgctacaa      60
ctgggctggc ggcc                                                                74

15 <210> 105
<211> 74
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 105
ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gcctggccag tcgtctgggc ggtgctacaa      60
ctgggctggc ggcc                                                                74

<210> 106
<211> 74
<212> ADN
25 <213> Homo sapiens

<400> 106
ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctgccag tcgtctgggc ggtgctacaa      60
ctgggctggc ggcc                                                                74

<210> 107
<211> 53
<212> ADN
30 <213> Homo sapiens

<400> 107
ggctgctcca ggcatgcagt cgtctgggcg gtgctacaac tgggctggcg gcc              53

<210> 108
<211> 62
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

ES 2 658 691 T3

<400> 108
ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
cc 62
<210> 109
<211> 74
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens

<400> 109
ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctgccag tcgtctgggc ggtgctacaa 60
ctgggctggc ggcc 74
<210> 110
<211> 59
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 110
ggctgctcca ggcatgcaga tccagtcgtc tggcggtgc tacaactggg ctggcgcc 59

15

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de dedo de cinc que se une a un sitio diana en un gen de PD1, que comprende cinco o seis regiones de reconocimiento de dedo de cinc ordenadas de F1 a F5 o de F1 a F6, desde el extremo N al extremo C, y en donde las regiones de reconocimiento comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos:

- 5 (i) F1: RSSALSR (SEQ ID NO: 23);
 F2: RPLALKH (SEQ ID NO: 24);
 F3: RNDHRKN (SEQ ID NO: 12);
 F4: TRPVLKR (SEQ ID NO: 25); y
 F5: DRSLAR (SEQ ID NO: 9), y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana
 10 mostrado en el SEQ ID NO: 60;
- (ii) F1: RPSTLHR (SEQ ID NO: 27);
 F2: RDELTR (SEQ ID NO: 28);
 F3: RNNLRT (SEQ ID NO: 29) o TNWHLRT (SEQ ID NO: 30) o RTPHLTL (SEQ ID NO: 31) o
 15 RSAQLAT (SEQ ID NO: 32) o RCTHLYL (SEQ ID NO: 33) o RPTQRYS (SEQ ID NO: 34) o
 RANHREC (SEQ ID NO: 35) o RMGRLST (SEQ ID NO: 39) o RANHRVC (SEQ ID NO: 42) o
 RSTHLLG (SEQ ID NO: 43);
 F4: TRPVLKR (SEQ ID NO: 25); y
 F5: DRSLAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana
 20 mostrado en el SEQ ID NO: 60;
- (iii) F1: RPSTLHR (SEQ ID NO: 27);
 F2: RDELTR (SEQ ID NO: 28);
 F3: RSHRLTT (SEQ ID NO: 40);
 F4: TRPVLMR (SEQ ID NO: 41); y
 F5: DRSLAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana
 25 mostrado en el SEQ ID NO: 60;
- (iv) F1: RNAALTS (SEQ ID NO: 45);
 F2: RDELTR (SEQ ID NO: 28);
 F3: RSCGLWS (SEQ ID NO: 44) o RPMHLTN (SEQ ID NO: 49) o RSPHLYH (SEQ ID NO: 50) o
 RLPALLS (SEQ ID NO: 53);
 30 F4: TRPVLKR (SEQ ID NO: 25); y
 F5: DRSLAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana
 mostrado en el SEQ ID NO: 60;
- (v) F1: CNAALTR (SEQ ID NO: 46);
 F2: RDELTR (SEQ ID NO: 28);
 35 F3: REEHRAT (SEQ ID NO: 47);
 F4: TRPVLKR (SEQ ID NO: 25) y
 F5: DRSLAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana
 mostrado en el SEQ ID NO: 60;
- (vi) F1: RNAALTR (SEQ ID NO: 45);
 40 F2: RDELTR (SEQ ID NO: 28);
 F3: RCEALHH (SEQ ID NO: 51);

F4: TRPVLKR (SEQ ID NO: 25); y

F5: DRSAQAR (SEQ ID NO: 52) o DRSEALAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana mostrado en el SEQ ID NO: 60; o

(vii) F1: HNAALTR (SEQ ID NO: 54);

5 F2: RSEDELTR (SEQ ID NO: 28);

F3: RTYNRTQ (SEQ ID NO: 55);

F4: TRPVLKR (SEQ ID NO: 25); Y

F5: DRSEALAR (SEQ ID NO: 9) y en donde la proteína de dedo de cinc se une al sitio diana mostrado en el SEQ ID NO: 60.

10 2. Una proteína de fusión que comprende una proteína de dedo de cinc de acuerdo con la reivindicación 1 y un dominio funcional.

3. La proteína de fusión de la reivindicación 2, en donde el dominio funcional comprende un dominio regulador de la transcripción.

15 4. La proteína de fusión de la reivindicación 3, en donde el dominio regulador de la transcripción es un dominio de activación o un dominio de represión.

5. La proteína de fusión de la reivindicación 2, en donde el dominio funcional comprende un dominio de escisión o un semidominio de escisión.

6. Un polinucleótido que comprende una proteína de dedo de cinc de acuerdo con la reivindicación 1 o una proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.

20 7. Un método *ex vivo* de modulación de la expresión del gen de PD1 en una célula, comprendiendo el método la introducción en la célula de al menos un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6, en condiciones tales que la expresión del gen de PD1 sea modulada.

8. El método *ex vivo* de la reivindicación 7, en donde la modulación comprende la activación, represión o inactivación mediante la escisión del gen de PD1.

25 9. El método *ex vivo* de la reivindicación 8, en donde la inactivación se produce a través de la unión de extremos no homólogos (NHEJ) después de la escisión del gen de PD1.

10. El método *ex vivo* de la reivindicación 8, en donde la modulación comprende la inactivación por escisión y adicionalmente en donde el método comprende la introducción de una secuencia exógena flanqueada por secuencias que tienen homología con el gen de PD1 en la célula, en donde la secuencia exógena se integra en el gen de PD1 mediante recombinación homóloga.

30 11. El método *ex vivo* de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la célula es una célula primaria o una célula madre.

12. El método *ex vivo* de la reivindicación 11, en donde la célula primaria es una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), una célula T CD4+ o una célula T CD8+ o la célula madre es una célula madre embrionaria, una célula madre pluripotente inducida, una célula madre hematopoyética, una célula madre neuronal o una célula madre mesenquimal.

40 13. Un polinucleótido definido de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno, en donde la enfermedad o trastorno es un cáncer, una infección viral o una enfermedad autoinmunitaria, caracterizados por la expresión o regulación aberrante de un gen de PD1, de manera que la enfermedad o trastorno se tratan modulando la expresión del gen de PD1 de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.

14. El polinucleótido de la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno de manera que la enfermedad o trastorno se tratan adicionalmente administrando terapias anti-virales o anti-cancerosas adicionales al sujeto.

45

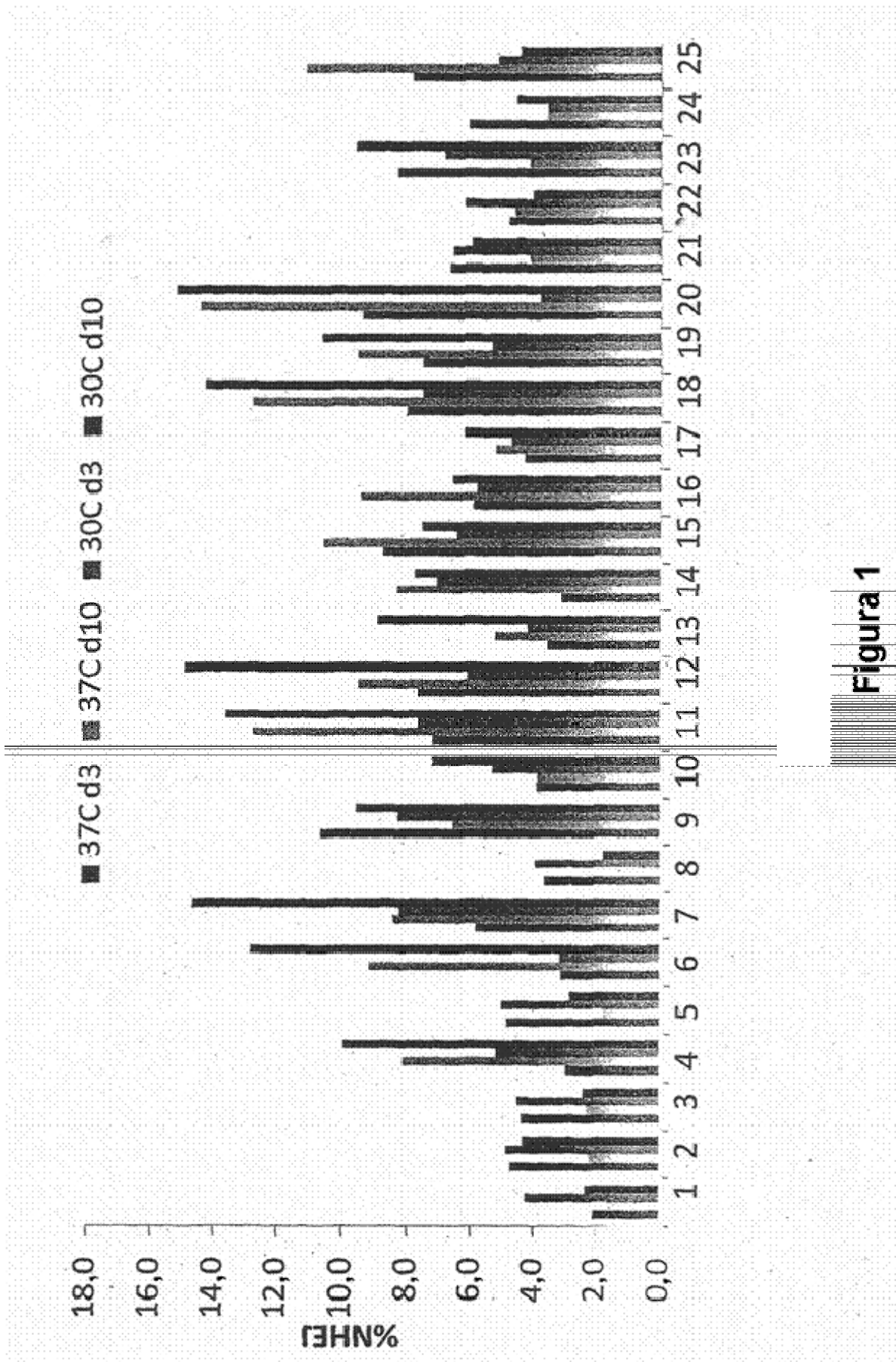


Figura 1

Figura 2

 ggcctgccaggcatgcagatccacagggccctggccagctgctctggggggtgctacaactggcctggcggcc WT PD1
 ***** (*) = Sitios de unión a ZFN

Inserciones:
 1 ggtgctccaggcatgcatgccacagggccctggccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc +1
 3 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc +1
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagt-cgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc +1
 4 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc +1
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagt-cgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc +1
 2 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggc +5
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggc +4
 2 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggc +5
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggc +4
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggc +2
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggc +1
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggc +1
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggc +1
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggc +4
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggc +1
 4 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggc +1

Deleciones:
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc -7
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc -22
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctggccAagccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc -13
 1 ggc-----tgctacaactggcctggcggc -50
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacagggccctg-----ctacaactggcctggcggc -19
 1 ggtgctccaggcatgcagatccac-----gggcgggtgctacaactggcctggcggc -20
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacaag-----cagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc -13
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacaagggcc-----ggtctggcgggtgctacaactggcctggcggc -13
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacaagggccc-ggcccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc -1
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacaagggc-cctggcccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc -1
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacaagggccctg-ccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc -1
 2 ggtgctccaggcatg-----cagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc -22
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacaagg-----cgtctggcgggtgctacaactggcctggcggc -13
 1 ggtgctccaggcatgcagatccacaagggccct-gcccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc -1
 1 ggtgctccaggcatgcagat-----cccagctcgtctggggcgggtgctacaactggcctggcggc -16

Figura 3: La transfección de células T Pmel con ADN de FokI Mut o FokI WT disminuye la expresión de PD1 tras la estimulación anti-CD3

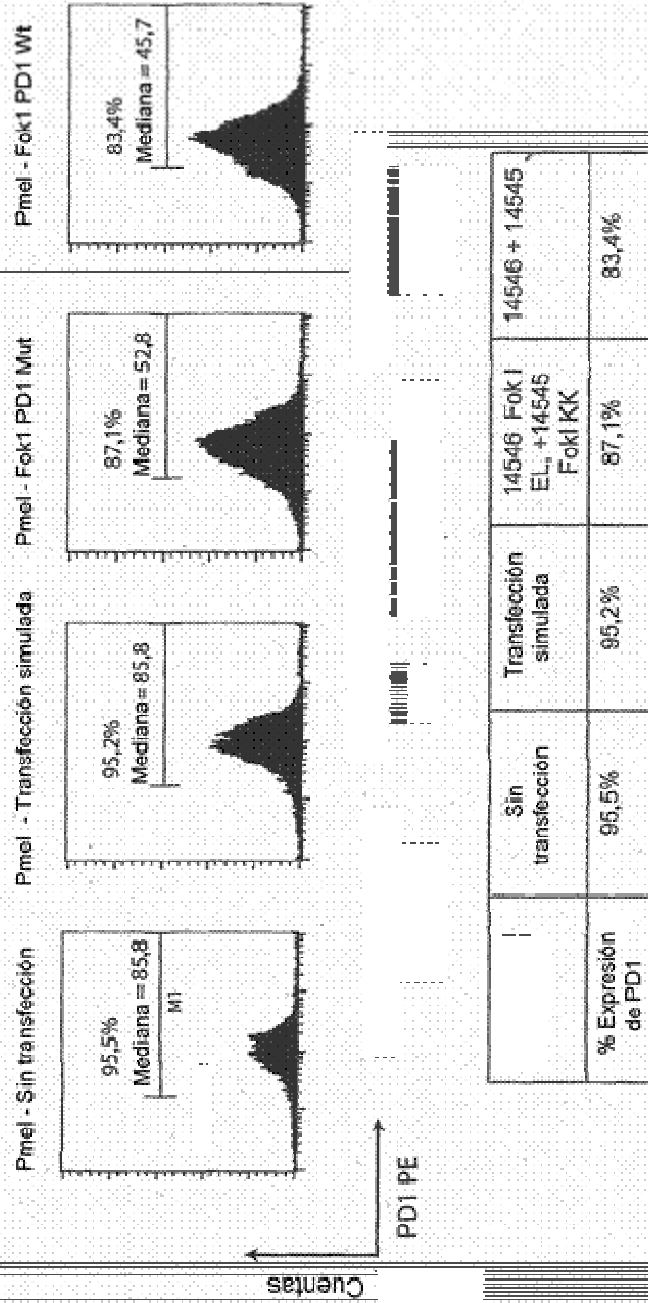
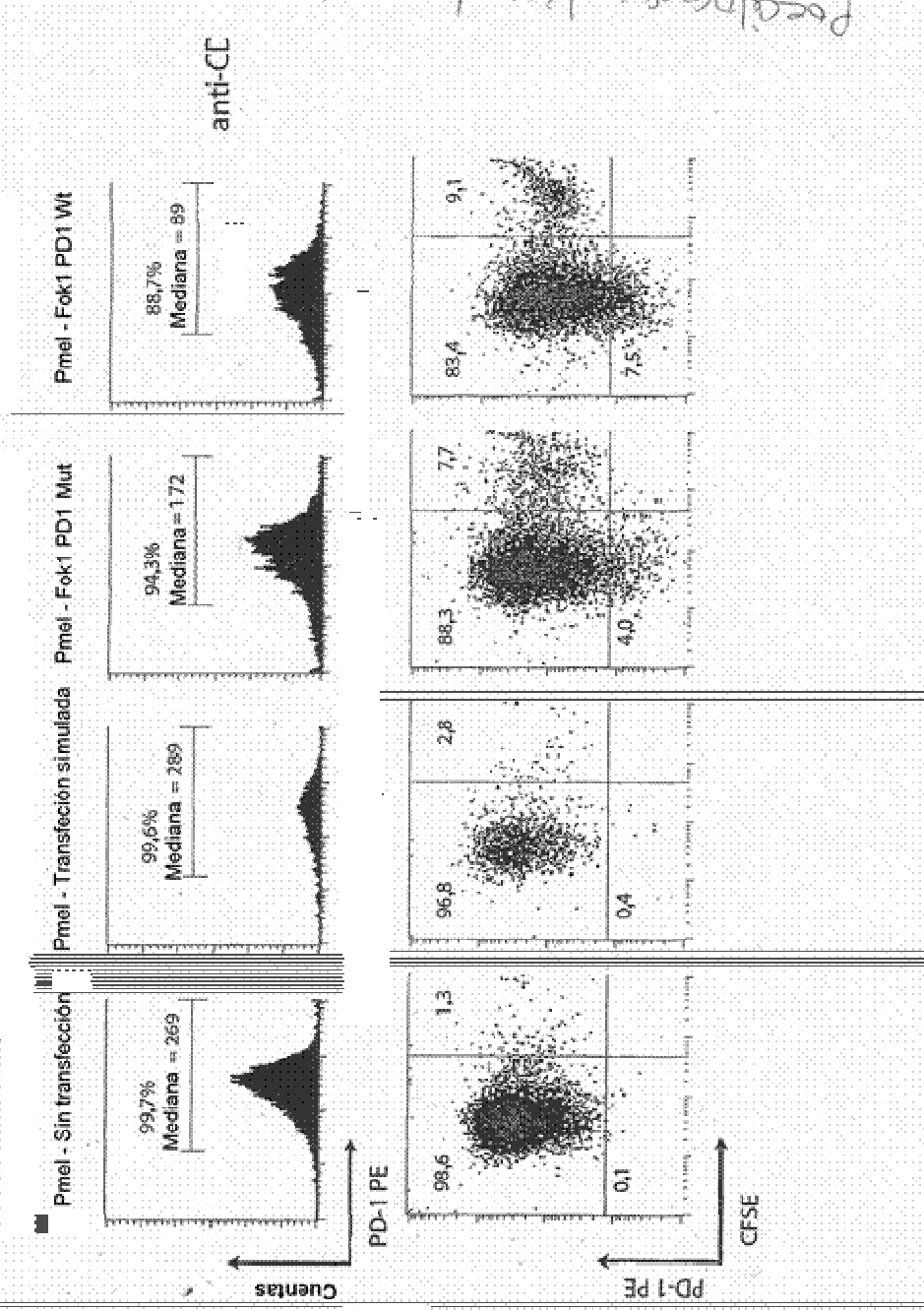
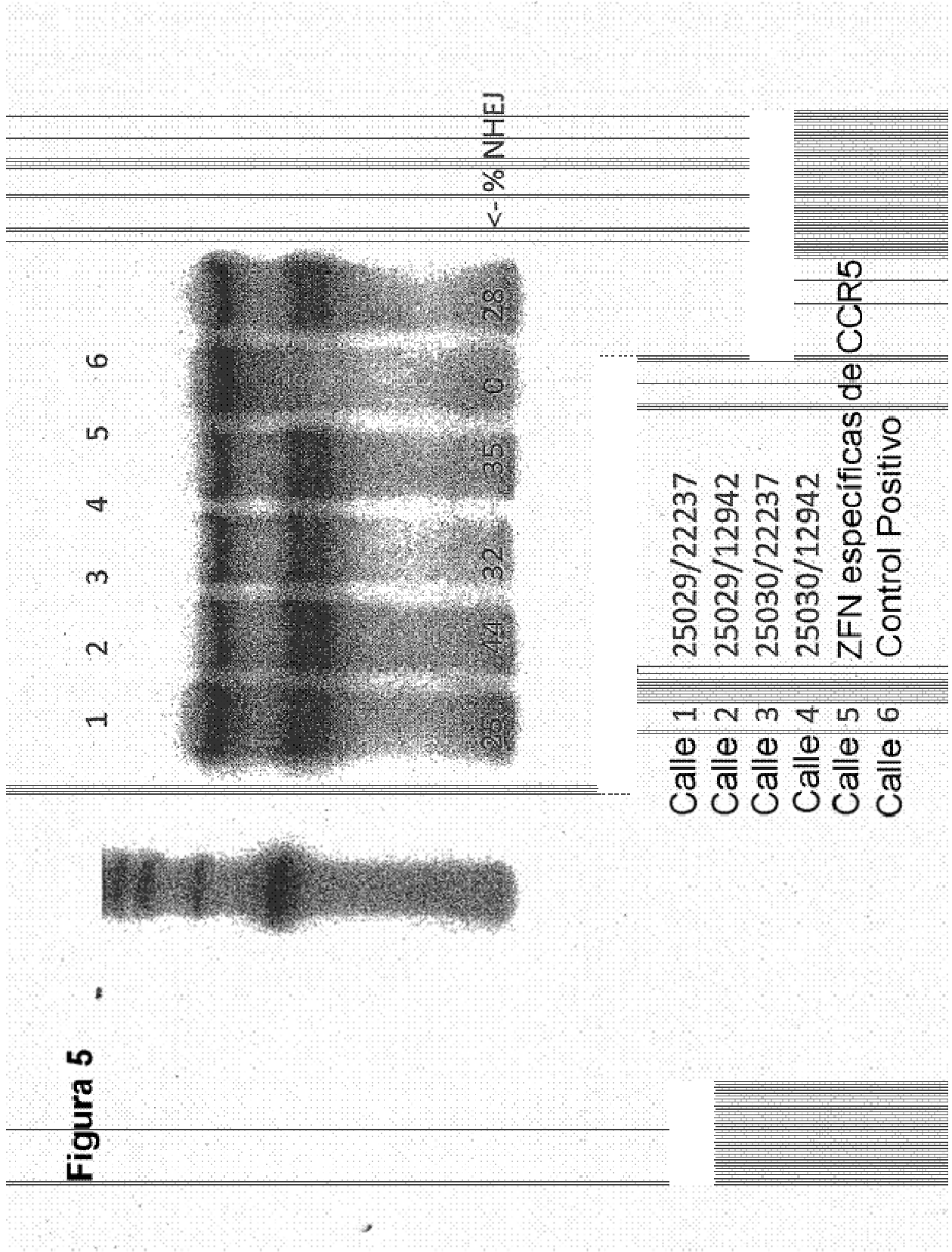


Figura 4: La expresión de PD1 aún se reduce a las 72 horas en células T Pmel transfectadas con ADN de Fok1 Mut o Fok1 WT





L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

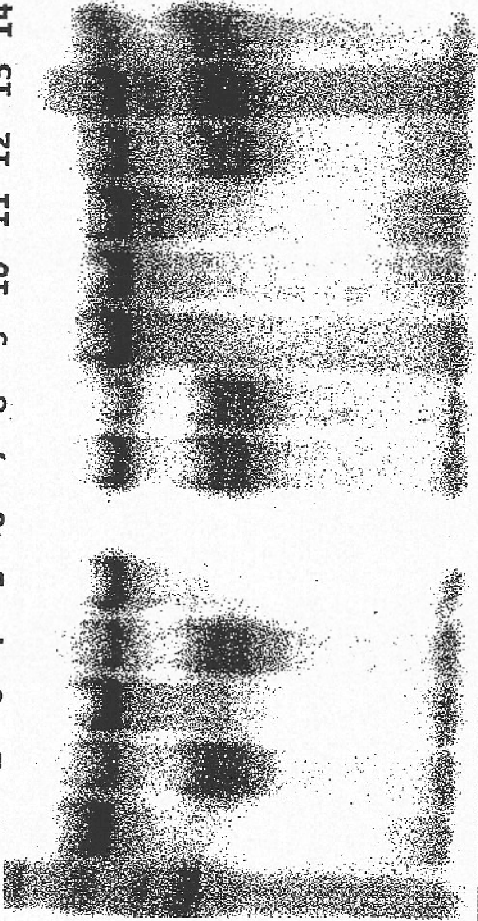


Figura 6

| Muestra Núm | Contenidos muestra | % NHEJ |
|-------------|---|--------|
| 1 | ZFN CCR5, 1ª estimulación | 0 |
| 2 | ZFN PD1, 1ª estimulación | 41,8 |
| 3 | ZFN CCR5, 2ª estimulación antes de clasificación | 0 |
| 4 | ZFN PD1, 2ª estimulación antes de clasificación | 42,6 |
| 5 | ZFN CCR5, 2ª estimulación, tras clasificación para PD1+ CD25+ | 0 |
| 6 | ZFN CCR5, 2ª estimulación, tras clasificación para PD1- CD25+ | 0 |
| 7 | ZFN PD1, 2ª estimulación, tras clasificación para PD1+, CD25+ | 36,6 |
| 8 | ZFN PD1, 2ª estimulación, tras clasificación para PD1-, CD25+ | 56,4 |
| 9 | ZFN CCR5, 2ª estimulación, PD1+ purificación esferas | 0 |
| 10 | ZFN CCR5, 2ª estimulación, PD1-, CD25 purificación esferas | 0 |
| 11 | ZFN CCR5, 2ª estimulación, PD1-, CD25- purificación esferas | 0 |
| 12 | ZFN PD1, 2ª estimulación, PD1+ purificación esferas | 29,6 |
| 13 | ZFN PD1, 2ª estimulación, PD1-, CD25+ purificación esferas | 42 |
| 14 | ZFN PD1, 2ª estimulación, PD1-, CD25- purificación esferas | 48 |

