

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 560**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010 E 10187818 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2441774**

54 Título: **Péptidos que tienen dominios de dedos de zinc y usos de estos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.05.2019**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ CENTRE DE REGULACIÓ GENÒMICA  
(100.0%)  
Doctor Aiguader, 88  
08003 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 713 560 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Péptidos que tienen dominios de dedos de zinc y usos de estos

## 5 Campo de la Invención

Esta invención se refiere a péptidos con dedos de zinc novedosos que tienen propiedades convenientes, lo que incluye especificidad de unión y afinidad por secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas y represión de la expresión del gen objetivo. En particular, la invención se refiere a proteínas represoras transcripcionales de dedos de zinc y a la represión de genes implicados en trastornos neurológicos, y a métodos de creación y usos que involucran dichas proteínas y ácidos nucleicos.

## Antecedentes de la Invención

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

20 Aunque muchos tejidos y órganos en animales son capaces de autorreparación, generalmente el sistema neurológico no lo es. Por lo tanto, los trastornos neurológicos se caracterizan a menudo por ser de naturaleza progresiva, al comenzar con problemas menores que permiten la detección y el diagnóstico, pero que se tornan cada vez más graves, lo que a veces resulta en la muerte del individuo afectado. Si bien aún se desconocen las causas o desencadenantes exactos de muchos trastornos neurológicos, para otros las causas están bien documentadas e investigadas. Para algunas de estas enfermedades existen tratamientos "eficaces", que alivian los síntomas y/o prolongan la supervivencia. Sin embargo, a pesar de esfuerzos intensos de investigación, para la mayoría de los trastornos neurológicos, y particularmente para las enfermedades más graves, todavía no existe cura. Por lo tanto, existe una clara necesidad de nuevos agentes terapéuticos y tratamientos para los trastornos neurológicos.

30 El conocimiento actual de los trastornos neurológicos muestra que estos pueden causarse por muchos factores diferentes, lo que incluye (pero no se limitan a): anomalías genéticas hereditarias, problemas en el sistema inmunitario, lesiones al cerebro o al sistema nervioso, o diabetes. Una causa conocida de trastorno neurológico es una anomalía genética que conduce a la expansión patológica de las repeticiones de CAG en ciertos genes, lo que resulta en regiones de poliglutamina (poliQ) extensas en productos de genes mutados expresados (Walker (2007) Lancet 369(9557): 218-228). Se cree que las proteínas resultantes se agregan y causan enfermedades de ganancia de función tóxicas, lo que incluye las ataxias espinocerebelosas, la atrofia muscular espinobulbar y la enfermedad de Huntington (HD; Orr y Zoghbi (2007) Annu. Rev. Neurosci. 30: 575-621; Cha (2007) Prog. Neurobiol. 83(4): 228-248). La neuropatología de la HD se asocia con la muerte celular neuronal selectiva, principalmente de las neuronas espinosas medias del núcleo caudado y el putamen, y en menor medida de las neuronas corticales, lo que conduce a disfunción cognitiva y corea (Walker (2007) Lancet 369(9557): 218-228; y Kumar y otros Pharmacol. Rep. 62(1): 1-14). Desde el descubrimiento, en 1993, de que el gen *htt* causa la HD (The-Huntington's-Disease-Collaborative-Research-Group (1993) Cell 72(6): 971-983), se ha centrado mucha atención en cómo el número de repeticiones de CAG afecta la patología y la progresión de esta enfermedad. Normalmente, el número de repeticiones de CAG en el gen *htt* de tipo salvaje varía de 10 a 29 (con una mediana de 18), mientras que en los pacientes con HD se encuentra típicamente en el intervalo de 36 a 121 (con una mediana de 44). Además, se ha demostrado que la edad de aparición de la enfermedad HD se correlaciona con el número de repeticiones de CAG (Walker (2007) Lancet 369(9557): 218-228; y Kumar y otros Pharmacol. Rep. 62(1): 1-14).

50 Aunque ha habido una gran cantidad de investigaciones sobre curas para la enfermedad HD, las terapias disponibles actualmente tratan solo los síntomas de la enfermedad, y por lo tanto todavía no hay forma de detener o retrasar la aparición o progresión de la HD (Walker (2007) Lancet 369(9557): 218-228; y Kumar y otros Pharmacol. Rep. 62(1): 1-14). Por esta razón, sería extremadamente conveniente tener un tratamiento para la enfermedad HD que se dirija a la causa antes que a los síntomas de la enfermedad.

55 Recientemente, se demostró que la interferencia de ARN (ARNi) reduce la expresión del *htt* mutante (van Bilsen y otros (2008) Hum. Gene Ther. 19(7): 710-719; Zhang y otros (2009) J. Neurochem. 108(1): 82-90; Pfister y otros (2009) Curr. Biol. 19(9): 774-778). Aunque se ha demostrado que el ARNi es una herramienta muy poderosa, el éxito de esta técnica depende de dirigirse a un solo nucleótido o polimorfismos de delección que diferencian entre alelos mutantes y *wt*, y estos a menudo difieren de paciente a paciente. El requerimiento aparente de diseños de ARNi personalizados plantea actualmente desafíos para ensayos clínicos y su uso aprobado en seres humanos.

60 En un enfoque más general, Hu y otros usaron ácido nucleico peptídico (PNA), y oligómeros antisentido de ácido nucleico bloqueado (LNA), para dirigirse a las repeticiones de CAG expandidas de los genes *ataxina-3* y *htt* (Hu y otros (2009) Nat. Biotechnol. 27(5): 478-484; Hu y otros (2009) Ann. NY Acad. Sci. 1175: 24-31). Ellos informaron la inhibición selectiva del alelo mutante con ácidos nucleicos peptídicos (PNA) por hasta 22 días. Aunque estos resultados fueron prometedores, los PNA no pueden suministrarse al sistema nervioso central. Por lo tanto, los autores probaron, además, los ácidos

nucleicos bloqueados (LNA), que quizás son más adecuados para su uso *in vivo*. Aunque se observó una inhibición selectiva del alelo mutante, solo se observó una inhibición de hasta el 30 % del *htt* wt a la concentración más alta y eficaz de LNA usada.

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

En consecuencia, la presente invención busca superar o al menos aliviar uno o más de los problemas en la técnica anterior.

10

Resumen de la Invención

15 En términos generales, la presente invención proporciona nuevos marcos de péptidos con dedos de zinc (y moléculas que codifican ácidos nucleicos) que pueden usarse para la modulación de la expresión génica *in vitro* y/o *in vivo*. Los nuevos péptidos con dedos de zinc de la invención pueden ser útiles particularmente en la modulación de genes objetivo asociados con repeticiones de nucleótidos expandidas, tales como repeticiones de CAG, y más específicamente en la represión de dichos genes. En algunas modalidades, los nuevos péptidos con dedos de zinc de la invención contienen un número mayor de dominios de dedos de zinc individuales que cualquier otro péptido con dedos de zinc artificial conocido que demuestre poseer actividad de modulación transcripcional ya sea *in vitro* o *in vivo* y, por lo tanto, abre la posibilidad de dirigirse a secuencias de ácido nucleico más largas de lo que se creía posible anteriormente y, como consecuencia, la posibilidad de un direccionamiento génico más específico, lo que puede ser útil particularmente para la modulación de la expresión génica dentro del genoma y/o para distinguir entre secuencias similares de longitudes diferentes. Además, la invención se refiere a moléculas y composiciones terapéuticas para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con secuencias de repetición de CAG expandidas, tales como enfermedades neurológicas y particularmente la enfermedad de Huntington (HD). Además, se describen métodos y regímenes de tratamientos terapéuticos para el tratamiento de pacientes afectados por o diagnosticados con HD. Por ejemplo, las moléculas terapéuticas de la invención pueden usarse para retrasar la aparición de los síntomas y/o para tratar o aliviar los síntomas de la enfermedad, y/o para reducir la gravedad o evitar la progresión de la enfermedad.

20 Por lo tanto, en esta invención, el solicitante ha creado péptidos con dedos de zinc (ZFP) novedosos que pueden usarse para reducir la expresión de genes *htt* mutantes. Además, dado que los dedos de zinc pueden volver a diseñarse fácilmente para unirse a diferentes secuencias de ADN (Annu. Rev. Biochem. 70: 313-340 (2001); Chem. Rev. 104(2): 789-799; Bioquímica 41(22): 7074-7081 (2002); Nucleic Acids Res. 34 (edición del servidor web): W516-523 92006); Nat. Methods 7(2): 91-9, (2009); Genome Res. 19(7): 1279-1288 (2009); Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 100(21): 12271-12276 (2003); Nat. Protoc. 1(3): 1637-1652 (2006); Mol. Cell 31(2): 294-301 (2008), lo que incluye las repeticiones de CAG (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 106(24): 9607-9612, (2009)), pueden ser útiles para dirigirse a genes tales como el *htt* a un nivel transcripcional.

30 Se usó un diseño racional para crear ZFP capaces de reconocer y unir poli-5'-GC(AT)-3', de manera que reconocerían tanto las secuencias de poli-CAG como su cadena de ADN complementaria. Se demostró que la expresión estable de los ZFP reduce la expresión del gen *htt* mutante cromosomal en una línea celular modelo, tanto a nivel de proteína como de ARN. Además, se demostró que la represión del gen mutante persiste durante períodos extensos de al menos 20 días.

35 Se sintetizaron ZFP que varían de 4 a 18 dedos y se demostró que reprimen un gen objetivo con 35 o más repeticiones de CAG preferentemente, cuando se comparan con repeticiones más cortas, lo que demuestra la utilidad de estas moléculas para dirigirse preferentemente a repeticiones de CAG extensas. En consecuencia, la expresión del gen *htt* mutante puede reprimirse a la vez que se deja el alelo de tipo salvaje sin afectación relativamente.

40 Mediante la concatenación de dominios de dedos de zinc individuales en cadenas largas mediante el uso de secuencias enlazadoras seleccionadas, los péptidos con dedos de zinc de la invención se han diseñado y sintetizado con un número mayor de dominios de dedos de zinc que los conocidos anteriormente; y se ha demostrado que estos ZFP extensos se dirigen selectivamente a secuencias de ácidos nucleicos con una afinidad y especificidad alta.

45 En consecuencia, en un primer aspecto de la invención se proporciona un péptido con dedos de zinc que comprende la secuencia: N'- [(Fórmula 2) - X<sub>6</sub>]<sub>n0</sub> - {[(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2) - X<sub>6</sub>]<sub>n1</sub> - [(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2) - X<sub>L</sub>]<sub>n2</sub> - [(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2) - X<sub>6</sub>]<sub>n3</sub> - [(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2)] - [X<sub>6</sub> - (Fórmula 2)]<sub>n4</sub> - C', en donde n0 es 0 o 1, n1 es de 1 a 4, n2 es 1 o 2, n3 es de 1 a 4, n4 es 0 o 1, X<sub>5</sub> es una secuencia enlazadora de 5 aminoácidos, X<sub>6</sub> es una secuencia enlazadora de 6 o 7 aminoácidos, y X<sub>L</sub> es una secuencia enlazadora de al menos 8 aminoácidos; y la Fórmula 2 es un dominio de dedos de zinc de la secuencia - X<sub>0-2</sub> C X<sub>1-5</sub> C X<sub>2-7</sub> X<sup>-1</sup> X<sup>+1</sup> X<sup>+2</sup> X<sup>+3</sup> X<sup>+4</sup> X<sup>+5</sup> X<sup>+6</sup> H X<sub>3-6</sub> H/C-, en donde X es cualquier aminoácido, los números en el subíndice indican los posibles números de residuos representados por X en esa posición, y el número en superíndice indica la posición del aminoácido en la secuencia de reconocimiento del dominio de dedos de zinc. Adicionalmente, al menos una secuencia X<sup>-1</sup> X<sup>+1</sup> X<sup>+2</sup> X<sup>+3</sup> X<sup>+4</sup> X<sup>+5</sup> X<sup>+6</sup> es la secuencia de aminoácidos QRATLQR (SEQ ID NO: 1). Ventajosamente, n0 y/o n4 = 0. Adecuadamente, X<sub>6</sub> es un enlazador de 6 aminoácidos. Por lo tanto, el péptido con dedos de zinc de la invención puede tener la fórmula N'- {[(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2) - X<sub>6</sub>]<sub>n1</sub> - [(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2) - X<sub>L</sub>]<sub>n2</sub> - [(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2) - X<sub>6</sub>]<sub>n3</sub> - [(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2)] - C', en donde X<sub>6</sub> es una secuencia enlazadora de 6 aminoácidos, y n1, n2, n3, n4, X<sub>5</sub> y X<sub>L</sub> son como se describió anteriormente.

En algunas modalidades beneficiosas, la secuencia enlazadora extensa  $X_L$  es de 8 a 50 aminoácidos, o de 11 a 40 aminoácidos;  $n_1$  es preferentemente 2, y  $n_3$  es preferentemente 2.

5 Al configurar la secuencia  $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$  para ser la misma o similar secuencia de aminoácidos en una pluralidad de dominios de dedos de zinc adyacentes (de modo que cada uno de la pluralidad de dedos se une preferentemente a la misma secuencia de trinucleótidos), los péptidos de la invención son capaces ventajosamente de dirigirse (o unirse) a secuencias de repetición de trinucleótidos en el ADN, las que pueden asociarse con anomalías genéticas. En este y otros aspectos de la invención, por lo tanto, al menos una secuencia  $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$  es la secuencia de aminoácidos QRATLQR (SEQ ID NO: 1), lo que permite el direccionamiento a secuencias de repetición de CAG.

10 En consecuencia, la invención proporciona un péptido con dedos de zinc que comprende al menos 4 dominios de dedos de zinc de Fórmula 2:  $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{2-7} X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6} H X_{3-6}^H/C$ , en donde X es cualquier aminoácido, los números en el subíndice indican los posibles números de residuos representados por X en esa posición, y el número en superíndice indica la posición del aminoácido en la secuencia de reconocimiento del dominio de dedos de zinc; y al menos una secuencia  $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$  es la secuencia de aminoácidos QRATLQR (SEQ ID NO: 1). En algunas modalidades, al menos 4 (por ejemplo, 4, 6, 11, 12 o 18) dominios de dedos de zinc adyacentes del péptido pueden tener la secuencia QRATLQR; y adecuadamente, todos los dominios de dedos de zinc del péptido tienen esta secuencia.

15 Péptidos particularmente útiles de la invención comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a proteínas quiméricas o de fusión que comprenden los péptidos con dedos de zinc de la invención conjugados a un dominio sin dedos de zinc.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a una biblioteca de péptidos con dedos de zinc virgen. Por lo tanto, se contempla el uso de una biblioteca de péptidos con dedos de zinc virgen en la selección de un péptido con dedos de zinc capaz de unirse a una secuencia de ácidos nucleicos objetivo deseada, así como también péptidos con dedos de zinc identificados a partir de las bibliotecas de la invención.

30 En otro aspecto, la invención proporciona usos terapéuticos y no terapéuticos (por ejemplo, diagnósticos) para los péptidos con dedos de zinc y las proteínas de fusión de la invención. Los aspectos y modalidades de la invención incluyen, por lo tanto, composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos con dedos de zinc. En una modalidad, la invención se refiere a un péptido con dedos de zinc para su uso en medicina. Más específicamente, los péptidos con dedos de zinc y los agentes terapéuticos de la invención pueden usarse para modular la expresión de un gen objetivo en una célula. Los péptidos con dedos de zinc de la invención pueden usarse en el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones del cuerpo humano o animal, tales como enfermedades neurológicas, por ejemplo, enfermedad de Huntington; y otras enfermedades causadas por o diagnosticadas por la expansión de genes de secuencias de nucleótidos repetidos, particularmente secuencias de repetición de trinucleótidos. La descripción se refiere, además, al tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas con el gen de repetición de CAG mutado y/o la expresión de productos génicos que contienen regiones de poliglutamina (poliQ) extensas. El tratamiento puede incluir, además, tratamientos preventivos así como también terapéuticos y el alivio de una enfermedad o afección.

35 La invención abarca, además, ácidos nucleicos que codifican los péptidos con dedos de zinc, bibliotecas de péptidos y proteínas de fusión de la invención, por ejemplo: vectores de expresión y vectores virales, tales como AAV (por ejemplo, para su uso en terapia génica).

40 En aún otro aspecto, la invención proporciona un método para crear una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido con poli-dedos de zinc que comprende al menos 8 dominios de dedos de zinc de Fórmula 1:  $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{9-14} H X_{3-6}^H/C$ , en donde X es cualquier aminoácido y los números en el subíndice indican el posible número de residuos representados por X en esa posición.

45 El método comprende: (a) proporcionar al menos 4 moléculas de ácido nucleico que codifican un par de dominios de dedos de zinc de Fórmula 1, en donde los dominios de dedos de zinc adyacentes de cada par se separan por una secuencia enlazadora de 5 aminoácidos; (b) unir 2 o 3 moléculas de ácido nucleico de la etapa (a) para crear al menos 2 moléculas de ácido nucleico que codifican una matriz de 4 o 6 dominios de dedos de zinc, en donde los pares adyacentes de dominios de dedos de zinc de la etapa (a) se separan por una secuencia enlazadora de 6 o 7 aminoácidos; y (c) unir las al menos 2 moléculas de ácido nucleico de la etapa (b) para crear una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido con poli-dedos de zinc, en donde las matrices adyacentes de dominios de dedos de zinc de la etapa (b) se separan por una secuencia enlazadora de al menos 8 aminoácidos. Opcionalmente, el método puede comprender, además, añadir un único dominio de dedos de zinc para crear un péptido con poli-dedos de zinc que tiene un número impar de dominios de dedos de zinc. Adicionalmente, el método comprende, además, la etapa (d) unir al extremo 5' o 3' de la secuencia de ácido nucleico de la etapa (c), un ácido nucleico que codifica un único dominio de dedos de zinc y una secuencia enlazadora de 5 a 7 aminoácidos para crear opcionalmente un péptido con poli-dedos de zinc que tenga un número impar de dominios de dedos de zinc. Las etapas del método de la invención pueden realizarse en cualquier orden apropiado. Se apreciará que existen muchos métodos diferentes mediante los cuales puede obtenerse una secuencia de ácido

nucleico que codifica dicho péptido con poli-dedos de zinc. Por lo tanto, la invención se dirige, además, a ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos con poli-dedos de zinc no importa cómo se obtengan, y a péptidos con poli-dedos de zinc que pueden obtenerse mediante la expresión de las secuencias de ácido nucleico anteriores.

- 5 En consecuencia, la descripción proporciona además un método para crear un péptido con poli-dedos de zinc que comprende al menos 8 dominios de dedos de zinc de Fórmula 1:  $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{9-14} H X_{3-6} H/C$ , en donde X es cualquier aminoácido y los números en el subíndice indican el posible número de residuos representados por X en esa posición, el método comprende la expresión de una secuencia de ácido nucleico que puede obtenerse mediante el método anterior.
- 10 La descripción proporciona, además, un método para crear un péptido con poli-dedos de zinc que comprende al menos 8 dominios de dedos de zinc de Fórmula 1:  $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{9-14} H X_{3-6} H/C$ , en donde X es cualquier aminoácido y los números en el subíndice indican el posible número de residuos representados por X en esa posición, el método comprende: (a) crear al menos 4 pares de dominios de dedos de zinc de Fórmula 1, los dominios de dedos de zinc adyacentes de cada par se separan por una secuencia enlazadora de 5 aminoácidos; (b) crear al menos 2 matrices de 4 o 6 dominios de dedos de zinc cada una mediante la unión de 2 o 3 pares de dedos de zinc de la etapa (a) mediante el uso de una secuencia enlazadora de 6 o 7 aminoácidos; y (c) unir las al menos 2 matrices de dominios de dedos de zinc de la etapa (b) mediante el uso de una secuencia enlazadora de al menos 8 aminoácidos. Adecuadamente, el método es para crear un péptido con poli-dedos de zinc de acuerdo con la descripción.
- 15
- 20 Se apreciará que los péptidos con dedos de zinc de la invención pueden formar derivados o conjugarse después a moléculas adicionales, y que dichos derivados y conjugados caen dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.
- 25 A menos que se especifique de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

#### Breve descripción de los dibujos

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

Figura 1 Las matrices de dedos de zinc de acuerdo con la invención se unen a las repeticiones de CAG. (A) Una ilustración esquemática de una matriz de 12 dedos, que muestra las hélices de reconocimiento que entran en contacto con las bases 5'-GCT-3' en la cadena de ADN inferior. Se construyeron matrices similares de 4, 6, 12 o 18 dedos de zinc (ZF4xHunt, ZF6xHunt, ZF12xHunt y ZF18xHunt). Se añadieron señales de localización nuclear (NLS) y efectores (por ejemplo, el dominio de represión de la transcripción Kox-1) a los extremos terminales N- y C-, respectivamente. (B) Los ensayos de retardo en gel muestran matrices de 4, 6 o 12 dedos que unen ADNbc de poli-CAG y forman complejos distintos; control negativo, mezcla de transcripción-traducción (TNT). (C) Columna de la mano izquierda: una ilustración esquemática de un diseño de dedos de zinc híbrido de acuerdo con una modalidad de la invención, que reconoce la secuencia de ácido nucleico 5'-GC(A/T)-3', lo que permite la unión a las cadenas complementarias  $(GCA)_n$  o  $(GCT)_n$  de la secuencia de ADNbc de repetición de CAG. Columna de la mano derecha: un ensayo de retardo en gel que demuestra que el dedo de zinc híbrido se une por igual a tripletes GCA o GCT en secuencias mixtas. (D) Ensayo de retardo en gel de especificidad que ilustra que un péptido con dedos de zinc de acuerdo con una modalidad de la invención (ZF6xHunt), se une preferentemente a repeticiones de CAG en comparación a secuencias mutantes (D=A,G,T; S=C,G; H=A,C,T).

35

40

45

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

50

55

Figura 3 Represión del informador episomal por ZFxHunt-FokI. Las células se transfectaron conjuntamente con los plásmidos de expresión informador y ZFP-FokI: el plásmido informador pEH contiene EGFP, fusionado a secuencias codificantes de poli-Q de longitudes diferentes, bajo un promotor de SV40. Un gen HcRed control, bajo un promotor de CMV, mide la represión fuera de objetivo o de largo alcance. Los constructos de expresión de ZF-FokI (promotor de CMV) contienen cadenas de ZFxHunt (0, 4, 6 o 12 dedos, como se indicó). El vector pTarget no contiene ZFP y se usa como un control. (A) Ensayo FACS que mide la reducción en veces en células fluorescentes EGFP o HcRED, en respuesta a diferentes dedos de zinc. Una represión de 2,5 veces equivale a una reducción del 60 %. (B) Ensayo qRT-PCR para medir

60

65

la represión en veces de ARNm de EGFP o HcRED por ZFP. (C) Transferencia de Western de EGFP para la represión por ZFP de objetivos pEH-Qx. La tinción con  $\beta$ -actina se usa como un control de carga.

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

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

30 Figura 6 Expresión de genes de repetición de CAG cromosómicos, 20 días después del suministro retroviral de ZFP. Los ensayos se llevaron a cabo en células *STHDH* de tipo salvaje (wt) de ratón con 7 repeticiones de CAG asociadas con cada copia del gen *Hdh* (Q7/Q7); en ratones mutantes *STHDH* poli-Q con 111 repeticiones de CAG asociadas con cada copia del gen *Hdh* (Q111/Q111); y en HEK293T humanas, como se indicó. (A) Ilustra la represión de *htt* endógeno por los péptidos de 6 y 11 dedos de la invención (ZF6xHunt y ZF11xHunt, respectivamente), con o sin el dominio represor Kox-1. Las transferencias de Western para Htt (fila superior) se controlaron con tinción con  $\beta$ -actina y se cuantificaron mediante el uso de ImageJ (represión en veces de la proteína; fila central). Se usó qRT-PCR para comparar los niveles de ARNm de *htt* (represión en veces del ARN; fila de la parte inferior). (B) Muestra que los niveles de ARNm de otros genes de repeticiones de CAG wt no se afectan en general. Los niveles de expresión de siete genes wt asociados con repeticiones de CAG se analizaron mediante qRT-PCR (atrofina 1: ATN1; ataxina 1, 2, 3 y 7: ATXN1, ATXN2, ATXN3 y ATXN7; subunidad alfa 1A del canal de calcio: CACNA1A; y proteína de unión TATA: TBP). Los números de repeticiones de CAG se ilustran en la Tabla 3. Dos vecinos genómicos de *htt* (el receptor cinasa 4 acoplado a la proteína G: GRK4; y la señalización de proteína G 12: Rgs12) tampoco se afectaron en células *STHDh*. (C) Los niveles de ARNm de los siete genes CAG wt y HTT wt (huntingtina; 21 repeticiones de CAG) tampoco se afectaron en general en células HEK293T (N.B. CACNA1A no se expresa en células HEK293T).

45 Figura 7 Ensayo de toxicidad de ZFP. Las células HEK-293T se transfectaron con los constructos de vector indicados. Se usaron como control células no transfectadas (negativo) o solo con Lipofectamina 2000. La citotoxicidad se analizó mediante el uso del ensayo de toxicidad celular Guava (PCA) y las barras muestran el porcentaje de células muertas, en apoptosis intermedia y viables. Los resultados son un promedio de al menos 3 experimentos independientes.

#### 50 Descripción detallada de la invención

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

55 A menos que se indique de otra forma, la práctica de la presente invención emplea técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante, métodos químicos, formulaciones farmacéuticas y suministro y tratamiento de pacientes, que están dentro de las capacidades de un experto en la técnica. Dichas técnicas también se explican en la literatura, por ejemplo, J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. y otros (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J.M. Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridisation: Principles and Practice*, Oxford University Press; M.J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; y D.M.J. Lilley y J.E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Parte A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press. Para ayudar con la comprensión de la invención, se definen varios términos en la presente descripción.

El término "aminoácido" en el contexto de la presente invención se usa en su sentido más amplio y se pretende que incluya L  $\alpha$ -aminoácidos o residuos de origen natural. Las abreviaturas de una y tres letras usadas comúnmente para los aminoácidos de origen natural se usan en la presente descripción: A = Ala; C = Cys; D = Asp; E = Glu; F = Phe; G = Gly; H = His; I = Ile; K = Lys; L = Leu; M = Met; N = Asn; P = Pro; Q = Gln; R = Arg; S = Ser; T = Thr; V = Val; W = Trp; e Y = Tyr (Lehninger, A.L., (1975) *Biochemistry*, 2da ed., pp. 71-92, Worth Publishers, Nueva York). El término general "aminoácido" incluye además D-aminoácidos, aminoácidos retroinversos, así como también aminoácidos modificados químicamente tales como los análogos de aminoácidos, aminoácidos de origen natural que no se incorporan usualmente en proteínas tales como la norleucina, y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica por ser característicos de un aminoácido, tal como los  $\beta$ -aminoácidos. Por ejemplo, los análogos o miméticos de fenilalanina o prolina, que permiten la misma restricción conformacional de los compuestos peptídicos como lo hacen los Phe o Pro naturales, se incluyen dentro de la definición de aminoácido. Dichos análogos y miméticos se denominan en la presente descripción como "equivalentes funcionales" del aminoácido respectivo. Otros ejemplos de aminoácidos se enumeran por Roberts y Vellaccio, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Gross and Meiehofer, eds., Vol. 5 p. 341, Academic Press, Inc., N.Y. 1983.

El término "péptido" como se usa en la presente (por ejemplo, en el contexto de un marco o péptido con dedos de zinc (ZFP)) se refiere a una pluralidad de aminoácidos unidos en una cadena lineal o circular. El término oligopéptido se usa típicamente para describir péptidos que tienen entre 2 y aproximadamente 50 o más aminoácidos. Los péptidos más grandes que aproximadamente 50 aminoácidos se denominan a menudo como polipéptidos o proteínas. Para los propósitos de la presente invención, sin embargo, el término "péptido" no se limita a ningún número particular de aminoácidos, y se usa indistintamente con los términos "polipéptido" y "proteína".

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

Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a un polímero de desoxirribonucleótidos (ADN) o ribonucleótidos (ARN), en conformación lineal o circular, y en forma monocatenaria o bicatenaria. Para los propósitos de la presente invención, dichos polímeros de ADN o ARN pueden incluir nucleótidos naturales, nucleótidos no naturales o sintéticos, y mezclas de estos. Los nucleótidos no naturales pueden incluir análogos de nucleótidos naturales, así como también nucleótidos que se modifican en los restos base, azúcar y/o fosfato (por ejemplo, cadenas principales de fosforotioato). Ejemplos de ácidos nucleicos modificados son los PNA y los ácidos nucleicos morfolino. Generalmente, un análogo de un nucleótido en particular tiene la misma especificidad de emparejamiento de bases, es decir, un análogo de G se emparejará por bases con C. Para los propósitos de la invención, estos términos no deben considerarse limitantes con respecto a la longitud de un polímero.

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

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

Un ácido nucleico "objetivo", "sitio objetivo" o "secuencia objetivo", como se usa en la presente, es una secuencia de ácido nucleico a la que se unirá el péptido con dedos de zinc de la invención, siempre y cuando las condiciones de la reacción de unión no sean prohibitivas. Un sitio objetivo puede ser una molécula de ácido nucleico o una porción de un polinucleótido más grande. Los sitios objetivo particularmente adecuados comprenden secuencias de ácido nucleico repetitivas; especialmente las secuencias de repetición de trinucleótidos. Las secuencias objetivo preferidas de acuerdo con la invención incluyen aquellas definidas por secuencias de repetición de CAG (por ejemplo, CAGCAG...; AGCAGC...; y GCAGCA...), y sus secuencias complementarias, repeticiones de CTG (por ejemplo, CTGCTG...; TGCTGC...; y GCTGCT...). De acuerdo con la descripción, una secuencia objetivo para un péptido con poli-dedos de zinc de la invención puede comprender una secuencia de ácido nucleico contigua única, o más de una secuencia de ácido nucleico no contigua (por ejemplo, dos secuencias contiguas separadas, y cada una representa un sitio objetivo parcial), que se intercalan por

uno o más nucleótidos o secuencia de nucleótidos intermedios. Estos términos, además, pueden sustituirse o complementarse con los términos "sitio de unión", "secuencia de unión", "sitio de reconocimiento" o "secuencia de reconocimiento", los que se usan indistintamente.

5 Como se usa en la presente, "unión" se refiere a una interacción no covalente entre macromoléculas (por ejemplo, entre un péptido con dedos de zinc y un sitio objetivo de ácido nucleico). En algunos casos, la unión será específica de secuencia, tal como entre uno o más nucleótidos específicos (o pares de bases) y uno o más aminoácidos específicos. Sin embargo, se apreciará que no todos los componentes de una interacción de unión necesitan ser específicos de secuencia (por ejemplo, interacciones no covalentes con residuos de fosfato en una cadena principal de ADN). Las interacciones de unión entre una secuencia de ácido nucleico y un péptido de dedos de zinc de la invención pueden caracterizarse mediante la afinidad de unión y/o la constante de disociación (Kd). Una constante de disociación adecuada para un péptido con dedos de zinc de la invención que se une a su sitio objetivo puede estar en el orden de 1  $\mu\text{M}$  o inferior, 1 nM o inferior, o 1 pM o inferior. "Afinidad" se refiere a la fuerza de la unión, de manera que un aumento en la afinidad de unión se correlaciona con un valor de Kd inferior. Los péptidos con dedos de zinc de la invención pueden tener actividad de unión a ADN, actividad de unión a ARN y/o incluso actividad de unión a proteína. Preferentemente, los péptidos con dedos de zinc de la invención se diseñan o seleccionan para tener una actividad de unión a ADNbc específica de secuencia. Preferentemente, el sitio objetivo para un péptido con dedos de zinc en particular es una secuencia a la que el dedo de zinc de interés es capaz de unirse en forma específica con el nucleótido. Sin embargo, se apreciará que, en dependencia de la secuencia de aminoácidos de un péptido con dedos de zinc, puede unirse a o reconocer más de una secuencia objetivo, aunque típicamente una secuencia se unirá en preferencia a cualesquiera otras secuencias reconocidas, en dependencia de la especificidad relativa de las interacciones individuales no covalentes. Generalmente, la unión específica se logra preferentemente con una constante de disociación (Kd) de 1 nM o inferior, 100 pM o inferior; o 10 pM o inferior. Preferentemente, un péptido con dedos de zinc de la invención se une a una secuencia objetivo específica con una constante de disociación de 1 pM o inferior; tal como 0,1 pM o inferior, o incluso 10 fM o inferior.

25 Por "no objetivo" se entiende que la secuencia de ácido nucleico en cuestión no se une apreciablemente por el péptido con dedos de zinc relevante. En algunas modalidades, puede considerarse que, cuando un péptido con dedos de zinc de la invención tiene una secuencia objetivo específica de secuencia conocida, todas las demás secuencias de ácido nucleico pueden considerarse no objetivo. Desde una perspectiva práctica, puede ser conveniente definir una interacción entre una secuencia no objetivo y un péptido con dedos de zinc en particular como que es subfisiológica (es decir, que no es capaz de crear una respuesta fisiológica bajo concentraciones de péptido con dedos de zinc/secuencia objetivo fisiológicas). Por ejemplo, si puede medirse cualquier unión entre el péptido con dedos de zinc y la secuencia no objetivo, la constante de disociación (Kd) es típicamente más débil que 1  $\mu\text{M}$ , tal como 10  $\mu\text{M}$  o más débil, 100  $\mu\text{M}$  o más débil, o al menos 1 mM.

35 El término "biblioteca" se usa de acuerdo con su uso común en la técnica, para denotar una colección de polipéptidos diferentes o una colección de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos diferentes. Los marcos de péptidos con dedos de zinc de la invención son útiles para crear bibliotecas de péptidos con dedos de zinc que tienen series extensas de dominios de dedos de zinc adyacentes, que comprenden o codifican un repertorio de polipéptidos de secuencias diferentes, cada uno de los cuales puede tener una secuencia de unión preferida diferente. Las bibliotecas de marcos de dedos de zinc preferidas comprenden al menos 8 dedos de zinc adyacentes, y con mayor preferencia al menos 11 o 12 dedos de zinc adyacentes. En algunas modalidades, una biblioteca de marcos de dedos de zinc comprende 18 dominios de dedos de zinc adyacentes. Como se usa en la presente, una biblioteca "virgen" se refiere a una colección de péptidos con dedos de zinc diferentes o los ácidos nucleicos codificantes correspondientes que no se han predeterminado o seleccionado para tener un sitio de unión objetivo preferido en particular.

#### Péptidos con dedos de zinc

50 La presente invención se refiere a dedos de zinc que no son de origen natural para su unión a cualquier secuencia de ácido nucleico deseada, y su uso como moléculas terapéuticas; por ejemplo, en el tratamiento de la HD. La invención proporciona, además, el uso de módulos de dedos de zinc en péptidos con poli-dedos de zinc para unirse a secuencias de ácido nucleico repetitivas, tales como repeticiones de trinucleótidos, y particularmente repeticiones de CAG expandidas en secuencias de ADN genómico. Preferentemente, los péptidos con poli-dedos de zinc de la invención se unen a repeticiones de CAG expandidas asociadas con secuencias de genes mutados preferentemente y/o selectivamente sobre las secuencias de repeticiones de CAG más cortas de los genes normales.

60 Un dedo de zinc es un dominio polipeptídico pequeño relativamente que comprende aproximadamente 30 aminoácidos, que se pliega para formar una hélice  $\alpha$  adyacente a una lámina  $\beta$  antiparalela (conocido como pliegue  $\beta\beta\alpha$ ). El pliegue se estabiliza mediante la coordinación de un ión de zinc entre cuatro residuos de Cys y/o His en gran parte no variantes (en dependencia del tipo de marco de dedos de zinc), como se describe más abajo. Los dominios de dedos de zinc naturales se han estudiado y descrito bien en la literatura, ver, por ejemplo, Miller y otros, (1985) EMBO J. 4: 1609-1614; Berg (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85: 99-102; y Lee y otros, (1989) Science 245: 635-637. Un dominio de dedos de zinc reconoce y se une a un triplete de ácido nucleico, o a un cuadruplete superpuesto (como se explica más abajo), en una secuencia objetivo de ADN bicatenario. Sin embargo, también se conoce que los dedos de zinc se unen al ARN y a las proteínas (Clemens, K.R. y otros (1993) Science 260: 530-533; Bogenhagen, D.F. (1993) Mol. Cell. Biol. 13:

5149-5158; Searles, M.A. y otros (2000) *J. Mol. Biol.* 301: 47-60; Mackay, J.P. y Crossley, M. (1998) *Trends Biochem. Sci.* 23: 1-4).

5 Las proteínas con dedos de zinc contienen generalmente hebras o cadenas de dominios de dedos de zinc (o módulos). Por lo tanto, una proteína con dedos de zinc natural puede incluir 2 o más dominios de dedos de zinc, que pueden estar adyacentes directamente entre sí (es decir, separados por una secuencia enlazadora corta (canónica)), o pueden separarse por secuencias polipeptídicas más largas, flexibles o estructuradas. Se espera que los dominios de dedos de zinc adyacentes directamente se unan a secuencias de ácido nucleico contiguas, es decir, a trinucleótidos/tripletes adyacentes. En algunos casos, puede producirse también unión cruzada entre dedos de zinc adyacentes y sus respectivos tripletes objetivo, lo que ayuda a fortalecer o mejorar el reconocimiento de la secuencia objetivo, y conduce a la unión de secuencias cuadrupletes superpuestas (Isalan y otros, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 94: 5617-5621.). En comparación, los dominios de dedos de zinc distantes dentro de la misma proteína pueden reconocer (o unirse a) secuencias de ácido nucleico no contiguas o incluso a moléculas diferentes (por ejemplo, proteína en lugar de ácido nucleico).

15 La mayoría de las cadenas laterales de aminoácidos en un dominio de dedos de zinc que son importantes para el reconocimiento de bases del ADNbc se localizan en la hélice  $\alpha$  del dedo. Convenientemente, por lo tanto, las posiciones de aminoácidos en un dominio de dedos de zinc se numeran desde el primer residuo en la hélice  $\alpha$ , al que se le asigna el número (+)1; y se considera generalmente que la hélice termina en el residuo final de Cys o His que se coordina con el zinc, que es típicamente la posición +11. Por lo tanto, "-1" se refiere al residuo en la estructura marco inmediatamente anterior al primer residuo de la hélice  $\alpha$ . Como se usa en la presente, los residuos denominados como "++" se ubican en el dominio de dedos de zinc inmediatamente adyacente (C-terminal). Generalmente, el reconocimiento de ácido nucleico por un módulo de dedos de zinc se logra principalmente por las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones -1, +3, +6 y ++2; aunque otras posiciones de aminoácidos pueden contribuir a veces a la unión entre el dedo de zinc y la molécula objetivo. Por lo tanto, es conveniente definir la secuencia de un dominio de dedos de zinc de -1 a (+)6 (es decir, residuos -1, 1, 2, 3, 4, 5 y 6) como una "secuencia de reconocimiento" de dedos de zinc. El primer residuo de histidina no variable que coordina el ion de zinc es la posición (+)7 del dominio de dedos de zinc.

30 Cuando se une a una secuencia de ácido nucleico, un dominio de dedos de zinc generalmente interactúa principalmente con una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenaria (la cadena o secuencia primaria). Sin embargo, puede haber interacciones subsidiarias entre los aminoácidos de un dominio de dedos de zinc y la cadena complementaria (o secundaria) de la molécula de ácido nucleico bicatenaria. La hélice  $\alpha$  del dominio de dedos de zinc se encuentra casi invariablemente dentro del surco principal del ADNbc y se alinea antiparalelamente a la cadena de ácido nucleico objetivo. En consecuencia, la secuencia de ácido nucleico primaria se dispone de 3' a 5' para corresponder con la secuencia N-terminal a C-terminal del péptido con dedos de zinc. Dado que las secuencias de ácido nucleico se escriben convencionalmente de 5' a 3', y las secuencias de aminoácidos del extremo N-terminal al extremo C-terminal, cuando una secuencia de ácido nucleico objetivo y un péptido con dedos de zinc se alinean de acuerdo con la convención, la interacción primaria del péptido con dedos de zinc es con la cadena complementaria (o negativa) de la secuencia de ácido nucleico, ya que es esta cadena la cual se alinea de 3' a 5'. Estas convenciones se siguen en la nomenclatura usada en la presente descripción.

45 Los péptidos con dedos de zinc de acuerdo con la descripción son no naturales y contienen adecuadamente 3 o más, por ejemplo, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más (por ejemplo, hasta aproximadamente 30 o 32) dominios de dedos de zinc dispuestos de forma adyacente entre sí en tándem. Dichos péptidos pueden denominarse como "péptidos con poli-dedos de zinc". Los péptidos con dedos de zinc particularmente beneficiosos de la invención incluyen al menos 6 dominios de dedos de zinc, al menos 11 o al menos 12 dominios de dedos de zinc; y en algunos casos al menos 18 dominios de dedos de zinc. Los péptidos con dedos de zinc de la invención pueden unirse a sitios de unión de ácidos nucleicos no contiguos o contiguos. Cuando se dirigen a sitios de unión no contiguos, cada subsitio (o sitio medio donde hay dos secuencias no contiguas) es adecuadamente de una longitud de 18 bases aproximadamente, pero puede ser alternativamente de una longitud de 12 o 24 bases aproximadamente.

55 En los péptidos con (poli-)dedos de zinc de la presente invención, los dominios de dedos de zinc adyacentes se unen entre sí mediante "secuencias enlazadoras" que pueden ser canónicas, similares a canónicas, flexibles o estructuradas, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/53480 (Moore y otros, (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 98: 1437-1441). Generalmente, una secuencia enlazadora de dedos de zinc natural carece de estructura secundaria en la forma libre del péptido. Sin embargo, cuando la proteína se une a su sitio objetivo, un enlazador canónico está típicamente en una conformación lineal, extendida, y las cadenas laterales de aminoácidos dentro del enlazador pueden formar interacciones locales con el ADN. En una matriz en tándem de dominios de dedos de zinc, la secuencia enlazadora es la secuencia de aminoácidos que se encuentra entre el último residuo de la hélice  $\alpha$  en un dedo de zinc N-terminal y el primer residuo de la lámina  $\beta$  en el siguiente dedo de zinc (es decir, adyacente al extremo C-terminal). Para los propósitos de la presente invención, se considera que el último aminoácido de la hélice  $\alpha$  en un dedo de zinc es el residuo final de histidina (o cisteína) que coordina el zinc, mientras que el primer aminoácido del siguiente dedo es generalmente una tirosina, fenilalanina u otro residuo hidrofóbico.

65 Marcos y bibliotecas de péptidos con dedos de zinc

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

Para la funcionalidad biológica específica y el uso terapéutico, particularmente *in vivo* (por ejemplo, en terapia génica y en animales transgénicos), es conveniente que un péptido con poli-dedos de zinc de la invención sea capaz de dirigirse a sitios únicos o virtualmente únicos dentro de cualquier genoma. Para genomas complejos, tales como en humanos, se considera generalmente que se requiere una dirección de al menos 16 pb para especificar una secuencia de ADN potencialmente única. Las secuencias de ADN más cortas tienen una probabilidad significativa de aparecer varias veces en un genoma, lo que aumenta la posibilidad de obtener efectos biológicos y de direccionamiento génico no específicos convenientes. Dado que los dedos de zinc individuales generalmente se unen a 3 nucleótidos consecutivos, 6 dominios de dedos de zinc con un sitio de unión de 18 pb podrían, en teoría, usarse para el reconocimiento específico de una secuencia objetivo única dentro de cualquier genoma. En consecuencia, se ha realizado una gran cantidad de investigaciones sobre los llamados "factores de transcripción de diseño" para la regulación de genes específicos, los que involucran típicamente 4 o 6 dominios de dedos de zinc que pueden disponerse en tándem o en grupos dimerizables (por ejemplo, de 3 unidades de dedo). Sin embargo, no se ha demostrado previamente que puedan sintetizarse y expresarse matrices en tándem de más de 6 dominios de dedos de zinc, tales como 8, 9, 10, 11, 12 o más (por ejemplo, 15, 16 o 18) dedos de zinc. Además, nunca se ha demostrado previamente que dichas matrices largas de dominios de dedos de zinc no naturales puedan tener actividad de unión a ácido nucleico (específica) *in vitro* o *in vivo*. Ciertamente, no se ha informado previamente que dichas matrices extensas de péptidos con dedos de zinc puedan dirigirse a secuencias de ADN genómico e incluso tener actividad de modulación génica *in vitro* y/o *in vivo*.

En la presente invención, se han creado nuevos marcos peptídicos con dedos de zinc extensos que comprenden al menos 4, al menos 6, al menos 11, al menos 12 o al menos 18 dominios de dedos de zinc. Por lo tanto, los marcos de péptidos con dedos de zinc preferidos de la invención comprenden 6, 11, 12 o 18 dominios de dedos de zinc.

Los marcos de péptidos con dedos de zinc de la invención pueden comprender dominios de dedos de zinc directamente adyacentes que tienen secuencias enlazadoras canónicas (o similares a canónicas) entre dominios de dedos de zinc adyacentes, de manera que se unen preferentemente a secuencias de ácido nucleico contiguas. En consecuencia, un (marco) péptido con 6 dedos de zinc de la invención es particularmente adecuado para unirse a tramos contiguos de aproximadamente 18 bases de ácido nucleico, particularmente de la cadena de ácido nucleico negativa; un (marco) péptido con 12 dedos de zinc de la invención es particularmente adecuado para unirse a aproximadamente 36 bases de ácidos nucleicos, los que pueden disponerse como un tramo contiguo o como subsitios no contiguos de, por ejemplo, 18 bases de ácido nucleico; un péptido con 11 dedos de zinc es adecuado para unir aproximadamente 33 bases de ácido nucleico, lo que demuestra que los números impares de cadenas de dedos largos también son funcionales; y un (marco) péptido con 18 dedos de zinc de la invención es particularmente adecuado para unirse a aproximadamente 54 bases de ácido nucleico, los que pueden disponerse de forma contigua o en subsitios no contiguos de, por ejemplo, 18 bases de ácido nucleico.

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

Los marcos con dedos de zinc de la invención pueden comprender dos o más (por ejemplo, 2, 3 o 4) matrices de 4, 6 u 8 dominios de dedos de zinc directamente adyacentes separados por enlazadores flexibles largos (o estructurados). Preferentemente, dichos péptidos con (poli-)dedos de zinc extensos se disponen en matrices múltiples de unidades de 6 dedos separadas por enlazadores flexibles largos.

Los inventores han demostrado por primera vez que dichos péptidos con dedos de zinc extensos de más de 6 dedos de zinc pueden exhibir una unión específica y de afinidad alta a las secuencias objetivo deseadas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se ha demostrado que estos péptidos con dedos de zinc extensos pueden expresarse de manera estable dentro de una célula objetivo, pueden ser no tóxicos para la célula objetivo, y pueden tener una actividad de modulación génica específica y deseada.

Los péptidos con dedos de zinc extensos de la invención son adecuados particularmente para unirse a secuencias de repetición (por ejemplo, repeticiones de trinucleótidos) en los genes objetivo. Las secuencias de repetición objetivo adecuadas comprenden al menos 10 repeticiones de trinucleótidos, al menos 12 repeticiones de trinucleótidos, o al menos

20 repeticiones de trinucleótidos. Beneficiosamente, existen al menos 22 repeticiones de trinucleótidos, al menos 29 repeticiones de trinucleótidos o más.

5 En una modalidad, los péptidos con dedos de zinc extensos de la invención se unen a secuencias dentro de secuencias de repetición de CAG y/o CTG expandidas en ADN bicatenario, por ejemplo, moléculas de ADN, fragmentos, secuencias de genes o cromatina. Adecuadamente, el sitio de unión comprende repeticiones de 5'- GCA -3' y/o 5'- GCT -3'. Por lo tanto, el sitio de unión comprende preferentemente repeticiones de la secuencia 5'- GC<sup>T/A</sup> -3'. Convenientemente, las secuencias objetivo para los péptidos con dedos de zinc extensos preferidos de la invención comprenden 22 o más repeticiones de CAG (o CTG) contiguas, tales como al menos 35 repeticiones de CAG (o CTG) contiguas, al menos 63 repeticiones de CAG (o CTG) contiguas, al menos 104 repeticiones de CAG (o CTG) contiguas, o al menos 111 repeticiones de CAG (o CTG) contiguas.

15 Una ventaja sorprendente de los péptidos con dedos de zinc de una modalidad de la invención es que se unen a matrices más largas de secuencias de repetición de CTG o de CAG en preferencia a matrices más cortas. En consecuencia, los péptidos con dedos de zinc dirigidos a CAG (o CTG) de la invención se unen más eficazmente (por ejemplo, con mayor afinidad o mayor capacidad de modulación génica) a las secuencias de repetición de CTG o CAG expandidas que contienen al menos 22 repeticiones, en comparación con las secuencias que contienen, por ejemplo, 10 o menos repeticiones. De manera similar, las secuencias que contienen al menos 35 repeticiones de CAG o CTG pueden unirse preferentemente sobre las secuencias que contienen 22 o menos repeticiones (lo que incluye 10 o menos); las secuencias que contienen al menos 63 repeticiones de CAG o CTG pueden unirse preferentemente a las secuencias que contienen 35 repeticiones o menos (lo que incluye 22 o menos, o 10 o menos); y las secuencias que contienen al menos 104 repeticiones de CAG o CTG pueden unirse preferentemente a secuencias que contienen 63 o menos repeticiones (lo que incluye 35 o menos, 22 o menos, o 10 o menos).

25 Los marcos de péptidos con dedos de zinc extensos de la invención son adecuados, además, para la generación de bibliotecas de péptidos con dedos de zinc vírgenes, los que pueden analizarse o probarse de cualquier otra manera para determinar las propiedades convenientes, tales como la afinidad de unión a una secuencia objetivo seleccionada (tal como ADN o ARN). Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un marco de péptido con dedos de zinc extenso que puede formar un andamio para la selección o diseño de factores de transcripción de dedos de zinc artificiales y/o proteínas de unión a ADN. Por ejemplo, el marco de la matriz de dedos de zinc extenso puede comprender 12 o más dominios de dedos de zinc (tal como 18), los que pueden diversificarse en una o más posiciones de aminoácidos.

35 Hay una serie de marcos de dedos de zinc naturales conocidos en la técnica, y cualquiera de estos marcos puede adecuarse para su uso en los marcos de péptidos con dedos de zinc extensos de la invención. En general, un marco de dedos de zinc natural tiene la secuencia, Fórmula 1: X<sub>0-2</sub> C X<sub>1-5</sub> C X<sub>9-14</sub> H X<sub>3-6</sub> <sup>H/C</sup>; o Fórmula 2: X<sub>0-2</sub> C X<sub>1-5</sub> C X<sub>2-7</sub> X<sup>-1</sup> X<sup>+1</sup> X<sup>+2</sup> X<sup>+3</sup> X<sup>+4</sup> X<sup>+5</sup> X<sup>+6</sup> H X<sub>3-6</sub> <sup>H/C</sup> donde X es cualquier aminoácido, los números en el subíndice indican los posibles números de residuos representados por X, y los números en superíndice indican la posición del aminoácido en la hélice α. De acuerdo con la invención, el marco de péptido con dedos de zinc extenso se basa en una matriz de dominios de dedos de zinc de Fórmula 1 o 2. Alternativamente, el motivo de dedos de zinc puede representarse mediante la secuencia general, Fórmula 3: X<sub>2</sub> C X<sub>2,4</sub> C X<sub>12</sub> H X<sub>3,4,5</sub> <sup>H/C</sup>; o Fórmula 4: X<sub>2</sub> C X<sub>2,4</sub> C X<sub>5</sub> X<sup>-1</sup> X<sup>+1</sup> X<sup>+2</sup> X<sup>+3</sup> X<sup>+4</sup> X<sup>+5</sup> X<sup>+6</sup> H X<sub>3,4,5</sub> <sup>H/C</sup>. Aún con mayor preferencia, el motivo de dedos de zinc puede representarse mediante la secuencia general, Fórmula 5: X<sub>2</sub> C X<sub>2</sub> C X<sub>12</sub> H X<sub>3</sub> H; o Fórmula 6: X<sub>2</sub> C X<sub>2</sub> C X<sub>5</sub> X<sup>-1</sup> X<sup>+1</sup> X<sup>+2</sup> X<sup>+3</sup> X<sup>+4</sup> X<sup>+5</sup> X<sup>+6</sup> H X<sub>3</sub> H. En consecuencia, un marco de péptido de dedo de zinc extenso como se describe en la presente puede basarse en los dominios de dedos de zinc de las Fórmulas 1 a 6, o combinaciones de las fórmulas 1 a 6, unidas en una matriz mediante el uso de las secuencias enlazadoras descritas en la presente.

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

55 En una modalidad de la invención, el marco de péptido con dedos de zinc extenso comprende al menos 11 dominios de dedos de zinc de una de las Fórmulas 1 a 6, unidos por secuencias enlazadoras, es decir, Fórmula 7: [(Fórmula 1-6) - enlazador]<sub>n</sub> - (Fórmula 1-6)], donde n es ≥10, tal como entre 10 y 31. Como se indica, en la Fórmula 7 puede usarse cualquier combinación de las Fórmulas 1 a 6. En otra modalidad, el marco de péptido con dedos de zinc extensa comprende entre 11 y 18 dominios de dedos de zinc de las fórmulas anteriores. Adecuadamente, por lo tanto, n es 10 a 17; más adecuadamente, n es 10, 11, 13, 14, 15 o 17; y n es preferentemente 10, 11 o 17.

60 De acuerdo con la invención, la secuencia de reconocimiento de uno o más de los dominios de dedos de zinc (es decir, las posiciones X<sup>-1</sup>, X<sup>+1</sup>, X<sup>+2</sup>, X<sup>+3</sup>, X<sup>+4</sup>, X<sup>+5</sup> y X<sup>+6</sup> en las Fórmulas 2, 4 y 6 anteriores se representa por la secuencia de aminoácidos QRATLQR (SEQ ID NO: 1). Por lo tanto, en una modalidad, se proporciona un péptido con dedos de zinc (unión a ADN) diseñado que comprende al menos 11 dominios de dedos de zinc, en donde al menos una secuencia de reconocimiento de dedos de zinc tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1. De manera beneficiosa, el péptido con dedos de zinc diseñado de la invención comprende al menos 11 secuencias de reconocimiento de dedos de zinc de la SEQ ID NO: 1. Adecuadamente, el péptido con dedos de zinc comprende entre 11 y 18 (por ejemplo, 12) secuencias de reconocimiento

de dedos de zinc de la SEQ ID NO: 1. El péptido con dedos de zinc de la invención se une preferentemente a secuencias de repetición de CAG; y con mayor preferencia a secuencias génicas *htt* expandidas humanas.

5 Como ya se ha descrito, los dominios de dedos de zinc adyacentes se unen mediante secuencias enlazadoras. En una proteína con dedos de zinc natural, la treonina es a menudo el primer residuo en el enlazador, y la prolina es a menudo el último residuo del enlazador. Sobre la base de la homología de secuencia, la secuencia enlazadora canónica natural se considera que es -TGEKP- (enlazador 1 o L1) [SEQ ID NO: 20]. Sin embargo, los enlazadores naturales pueden variar grandemente en términos de longitud y secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, una secuencia de consenso común basada en secuencias enlazadoras naturales puede representarse por -TG<sup>E/Q</sup>K<sup>R</sup>P- (enlazador 2 o L2) [SEQ ID NO: 21], y esta secuencia se prefiere para su uso como un enlazador "canónico" (o "similar a canónico") de acuerdo con la invención.

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

20 Los enlazadores similares a canónicos para su uso de acuerdo con la invención pueden basarse adecuadamente en la secuencia, -TG<sup>G/S</sup>E<sup>F/Q</sup>K<sup>R</sup>P- (enlazador 3 o L3) [SEQ ID NO: 22]. Por lo tanto, los enlazadores similares a canónicos preferidos incluyen las secuencias específicas: TGGERP [SEQ ID NO: 23], TGSERP [SEQ ID NO: 24], TGGQRP [SEQ ID NO: 25], TGSQRP [SEQ ID NO: 26], TGGEKP [SEQ ID NO: 27], TGSEKP [SEQ ID NO: 28], TGGQKP [SEQ ID NO: 29], o TGSQKP [SEQ ID NO: 30]. Un enlazador similar a canónico preferido particularmente es TGSERP (enlazador 4 o L4) [SEQ ID NO: 24]. Sin embargo, también pueden usarse otras secuencias enlazadoras entre uno o más pares de dominios de dedos de zinc, por ejemplo, enlazadores de la secuencia -TG<sup>(G/S)</sup><sub>0-2</sub>E<sup>F/Q</sup>K<sup>R</sup>P- (enlazador 5 o L5) [SEQ ID NO: 33] o -T<sup>(G/S)</sup><sub>0-2</sub>G<sup>E/Q</sup>K<sup>R</sup>P- (enlazador 6 o L6) [SEQ ID NO: 34].

30 En algunas modalidades pueden usarse enlazadores flexibles aún más largos de 8 o más aminoácidos, como se describió previamente. Los enlazadores de 8 aminoácidos incluyen las secuencias - TG<sup>(G/S)</sup><sub>3</sub>E<sup>F/Q</sup>K<sup>R</sup>P- [SEQ ID NO: 31] y - T<sup>(G/S)</sup><sub>3</sub>G<sup>E/Q</sup>K<sup>R</sup>P- (L12) [SEQ ID NO: 32]. Enlazadores flexibles largos ilustrativos son: LRQKDGSGGGSQVLGTAERP (enlazador 7 o L7) [SEQ ID NO: 35], LRQKDGSGGGSQVLGTAERP (enlazador 8 o L8) [SEQ ID NO: 36], LRQKDGSGGGSQVLGTAERP (enlazador 9 o L9) [SEQ ID NO: 37], LRQKDGSGGGSQVLGTAERP (enlazador 10 o L10) [SEQ ID NO: 38] y LRQKDGSGGGSQVLGTAERP (enlazador 11 o L11) [SEQ ID NO: 39].

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

50 Además, podría esperarse además un aumento significativo en la afinidad de unión, en comparación con los péptidos con dedos de zinc con menos dedos. Por ejemplo, donde un péptido con 3 dedos (con una secuencia de reconocimiento de 9 pb) se une al ADN con afinidad nanomolar, podría esperarse que un péptido con 6 dedos se una a una secuencia de 18 pb con una afinidad de entre 10<sup>-9</sup> y 10<sup>-18</sup> M, en dependencia de la disposición y secuencia de los péptidos con dedos de zinc. Para optimizar tanto la afinidad como la especificidad de los péptidos de 6 dedos, se ha demostrado que es ventajosa una fusión de tres dominios de 2 dedos (Moore y otros, (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 98: 1437-1441; y el documento WO 01/53480). Por lo tanto, en algunas modalidades de la invención, los péptidos con dedos de zinc de la invención comprenden submatrices de unidades de 2 dedos dispuestas en tándem. En otras modalidades, los péptidos con dedos de zinc de la invención comprenden submatrices de unidades de 3 dedos dispuestas en tándem.

60 En consecuencia, el marco con dedos de zinc extenso de la descripción puede comprender una secuencia seleccionada de:

65 SEQ ID NO: 2 N'- [(Fórmula 2) - X<sub>6</sub>]<sub>n0</sub> - {[(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2) - X<sub>6</sub>]<sub>n1</sub> - [(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2) - X<sub>1</sub>]<sub>n2</sub> - [(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2) - X<sub>6</sub>]<sub>n3</sub> - [(Fórmula 2) - X<sub>5</sub> - (Fórmula 2)] - [X<sub>6</sub> - (Fórmula 2)]<sub>n4</sub> - C', en donde n0 es 0 o 1, n1

es de 1 a 4,  $n_2$  es 1 o 2,  $n_3$  es de 1 a 4,  $n_4$  es 0 o 1,  $X_5$  es una secuencia enlazadora de 5 aminoácidos,  $X_6$  es una secuencia enlazadora de 6 o 7 aminoácidos, y  $X_L$  es un enlazador de al menos 8 aminoácidos;

5 SEQ ID NO: 3 N'- [(Fórmula 1-6) - L3] $_{n_0}$  - {[(Fórmula 1-6) - L2 - (Fórmula 1-6) - L3] $_{n_1}$  - [(Fórmula 1-6) - L2 - (Fórmula 1-6) -  $X_L$ ] $_{n_2}$  - [(Fórmula 1-6) - L2 - (Fórmula 1-6) - L3] $_{n_3}$  - [(Fórmula 1-6) - L2 - (Fórmula 1-6)] - [L3 - (Fórmula 1-6)] $_{n_4}$ -C' donde  $n_0$ ,  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $n_3$ ,  $n_4$  y  $X_L$  son como se definió anteriormente;

10 SEQ ID NO: 4 N'- [(Fórmula 1-6) - L4] $_{n_0}$  - {[(Fórmula 1-6) - L1 - (Fórmula 1-6) - L4] $_{n_1}$  - [(Fórmula 1-6) - L1 - (Fórmula 1-6) -  $X_L$ ] $_{n_2}$  - [(Fórmula 1-6) - L1 - (Fórmula 1-6) - L4] $_{n_3}$  - [(Fórmula 1-6) - L1 - (Fórmula 1-6)] - [L4 - (Fórmula 1-6)] $_{n_4}$ -C', donde  $n_0$ ,  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $n_3$ ,  $n_4$  y  $X_L$  son como se definió anteriormente;

15 SEQ ID NO: 5 N'- [(Fórmula 6) - L4] $_{n_0}$  - {[(Fórmula 6) - L1 - (Fórmula 6) - L4] $_{n_1}$  - [(Fórmula 6) - L1 - (Fórmula 6) -  $X_L$ ] $_{n_2}$  - [(Fórmula 6) - L1 - (Fórmula 6) - L4] $_{n_3}$  - [(Fórmula 6) - L1 - (Fórmula 6)] - [L4 - (Fórmula 6)] $_{n_4}$ -C', donde  $n_0$ ,  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $n_3$ ,  $n_4$  y  $X_L$  son como se definió anteriormente.

Para evitar dudas, los guiones ("-") en las fórmulas y las SEQ ID NO de la invención representan solo enlaces, y por lo tanto estas fórmulas y las SEQ ID NO también pueden representarse sin guiones.

20 Preferentemente en las SEQ ID NO: 2 a 5,  $n_0$  es 0 o 1,  $n_1$  es de 1 a 3,  $n_2$  es 1 o 2,  $n_3$  es 2 o 3,  $n_4$  es 0 y  $X_L$  es aproximadamente de 8 a 50. Con mayor preferencia,  $n_0$  es 0,  $n_1$  es 2 o 3,  $n_2$  es 1 o 2,  $n_3$  es 2 y  $n_4$  es 0, y/o  $X_L$  es aproximadamente de 11 a 40 aminoácidos. Aún con mayor preferencia,  $n_0$  es 0,  $n_1$  es 2,  $n_2$  es 1 o 2,  $n_3$  es 2 y  $n_4$  es 0; y/o  $X_L$  es aproximadamente de 15 a 35 aminoácidos. Aún con mayor preferencia  $X_L$  es aproximadamente de 15 a 29 aminoácidos. Con la máxima preferencia  $X_L$  se selecciona entre L7, L8, L9, L10, L11 y L12.

25 En consecuencia, la invención proporciona además métodos para la construcción y el uso de péptidos con poli-dedos de zinc que comprenden al menos 8, y preferentemente al menos 11 o 12 (por ejemplo, 11, 12 o 18) dominios de dedos de zinc. Los métodos de la invención son adecuados particularmente para construir matrices de dominios de dedos de zinc idénticos, los que pueden unirse a secuencias objetivo de trinucleótidos repetidos.

30 En los marcos con dedos de zinc anteriores, el número total de dominios de dedos de zinc es preferentemente de 11 a 18 y la secuencia de reconocimiento de dedos de zinc es preferentemente la SEQ ID NO: 1. Los péptidos con dedos de zinc preferidos tienen 6, 11, 12 o 18 dominios de dedos de zinc, y comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14 respectivamente (ver Tabla 1).

35 La invención abarca, además, moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de péptidos de la invención. Las secuencias codificantes de péptidos con dedos de zinc preferidas comprenden las SEQ ID NO: 9, 11, 13 y 15, las que codifican los péptidos con dedos de zinc de las SEQ ID NO: 8, 10, 12 y 14, respectivamente.

40 Se apreciará que las secuencias de los marcos de péptidos con dedos de zinc de la invención pueden incluir además secuencias líder opcionales (N-terminales), tales como: aminoácidos para ayudar a la expresión (por ejemplo, dipéptido Met-Ala N-terminal); etiquetas de purificación (por ejemplo, etiquetas FLAG); y secuencias de localización/direccionamiento (por ejemplo, secuencias de localización nuclear (NLS), tales como PKKKRKV). Además, los péptidos pueden incluir opcionalmente secuencias C-terminales adicionales, tales como: secuencias enlazadoras para fusionar dominios de dedos de zinc a moléculas efectoras; y moléculas efectoras. Pueden emplearse otras secuencias para propósitos de clonación. Las secuencias de cualesquiera secuencias N o C-terminales pueden variar, típicamente sin alterar la actividad de unión del marco con dedos de zinc, y dichas variantes se abarcan dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

50 Los marcos con dedos de zinc de la descripción pueden usarse para diseñar o seleccionar matrices de péptidos con dedos de zinc dirigidos a cualquier secuencia de ácido nucleico deseada. En este caso, los marcos con dedos de zinc pueden diversificarse en una o más posiciones. En algunas modalidades, el marco se diversifica en una o más de las posiciones de aminoácidos -1, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de las Fórmulas 1 a 6, y por lo tanto de las SEQ ID NO: 2 a la 5. Los cambios en la secuencia polipeptídica pueden lograrse convenientemente mediante la diversificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica los marcos de péptidos con dedos de zinc en los codones para al menos una de esas posiciones, para codificar más de una variante polipeptídica. En otra modalidad, el marco de ácido nucleico o péptido se varía específica o aleatoriamente en una o más (por ejemplo, todas) de las posiciones -1, 2, 3 y 6. En aún otra modalidad, el marco se varía en las posiciones -1, 3 y 6. De manera beneficiosa, se diversifican al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 de las posiciones en la secuencia de reconocimiento de cada dominio de dedos de zinc. Todas estas variantes de ácidos nucleicos y polipéptidos se comprenden dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

65 Por lo tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una biblioteca virgen de ácidos nucleicos o polipéptidos que comprende más de un péptido con dedos de zinc o una secuencia de ácido nucleico codificante, lo que permite la selección de péptidos con dedos de zinc que tienen propiedades convenientes (tales como la afinidad de unión por una secuencia de ácido nucleico objetivo seleccionada), a partir de un método de selección/tamizaje de biblioteca adecuado. Para los propósitos de esta invención, una biblioteca que tiene una mezcla de péptidos o ácidos nucleicos que no se ha optimizado

o seleccionado para tener una funcionalidad en particular se denomina en la presente descripción una biblioteca "virgen". Una ventaja potencial del marco del péptido con dedos de zinc de la invención es que los sitios objetivo que pueden unirse por miembros individuales de la biblioteca de marco pueden no restringirse a un tipo o conformación particular de molécula (por ejemplo, ADN bicatenario). Por lo tanto, cualquier molécula o secuencia objetivo conveniente puede reconocerse (es decir, unirse), tales como ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN o ARN), proteínas o péptidos. Una molécula objetivo preferida es un ácido nucleico bicatenario, y es más adecuadamente el ADN.

Los residuos de aminoácidos en cada una de las posiciones diversificadas pueden aleatorizarse de forma no selectiva, es decir, al permitir que el aminoácido en la posición de interés sea cualquiera de los 20 aminoácidos comunes de origen natural; o puede aleatorizarse selectivamente, es decir, permitir que el aminoácido especificado sea uno de un subgrupo definido de los 20 aminoácidos de origen natural. Se apreciará que una forma conveniente de crear una biblioteca de péptidos mutantes con aminoácidos aleatorizados en cada localización seleccionada, es aleatorizar el codón de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico correspondiente que codifica el aminoácido seleccionado. Por otro lado, dado el conocimiento que ahora se ha acumulado en relación con la unión específica de secuencia de los dominios de dedos de zinc a los ácidos nucleicos, en algunas modalidades puede ser conveniente seleccionar un aminoácido específico (o un subgrupo pequeño de aminoácidos) en una o más posiciones seleccionadas en el dominio de dedos de zinc, por ejemplo, cuando se conoce que un aminoácido específico proporciona una unión óptima a un residuo de nucleótido en particular en una secuencia objetivo específica. Dichos péptidos o marcos son el resultado de un diseño "inteligente". Convenientemente, la totalidad de la secuencia de reconocimiento de dedos de zinc puede seleccionarse mediante un diseño inteligente e insertarse/incorporarse en un marco con dedos de zinc apropiado. El experto en la técnica conoce bien las secuencias de codones que pueden usarse para especificar uno o más de un residuo de aminoácido en particular dentro de una biblioteca. Las posiciones de aminoácidos no aleatorias en cada dominio de dedos de zinc pueden elegirse a partir de estructuras de dedos de zinc de tipo salvaje o artificiales conocidas.

La presente descripción también se dirige hacia la selección, identificación y/o caracterización de péptidos con dedos de zinc que tienen una propiedad deseada, a partir de un marco con dedos de zinc virgen de la invención. Una biblioteca virgen comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, al menos  $10^6$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{12}$  o más secuencias de codificación diferentes) que pueden expresarse y tamizarse para identificar péptidos con dedos de zinc que tienen la propiedad deseada.

La descripción se refiere, además, a derivados de los péptidos con dedos de zinc de la invención. Con respecto a esto, se apreciará que pueden realizarse modificaciones, tales como sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones en el péptido, sin afectar adversamente sus propiedades físicas (tales como especificidad de unión o afinidad). Por "derivado" de un péptido con dedos de zinc se entiende una secuencia peptídica que tiene la actividad deseada seleccionada (por ejemplo, afinidad de unión por una secuencia objetivo seleccionada), pero que incluye además una o más mutaciones o modificaciones a la secuencia de aminoácidos primaria. Por lo tanto, un derivado de la invención puede tener una o más cadenas laterales de aminoácidos modificadas químicamente (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) tales como modificaciones por pegilación, sialilación y glicosilación. Además o alternativamente, un derivado puede contener una o más mutaciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) a la secuencia primaria de un péptido con dedos de zinc seleccionado. En consecuencia, la descripción abarca los resultados de los experimentos de maduración realizados en un péptido con dedos de zinc seleccionado o en un marco de péptido con dedos de zinc para mejorar o cambiar una o más características del péptido identificado inicialmente. A manera de ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos de un dominio de dedos de zinc seleccionado pueden mutarse (o sustituirse) de forma aleatoria o específica mediante el uso de procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, mediante modificación de la secuencia de ADN o ARN codificante). La biblioteca o población resultante de péptidos derivados puede seleccionarse adicionalmente, mediante cualquier método conocido en la técnica, de acuerdo con requerimientos predeterminados: tal como una especificidad mejorada frente a sitios objetivo en particular; o propiedades mejoradas del fármaco (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, inmunogenicidad, etcétera). Los péptidos seleccionados para exhibir dichas características adicionales o mejoradas y que muestran la actividad para la que se seleccionó el péptido inicialmente son derivados de los péptidos con dedos de zinc de la invención y caen, además, dentro del alcance de la descripción.

#### Moduladores de péptidos con dedos de zinc y efectores

Si bien los péptidos con dedos de zinc de la invención pueden tener propiedades biológicas útiles por separado, pueden recibir, además, funciones biológicas útiles mediante la adición de dominios efectores. Por lo tanto, en algunos casos es conveniente conjugar un péptido con dedos de zinc de la invención con uno o más dominios sin dedos de zinc, y crear de esta forma péptidos con dedos de zinc quiméricos o de fusión. Además, puede ser conveniente, en algunos casos, crear un multímero (por ejemplo, un dímero), de un péptido con dedos de zinc de la invención, por ejemplo, para unir más de una secuencia objetivo simultáneamente.

Por lo tanto, una vez identificado un péptido con dedos de zinc conveniente, entonces se le puede unir, conjugar o fusionar un efector o grupo funcional apropiado al péptido con dedos de zinc. La proteína resultante de la invención, la que comprende al menos una porción de dedos de zinc (de más de un dominio de dedos de zinc) y un dominio, porción o resto efector sin dedos de zinc, puede denominarse como péptido con dedos de zinc de "fusión", "quimérico" o "compuesto". De manera beneficiosa, el péptido con dedos de zinc se enlazará al otro resto a través de sitios que no interfieran con la actividad de ninguno de los restos.

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

5 De manera beneficiosa, los péptidos con dedos de zinc o las proteínas de fusión quiméricas de la invención se usan para regular negativamente o positivamente los genes objetivo deseados, *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, los dominios efectores potenciales incluyen dominios represores transcripcionales, dominios activadores transcripcionales, dominios aisladores transcripcionales, dominios de remodelación, condensación o descondensación de cromatina, dominios de escisión de ácido nucleico o proteína, dominios de dimerización, dominios enzimáticos, secuencias o dominios de señalización/direccionamiento, o cualquier otro dominio biológicamente funcional apropiado. Otros dominios que también pueden adjuntarse a los péptidos con dedos de zinc de la invención (y que tienen funcionalidad biológica) incluyen secuencias peptídicas involucradas en el transporte de proteínas, secuencias de localización (por ejemplo, secuencias de localización subcelular, localización nuclear, direccionamiento de proteínas) o secuencias señal. Los péptidos con dedos de zinc también pueden fusionarse a etiquetas epitopos (por ejemplo, para su uso para señalar la presencia o ubicación de una secuencia de nucleótidos objetivo reconocida por el péptido con dedos de zinc). Además, pueden usarse fragmentos funcionales de cualquier dicho dominio.

20 La expresión de muchos genes se logra también mediante el control del destino del transcrito de ARN asociado. Las moléculas de ARN a menudo contienen sitios para las proteínas de unión al ARN, las que determinan la vida media del ARN y, por lo tanto, los niveles de expresión de proteínas. Por lo tanto, los moduladores de péptidos con dedos de zinc de la invención también pueden controlar la expresión génica al dirigirse específicamente a los transcritos de ARN para aumentar o disminuir su vida media dentro de una célula.

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

35 Otros dominios funcionales útiles para el control de la expresión génica incluyen, por ejemplo, dominios modificadores de proteínas tales como las histonas acetiltransferasas, quinasas, metilasas y fosfatasas, las que pueden silenciar o activar los genes mediante la modificación de la estructura del ADN o de las proteínas que se asocian con los ácidos nucleicos (Wolffe (1996) Science 272: 371-372; y Hassig y otros, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 95: 3519-3524). Los dominios efectores útiles adicionales incluyen aquellos que modifican o reorganizan las moléculas de ácido nucleico tales como las metiltransferasas, endonucleasas, ligasas, recombinasas y los dominios de escisión de ácido nucleico (ver, por ejemplo, Smith y otros (2000) Nucleic Acids Res., 17: 3361-9; documento WO 2007/139982 y referencias citadas en este).

45 Los dominios transcripcionales/de activación génica potenciales para la fusión a los péptidos con dedos de zinc de la invención incluyen el dominio VP64 (ver Seipel y otros, (1996) EMBO J. 11: 4961-4968) y el dominio VP16 del virus del herpes simplex (HSV) (Hagmann y otros (1997) J. Virol. 71: 5952-5962; Sadowski y otros (1988) Nature 335: 563-564); y el dominio de transactivación 1 y/o 2 de la subunidad p65 del factor nuclear- $\kappa$ B (NP $\kappa$ B; Schmitz y otros (1995) J. Biol. Chem. 270: 15576-15584).

50 Un dominio de represión transcripcional preferido es el dominio de caja asociada a Kruppel (KRAB), el cual es un represor poderoso de la actividad génica. En algunas modalidades preferidas, por lo tanto, los péptidos o marcos con dedos de zinc de la invención se fusionan al dominio represor KRAB de la proteína Kox-1 humana para reprimir la actividad de un gen objetivo (por ejemplo, ver Thiesen y otros (1990) New Biologist 2: 363-374). Los fragmentos de la proteína Kox-1 que comprenden el dominio KRAB, hasta y con inclusión de la proteína Kox de longitud completa, pueden usarse como dominios de represión transcripcional, como se describe en Abrink y otros (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 98: 1422-1426. Una secuencia de dominio de Kox-1 útil se muestra en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17). Pueden usarse alternativamente otros dominios represores transcripcionales conocidos en la técnica, tales como el dominio *engrailed*, el dominio *snag*, y el dominio de represión transcripcional de v-*erbA*.

60 Se incorporan todos los métodos conocidos de conjugación de un dominio efector a una secuencia peptídica. El término "conjugado" se usa en su sentido más amplio para abarcar todos los métodos de ligación o unión que se conocen en la técnica, y se usa indistintamente con los términos tales como "enlazado", "unido", "asociado" o "ligado". El(los) dominio(s) efector(es) pueden unirse covalentemente o no covalentemente al dominio de unión: por ejemplo, cuando el dominio efector es un polipéptido, puede enlazarse directamente a un péptido con dedos de zinc (por ejemplo, en el extremo terminal C) mediante una secuencia de aminoácidos flexible o estructurada (enlazador) codificada por la molécula de ácido nucleico correspondiente. En la Tabla 2 (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19) se ilustra una secuencia enlazadora adecuada para unir un dominio efector al extremo C terminal de un péptido con dedos de zinc. Alternativamente, puede usarse un enlazador no aminoacídico o químico sintético, tal como polietilenglicol, un enlace maleimida-tiol (útil para unir

ácidos nucleicos a aminoácidos), o un enlace disulfuro. Los enlazadores sintéticos están disponibles comercialmente, y los métodos de conjugación química se conocen en la técnica.

Pueden formarse enlaces no covalentes entre un péptido con dedos de zinc y un dominio efector mediante el uso, por ejemplo, de dominios de cremallera de leucina/bobina en espiral, u otros dominios de dimerización sintéticos o de origen natural (Luscher & Larsson (1999) *Oncogene* 18: 2955-2966; y Gouldson y otros (2000) *Neuropsychopharm.* 23: S60-S77. Otros medios no covalentes de conjugación pueden incluir un enlace de biotina-(estrept) avidina o similares. En algunos casos, también pueden emplearse adecuadamente las interacciones anticuerpo (o fragmento de anticuerpo)-antígeno, tal como la interacción fluoresceína-antifluoresceína.

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

Cuando la secuencia objetivo es el ADN, las regiones de ADN preferidas desde las cuales se efectúa la regulación negativa o positiva de genes específicos incluyen promotores, potenciadores o regiones de control de locus (LCR). Otras regiones adecuadas dentro de los genomas, las que pueden proporcionar objetivos útiles para los péptidos con dedos de zinc de la invención, incluyen los telómeros y centrómeros. En una modalidad, la secuencia objetivo de ADN genómico comprende una secuencia de repetición de trinucleótidos que comprende al menos 10 de dichas repeticiones. En otra modalidad, la secuencia objetivo de ADN genómico comprende una secuencia de repetición de CAG como la que se encuentra en repeticiones de CAG expandidas de genes mutantes. En aún otra modalidad, la secuencia objetivo de ADN comprende una secuencia de repetición de CTG, la que es el complemento de una secuencia de repetición de CAG expandida.

#### Ácidos nucleicos y expresión de péptidos

Los péptidos con dedos de zinc de acuerdo con la invención y, cuando sea apropiado, el conjugado péptido con dedos de zinc/moléculas efectoras de la invención puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante y procedimientos estándar de expresión y purificación de proteínas. Por lo tanto, la invención proporciona además moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos con dedos de zinc de la invención, así como también sus derivados; y constructos de ácidos nucleicos, tales como vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican péptidos y derivados de acuerdo con la invención.

Por ejemplo, el ADN que codifica el péptido relevante puede insertarse en un vector de expresión adecuado (por ejemplo, pGEM®, Promega Corp., Estados Unidos), donde se une operativamente a las secuencias de expresión apropiadas, y se transforma en una célula hospedadora adecuada para la expresión de proteínas de acuerdo con las técnicas convencionales (Sambrook J. y otros, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Las células hospedadoras adecuadas son aquellas que pueden crecer en cultivo y son susceptibles de transformación con ADN exógeno, lo que incluye bacterias, células fúngicas y células de origen eucariótico superior, preferentemente células de mamíferos.

Para ayudar en la purificación, los péptidos con dedos de zinc (y los ácidos nucleicos correspondientes) de la invención pueden incluir una secuencia de purificación, tal como una etiqueta His. Además, o alternativamente, los péptidos con dedos de zinc pueden, por ejemplo, cultivarse en fusión con otra proteína y purificarse como cuerpos de inclusión insolubles a partir de células bacterianas. Esto es conveniente particularmente cuando el péptido con dedos de zinc o el resto efector puede ser tóxico para la célula hospedadora en la que va a expresarse. Alternativamente, los péptidos de la invención pueden sintetizarse *in vitro* mediante el uso de un sistema de (transcripción y) traducción *in vitro* adecuado (por ejemplo, el sistema del extracto S30, *E. coli*, Promega corp., Estados Unidos).

El término "unida operativamente", cuando se aplica a secuencias de ADN, por ejemplo, en un vector de expresión o constructo, indica que las secuencias se disponen de modo que funcionen cooperativamente para lograr sus propósitos previstos, es decir, una secuencia promotora permite el inicio de la transcripción que procede a través de una secuencia de codificación enlazadora hasta la secuencia de terminación.

Se apreciará que, en dependencia de la aplicación, el péptido con dedos de zinc o la proteína de fusión de la descripción pueden comprender una secuencia o secuencias de péptidos adicionales en el extremo N-terminal y/o C-terminal para facilitar la expresión de proteínas, la clonación y/o la estabilidad del péptido o ARN, sin cambiar la secuencia de ningún dominio de dedos de zinc. Por ejemplo, las secuencias peptídicas líder N-terminales adecuadas son MA, MAERP [SEQ ID NO: 41] o MAERP [SEQ ID NO: 42].

En algunas aplicaciones puede ser conveniente controlar la expresión de polipéptidos con dedos de zinc (fusión) de la invención mediante secuencias promotoras o promotores inducibles específicos de tejido, los que pueden proporcionar los beneficios de la expresión inducible y/o específica de órganos o tejidos de polipéptidos de la invención. Estos sistemas pueden ser particularmente ventajosos para aplicaciones *in vivo* y terapia génica. Los ejemplos de promotores específicos

de tejido incluyen el promotor CD2 humano (para células T y timocitos, Zhumabekov y otros (1995) J. Immunological Methods 185: 133-140); el promotor de la cinasa II dependiente de alfa calcio calmodulina (para células del hipocampo y neocórtex, Tsien y otros (1996) Cell 87: 1327-1338); el promotor de la proteína ácida del suero (glándula mamaria, Wagner y otros (1997) Nucleic Acids Res. 25: 4323-4330); el promotor de la miogenina del ratón (músculo esquelético, Grieshammer y otros (1998) Dev. Biol. 197: 234-247); y muchos otros promotores específicos de tejido que se conocen en la técnica. Para la terapia génica de la enfermedad de Huntington, es conveniente infectar partes particulares del cerebro (el cuerpo estriado). Por lo tanto, los vectores de subtipo AAV2/1 (ver, por ejemplo, Molecular Therapy (2004) 10: 302-317) son ideales para este propósito y pueden usarse con un promotor de AAV fuerte incluido en los vectores.

Los sistemas inducibles adecuados pueden usar la inducción de moléculas pequeñas, tales como los sistemas controlados por tetraciclina (tet-on y tet-off), el promotor del gen-1 de respuesta temprana a crecimiento (EGR1) inducible por radiación, y cualquier otro sistema inducible apropiado conocido en la técnica.

Expresión y caracterización de péptidos con dedos de zinc a partir de bibliotecas

Los péptidos con dedos de zinc que tienen una actividad de unión conveniente pueden seleccionarse mediante el tamizaje de bibliotecas de péptidos a partir de un marco de péptidos con dedos de zinc de la invención. De acuerdo con un aspecto de la descripción, se expresan bibliotecas de ácido nucleico que codifican una pluralidad de péptidos con dedos de zinc, y los péptidos sintetizados se seleccionan inicialmente por su capacidad para unirse a una secuencia objetivo deseada. El tamizaje puede realizarse mediante el uso de cualquier sistema de generación y selección de bibliotecas conocido por los expertos en la técnica, tales como aquellos identificados más abajo.

Un enfoque consiste en producir una población mixta de péptidos candidatos mediante la clonación de una biblioteca de oligonucleótidos aleatorizada en un gen de fago filamentoso Ff, lo que permite que se expresen grandes péptidos en la superficie del bacteriófago (H. Lowman (1997) Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 26: 401-424; y G. Smith y otros (1993) Meth. Enz., 217: 228-257). También se han creado bibliotecas de péptidos aleatorios de hasta 38 aminoácidos de longitud, y pueden lograrse péptidos más largos mediante el uso de este sistema. Las bibliotecas de péptidos que se producen se mezclan después típicamente con una secuencia objetivo de ácido nucleico unida a una matriz seleccionada previamente. Los péptidos que se unen se aíslan, y se determinan sus secuencias. A partir de esta información, se sintetizan nuevos péptidos y pueden evaluarse sus propiedades biológicas.

Una desventaja potencial de los procedimientos anteriores es que el tamaño de las bibliotecas que se generan típicamente con la visualización de fagos y la síntesis química se limita dentro del intervalo de  $10^6$ - $10^9$ . Esta limitación puede resultar en el aislamiento de péptidos de afinidad de unión relativamente baja para el ligando objetivo, a menos que se use subsecuentemente un proceso de maduración que consume mucho tiempo. Esta limitación del tamaño de la biblioteca ha conducido al desarrollo de técnicas para la generación *in vitro* de bibliotecas de péptidos que incluyen: presentación en ARNm (Roberts, y Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 94, 12297-12302); presentación en ribosoma (Mattheakis y otros, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 91, 9022-9026); y presentación CIS (Odegrip y otros, (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 101: 2806-2810) entre otras. Estas bibliotecas pueden ser superiores a las bibliotecas de presentación de fagos (y otros procedimientos basados *in vivo*), en que el tamaño de las bibliotecas generadas puede ser de 2 a 5 órdenes de magnitud más grande de lo que es posible con la presentación en fagos.

Cuando el tamaño de la biblioteca es demasiado grande o la longitud del péptido demasiado larga para una estrategia de tamizaje de biblioteca en particular, los dominios de péptidos con dedos de zinc pueden tamizarse y seleccionarse como parte de subdominios más pequeños (por ejemplo, de 2 o 3 dominios de dedos de zinc adyacentes), y después unirse mediante el uso de enlazadores, tales como la disposición de enlazadores descrita en relación con los péptidos marco de la invención. Alternativamente, las secuencias de ácido nucleico que codifican los residuos de unión a ácido nucleico (por ejemplo, la secuencia de reconocimiento) de cada dominio de dedos de zinc pueden sintetizarse e injertarse o clonarse en la secuencia genética que codifica cada dominio de dedos de zinc del marco.

La afinidad de unión de un péptido con dedos de zinc seleccionado para la secuencia objetivo seleccionada puede medirse mediante el uso de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como resonancia de plasmón de superficie, o interferometría de biocapa. Los enfoques de biosensor se revisan por Rich y otros (2009), "A global benchmark study using affinity-based biosensors", Anal. Biochem., 386:194-216. Alternativamente, los ensayos de unión en tiempo real entre un péptido con dedos de zinc y un sitio objetivo pueden realizarse mediante el uso de interferometría de biocapa con un sistema Octet Red (Fortebio, Menlo Park, CA).

Los péptidos con dedos de zinc de la invención tienen una afinidad de unión  $\mu\text{M}$  o superior para una secuencia de ácido nucleico objetivo. Adecuadamente, un péptido con dedos de zinc de la invención tiene una afinidad de unión nM o sub-nM por su secuencia objetivo específica; por ejemplo,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M, o  $10^{-12}$  M o menos. En algunos ejemplos preferidos particularmente, la afinidad de un péptido con dedos de zinc de la invención por su secuencia objetivo está en el rango pM o más abajo, por ejemplo, en el rango de  $10^{-13}$  M,  $10^{-14}$  M, o  $10^{-15}$  M o menos.

En algunas modalidades de péptidos con dedos de zinc para el direccionamiento a repeticiones de CAG expandidas, el péptido con dedos de zinc tiene una constante de disociación para secuencias de 35 o más repeticiones de CAG que es al menos 2 veces más alta, al menos 5 veces, o al menos 10 veces más alta que para secuencias de menos de 22

repeticiones de CAG. Adecuadamente, la afinidad de dichos péptidos con dedos de zinc de la invención para secuencias de ADN que tienen al menos 63 repeticiones de CAG es al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 20 veces más alta que para secuencias que tienen menos de 22 repeticiones de CAG. En algunas modalidades ventajosas particularmente, la afinidad de dichos péptidos con dedos de zinc por las secuencias de ADN que tienen al menos 104 repeticiones de CAG es al menos 2 veces, al menos 10 veces o al menos 50 veces más alta que para las secuencias que tienen menos de 22 repeticiones de CAG.

Los métodos de tamizaje y selección usados de acuerdo con la descripción pueden aplicarse a la selección de péptidos con dedos de zinc para unirse a cualquier sitio objetivo o secuencia de ácido nucleico deseada; las secuencias de reconocimiento adecuadas particularmente comprenden 18 o más, 36 o más, o 54 o más nucleótidos, los que pueden ser contiguos, o no contiguos, que comprenden preferentemente subsitios de 18 nucleótidos contiguos. Las secuencias objetivo de ácido nucleico adecuadas son aquellas asociadas con trastornos genéticos, particularmente con trastornos neurológicos, y aún más adecuadamente con trastornos asociados con la duplicación, inserción, y expansión de secuencias genómicas, tales como HD.

#### Composiciones terapéuticas

Un péptido con dedos de zinc o un modulador quimérico de la invención puede incorporarse en una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un animal; preferentemente un humano. Un péptido terapéutico de la invención (o un derivado de este) puede usarse para tratar una o más enfermedades o infecciones, en dependencia de que sitio de unión del péptido con dedos de zinc se seleccionó o diseñó para reconocerlo. Alternativamente, un ácido nucleico que codifica el péptido terapéutico puede insertarse en un constructo/vector de expresión e incorporarse en formulaciones farmacéuticas/medicamentos para el mismo propósito.

Los péptidos con dedos de zinc y los moduladores quiméricos de la invención contienen típicamente residuos de aminoácidos de origen natural, pero en algunos casos también pueden presentar residuos de aminoácidos de origen no natural. Por lo tanto, los llamados "miméticos peptídicos" y los "análogos peptídicos", los que pueden incluir estructuras químicas no aminoacídicas que imitan la estructura de un aminoácido o péptido en particular, también pueden usarse dentro del contexto de la invención. Dichos miméticos o análogos se caracterizan generalmente por exhibir características físicas similares tales como tamaño, carga o hidrofobicidad, y la orientación espacial apropiada que se encuentra en sus contrapartes de péptidos naturales. Un ejemplo específico de un compuesto mimético peptídico es un compuesto en el que el enlace amida entre uno o más de los aminoácidos se reemplaza por, por ejemplo, un enlace carbono-carbono u otro enlace diferente de amida, como se conoce bien en la técnica (ver, por ejemplo, Sawyer, en *Peptide Based Drug Design*, págs. 378-422, ACS, Washington D.C. 1995). Dichas modificaciones pueden ser ventajosas particularmente para aumentar la estabilidad de los productos terapéuticos de péptidos con dedos de zinc y/o para mejorar o modificar la solubilidad, la biodisponibilidad y las características de suministro (por ejemplo, para aplicaciones *in vivo*).

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

Los usos y aplicaciones terapéuticos para los péptidos con dedos de zinc y ácidos nucleicos de la descripción incluyen: agentes anti-VEGF para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos neoplásicos y no neoplásicos; cánceres/enfermedades neoplásicas y afecciones relacionadas; afecciones no neoplásicas, tales como trastornos neurológicos, lo que incluye lesión en la cabeza, lesión de la médula espinal, hipertensión aguda, meningitis, encefalitis, malaria cerebral, esclerosis múltiple y encefalopatía; retinopatías diabéticas y otras retinopatías proliferativas; inflamación y afecciones relacionadas con la inflamación. Otros usos terapéuticos para las moléculas y composiciones de la presente descripción incluyen el tratamiento de infecciones microbianas y afecciones asociadas, por ejemplo, infección bacteriana, viral, fúngica o parasitaria. Las enfermedades de expansión de repetición de trinucleótidos son preferidas particularmente y susceptibles a las terapias de la presente invención, por ejemplo: Enfermedad de Huntington (poli-CAG), ataxias espinocerebelosas (poli-CAG), atrofia dentatorubropalidoluisiana (poli-CAG), epilepsia mioclónica juvenil (repeticiones dodecaméricas; poli-CCCCGCCCGCG), ataxia de Friedreich (poli-GAA), síndrome X frágil (poli-CGG), síndrome X-E frágil (poli-CCG), distrofia miotónica (poli-CTG).

Uno o más portadores adicionales aceptables farmacéuticamente (tales como diluyentes, adyuvantes, excipientes o vehículos) pueden combinarse con el péptido terapéutico de la invención en una composición farmacéutica. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "*Remington's Pharmaceutical Sciences*" de E.W. Martin. Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la descripción se formulan para cumplir con los estándares regulatorios y pueden administrarse por vía oral, intravenosa, tópica o por otras vías estándar.

De acuerdo con la invención, el péptido o el ácido nucleico terapéutico pueden fabricarse en medicamentos o pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Cuando se administra a un sujeto, un agente terapéutico se administra

- adecuadamente como un componente de una composición que comprende un vehículo aceptable farmacéuticamente. Las moléculas, compuestos y composiciones de la invención pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intravaginal, transdérmica, rectal, por inhalación, o tópicamente a la piel. La administración puede ser sistémica o local. Los sistemas de suministro que se conocen incluyen además, por ejemplo, la encapsulación en microgeles, liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etcétera, y pueden usarse para administrar los compuestos de la invención. Cualquier otro sistema de suministro adecuado conocido en la técnica también se contempla en el uso de la presente invención.
- Los vehículos aceptables farmacéuticamente pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, lo que incluye aquellos de origen a partir del petróleo, animal, vegetal o sintético tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser solución salina, goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea, y similares. Además, pueden usarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes, y colorantes. Cuando se administran a un sujeto, los vehículos aceptables farmacéuticamente son estériles preferentemente. El agua es un vehículo adecuado cuando el compuesto de la invención se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa y glicerina acuosas pueden emplearse también como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerilo, talco, cloruro de sodio, leche seca descremada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares. La presente composición, si se desea, puede contener, además, cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampones.
- Los medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden tomar la forma de líquidos, soluciones, suspensiones, lociones, geles, tabletas, píldoras, gránulos, polvos, formulaciones de liberación modificada (tales como de liberación lenta o sostenida), supositorios, emulsiones, aerosoles, atomizadores, cápsulas (por ejemplo, cápsulas que contienen líquidos o polvos), liposomas, micropartículas o cualquier otra formulación adecuada conocida en la técnica. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Alfonso R. Gennaro ed., Mack Publishing Co. Easton, Pa., ed. 19, 1995, ver por ejemplo las páginas 1447-1676.
- Adecuadamente, las composiciones o medicamentos terapéuticos de la invención se formulan de acuerdo con procedimientos rutinarios tales como una composición farmacéutica adaptada para la administración oral (más adecuadamente para seres humanos). Las composiciones para el suministro por vía oral pueden estar en forma de comprimidos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes, o elixires, por ejemplo. Por lo tanto, en una modalidad, el vehículo aceptable farmacéuticamente es una cápsula, comprimido o píldora.
- Las composiciones administradas por vía oral pueden contener uno o más agentes, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes saborizantes tales como menta, aceite de gaulteria, o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación palatable farmacéuticamente. Cuando la composición está en forma de un comprimido o píldora, las composiciones pueden recubrirse para retardar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal, para proporcionar una liberación sostenida del agente activo durante un período prolongado de tiempo. Las membranas selectivamente permeables, que rodean el compuesto primario osmóticamente activo también son convenientes para las composiciones que se administran oralmente. En estas formas de dosificación, el fluido del ambiente que rodea la cápsula se embebe por el compuesto primario, el que se hincha para desplazar el agente o la composición del agente a través de una abertura. Estas formas de dosificación pueden proporcionar un perfil de liberación esencialmente de orden cero en oposición a los perfiles en picos de las formulaciones de liberación inmediata. Además, puede usarse un material retardante como el monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo. Las composiciones orales pueden incluir vehículos estándares tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etcétera. Dichos vehículos son preferentemente de grado farmacéutico. Para las formulaciones orales, la localización de la liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno o el íleon) o el intestino grueso. Un experto en la técnica es capaz de preparar formulaciones que no se disolverán en el estómago, pero que liberarán el material en el duodeno o en cualquier otra parte del intestino. Adecuadamente, la liberación evitará los efectos nocivos del entorno estomacal, ya sea mediante la protección del péptido (o derivado) o mediante la liberación del péptido (o derivado) más allá del entorno estomacal, tal como en el intestino. Para garantizar una resistencia gástrica total, sería esencial un recubrimiento impermeable al menos a un pH 5,0.
- Ejemplos de los ingredientes inertes más comunes que se usan como recubrimientos entéricos son el trimelitato de acetato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, ftalato de acetato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ftalato de acetato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S, y Shellac, los que pueden usarse como películas mixtas.
- Para ayudar a la disolución del agente o ácido nucleico (o derivado) terapéutico en el entorno acuoso, puede añadirse un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos, tales como laurilsulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio y dioctil sulfonato de sodio. Podrían usarse detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. Los detergentes no iónicos potenciales que podrían incluirse en la formulación como tensioactivos incluyen: lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 20, 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso y sacarosa,

metil celulosa y carboximetil celulosa. Estos tensioactivos, cuando se usan, podrían presentarse en la formulación del péptido o ácido nucleico o derivado ya sea solo o como una mezcla en relaciones diferentes.

5 Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa comprenden tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede incluir además un agente de solubilización.

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

10 Pueden incluirse aditivos para mejorar la captación celular del péptido (o derivado) o ácido nucleico terapéutico de la invención, tales como los ácidos grasos ácido oleico, ácido linoleico y ácido linoléico.

15 En una composición farmacéutica, un péptido con dedos de zinc o un ácido nucleico de la invención (y opcionalmente cualquier resto sin dedos de zinc asociado, por ejemplo, un modulador de la expresión génica y/o el resto de direccionamiento) puede mezclarse con una población de liposomas (es decir, una vesícula lipídica u otro compartimento encapsulado con membrana artificial), para crear una población terapéutica de liposomas que contienen el agente terapéutico y opcionalmente el resto modulador o efector. La población terapéutica de liposomas puede administrarse a un paciente mediante cualquier medio adecuado, tal como por inyección intravenosa. Cuando sea necesario que la composición de liposomas terapéuticos se dirija específicamente a un tipo de célula en particular, tal como una especie microbiana en particular o una célula infectada o anormal, la composición de liposoma puede formularse adicionalmente con un dominio de anticuerpo apropiado o similar (por ejemplo, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, scFv *etcétera*) o un resto de direccionamiento alternativo, el que reconoce el tipo de célula objetivo. Dichos métodos se conocen por el experto en la técnica.

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

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

30 Terapia génica

Un aspecto de la descripción se refiere a tratamientos de terapia génica que usan péptidos con dedos de zinc de la invención para el tratamiento de enfermedades.

35 La terapia génica consiste en la inserción de genes en las células de un individuo (por ejemplo, animales o humanos) y tejidos biológicos para tratar enfermedades, por ejemplo, mediante el reemplazo de alelos mutantes nocivos por versiones funcionales/corregidas. Las enfermedades objetivo más prometedoras hasta la fecha son aquellas causadas por defectos de un solo gen, tales como la fibrosis quística, la hemofilia, la distrofia muscular, la anemia de células falciformes, y la HD. Otros objetivos comunes de la terapia génica se dirigen al cáncer y las enfermedades hereditarias relacionadas con un defecto genético, tales como las repeticiones de nucleótidos expandidos.

40 La terapia génica se clasifica en dos tipos: la terapia génica de la línea germinal, en la cual las células germinales (es decir, los espermatozoides o los óvulos), se modifican mediante la introducción de genes terapéuticos, que se integran típicamente en el genoma y tienen la capacidad de ser hereditarios (es decir, transmitidos a las generaciones posteriores); y la terapia génica somática, en la que los genes terapéuticos se transfieren a las células somáticas de un paciente, lo que significa que pueden localizarse y que no se heredan por las generaciones futuras.

45 Los tratamientos de terapia génica requieren el suministro del gen terapéutico (o molécula de ADN o ARN) a las células objetivo. Existen dos categorías de sistemas de suministro, ya sea mecanismos de suministro basados en virus o mecanismos no virales, y ambos mecanismos se prevén para su uso con la presente invención.

50 Los sistemas virales pueden basarse en cualquier virus adecuado, tales como: los retrovirus, que portan ARN (por ejemplo, influenza, SIV, HIV, lentivirus, y leucemia murina de Moloney); adenovirus, que portan ADNbc; virus adenoasociados (AAV), que portan ADNmc; virus del herpes simple (HSV), que porta ADNbc; y virus quiméricos (por ejemplo, cuando la envoltura del virus se ha modificado mediante el uso de proteínas de la envoltura de otro virus).

55 Un sistema de suministro viral preferido particularmente es el AAV. El AAV es un virus pequeño de la familia del parvovirus con un genoma de ADN monocatenario. Una característica clave del AAV de tipo salvaje es que casi invariablemente inserta su material genético en un sitio específico en el cromosoma humano 19. Sin embargo, el AAV recombinante, que contiene un gen terapéutico en lugar de sus genes virales normales, puede no integrarse en el genoma animal, y en su lugar puede formar ADN circular episomal, que probablemente sea la causa principal de la expresión génica a largo plazo. Las ventajas de los vectores de terapia génica basados en AAV incluyen: que el virus no es patógeno para los humanos (y ya es portado por la mayoría de las personas); la mayoría de las personas tratadas con AAV no desarrollarán una respuesta inmunitaria para eliminar el virus o las células con las que se han infectado exitosamente; infectará células en división así como también las que no están en división (quiescentes); y se muestra promisorio particularmente para los

tratamientos de terapia génica de músculos, ojos, y cerebro. Hasta la fecha, los vectores de AAV se han usado para ensayos clínicos de primera y segunda fase para el tratamiento de la fibrosis quística; y se han llevado a cabo ensayos clínicos de primera fase para el tratamiento de la hemofilia. Además, se han obtenido resultados alentadores de ensayos clínicos de fase I para la enfermedad de Parkinson, lo que proporciona esperanzas para los tratamientos que requieren el suministro al sistema nervioso central. Además, se han informado ensayos de terapia génica mediante el uso de AAV para el tratamiento de la enfermedad de Canavan, la distrofia muscular y la lipofuscinosis neuronal ceroida infantil tardía. El HSV, que infecta naturalmente las células nerviosas en los seres humanos, también puede ofrecer ventajas para la terapia génica de enfermedades que involucran el sistema nervioso.

Adecuadamente, de acuerdo con la descripción, los constructos de ácido nucleico que codifican dedos de zinc (como se describió en otra parte en la presente descripción) se insertan en un vector de virus adenoasociado (AAV), particularmente el subtipo AAV2/1 (ver, por ejemplo, *Molecular Therapy* (2004) 10: 302-317). Este vector es adecuado particularmente para la inyección y la infección del cuerpo estriado, en el cerebro, donde los efectos nocivos de la agregación de Htt mutante tienen más prevalencia en la HD. De esta manera, los constructos de ácido nucleico que codifican dedos de zinc de la invención pueden suministrarse a las células objetivo deseadas, y los péptidos con dedos de zinc se expresan para reprimir la expresión de genes *htt* mutantes.

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

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

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

#### Enfermedad de Huntington (HD) y terapias

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

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

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

Por lo tanto, aún existe una clara necesidad en la técnica de terapias eficaces para inhibir la expresión de la proteína Htt mutante, a la vez que se deja la expresión del alelo de tipo salvaje en gran medida sin afectación.

En consecuencia, en este trabajo, los inventores diseñaron racionalmente péptidos con dedos de zinc para ser capaces de reconocer y unir secuencias de poli- 5' -GC(A/T) -3', de manera que reconocerían tanto poli-CAG como su cadena de ADN complementaria, poli-CTG. Los péptidos con dedos de zinc beneficiosos de la invención fueron capaces de reprimir un gen objetivo con secuencias de repetición de CAG expandidas sobre preferentemente las secuencias de repetición más cortas en ensayos informadores de transfección transitoria. Mediante el uso de una línea celular modelo para HD, los inventores lograron una expresión estable de péptidos con dedos de zinc, lo que redujo, además, la expresión del gen *htt* mutante cromosómico (que tiene 111 repeticiones de CAG). La represión de la expresión génica se demostró tanto en la proteína como en los niveles de ARN. Se demostró que la represión de los genes mutantes que fueron objetivo persiste durante períodos prolongados (por ejemplo, durante 20 días), y se encontró que la expresión de los genes que tienen secuencias de repetición de CAG genómicas más cortas permanece inalterada ampliamente. De esta forma, los péptidos con dedos de zinc de la invención se dirigen a las repeticiones de CAG expandidas asociadas con el gen *htt* mutante en preferencia a las repeticiones de CAG normales asociadas con el gen *htt* de tipo salvaje. Por lo tanto, los péptidos con dedos de zinc de la invención son represores eficientes y selectivos de genes con regiones de CAG largas.

Igualmente, los péptidos con dedos de zinc de la invención son adecuados para el direccionamiento y la modulación de genes que contienen secuencias repetidas largas (particularmente, repeticiones de trinucleótidos) asociadas con genes distintos de *htt*, como se ha indicado anteriormente.

La invención se ilustrará ahora aún más por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

## EJEMPLOS

A menos que se indique de cualquier otra manera, se usaron reactivos disponibles comercialmente y técnicas estándar en biología molecular y bioquímica.

### Materiales y Métodos

Los procedimientos siguientes usados por el solicitante se describen en Sambrook, J. y *otros* 1989 *citado más arriba*: análisis de productos de digestión con enzimas de restricción sobre geles de agarosa y preparación de solución salina tamponada con fosfato. Los reactivos de propósito general, oligonucleótidos, productos químicos y solventes se adquirieron de Sigma-Aldrich Química SA (Madrid, España). Las enzimas y las polimerasas se obtuvieron de New England Biolabs (NEB Inc.; c/o IZASA, S.A. Barcelona, España).

### Construcción de vectores y péptidos con dedos de zinc (ZFP)

Para crear un marco de péptido con dedos de zinc (ZFP) que reconozca tanto las secuencias de ADN de GCA como de GCT (que se encuentran dentro de las repeticiones de CAG expandidas), se seleccionó un andamio de dedos de zinc basado en la secuencia de cadena principal de tipo salvaje de la región de dedos de zinc de zif268 tipo salvaje. Los residuos de aminoácidos responsables del reconocimiento del ADN objetivo (es decir, la "secuencia de reconocimiento", la que corresponde esencialmente a la región de  $\alpha$ -hélice del marco) se diseñaron y se tuvo en consideración dos estudios informados previamente: (1) Choo y *otros* (1994) *Nature* 372(6507): 642-645, ZFP diseñadas con las secuencias de reconocimiento  $\alpha$ -hélice siguientes (residuos -1 a 6), QAATLQR para la unión al triplete GCA, y QAQTLQR [SEQ ID NO: 44] para la unión al triplete GCT; y (2) Isalan y *otros* (1998) *Biochemistry* 37(35): 12026-12033, informaron que la secuencia QRASRKR [SEQ ID NO: 46] fue capaz de reconocer tripletes GN(T/A). Estas secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -hélice se combinaron para generar una secuencia híbrida de  $\alpha$ -hélice nueva, QRATLQR (SEQ ID NO: 1), que comprende las posiciones -1, 1 y 2 de Isalan y *otros* y los residuos 3, 4, 5 y 6 de Choo y *otros*. Se esperaba que el dominio de dedos de zinc resultante se uniera a la secuencia GC(T/A), y se denominó ZFxHunt (Fig. 1C). Se sintetizó un vector pUC57 que contiene 6 de dichos dominios de dedos de zinc, denominado ZF6xHunt (Genscript Corporation (Piscataway, NJ)). Además, este vector incluyó un promotor T7, un NLS N-terminal (PKKKRKV [SEQ ID NO: 40]) y sitios de restricción para derivar péptidos con 4 (ZF4), 11 (ZF11), 12 (ZF12) y 18 (ZF18) dedos de zinc en matrices en tándem mediante subclonación (ver la Tabla 1 para las secuencias de dedos de zinc; SEQ ID NO: 6 a 15). Por ejemplo, para clonar el ZF4 pUC57, el vector ZF6 pUC57 se cortó con *Eag*1 y se volvió a ligar (péptido con dedos de zinc SEQ ID NO: 6). Para clonar ZF12, se digirió ZF6 pUC con *Spe*1, y un fragmento de PCR que contiene ZF6 (con enlazadores *Spe*1) se clonó en el sitio *Spe*1 (péptido con dedos de zinc, SEQ ID NO: 12). Se añadió un sitio *Kpn*1 para propósitos de clonación futuros (fragmento de PCR: "Spe1-Kpn1-ZF6-Spe1"). El ZF11 se derivó de ZF12 mediante la delección del dedo N-terminal por recombinación homóloga (péptido con dedos de zinc, SEQ ID NO: 10). El ZF18 se construyó con una estrategia de clonación por PCR similar a la de ZF12, lo que resultó en enlazadores ligeramente más cortos (péptido con dedos de zinc, SEQ ID NO: 14).

Los péptidos con dedos de zinc se subclonaron después en el vector de expresión de mamíferos pTarget (Promega). Se introdujo una secuencia etiqueta 3xFLAG (DYKDHDG DYKDHDY DYKDDDDK [SEQ ID NO: 47]) mediante PCR en el extremo N-terminal, y se introdujeron en el extremo C-terminal ya sea las secuencias codificantes de Kox-1 (dominio de represión KRAB) o el dominio de endonucleasa FokI, con un enlazador 3xGGGGS [SEQ ID NO: 48] entre el péptido con dedos de zinc y el dominio efector.

La serie de vectores pEH se clonó en dos etapas. Primero, la región codificante de EGFP se escindió de pEGFP-N1 (Clontech), mediante el uso de *Hind*III/*Xba*I, y se clonó en pGL4.13 (Promega) para dar pSV40-EGFP. Después, un

producto de PCR que contenía enlazadores CMV-HcRed-poliA y *ClaI* se clonó en pSV40-EGFP (digerido parcialmente con *ClaI*). El codón de inicio EGFP se mutó a alanina por mutagénesis dirigida al sitio, y los fragmentos de PCR que contenían el exón I de *Htt* humano de plantillas genómicas humanas diferentes (para obtener números de repeticiones de CAG diferentes), se clonaron en el sitio *EcoRI* de pEH, aguas arriba y en marco con EGFP (serie pEH-Q). Las series de vectores pSV40-mCherry se generaron mediante el reemplazo del EGFP de las series de vectores pSV40-EGFP con mCherry mediante el uso de los sitios *XmaI/XbaI*.

#### Ensayos de retardo en gel in vitro

Primero, se usaron los cebadores pUC57-ZFxFunt, M13fwd y M13rev (M13directo, GTAAAACGACGGCCAG; M13inverso, CAGGAAACAGCTATGAC; ver Tabla 3), para generar productos de PCR para la expresión *in vitro* del ZFP, mediante el uso del kit de ADN de PCR Quick TNT T7 (Promega). Las sondas de ADN bicatenario con diferentes números de repeticiones de CAG basadas en la secuencia estándar: 5'- ACG TAC (CAG)<sub>n</sub> TCA CAG TCA GTC CAC ACG TC -3' [SEQ ID NO: 49] se produjeron mediante relleno Klenow. Se usaron 100 ng de ADN bicatenario en una reacción de marcaje con DIG mediante el uso del kit Gel Shift, 2<sup>da</sup> generación (Roche), y se siguieron las instrucciones del fabricante. Para los ensayos de retardo en gel, se incubaron 0,005 pmol de la sonda marcada con DIG con cantidades crecientes de proteína expresada en TNT en una reacción de 20 µl que contenía 0,1 mg/ml de BSA, 0,1 µg/ml de polidil:dC, glicerol al 5 %, propano Bis-Tris 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 50 mg/ml de ZnCl<sub>2</sub>, NonidetP40 al 0,1 % y TDT 5 mM durante 1 hora a 25 °C. Las reacciones de unión se separaron en un gel de acrilamida no desnaturalizante al 7 % durante 1 hora a 100 V, se transfirieron a una membrana de nailon durante 30 minutos a 400 mA y se realizó la visualización de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Cultivo celular y suministro de genes

La línea celular HEK-293T (ATCC) se cultivó en CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C en DMEM (Gibco) suplementado con FBS al 10 % (Gibco). El ADN purificado de Qiagen se transfectó en células mediante el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se colocaron en placas de 10 mm a una densidad del 50 % y se mezclaron y se añadieron a las células 70 ng del plásmido indicador, 330 ng del plásmido de expresión de ZFP y 2 µl de Lipofectamina 2000. Las células se cosecharon para su análisis 48 horas después.

Se cultivaron células STHdh+ / Hdh+ y STHdhQ111/Hdh111 (donación de M.E. MacDonald) en CO<sub>2</sub> al 5 % a 33 °C en DMEM suplementado con FBS al 10 % (Gibco) y 400 µg/ml de G418 (PAA). Las células se infectaron con partículas retrovirales mediante el uso del sistema pRetroX (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### 35 Análisis de citometría de flujo

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

#### 40 Transferencia de Western

Las células 293T se cosecharon 48 horas después de la transfección en 100 µl de colorante de carga 2xSDS con inhibidor de proteasa Complete (Roche). Se separaron 20 µl de muestra en geles listos Tris-HCl Criterion al 4-15 % (BioRad) durante 2 horas a 100 V, se transfirieron a una membrana Hybond-C (GE Healthcare) durante 1 hora a 100 V. Las proteínas se detectaron ya sea con el anticuerpo primario anti β-actina (Sigma A1978) a una dilución de 1:3.000 o con anti-EGFP (Roche) a una dilución de 1:1.500 y con un anticuerpo secundario anti-ratón de burro conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1:10.000. La visualización se realizó con el sistema ECL (GE Healthcare) mediante el uso de un sistema de formación de imágenes LAS-3000 (Fujifilm). Las células STHdh se tripsinizaron y se cosecharon en PBS que contenía inhibidor de proteasa Complete (Roche). Las células se resuspendieron en tampón RIPA (TritonX-100 al 1 %, desoxicolato de sodio al 1 %, Tris-HCl 40 mM, NaCl 150 mM, SDS al 0,2 %, Complete), se incubaron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína mediante el uso de un ensayo de proteínas D<sub>c</sub> de BioRad. Se separaron 60 µg de proteína en un gel listo Tris-HCl Criterion al 5 % (BioRad) durante 2 horas a 100 V, se transfirieron mediante el uso de iBlot Dry Blotting System (Invitrogen) durante 8 minutos y se detectó proteína Htt endógena con anticuerpo primario anti-huntingtina (Millipore MAB2166) a una dilución 1:1.000.

#### qRT-PCR

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

#### Ejemplo 1

65 Diseño de matrices de péptidos con dedos de zinc (ZFP) para unirse a repeticiones de CAG

Se conoce que los dominios de dedos de zinc pueden concatenarse para formar cadenas de múltiples dedos (por ejemplo, 6 dedos) (Moore y otros (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 98(4): 1437-1441; y Kim y Pabo (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 95(6): 2812-2817), pero hasta la fecha, no se ha informado una exploración sistemática de los modos de unión de ZFP de longitudes diferentes a regiones de ADN repetitivas largas.

5 Los inventores, por lo tanto, usaron un diseño racional para construir un dominio de dedos de zinc (ZF<sub>x</sub>Hunt) que se uniría a la secuencia 5'- GC(A/T) -3' en el ADN bicatenario. Por lo tanto, se esperaba que las proteínas poli-dedos que comprendían matrices de ZfxHunt se unieran a las secuencias de poli-GCA y poli-GCT (ver Materiales y Métodos más arriba y la Figura 1). Ambas cadenas de ADN de la repetición bicatenaria de CAG se tomaron como objetivo porque: (i) se pensó que esto aumentaría la avidéz de los péptidos con dedos de zinc por objetivos cromosómicos de baja copia; y (ii) permitió probar los diseños de fusión de nucleasa Fok-I (como se describe más abajo). Para intentar evitar que los péptidos con dedos de zinc perdieran su registro con el ADN relacionado (después de 3 o más dedos adyacentes y 9 pares de bases contiguas de ADN de doble hélice), las secuencias enlazadoras se diseñaron cuidadosamente. En particular, se moduló la longitud de los enlazadores entre los dedos de zinc adyacentes en las matrices. De esta manera, podría optimizarse el registro entre las matrices más largas de péptidos con dedos de zinc, especialmente en la unión al ADN<sub>bc</sub>. Mediante el uso de consideraciones estructurales, se decidió modificar periódicamente las secuencias enlazadoras canónicas estándar en las matrices. Por lo tanto, se incluyeron secuencias enlazadoras similares a canónicas que contienen un residuo extra Gly (o Ser) o secuencias enlazadoras flexibles (hasta 29 residuos) en la matriz de dedos de zinc larga después de cada 2 y 6 dedos, respectivamente (ver la Tabla 1 y las SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 y 14). De esta manera, podrían probarse diferentes números de dedos de zinc para determinar la discriminación óptima dependiente de la longitud.

25 Tabla 1: Aminoácidos del marco de péptido con dedos de zinc y secuencias de ácidos nucleicos codificantes. En las secuencias de aminoácidos, las secuencias de reconocimiento se subrayan y las secuencias enlazadoras se muestran en negrita.

<p><u>Secuencia de aminoácidos de ZF4xHunt (SEQ ID NO: 6):</u></p>
<p>FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH <b>TGEKP</b>                  FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH <b>TGSERP</b>                  FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH <b>TGEKP</b>                  FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH</p>
<p><u>Secuencia de ácido nucleico de ZF4xHunt (SEQ ID NO: 7):</u></p>
<p>TTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGGACCCATGCAGCGTCATATTCGCAC                  CCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTGCTAAATTTGCGCAGCGTGCGACCC                  TGCAGCGCCATACCAAAATTCACACCGGATCCGAACGCGCGTTTCAGTGCAGGATTTGCATGCGT                  AATTTTCCCAGCGCGGACCCATGCAGCGCCATATTCGCACCCATACTGGTGAAAAACCGTTTGC                  CTGCGATATTTGCGGTGCTAAATTTGCGCAGCGTGCTACCTTACAGCGCCATACCAAAATTCAT</p>
<p><u>Secuencia de aminoácidos de ZF6xHunt (SEQ ID NO: 8):</u></p>
<p>FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH <b>TGEKP</b>                  FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH <b>TGSERP</b>                  FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH <b>TGEKP</b>                  FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH <b>TGSERP</b></p>
<p>FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH <b>TGEKP</b>                  FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH</p>

(continuación)

<b>Secuencia de ácido nucleico de ZF6xHunt (SEQ ID NO: 9):</b>	
<p>TTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGCGACCCCTGCAGCGTCATATTCGCAC                  CCATACCGGTGAAAAACCGTTTTCGCGTGCATATTTGCGGTTCGTAATTTGCGCAGCGTGCACCC                  TGCAGCGCCATACCAAAATTCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGT                  AATTTTAGCCAGCGTGCAGCCCTGCAGCGCCATATTCGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGC                  CTGCGATATTTGTGGCCGTAATTTGCCAGCGCGCGACCCCTGCAGCGCCATACCAAAATTCATA                  CCGGTTCTGAACGGCCGTTTCAGTGCAGGATTTGCATGCGTAATTTTTCCAGCGCGCGACCCCTG                  CAGCGCCATATTCGCACCCATACTGGTAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTTCGTAATTT                  TGCGCAGCGTGCTACCTTACAGCGCCATACCAAAATTCAT</p>	
<b>Secuencia de aminoácidos de ZF11xHunt (SEQ ID NO: 10):</b>	
FQCRICMRNFSQRATLQRHTKIH	<b>TGSERP</b>
FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH	<b>TGEKP</b>
FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH	<b>TGSERP</b>
FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH	<b>TGEKP</b>
FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH	<b>LRQKDGSGSGSGSGSGSGSQLVGT AERP</b>
FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH	<b>TGEKP</b>
FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH	<b>TGSERP</b>
FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH	<b>TGEKP</b>
FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH	<b>TGSERP</b>
FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH	<b>TGEKP</b>
FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH	
<b>Secuencia de ácido nucleico de ZF11xHunt (SEQ ID NO: 11):</b>	
<p>TTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGCGACCCCTGCAGCGCCATACCAAAAT                  TCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGTAATTTAGCCAGCGTGCGA                  CCCTGCAGCGCCATATTCGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGTGGCCGT                  AAATTTGCCAGCGCGCGACCCCTGCAGCGCCATACCAAAATTCATACCGGTTCTGAACGGCCGTT                  TCAGTGCAGGATTTGCATGCGTAATTTTTCCAGCGCGCGACCCCTGCAGCGCCATATTCGCACCC                  ATACTGGTAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTTCGTAATTTGCGCAGCGTGCTACCTTA                  CAGCGCCATACCAAAATTCATCTGCGCCAGAAAGATGGTGGCGGGGCTCAGGTGGCGGGCGGTAG                  TGGTGGCGGGGCTCACAACCTAGTCGGTACCGCCGAGCGCCCTTCCAGTGCCGCATTTGTATGC                  GCAACTTTAGCCAGCGCGCGACCCCTGCAGCGTCATATTCGCACCCATACCGGTGAAAAACCGTTT                  GCGTGCGATATTTGCGGTTCGTAATTTGCGCAGCGTGCAGCCCTGCAGCGCCATACCAAAATTC                  CACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCCTATTTGCATGCGTAATTTAGCCAGCGTGCACCC                  TGCAGCGCCATATTCGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGTGGCCGTAAA                  TTTGCCAGCGCGCGACCCCTGCAGCGCCATACCAAAATTCATACCGGTTCTGAACGGCCGTTTCA                  GTGCAGGATTTGCATGCGTAATTTTTCCAGCGCGCGACCCCTGCAGCGCCATATTCGCACCCATA                  CTGGTAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTTCGTAATTTGCGCAGCGTGCTACCTTACAG                  CGCCATACCAAAATTCAT</p>	
<b>Secuencia de aminoácidos de ZF12xHunt (SEQ ID NO: 12):</b>	
FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH	<b>TGEKP</b>
FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH	<b>TGSERP</b>
FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH	<b>TGEKP</b>
FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH	<b>TGSERP</b>
FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH	<b>TGEKP</b>
FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH	<b>LRQKDGSGSGSGSGSGSQLVGT AERP</b>
FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH	<b>TGEKP</b>
FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH	<b>TGSERP</b>

(continuación)

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

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

TTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGTCATATTCGCAC  
 CCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCGACCC  
 TGCAGCGCCATACCAAAATTCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGT  
 AATTTTAGCCAGCGTGCGACCCCTGCAGCGCCATATTCGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGC  
 CTGCGATATTTGTGGCCGTAAATTTGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATACCAAAATTCATA  
 CCGGTTCTGAACGGCCGTTTCAGTGCGAGGATTTGCATGCGTAATTTTCCAGCGCGGACCCTG  
 CAGCGCCATATTCGCACCCATACTGGTAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTCGTAAATT  
 TGCGCAGCGTGCTACCTTACAGCGCCATACCAAAATTCATCTGCGCCAGAAAGATGGTGGCGGG  
 GCTCAGGTGGCGGGGCTAGTGGTGGCGGGGCTCACAAGTGGTACCGCCGAGCGCCCTTC  
 CAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGTCATATTCGCACCCA  
 TACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCGACCCCTGC  
 AGCGCCATACCAAAATTCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGTAAT  
 TTTAGCCAGCGTGCGACCCCTGCAGCGCCATATTCGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTG  
 CGATATTTGTGGCCGTAAATTTGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATACCAAAATTCATACCC  
 GTTCTGAACGGCCGTTTCAGTGCGAGGATTTGCATGCGTAATTTTCCAGCGCGGACCCTGCAG  
 CGCCATATTCGCACCCATACTGGTAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTCGTAAATTTGC  
 GCGCGTGCTACCTTACAGCGCCATACCAAAATTCAT

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

FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**  
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**  
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**  
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**  
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**  
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **LRQKDGGSQVLVGT AERP**  
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**  
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**  
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**  
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**  
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**  
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **LRQKDGGSQVGT AERP**  
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**  
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**  
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**  
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH **TGSERP**  
 FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTH **TGEKP**  
 FACDICGRKFAQRATLQRHTKIH

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

TTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGTCATATTCGCAC  
 CCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCGACCC  
 TGCAGCGCCATACCAAAATTCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGT  
 AATTTTAGCCAGCGTGCGACCCCTGCAGCGCCATATTCGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGC  
 CTGCGATATTTGTGGCCGTAAATTTGCCAGCGCGGACCCTGCAGCGCCATACCAAAATTCATA  
 CCGGTTCTGAACGGCCGTTTCAGTGCGAGGATTTGCATGCGTAATTTTCCAGCGCGGACCCTG  
 CAGCGCCATATTCGCACCCATACTGGTAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTCGTAAATT  
 TGCGCAGCGTGCTACCTTACAGCGCCATACCAAAATTCATCTGCGCCAGAAAGATGGTGGCGGGCT

(continuación)

5  
10  
15  
20

```

CACAACTAGTCGGTACCGCCGAGCGCCCTTCCAGTGCCGCATTTGTATGCGCAACTTTAGCCAG
CGCGCGACCCTGCAGCGTCATATTCGCACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTTCGCGTGGCAGATTTG
CGGTCGTAAATTTGCGCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCATACCAAAATTCACACCGGATCCGAAC
GGCCGTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGTAATTTTAGCCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCATATT
CGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGTGGCCGTAATTTGCCAGCGCGC
GACCCTGCAGCGCCATACCAAAATTCATACCGGTTCTGAACGGCCGTTTCAGTGCAGGATTTGCA
TGCGTAATTTTCCCAGCGCGGACCCCTGCAGCGCCATATTCGCACCCATACTGGTAAAAACCG
TTTGCCTGCGATATTTGCGGTTCGTAATTTGCGCAGCGTGCTACCTTACAGCGCCATACCAAAAT
TCATCTGCGCCAGAAAGATGGTGGCGGctcaggtaccGCCGAGCGCCCTTCCAGTGCCGCATTT
GTATGCGCAACTTTAGCCAGCGCGGACCCCTGCAGCGTCATATTCGCACCCATACCGGTGAAAA
CCGTTTTCGCGTGGCAGATATTTGCGGTTCGTAATTTGCGCAGCGTGCAGACCCTGCAGCGCCATACCA
AATTCACACCGGATCCGAACGGCCGTTTTCAGTGCCGTATTTGCATGCGTAATTTTAGCCAGCGTG
CGACCCTGCAGCGCCATATTCGTACCCATACCGGTGAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGTGGC
CGTAAATTTGCCAGCGCGGACCCCTGCAGCGCCATACCAAAATTCATACCGGTTCTGAACGGCC
GTTTTCAGTGCAGGATTTGCATGCGTAATTTTCCCAGCGCGGACCCCTGCAGCGCCATATTCGCA
CCCATACTGGTAAAAACCGTTTGCCTGCGATATTTGCGGTTCGTAATTTGCGCAGCGTGTACC
TTACAGCGCCATACCAAAATTCAT

```

## 25 Ejemplo 2

Unión de péptidos con dedos de zinc a secuencias de ADN objetivo *in vitro*

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

35 Se construyeron matrices de péptidos con dedos de zinc que contenían 4, 6 o 12 dominios ZFxHunt y se probaron en ensayos de retardo en gel, para determinar su unión a sondas CAG bicatenarias (Figura 1B). Estos resultados muestran que los ZFP más largos produjeron una unión más completa de la sonda. Curiosamente, se observaron complejos unidos distintos en el retardo en gel, lo que indica que los ZFP encontraron un equilibrio termodinámico único y no se atraparon por los intermediarios cinéticos. Podría esperarse que las secuencias de ADN y de dedos de zinc altamente repetitivas formaran eventos de unión parcial contiguos, lo que se esperaba que produjera manchas extensas en el retardo en gel; pero este no fue el caso. Notablemente, el ZFP de 12 dedos produjo un retardo secundario inferior, lo que presumiblemente se debe a un subproducto de degradación de 6 dedos (los dedos de zinc pueden ser inestables en las regiones enlazadoras; Miller y otros (1985) EMBO J. 4(6): 1609-1614). Se cree que los constructos de 12 dedos y subsecuentemente de 18 dedos (ver más abajo) descritos en la presente son las cadenas de ZFP artificiales funcionales más largas jamás construidas.

45 Para probar si los dominios de dedos de zinc ZFxHunt fueron capaces de unirse a ambas cadenas de una sonda de ADN con repetición de CAG, se ensayó el ZF6xHunt (es decir, el péptido de 6 dedos) mediante retardo en gel, y se mostró que se unía por igual tanto a una sonda repetitiva de CAG, (GCA)<sub>6</sub>, como a una sonda CAG-CTG alternada, (GCA-GCT)<sub>3</sub>, como se muestra en la Figura 1C. Además, cuando se comparó con las secuencias mutadas, ZF6xHunt mostró especificidad por la secuencia (CAG)<sub>37</sub> (ver Figura 1D).

50 En resumen, se sintetizaron ZFP de 4, 6 y 12 dedos y se demostraron capaces de unir las sondas de ADN poli 5'-GC(A/T)<sub>3</sub> *in vitro*; y se demostró que los ZFP más largos se unen de forma más específica y eficiente a sus secuencias objetivo.

## Ejemplo 3

55 Represión de genes indicadores poliQ *in vivo*

60 La actividad intracelular del dominio de dedos de zinc ZFxHunt se probó *in vivo* mediante el uso de vectores indicadores con diferentes números de repeticiones de CAG 5' en marco con EGFP (Q0, Q10, Q35 y Q104; donde Q = CAG y el número indica el número de repeticiones). Para evaluar si hubo algún efecto no específico causado por las proteínas con dedos de zinc, se clonó un indicador HcRed en una región diferente del mismo vector, bajo un promotor independiente (Figura 2A).

65 Las células HEK293T se transfectaron conjuntamente de forma transitoria con los vectores indicadores y ZFxHunt indicados, en los que la expresión de los dedos de zinc se dirigió por los promotores de CMV. Se llevaron a cabo tres conjuntos de ensayos: cuantificación de células fluorescentes con EGFP y HcRed mediante el uso de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS); los niveles de proteína EGFP en transferencias de Western; y los niveles de

ARNm de EGFP y HcRed en qRT-PCR (Figura 2B-D). Mientras que las repeticiones de CAG más cortas (Q0, Q10) no se afectaron esencialmente por cualquiera de ZF4, ZF6, ZF11 o ZF18xHunt, los objetivos de repetición de CAG más largos (Q35, Q104) se reprimieron fuertemente en los tres ensayos, por ejemplo, hasta una represión de 10 veces de EGFP por FACS, lo que equivale a una reducción del 90 % (Figura 2B).

Además, se encontró que las cadenas de dedos de zinc más largas produjeron una mayor represión de la expresión del gen objetivo como se determinó en qRT-PCR (Figura 2D). Se encontró que la proteína con 6 dedos, ZF6xHunt, fue óptima en FACS (Figura 2B) y en transferencias de Western (Figura 2C).

Para probar el potencial de una represión aún más fuerte, el dominio de represión KRAB Kox-1 (Gröner y otros PLoS Genet 6(3): e1000869) se fusionó al extremo C-terminal de las proteínas ZFxHunt (Figuras 2E-G; Tabla 2). Como se esperaba, la represión por Kox-1 fue en efecto más fuerte. Por ejemplo, hubo una reducción de hasta el 98 % de las células verdes por FACS para Q35- y Q104-EGFP, con niveles indetectables de proteína EGFP por análisis de transferencia de Western (Figura 2F). Aunque la represión fue generalmente más fuerte, aún fue proporcional a ZFP y la longitud de CAG: por ejemplo, el constructo EGFP que carece de repeticiones de CAG no se reprimió, y los constructos que tienen repeticiones de CAG más largas (por ejemplo, Q35) se reprimieron con más fuerza que los constructos con repeticiones más cortas (por ejemplo, Q10-EGFP). En este ensayo, se encontró que la proteína ZF11xHunt-Kox-1 proporciona el nivel más fuerte de represión, como se muestra en las Figuras 2E y G. Esto demuestra que, con diseños de enlazador adecuados, las cadenas largas que contienen números impares de dedos de zinc también pueden funcionar. Además, se demuestra que el mecanismo de la represión de HcRed mediado por Kox-1 depende de la presencia de repeticiones largas de CAG en el plásmido. El nivel no deseado de represión del gen vecino con las proteínas Kox-1 puede deberse a los efectos de largo alcance de Kox-1 en la estructura de la cromatina.

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

Para verificar que estos resultados no fueron puramente específicos para los ZFP bajo el control del promotor de CMV, también se llevaron a cabo pruebas equivalentes con ZFP que se expresaron bajo el control del promotor de fosfoglicerato cinasa (PGK). Como se ilustra en la Figura 4, se obtuvieron esencialmente los mismos resultados para los constructos de péptidos con dedos de zinc desnudos.

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

En resumen, en ensayos de transfección transitoria, las proteínas ZFxHunt desnudas reprimieron específicamente la expresión de un gen indicador que contiene 35 o más repeticiones de CAG. Las proteínas ZFxHunt fusionadas con el dominio Kox-1 tuvieron un efecto represivo más fuerte, y redujeron la expresión de todos los genes indicadores que contienen CAG, y los constructos más largos también tienen un efecto menor en un gen indicador control vecino.

Tabla 2: Secuencia peptídica y del ácido nucleico codificante del dominio Kox-1, y secuencia peptídica y del ácido nucleico codificante del enlazador dominio efector-dedos de zinc.

50	<u>Secuencia de aminoácidos del dominio Kox-1 (SEQ ID NO: 16):</u>
	SSLSPQHSVAVTQGSIIKNKEGMDAKSLTAWSRTRLVTFKDVFDFTREEWKLLDQAQQIVYRNVML ENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV
55	<u>Secuencia de ácido nucleico del dominio Kox-1 (SEQ ID NO: 17):</u>
60	TCTAGTTTGTCTCCTCAGCACTCTGCTGTCCTCAAGGAAGTATCATCAAGAACAAGGAGGGCAT GGATGCTAAGTCACTAAGTGCCTGGTCCCGGACACTGGTGACCTTCAAGGATGTATTTGTGGACT TCACCAGGGAGGAGTGAAGCTGCTGGACACTGCTCAGCAGATCGTGTACAGAAATGTGATGCTG GAGAACTATAAGAACCCTGGTTTCCTTGGGTTATCAGCTTACTAAGCCAGATGTGATCCTCCGGTT GGAGAAGGGAGAAGAGCCCTGGCTGGTGGAGAGAGAAATTCACCAAGAGACCCATCCTGATTACG AGACTGCATTTGAAATCAAATCATCAGTT

65

(continuación)

5	Secuencia peptídica del dominio efector-dedos de zinc (SEQ ID NO: 18):
	LRQKDGGGGSGGGGGSGGGGSQLV
	Secuencia de ácido nucleico del dominio efector-dedos de zinc (SEQ ID NO: 19):
10	CTGCGCCAGAAAGATGGTGGCGGCGGCTCAGGTGGCGGCGGTAGTGGTGGCGGCGGCTCACAAC AGTC

15

## Ejemplo 4

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

20

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

25

La expresión relativa de los dos indicadores se midió mediante FACS (células positivas a EGFP o mCherry), y los resultados se muestran en la Figura 5. En la fila superior, los cuadros de color gris claro representan niveles altos de expresión de la proteína GFP, mientras que los cuadros de color gris oscuro representan niveles bajos de expresión de la proteína GFP; en la fila central, los cuadros de color gris claro representan niveles altos de expresión de la proteína mCherry, mientras que los cuadros de color gris oscuro representan niveles bajos de expresión de la proteína mCherry; y en la fila inferior, los cuadros claros (grises) representan niveles más altos de expresión de la proteína GFP en comparación con la mCherry, los cuadros grises oscuros representan niveles más altos de expresión de la proteína mCherry en comparación con la GFP. Los resultados demuestran que las repeticiones de CAG más largas son tomadas como objetivo y reprimidas preferencialmente por todos los péptidos ZfxHunt, por lo que esas células se dominan por la expresión de los constructos verdes o rojos más cortos cuando el número de secuencias de repetición de CAG de su contraparte opuesta es mayor. Esto se ve directamente mediante la observación de la relación de la expresión de verde con respecto a rojo en la fila inferior, en la que la esquina superior derecha de cada cuadrícula es de un color más claro, lo que indica niveles de expresión más altos de GFP; y la esquina inferior izquierda de cada cuadrícula es de un color más oscuro, lo que indica niveles de expresión más altos de mCherry. Todos los constructos, de cadenas de hasta 18 dedos, demuestran la represión activa de los indicadores de repeticiones de CAG más largas.

40

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

45

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

50

55

## Ejemplo 5

Represión cromosómica del *htt* mutante

60

A continuación, probamos los efectos de los péptidos represores con dedos de zinc, ZF6xHunt y ZF11xHunt, en genes *htt* cromosómicos. Las células *STHDH* (Trettel y otros (2000) Hum. Mol. Genet. 9(19): 2799-2809) son una línea de células progenitoras neuronales establecidas a partir de primordio estriatal E14, derivadas de ratones wt (*STHdh*<sup>Q7</sup>/*Hdh*<sup>Q7</sup>), o con inserciones de secuencias génicas, donde el primer exón del gen *htt* de ratón con 7 repeticiones de CAG se ha reemplazado por un exón humano con 111 repeticiones de CAG (*STHdh*<sup>Q111</sup>/*Hdh*<sup>Q111</sup>). Las células *STHDH* que expresan de manera estable ZF6xHunt y ZF11xHunt desnudos o fusionados con Kox-1 se cosecharon 20 días después de la infección retroviral, y se analizaron los niveles de *htt* mediante transferencia de Western y qRT-PCR. El experimento se

65

repitió independientemente dos veces, y se obtuvieron resultados similares en ambas ocasiones; los resultados de un experimento se muestran en la Figura 6.

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

#### Ejemplo 6

##### Especificidad de la represión en genomas de tipo salvaje

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

Los resultados de estos ensayos se presentan en las Figuras 6B y 6C. Como se ilustra, no se midieron efectos adversos ni en las células de ratón *STHdh* (Figura 6B), ni en las células humanas HEK293T (Figura 6C). En estas últimas, incluso el *htt* humano, que tiene la mayor cantidad de repeticiones de CAG wt en esta línea celular en particular (21 repeticiones), tampoco se reprimió.

Dado que la represión por Kox-1 se propaga mediante el establecimiento de heterocromatina (Groner y otros PLoS Genet 6(3): e1000869), también probamos los efectos de ZF6xHunt-Kox-1 y ZF11xHunt-Kox-1 en genes *htt* vecinos en células *STHdh* transducidas establemente, mediante qRT-PCR (Figura 6B). Los dos genes adyacentes, el *receptor cinasa 4 acoplado a la proteína G*, que está aproximadamente 7 kb aguas arriba; y *señalización de proteína G 12*, que está aproximadamente 188 kb aguas abajo, se analizaron y se encontró que no se afectaron por la presencia de las proteínas represoras con dedos de zinc. Esto sugiere que ambos genes vecinos están fuera del rango de efectos de Kox-1.

Los resultados indican que la represión tanto de ZF6xHunt-Kox-1 como de ZF11xHunt-Kox-1 es específica para el *htt* mutante en el loci cromosómico.

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

Gen	Longitud de la repetición de CAG	Cebador Directo	Cebador Inverso
EGFP	0-104	CCTGAAGTTCATCTGCACCA	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG
HcRed	0	AGATGCTGCGGAAGAAGAAG	GGTACCGTCGACTGCAGAA
hHPRT	N/A	CTTTGCTTTTCCTTGCTCAGG	TATCCAACACTTCGTGGGGT
hATN1	15	GTCTCCCTCCGATCTGGATA	CACACTCCAGGGCTGTAGA
hATXN1	12	CCAGCACCGTAGAGAGGATT	AGCCCTGTCCAAACACAAA
hATXN2	13	GACGCAGCTGAGCAAGTTAG	GAAGGAACGTGGGTTGAACT
hATXN3	7	AGAGCTTCGGAAGAGACGAG	ACTCCCAAGTGCTCCTGAAC
hATXN7	10	AACTGTGTGGCTCACTCTGG	TGGGAAGATGTTACCGTTGA
hCACNA1A	13	GGGAACTACACCCTCCTGAA	CGCTGCTTCTTCTTCTCTT
hTBP	19	ACGCCGAATATAATCCCAAG	CTTCACTCTTGGCTCCTGTG
hHtt	21	CAGATGTCAGAATGGTGGCT	GCCTTGGGAAGATTAGAATCCA
mATN1	3	CACCTGCCTCCACCTCATGGC	ATGCTCCTTGGGGGCCCTGG

5	mATXN1	2	TGTGGAGAGAATCGAGGAGA	CAGCCCTGTCCAAATACAAA
	mATXN2	6	ATCCAATGCAAAGGAGTTC	CTGCTGATGACCCACCATAG
	mATXN3	5	ACCTCGCACTATTCTTGCT	TGCATCTGTTGGACCTTGATAT
	mATXN7	5	TGCCCGTGTTCTCACCGGA	GCGCGGAGACAGTGGTTGCT
10	mCACNA1A	2	CACTGGCAATAGCAAAGGAA	TTCTTGAGCGAGTTCACCAC
	mTBP	3	ACTTCGTGCAAGAAATGCTG	GCTCATAGCTCTTGGCTCCT
	mGRK4	N/A	TCCTGGCTTTGAGGAGCCGA	CCACAGCACAGCTCTGCAGCAT
	mRgs12	N/A	GGGGGCTCAAGCAGGCATGG	GGGAGCCAGCCTCCGAGTCA
15	mHtt	7 o 111	CAGATGTCAGAATGGTGGCT	GCCTTGAAGATTAGAATCCA
	mHPRT	N/A	GGTTAAGCAGTACAGCCCCA	AGAGGTCCTTTTCACCAGCA
20	M13	N/A	GTAAAACGACGGCCAG	CAGGAAACAGCTATGAC

Ejemplo 7

Ensayo de toxicidad celular

Dado que creemos que una terapia represora con ZFP requeriría una baja toxicidad, llevamos a cabo un ensayo de viabilidad celular con marcaje por colorante para probar la toxicidad (no específica) de los ZFP.

Las células HEK-293T se transfectaron con 400 ng de los constructos de vectores indicados mediante el uso de Lipofectamina 2000 y se cosecharon 48 horas después de la transfección. Se usaron como control células no transfectadas (negativo) o solo con Lipofectamina 2000. La citotoxicidad se analizó mediante el uso del ensayo de toxicidad celular Guava (PCA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se presentan como el porcentaje de células muertas, en apoptosis intermedia y viables (ver Figura 7), en la que las barras expresan los resultados de al menos 3 experimentos independientes.

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

Ejemplo 8

Represión del gen Htt mutante en un modelo de ratón para la enfermedad de Huntington

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

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

En este estudio, las proteínas con dedos de zinc de la invención se ensayan para determinar su capacidad para reducir la expresión del *htt* mutante en un modelo de ratón transgénico de HD, de acuerdo con la línea de tiempo que se muestra más abajo.

Primero, las proteínas represoras ZF6xHunt-Kox-1, ZF11xHunt-Kox-1 y ZF12xHunt-Kox-1 se insertan en vectores de virus adenoasociados (AAV) (subtipo AAV2/1; Molecular Therapy (2004) 10: 302-317). En experimentos paralelos, los vectores dedos de zinc-AAV se inyectan en el cuerpo estriado de ratones R6/2 para mediar la expresión de las proteínas de fusión ZFP-Kox-1 en las células del cuerpo estriado. La capacidad de las proteínas de fusión ZFP-Kox-1 expresadas en las

células del cuerpo estriado para reducir los síntomas de la HD en ratones R6/2 se evalúa durante un período de al menos 20 semanas mediante la evaluación periódica del comportamiento y los síntomas de los ratones R6/2 infectados con dedos de zinc-AAV, así como también los niveles de expresión de la proteína htt mutante, en comparación con los ratones R6/2 controles infectados con el vector control AAV-GFP.

5

Línea de tiempo:

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

10

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

Discusión

15

En estos ejemplos, los inventores han descrito el diseño de péptidos con dedos de zinc capaces de reconocer y unirse a ambas cadenas de ADN de un tramo de repeticiones de CAG, mediante el reconocimiento tanto de tripletes de poli-GCA como de poli-GCT; y demostrado que dichas proteínas son capaces de inducir la represión de la transcripción de genes objetivo, tanto *in vitro* como *in vivo*.

20

Recientemente, Mittelman y otros (2009), Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 106(24): 9607-9612 emplearon un enfoque de ZFP diferente para explorar la inestabilidad de la región CAG, después de inducir roturas bicatenarias con fusiones de nucleasa Fok-I de 3 dedos emparejadas. Describieron dos proteínas ZFP, zfGCT (secuencia de reconocimiento alfa-helicoidal: QSSDLTR [SEQ ID NO: 96]) y zfGCA (QSGDLTR [SEQ ID NO: 97]), diseñadas para reconocer GCT y GCA, respectivamente. Se observaron eventos de escisión que inducen el acortamiento de la región CAG en hasta 1 en 10<sup>4</sup> colonias celulares.

25

Los inventores también probaron originalmente los péptidos con dedos de zinc de la invención, ZFxHunt (con secuencia de reconocimiento, QRATLQR [SEQ ID NO: 1]) como fusiones a FokI y encontraron que reducían la transcripción de poli-CAG-EGFP de una manera similar al ZFP desnudo (Figura 3). Este efecto es mucho más fuerte que el efecto de nucleasa ya que la GFP se reprime en hasta aproximadamente el 85 % de las células, según lo evaluado por FACS de células transfectadas de forma transitoria.

30

Además, se cree que el efecto está en el nivel de ARN ya que tanto los niveles de ARN como de proteína se redujeron (Figura 3). Los plásmidos indicadores se extrajeron de las células transfectadas y se secuenciaron para buscar cambios de marco no homólogos de unión en el extremo que pudieran explicar la represión de EGFP observada (es decir, hasta aproximadamente el 85 % de reducción). Sin embargo, los inventores no pudieron detectar ningún cambio de marco no homólogo de unión en el extremo en los 30 plásmidos que se extrajeron y secuenciaron. Esto sugiere que los efectos de represión transcripcional de los péptidos con dedos de zinc simplemente mediante la unión a sus secuencias objetivo son mucho más fuertes que cualquier posible efecto de nucleasa; e indica que el mecanismo de acción de los péptidos ZFxHunt de la invención es diferente completamente al mecanismo informado por Mittelman y otros.

35

40

Los inventores han demostrado además, que los péptidos con dedos de zinc desnudos (es decir, que carecen de dominios efectores adicionales) pueden ser inhibidores altamente eficientes de la expresión del gen objetivo (la expresión de poliQ-EGFP se redujo hasta en un 90 %), particularmente, cuando el número de repeticiones de CAG es igual o superior a 35. Este es un hallazgo significativo, ya que el número de repeticiones de CAG en genes de tipo salvaje en el genoma humano (lo que incluye el gen *htt*), es menor de 35. Sin estar limitado por la teoría, es probable que el mecanismo de represión en estos casos se deba al impedimento estérico de la progresión del complejo ARN polimerasa, según lo informado por Choo y otros para un ZFP sintético contra el oncogén *Bcr-Abl* (Choo y otros (1994) Nature 372(6507): 642-645).

45

50

Se encontró que la fusión del dominio de represión de Kox-1 con los péptidos con dedos de zinc de la invención reduce adicionalmente la expresión de los genes objetivo. En estos experimentos, se demostró que la represión requería de la unión a las repeticiones de CAG, ya que los vectores control que carecían de repeticiones de CAG no se afectaron. Sin embargo, en algunos casos también hubo un efecto represivo sobre un control de un gen informador vecino, HcRed, especialmente para los objetivos más largos. Sin embargo, es probable que esta falta de especificidad sea un efecto del dominio represor específico más que del péptido con dedos de zinc: se conoce que Kox-1 recluta al represor conjunto

55

KAP-1 e induce una represión de largo alcance a través de la propagación de la heterocromatina (Groner y otros PLoS Genet. 6(3): e1000869).

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

Vale la pena señalar que existen algunas diferencias relevantes entre la represión cromosómica y del plásmido, que reflejan presumiblemente el número de copias objetivo y la accesibilidad dentro de la cromatina. Episomalmente, se ha demostrado que los péptidos con 6 dedos solos son represores eficaces de los genes objetivo. Sin embargo, la represión de Kox-1 parece ser demasiado fuerte para una discriminación de longitud óptima. A la inversa, en los loci endógenos, las proteínas de fusión Kox-1 parecen ser mejores para la represión del mutante, mientras que evitan el alelo de tipo salvaje. En este caso, los constructos Kox-1 de 6 y 11 dedos son fuertes represores tanto de la proteína objetivo como de la expresión de ARN. Después de 20 días de expresión estable de los péptidos con dedos de zinc, se encontró que la proteína de 11 dedos exhibía la represión más fuerte del alelo mutante objetivo. De hecho, cuando se fusionaron con el dominio de represión Kox-I, los péptidos con dedos de zinc más activos de la invención pudieron reducir dramáticamente los niveles de la proteína mutante endógena en un 95 %, y los niveles del ARNm mutante en aproximadamente el 80 %, con un efecto insignificante en la expresión del alelo de tipo salvaje, o en cualesquiera otros genes que contienen un número de repeticiones de CAG de tipo salvaje. La expresión terapéutica sostenida es, por lo tanto, factible potencialmente.

La terapia génica es una estrategia terapéutica atractiva para diversas enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, se han usado vectores lentivirales para mediar en la expresión generalizada y a largo plazo de transgenes en células que no se dividen, tales como las neuronas maduras (Dreyer, Methods Mol. Biol. 614: 3-35). Un vector rAAV también se usó por Rodríguez-Lebrón y otros (2005) Mol. Ther. 12(4): 618-633, para suministrar ARNhp anti-Htt mutante en modelo de ratones HD; lo que reduce de esta manera los niveles de mHtt en el cuerpo estriado y retrasan la progresión del fenotipo similar a la HD. Además, como el ARNi (van Bilsen y otros (2008) Hum. Gene Ther. 19(7): 710-719; Zhang y otros (2009) J. Neurochem. 108(1): 82-90; Pfister y otros (2009) Curr. Biol. 19(9): 774-778), y el LNA (Hu y otros (2009) Nat. Biotechnol. 27(5): 478-484; y Hu y otros (2009) Ann. NY Acad. Sci. 1175: 24-31) se han mostrado recientemente prometedores para el tratamiento de la HD, es probable que los vehículos de suministro adecuados se optimicen en los próximos años, y el enfoque de ZFP complementario descrito en la presente se beneficiará probablemente de dichos avances.

En consecuencia, se ha desarrollado y usado una línea celular modelo derivada de células del cuerpo estriado de un modelo de ratón de HD con inserción de secuencia génica (Trettel y otros (2000) Hum. Mol. Genet. 9(19): 2799-2809) para demostrar los efectos de los péptidos con dedos de zinc de la invención en condiciones terapéuticas apropiadas (es decir, alelos de una sola copia en loci cromosómicos).

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

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido con dedos de zinc que comprende la secuencia:  
 $N' - [(Fórmula 2) - X_6]_{n0} - \{[(Fórmula 2) - X_5 - (Fórmula 2) - X_6]_{n1} - [(Fórmula 2) - X_5 - (Fórmula 2) - X_L]_{n2} - [(Fórmula 2) - X_5 - (Fórmula 2) - X_6]_{n3} - [(Fórmula 2) - X_5 - (Fórmula 2)] - [X_6 - (Fórmula 2)]_{n4} - C'$ ,  
 en donde  $n_0$  es 0 o 1,  $n_1$  es de 1 a 4,  $n_2$  es 1 o 2,  $n_3$  es de 1 a 4,  $n_4$  es 0 o 1,  $X_5$  es una secuencia enlazadora de 5 aminoácidos,  $X_6$  es una secuencia enlazadora de 6 o 7 aminoácidos, y  $X_L$  es una secuencia enlazadora de al menos 8 aminoácidos, y la Fórmula 2 es un dominio de dedos de zinc de la secuencia  $-X_{0-2} C X_{1-5} C X_{2-7} X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6} H X_{3-6} H/C -$ , en donde X es cualquier aminoácido, los números en el subíndice indican los posibles números de residuos representados por X en esa posición, y el número en superíndice indica la posición del aminoácido en la secuencia de reconocimiento del dominio de dedos de zinc; en donde al menos una secuencia  $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$  es la secuencia de aminoácidos QRATLQR (SEQ ID NO: 1).
2. El péptido con dedos de zinc de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia:  
 $N' - [(Fórmula 6) - L3]_{n0} - \{[(Fórmula 6) - L2 - (Fórmula 6) - L3]_{n1} - [(Fórmula 6) - L2 - (Fórmula 6) - X_L]_{n2} - [(Fórmula 6) - L2 - (Fórmula 6) - L3]_{n3} - [(Fórmula 6) - L2 - (Fórmula 6)] - [L3 - (Fórmula 6)]_{n4} - C'$ ,  
 en donde  $n_0$  es 0 o 1,  $n_1$  es 1 o 2,  $n_2$  es 1 o 2,  $n_3$  es 2,  $n_4$  es 0,  $X_L$  es de 11 a 40 aminoácidos, L2 tiene la secuencia  $-TG^E/Q^K/RP-$ , L3 tiene la secuencia  $-TG^G/S^E/Q^K/RP-$ , y la Fórmula 6 tiene la secuencia  $-X_2 C X_2 C X_5 X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6} H X_3 H -$ , en donde X es cualquier aminoácido.
3. Un péptido con dedos de zinc que comprende al menos 4 dominios de dedos de zinc de Fórmula 2:  
 $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{2-7} X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6} H X_{3-6} H/C$ , en donde X es cualquier aminoácido, los números en el subíndice indican los posibles números de residuos representados por X en esa posición, y el número en superíndice indica la posición del aminoácido en la secuencia de reconocimiento del dominio de dedos de zinc, y al menos una secuencia  $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$  es la secuencia de aminoácidos QRATLQR (SEQ ID NO: 1).
4. El péptido con dedos de zinc de acuerdo con la reivindicación 3, en donde al menos cuatro dominios de dedos de zinc adyacentes comprenden una secuencia  $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$  que tiene la secuencia de aminoácidos QRATLQR (SEQ ID NO: 1).
5. El péptido con dedos de zinc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene 4, 6, 11, 12 o 18 dominios de dedos de zinc de Fórmula 6:  
 $X_2 C X_2 C X_5 X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6} H X_3 H$ , en donde cada secuencia  $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5} X^{+6}$  es la secuencia de aminoácidos QRATLQR (SEQ ID NO: 1).
6. El péptido con dedos de zinc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 14.
7. Una biblioteca de péptidos virgen que comprende una pluralidad de péptidos con dedos de zinc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos un dominio de dedos de zinc se diversifica en una o más de las posiciones  $X^{-1} X^{+1} X^{+2} X^{+3} X^{+4} X^{+5}$  y  $X^{+6}$ .
8. Una proteína de fusión que comprende el péptido con dedos de zinc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y al menos un dominio efector, seleccionado entre dominios represores de la transcripción, dominios activadores de la transcripción, dominios aisladores transcripcionales, dominios de remodelación, condensación o descondensación de la cromatina, dominios de escisión de ácido nucleico o proteína, dominios de dimerización, dominios enzimáticos, secuencias o dominios de señalización/direccionamiento.
9. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. El péptido con dedos de zinc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en la modulación de la expresión de un gen objetivo en una célula, y en donde el uso es en medicina o para propósitos no médicos.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el gen objetivo se asocia con o comprende al menos 10 repeticiones contiguas de trinucleótidos; preferentemente, en donde las repeticiones de trinucleótidos son repeticiones de CAG.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde el péptido con dedos de zinc reprime la expresión del gen objetivo y el uso es para tratar una enfermedad o afección de poliglutamina; preferentemente en donde la enfermedad o afección se selecciona de enfermedad de Huntington (HD), ataxias espinocerebelosas, atrofia dentatorubropalúdica y epilepsia mioclónica juvenil.
13. Una composición farmacéutica que comprende el péptido con dedos de zinc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 9.

14. Un método para crear un péptido con poli-dedos de zinc que comprende al menos 8 dominios de dedos de zinc de Fórmula 1:

5  $X_{0-2} C X_{1-5} C X_{9-14} H X_{3-6}^{H/C}$ ,

en donde X es cualquier aminoácido y los números en el subíndice indican el posible número de residuos representados por X en esa posición,

el método comprende expresar una secuencia de ácido nucleico obtenible mediante:

10

(a) proporcionar al menos 4 moléculas de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica un par de dominios de dedos de zinc de Fórmula 1, los dominios de dedos de zinc adyacentes de cada par se separan por una secuencia enlazadora de 5 aminoácidos;

15

(b) unir 2 o 3 moléculas de ácido nucleico de la etapa (a) para crear al menos 2 moléculas de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica una matriz de 4 o 6 dominios de dedos de zinc, los pares adyacentes de dominios de dedos de zinc de la etapa (a) se separan por una secuencia enlazadora de 6 o 7 aminoácidos; y

20

(c) unir las al menos 2 moléculas de ácido nucleico de la etapa (b) para crear una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido con poli-dedos de zinc, las matrices adyacentes de los dominios de dedos de zinc de la etapa (b) se separan por una secuencia enlazadora de al menos 8 aminoácidos; y opcionalmente

(d) unir al extremo 5' o 3' de la secuencia de ácido nucleico de la etapa (c), una molécula de ácido nucleico que codifica un único dominio de dedos de zinc y una secuencia enlazadora de 5 a 7 aminoácidos, para crear opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido con poli-dedos de zinc que tiene un número impar de dominios de dedos de zinc; y

25

en donde la secuencia de ácido nucleico codifica un péptido con poli-dedos de zinc que tiene la secuencia de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el enlazador de 5 aminoácidos de la etapa (a) se

30

selecciona de un enlazador de la secuencia  $-TG^{E/Q}K/RP-$ , el enlazador de 6 aminoácidos de la etapa (b) y (d) se selecciona de un enlazador de la secuencia  $-TG^G/S^E/Q^K/RP-$ , y el al menos un enlazador de 8 aminoácidos de la etapa (c) tiene de 8 a 50 aminoácidos.

35

40

45

50

55

60

65



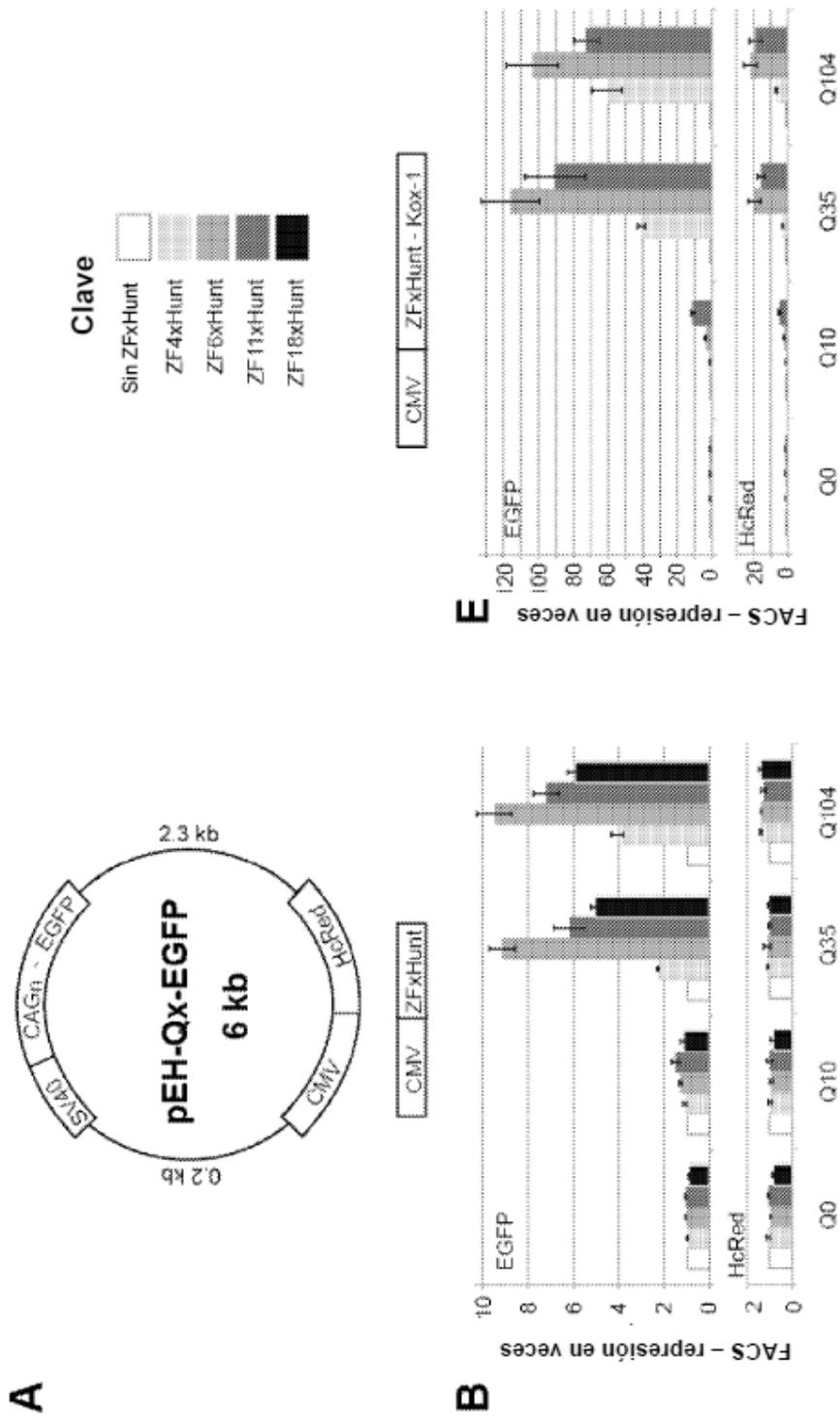


Figura 2

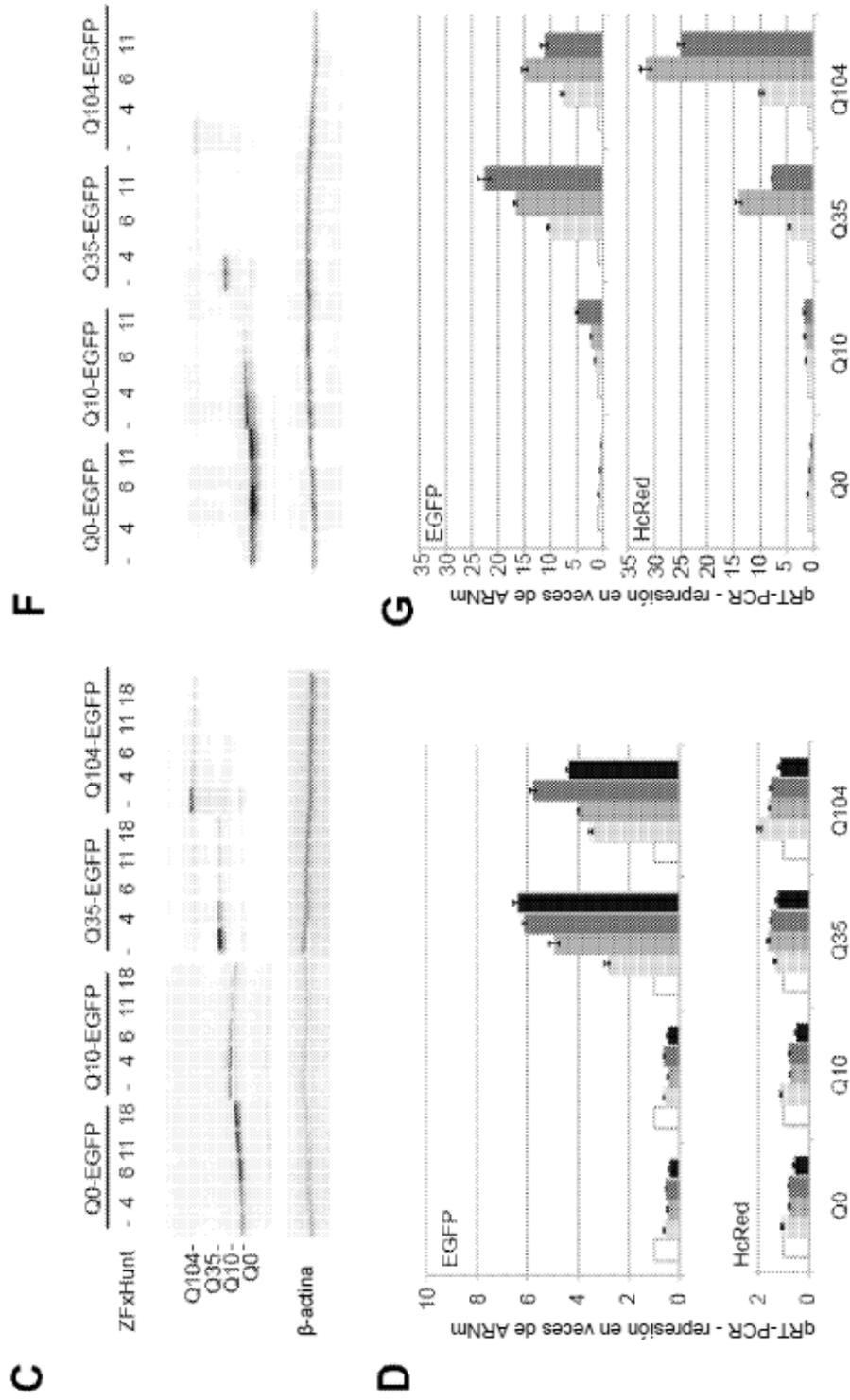


Figura 2 cont.

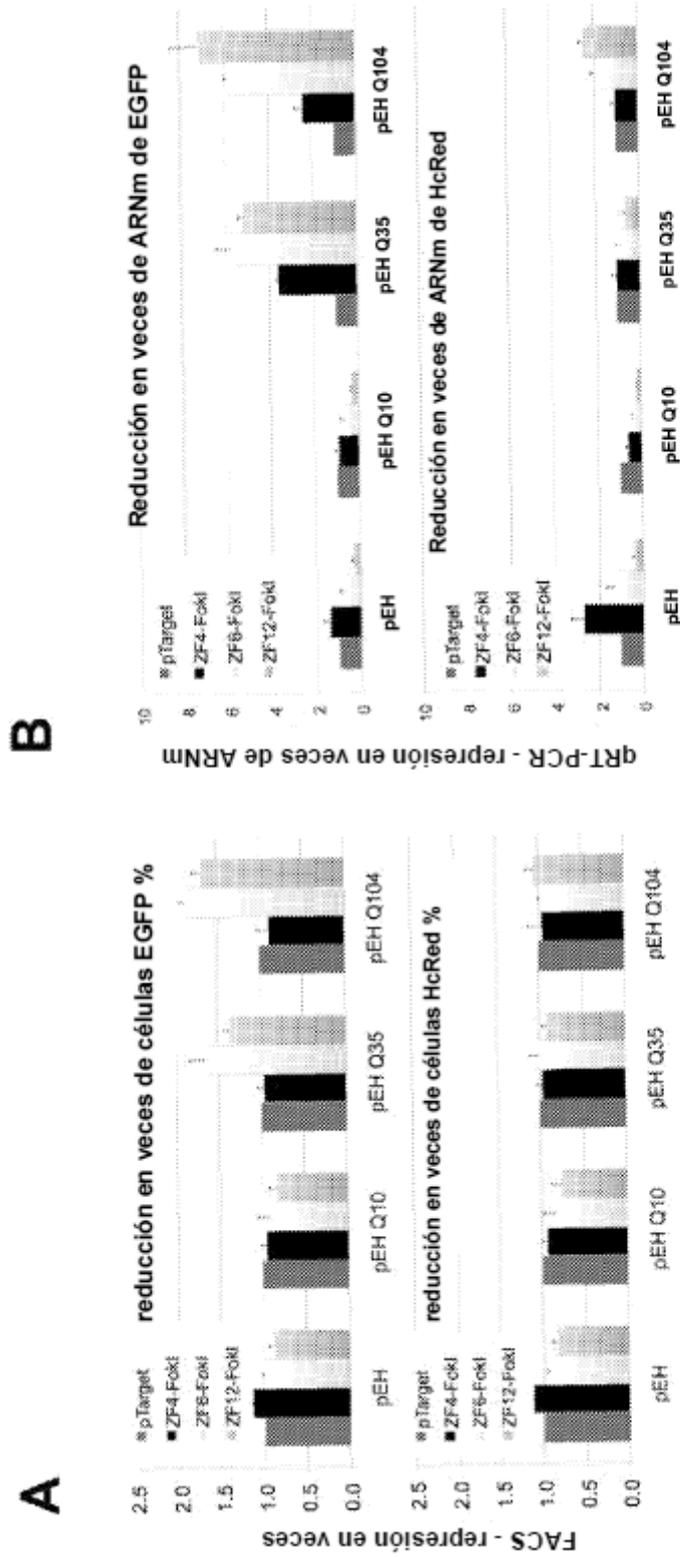


Figura 3

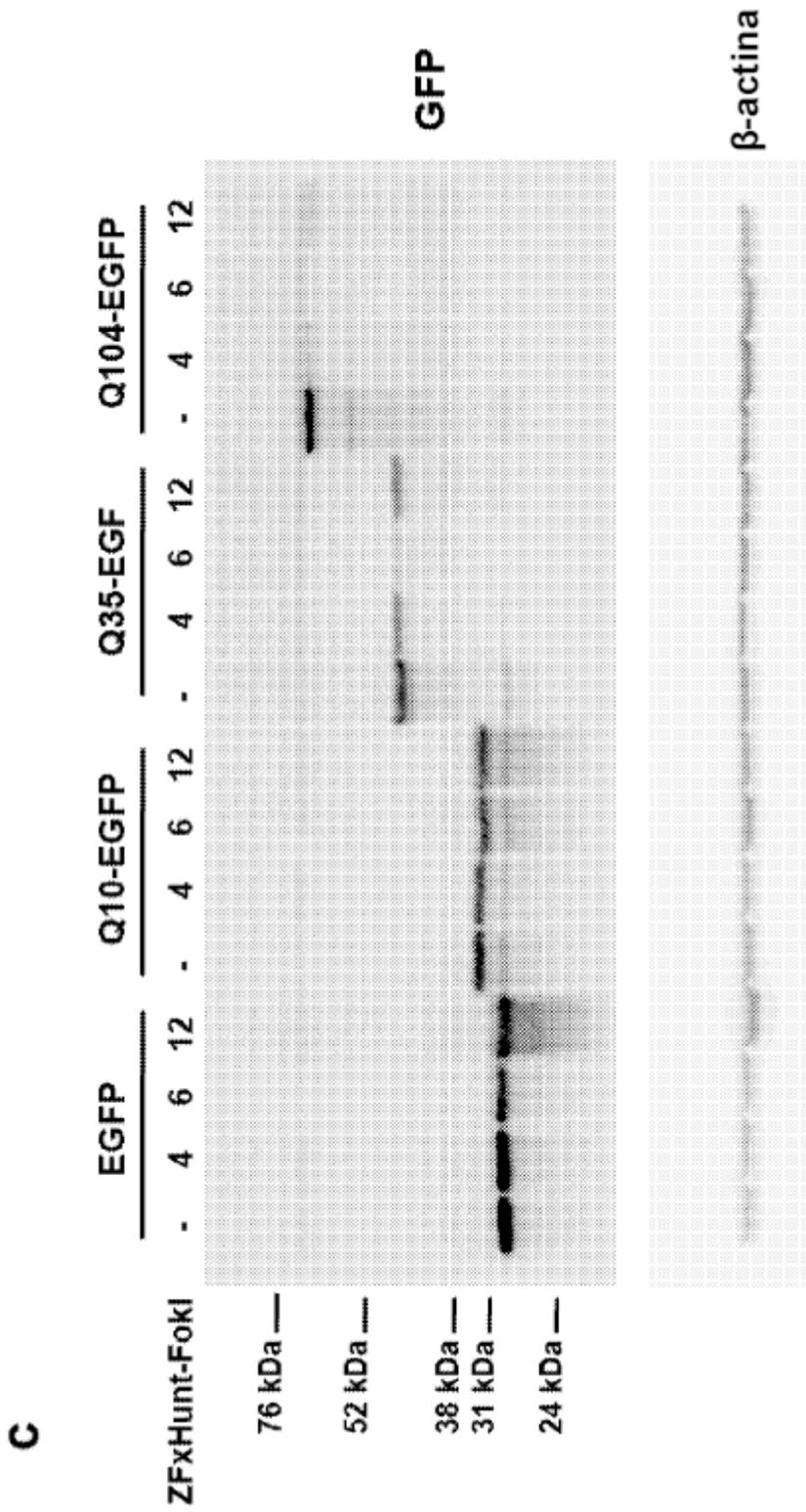


Figura 3 cont.

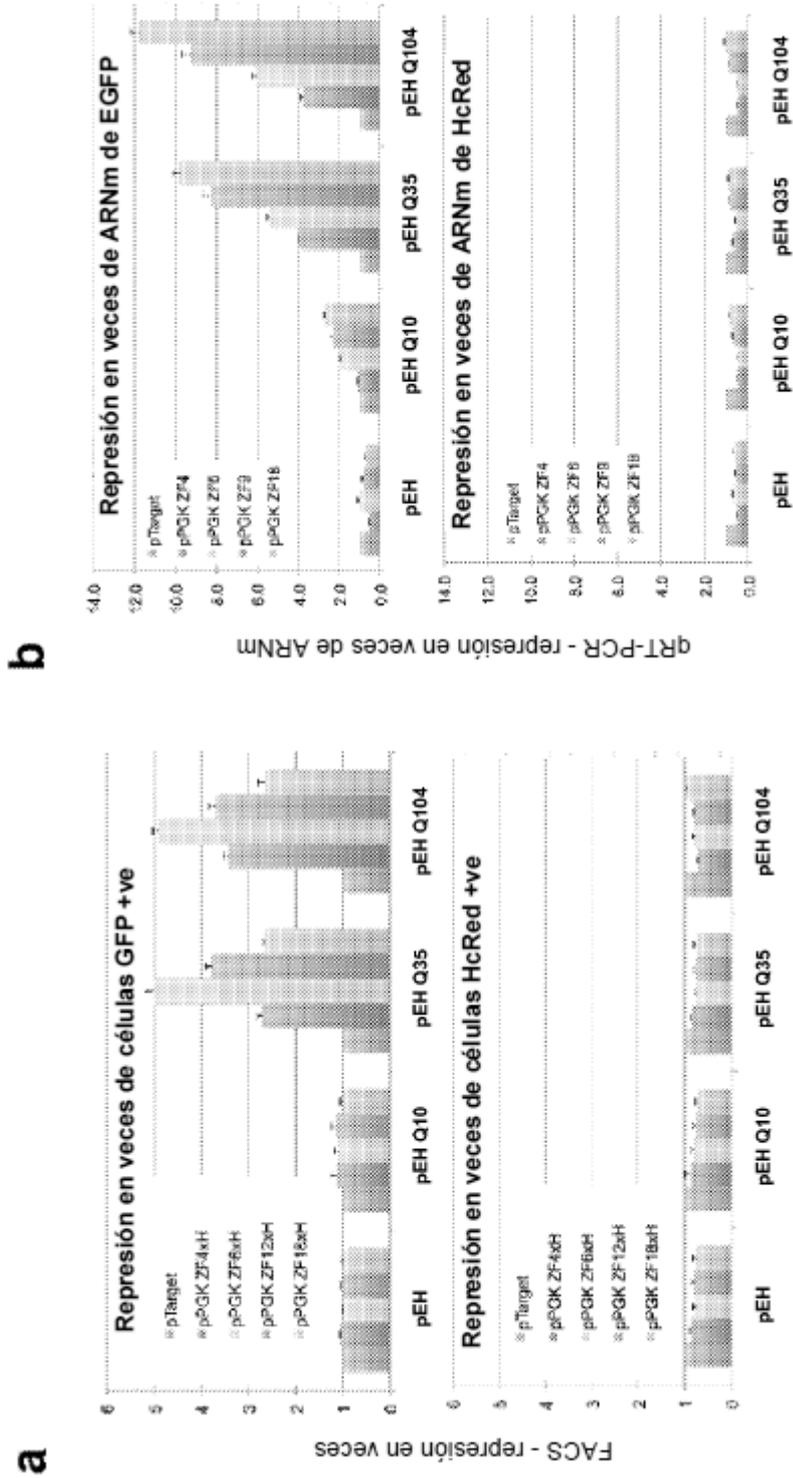


Figura 4

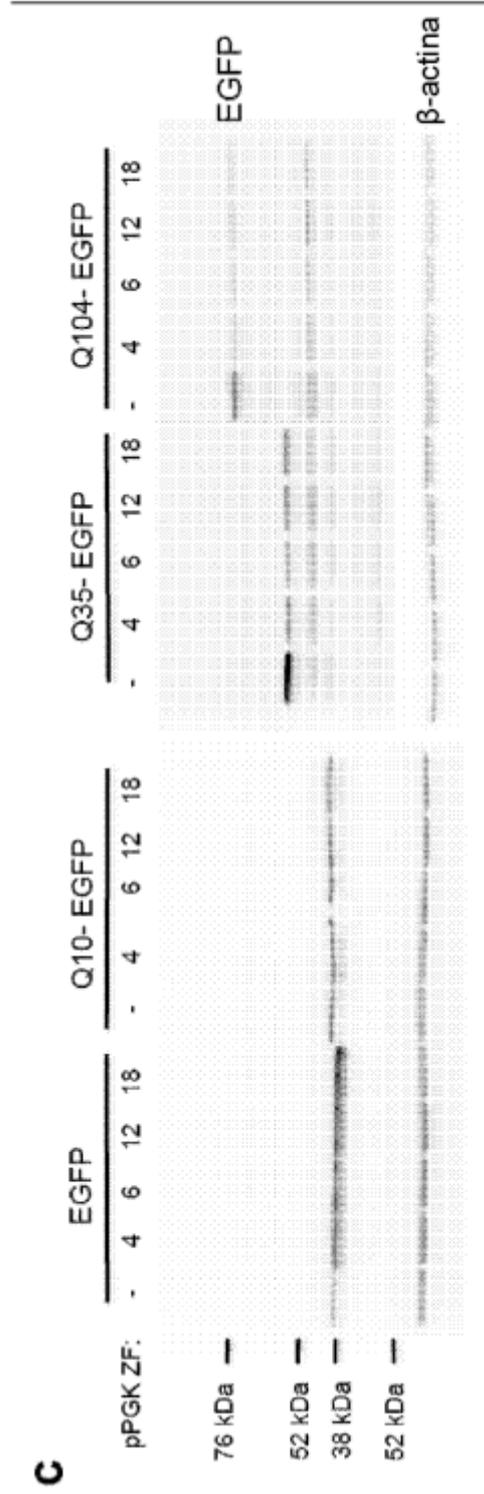


Figura 4 cont.

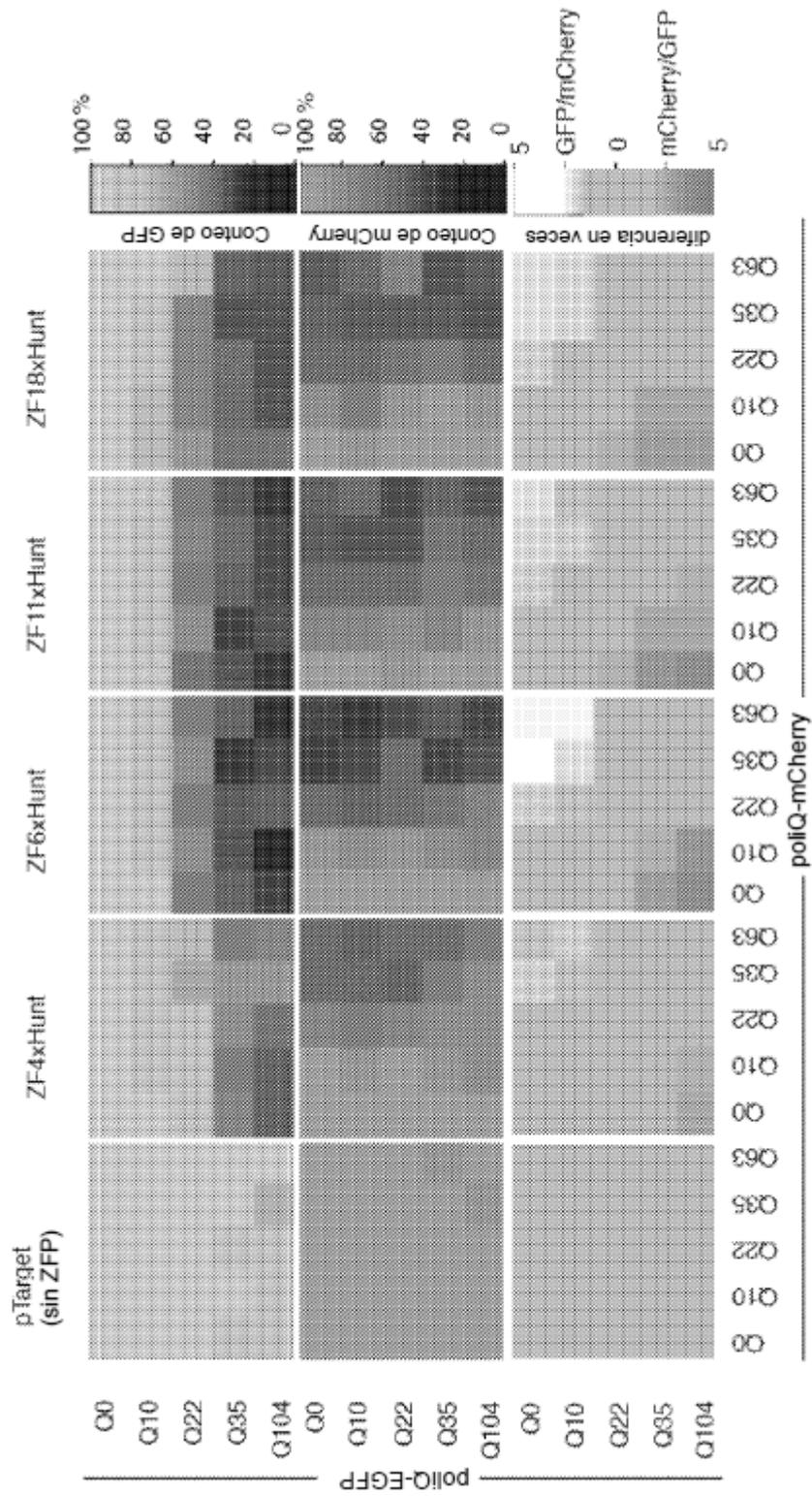


Figura 5

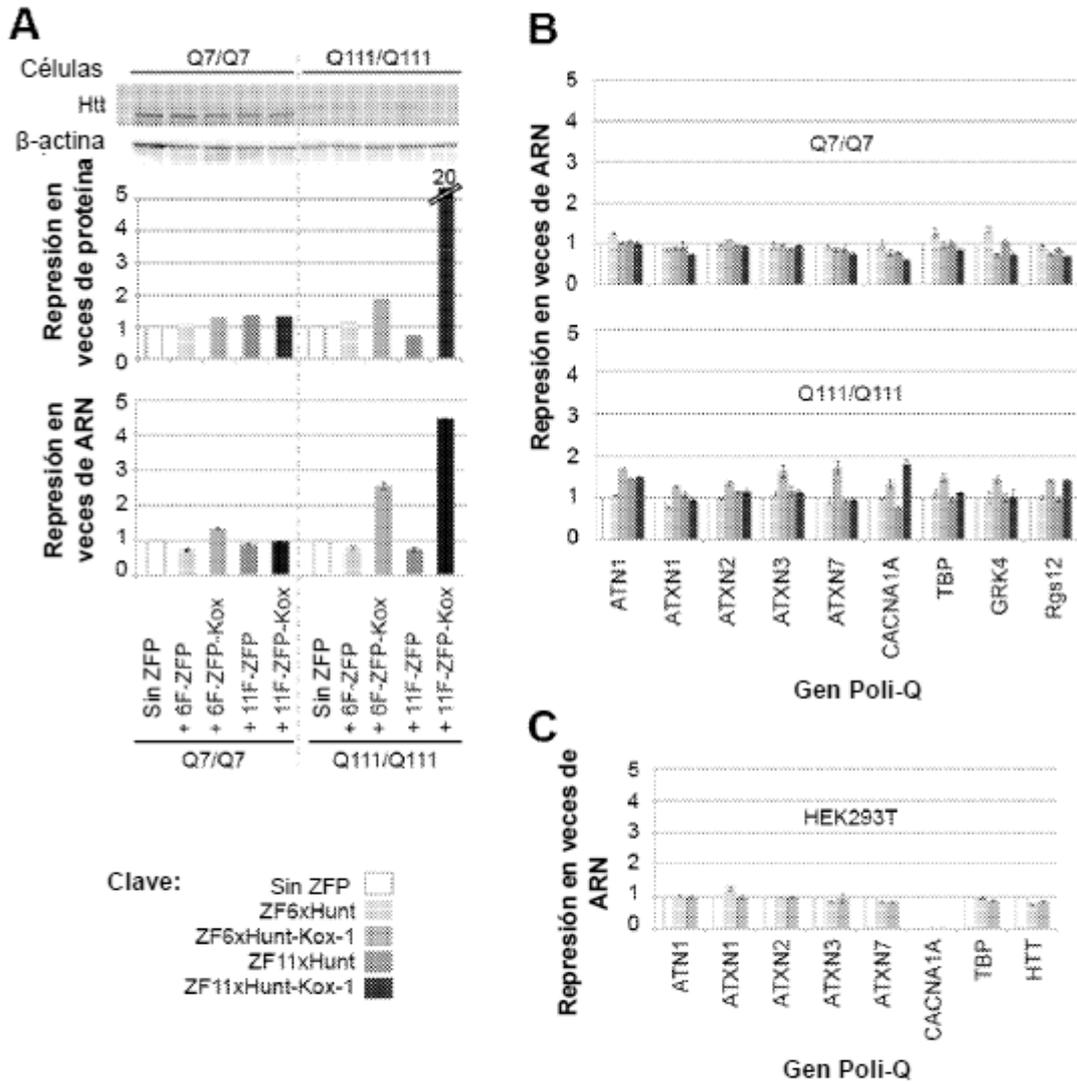


Figura 6

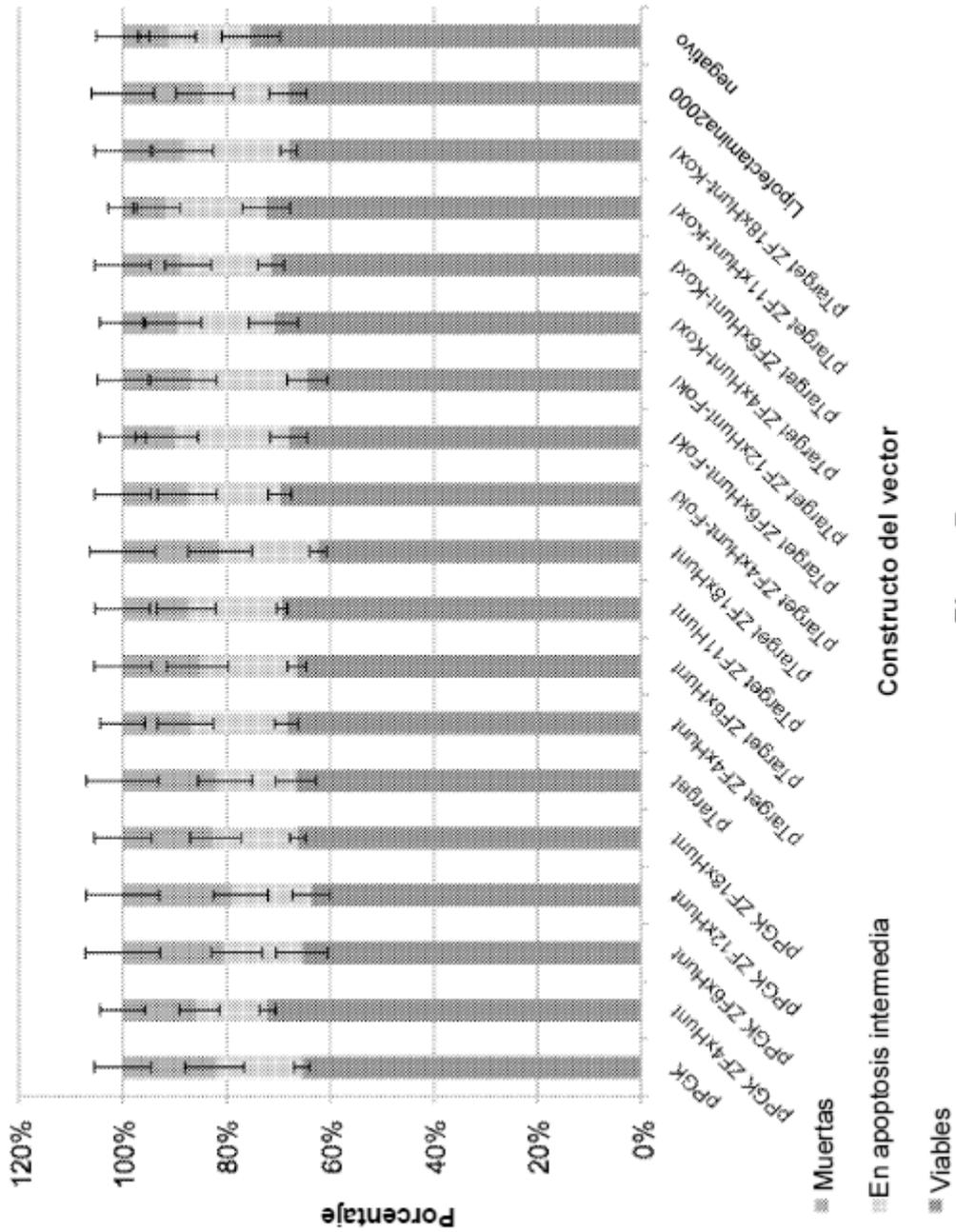


Figura 7