

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 916**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/195** (2006.01)

**C12N 9/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2011 PCT/US2011/000221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO11097036**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2011 E 11740153 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2534173**

54 Título: **Semidominios de escisión genomanipulados**

30 Prioridad:

**23.09.2010 US 403916 P**  
**08.02.2010 US 337769 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.04.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DOYON, YANNICK y**  
**MILLER, JEFFREY C.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 751 916 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

Semidominios de escisión genomanipulados

5 **Campo técnico**

La presente divulgación pertenece a los campos de manipulación polipeptídica y genómica y recombinación homóloga.

10 **Antecedentes**

Se han descrito nucleasas artificiales, tales como nucleasas de dedos de cinc (fusiones de dominios de dedos de cinc y dominios de escisión) para la escisión dirigida de ADN genómico. Dichos eventos de escisión dirigida pueden usarse, por ejemplo, para inducir mutagénesis dirigida, inducir eliminaciones dirigidas de secuencias de ADN celular y facilitar la recombinación dirigida en un locus cromosómico predeterminado. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; y la publicación internacional WO 07/014275.

Para aumentar la especificidad, puede usarse una pareja de proteínas de fusión, comprendiendo cada una un dominio de unión de dedos de cinc y un semidominio de escisión para escindir el ADN genómico diana. Como la escisión no se produce salvo que los semidominios de escisión se asocien para formar un dímero funcional, esta disposición aumenta la especificidad.

Para disminuir además los eventos de escisión inespecíficos, también se han desarrollado semidominios de escisión genomanipulados, por ejemplo, dominios que forman heterodímeros obligados. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0131963 y el documento EP 2027262 A2. Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de semidominios de escisión genomanipulados adicionales con actividad aumentada y actividad de escisión inespecífica disminuida.

30 **Sumario**

La presente divulgación proporciona semidominios de escisión genomanipulados que muestran actividad y especificidad potenciadas en comparación con dominios de escisión de tipo silvestre y/o semidominios de escisión genomanipulados descritos previamente. También se describen complejos (por ejemplo, heterodímeros) y proteínas de fusión que comprenden estos semidominios de escisión genomanipulados. La divulgación también proporciona métodos de uso de estas composiciones para escisión dirigida de cromatina celular en una región de interés y/o recombinación homóloga en una región predeterminada de interés en las células.

La presente invención proporciona la proteína de fusión que comprende un dominio de unión a ADN de dedos de cinc y un polipéptido que comprende un semidominio de escisión *FokI* de tipo silvestre genomanipulado, en la que el semidominio de escisión genomanipulado se obtiene de un semidominio de escisión *FokI* de tipo silvestre y comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en: mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 486, 499 y 496 en la que el resto de Gln (Q) de tipo silvestre en la posición 486 se reemplaza con un resto de Glu (E), el resto de Ile (I) de tipo silvestre en la posición 499 se reemplaza con un resto de Leu (L) o Ala (A) y el resto de Asn (N) de tipo silvestre en la posición 496 se reemplaza con un resto de Asp (D) o Glu (E); mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 487 y \_ 496 en la que el resto de Arg (R) de tipo silvestre en la posición 487 se reemplaza con un resto de Asp (D) y el resto de Asn (N) de tipo silvestre en la posición 496 se reemplaza con un resto de Asp (D) o Glu (E); mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 487, 499 y 496 en la que el resto de Arg (R) de tipo silvestre en la posición 487 se reemplaza con un resto de Asp (D), el resto de Ile (I) de tipo silvestre en la posición 499 se reemplaza con un resto de Leu (L) o Ala (A) y el resto de Asn (N) de tipo silvestre en la posición 496 se reemplaza con un resto de Asp (D) o Glu (E); mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 483 y 537 en la que el resto de Asp (D) de tipo silvestre en la posición 483 se reemplaza con un resto de Arg (R) y el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 se reemplaza con un resto de Lys (K) o Arg (R); mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 490 y 537 en la que el resto de Glu (E) de tipo silvestre en la posición 490 se reemplaza con un resto de Lys (K) y el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 se reemplaza con un resto de Lys (K) o Arg (R); mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 490, 537 y 538 en la que el resto de Glu (E) de tipo silvestre en la posición 490 se reemplaza con un resto de Lys (K), el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 se reemplaza con un resto de Lys (K) o Arg (R) y el resto de Ile (I) de tipo silvestre en la posición 538 se reemplaza con un resto Lys (K) o Val (V); y mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 483, 538 y 537 en la que el resto de Asp (D) de tipo silvestre en la posición 483 se reemplaza con un resto de Arg (R), el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 se reemplaza con un resto de Lys (K) o Arg (R) y el resto de Ile (I) de tipo silvestre en la posición 538 se reemplaza con un resto Lys (K) o Val (V), en la que los restos de aminoácido se enumeran con respecto a *FokI* de tipo silvestre de longitud completa.

Por tanto, en un aspecto, en este documento se describe un semidominio de escisión genomanipulado que

comprende dos o más mutaciones en comparación con el dominio de escisión de tipo silvestre precursor del que se obtienen. En determinadas realizaciones, los semidominios de escisión genomanipulados se obtienen de *FokI* y comprenden una mutación en dos o más de los restos de aminoácido 418, 432, 441, 481, 483, 486, 487, 490, 496, 499, 523, 527, 537, 538 y/o 559, numerados con respecto al semidominio de escisión *FokI* de tipo silvestre. En una  
 5 realización, el semidominio de escisión genomanipulado se obtiene de un dominio de escisión *FokI* de tipo silvestre y comprende mutaciones en los restos de aminoácido 486, 499 y 496, numerados con respecto a *FokI* de tipo silvestre. En otra realización, el semidominio de escisión genomanipulado comprende mutaciones en los restos de aminoácido 490, 538 y 537, numerados con respecto a *FokI* de tipo silvestre. En otra realización, los semidominios de escisión genomanipulados se obtienen de un dominio de escisión *FokI* de tipo silvestre y comprenden mutaciones  
 10 en los restos de aminoácido 487, 499 y 496, numerados con respecto a *FokI* de tipo silvestre. En una realización, los semidominios de escisión genomanipulados se obtienen de un dominio de escisión *FokI* de tipo silvestre y comprenden mutaciones en los restos de aminoácido 483, 538 y 537, numerados con respecto a *FokI* de tipo silvestre. En más realizaciones adicionales, el semidominio de escisión genomanipulado comprende mutaciones en los restos de aminoácido 490 y 537.

Los semidominios de escisión genomanipulados descritos en este documento pueden formar heterodímeros con semidominios de escisión de tipo silvestre y/o con otros semidominios de escisión genomanipulados. En determinadas realizaciones, el semidominio de escisión genomanipulado comprende mutaciones en las posiciones 486, 499 y 496 (numeradas con respecto a *FokI* de tipo silvestre), por ejemplo, mutaciones que remplazan el resto de Gin (Q) de tipo silvestre en la posición 486 con un resto de Glu (E), el resto de Iso (I) de tipo silvestre en la posición 496 con un resto de Asp (D) o Glu (E) (también denominados dominios "ELD" y "ELE", respectivamente). En otras realizaciones, el semidominio de escisión genomanipulado comprende mutaciones en las posiciones 490, 538 y 537 (numeradas con respecto a *FokI* de tipo silvestre.), por ejemplo, mutaciones que remplazan el resto de Glu (E) de tipo silvestre en la  
 20 posición 490 con un resto de Lys (K), el resto de Iso (I) de tipo silvestre en la posición 538 con un resto de Lys (K) y el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 con un resto de Lys (K) o un resto de Arg (R) (también denominados dominios "KKK" y "KKR", respectivamente). En otras realizaciones, el semidominio de escisión genomanipulado comprende mutaciones en las posiciones 490 y 537 (numeradas con respecto a *FokI* de tipo silvestre), por ejemplo, mutaciones que remplazan el resto de Glu (E) de tipo silvestre en la posición 490 con un  
 30 resto de Lys (K) y el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 con un resto de Lys (K) o un resto de Arg (R) (también denominados dominios "KIK" y "KIR", respectivamente). En otras realizaciones adicionales, el semidominio de escisión genomanipulado comprende mutaciones en las posiciones 487 y 496 (numeradas con respecto a *FokI* de tipo silvestre), por ejemplo, mutaciones que remplazan el resto de Arg (R) de tipo silvestre en la posición 487 con un resto de Asp (D) y el resto de Asn (N) de tipo silvestre en la posición 496 con un resto de Asp (D) (también denominado "DD") y/o mutaciones en las posiciones 483 y 537 (numeradas con respecto a *FokI* de tipo silvestre), por ejemplo, mutaciones que remplazan el resto de Asp (D) de tipo silvestre en la posición 483 con un resto de Arg (R) y el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 con un resto de Arg (R) (también denominado "RR"). En otras realizaciones, el semidominio de escisión genomanipulado comprende mutaciones en las posiciones 487, 499 y 496 (numeradas con respecto a *FokI* de tipo silvestre), por ejemplo, mutaciones que remplazan el resto de Arg (R)  
 40 de tipo silvestre en la posición 487 con un resto de Asp (D) y el resto de Ile (I) de tipo silvestre en la posición 499 con un resto de Ala (A) y el resto de Asn (N) de tipo silvestre en la posición 496 con un resto de Asp (D) (también denominado "DAD") y/o mutaciones en las posiciones 483, 538 y 537 (numeradas con respecto a *FokI* de tipo silvestre), por ejemplo, mutaciones que remplazan el resto de Asp (D) de tipo silvestre en la posición 483 con un resto de Arg (R) y el resto de Ile (I) de tipo silvestre en la posición 538 con un resto de Val (V), y el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 con un resto de Arg (R) (también denominado "RVR").

En otro aspecto, los semidominios de escisión genomanipulados pueden manipularse adicionalmente para que contengan mutaciones en el dominio de *FokI* distinto del dominio de dimerización. Por ejemplo, se ha demostrado que mutaciones en las posiciones 418, 432, 441, 481, 523, 527 y 559 aumentan la actividad catalítica de un dominio  
 50 *FokI* de tipo silvestre. En particular, las mutaciones donde Pro (P) remplaza el resto de Ser (S) de tipo silvestre en la posición 418 y donde un resto de Glu (E) remplaza el resto de Lys (K) de tipo silvestre en la posición 441 (conocido como "PE", también conocido como "Sharkey") han demostrado potenciar la actividad catalítica (véase Guo et al., (2010) J. Mol Biol, doi:10.101b/j.jmb.2010.04.060). En otro aspecto, las mutaciones donde Pro (P) remplaza la Ser (S) de tipo silvestre en la posición 418, donde Leu (L) remplaza la Phe (F) de tipo silvestre en la posición 432, donde  
 55 Glu (E) remplaza la Lys (K) de tipo silvestre en la posición 441, donde His (H) remplaza la Gin (Q) de tipo silvestre en la posición 481, donde Tyr (Y) remplaza la His (H) de tipo silvestre en la posición 523, donde Asp (D) remplaza la Asn (N) de tipo silvestre en la posición 527 y Gln (Q) remplaza la Lys (K) de tipo silvestre en la posición 559 (conocido como "Sharkey", véase Guo et al., *ibid*). Por tanto, en un aspecto, el dominio *FokI* mutante puede comprender mutaciones en las posiciones 418, 441, 486 y 499. En otro aspecto, el dominio *FokI* mutante puede comprender mutaciones en las posiciones 418, 441, 490 y 538. En aspectos adicionales, el dominio *FokI* de tipo silvestre puede mutarse para que incluya mutaciones en las posiciones 418, 441, 486, 496 y 499, y/o 418, 441, 490, 537 y 538. En una realización preferida, el dominio *FokI* de tipo silvestre puede mutarse en las posiciones 418, 432, 441, 481, 483, 486, 487, 496, 499, 523, 527 y 559 y/o en las posiciones 418, 432, 441, 481, 523, 527, 559, 490, 538 y 537. En particular, las mutaciones pueden incluir mutación de la Gln (Q) de tipo silvestre en la posición 486 con Glu (E), mutación de la Ile (I) de tipo silvestre en la posición 499 con una Leu (L), mutación de la Asn (N) de tipo silvestre en la posición 496 con una Asp (D), mutación de la Ser (S) de tipo silvestre en la posición 418 con una Pro (P) y

mutación de la Lys (K) de tipo silvestre en la posición 441 con una Glu (E) (también conocido como "ELD-S" o "ELD Sharkey") y/o mutación de la Glu (E) de tipo silvestre en la posición 490 con una Lys (K), mutación de la Ile (I) de tipo silvestre en la posición 538 con una Lys (K), mutación de la His (H) de tipo silvestre en la posición 537 con una Lys (K) o Arg(R), mutación de la Ser (S) de tipo silvestre en la posición 418 con una Pro (P) y mutación de la Lys (K) de tipo silvestre en la posición 441 con un resto de Glu (E) (también conocido como KKK-S o KKR-S, o KKK-Sharkey o KKR-Sharkey). Divulgaciones adicionales abarcan S418P:F432L:K441E:Q481H:Q486E:N496D:I499L: H523Y:N527D:K559Q, también conocido como ELD-Sharkey', S418P:F432L:K441E:Q481H:E490K:H523Y:N527D:H537K o R:I538K:K559Q, también conocidos como KKK-Sharkey' o KKR-Sharkey'.

En otro aspecto, se proporcionan semidominios de escisión genomanipulados que presentan actividad condicionada (por ejemplo, dependiendo de las condiciones en que se mantienen las células). En algunas divulgaciones, los semidominios de escisión genomanipulados condicionados presentan una disminución en la actividad en condiciones de temperatura disminuida. En algunas divulgaciones, los semidominios de escisión genomanipulados condicionados presentan una disminución en la actividad en condiciones de temperatura aumentada.

En otro aspecto más, los semidominios de escisión genomanipulados pueden incorporarse en nucleasas de dedos de cinc que comprenden restos de coordinación de cinc no canónicos (por ejemplo, CCHC en lugar de la configuración C2H2 canónica, véase la publicación de patente de Estados Unidos 2003-0108880).

En otro aspecto, se proporcionan polipéptidos de fusión que comprenden un dominio de unión a ADN y un semidominio de escisión genomanipulado como se describe en este documento. En una realización preferida, el dominio de unión a ADN es un dominio de unión de dedos de cinc (por ejemplo, un dominio de unión de dedos de cinc genomanipulado).

En otro aspecto, se proporcionan polinucleótidos que codifican cualquiera de los semidominios de escisión genomanipulados o proteínas de fusión como se describe en este documento.

En otro aspecto más, también se proporcionan células que comprenden cualquiera de los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos de fusión) y/o polinucleótidos como se describe en este documento. En una realización, las células comprenden una pareja de polipéptidos de fusión, un polipéptido de fusión que comprende un semidominio de escisión ELD o ELE y un polipéptido de fusión que comprende un semidominio de escisión KKK o KKR. En otra realización, un polipéptido de fusión comprende un semidominio de escisión de DAD mientras que otro comprende el polipéptido de fusión RVR. En otras realizaciones, los polipéptidos de fusión emparejados comprenden además mutaciones en otras ubicaciones del dominio de nucleasa *FokI*. En algunas realizaciones, estos mutantes del dominio catalítico son S418P y K441E, por tanto, estos polipéptidos de fusión mutantes comprenden los dominios *FokI* mutantes enumerados a continuación:

- (a) EL-S: S418P:K441E:Q486E:I499L
- (b) KK-S: S418P:K441E:E490K:I538K
- (c) ELD-S: S418P:K441E:Q486E:N496D:I499L
- (d) KKK-S: S418P:K441E:E490K:H537K:I538K
- (e) KKR-S: S418P:K441E:E490K:H537R:I538K
- (f) DA-S: S418P:K441E:R487D:I499A
- (g) RV-S: S418P:K441E:D483R:I538V
- (h) DAD-S: S418P:K441E:R487D:N496D:I499A
- (i) RVR-S: S418P:K441E:D483R:H537R:I538V
- (j) DD-S: S418P:K441E:R487D:N496D
- (k) RR-S: S418P:K441E:D483R:H537R.

En otro aspecto más, se proporcionan métodos para escisión dirigida de cromatina celular en una región de interés; métodos para provocar que se produzca recombinación homóloga en una célula; métodos de tratamiento de infección; y/o métodos de tratamiento de enfermedad. Los métodos implican escisión de cromatina celular en una región predeterminada de interés en células expresando una pareja de polipéptidos de fusión como se describe en este documento (es decir, una pareja de polipéptidos de fusión en que un polipéptido de fusión comprende los semidominios de escisión genomanipulados como se describe en este documento).

Los semidominios de escisión genomanipulados descritos en este documento pueden usarse en métodos para escisión dirigida de cromatina celular en una región de interés y/o recombinación homóloga en una región predeterminada de interés en células. Las células incluyen células cultivadas, células en un organismo y células que se han retirado de un organismo para el tratamiento en casos donde las células y/o sus descendientes se devolverán al organismo después del tratamiento. Una región de interés en cromatina celular puede ser, por ejemplo, una secuencia genómica o parte de la misma. Las composiciones incluyen polipéptidos de fusión que comprenden un dominio de unión a ADN (por ejemplo, un dominio de unión de dedos de cinc genomanipulado) y un semidominio de escisión como se describe.

Una proteína de fusión puede expresarse en una célula, por ejemplo, suministrando la proteína de fusión a la célula o suministrando un polinucleótido que codifica la proteína de fusión a una célula, en la que el polinucleótido, si es de ADN, se transcribe, y una molécula de ARN suministrada a la célula o un transcrito de una molécula de ADN suministrada a la célula se traduce, para generar la proteína de fusión. Se presentan métodos para el suministro de polinucleótidos y polipéptidos a las células en otra parte en esta divulgación.

Por consiguiente, en una realización preferida, un método para escindir cromatina celular en una región de interés puede comprender (a) seleccionar una primera secuencia en la región de interés; (b) manipular un primer dominio de unión a ADN (por ejemplo, dominio de unión de dedos de cinc) para que se una a la primera secuencia; (c) expresar una primera proteína de fusión en la célula, comprendiendo la primera proteína de fusión el primer dominio de unión a ADN y un primer semidominio de escisión genomanipulado como se describe en este documento; y (d) expresar una segunda proteína de fusión en la célula, comprendiendo la segunda proteína de fusión un segundo dominio de unión a ADN y un segundo semidominio de escisión como se describe en este documento, en el que la primera proteína de fusión se une a la primera secuencia y la segunda proteína de fusión se une a una segunda secuencia ubicada entre 2 y 50 nucleótidos desde la primera secuencia, colocando de ese modo los semidominios de escisión genomanipulados de modo que formen un heterodímero, que es un heterodímero que escinde la cromatina celular en la región de interés.

En otros aspectos, cualquiera de los métodos descritos en este documento puede comprender (a) seleccionar una primera y segunda secuencia en una región de interés, en los que la primera y segunda secuencia están separadas entre 2 y 50 nucleótidos; (b) manipular un primer dominio de unión a ADN (por ejemplo, dominio de unión de dedos de cinc) para que se una a la primera secuencia; (c) manipular un segundo dominio de unión de dedos de cinc para que se una a la segunda secuencia; (d) expresar una primera proteína de fusión en la célula, comprendiendo la primera proteína de fusión el primer dominio de unión a ADN y un primer semidominio de escisión como se describe en este documento; € expresar una segunda proteína de fusión en la célula, comprendiendo la segunda proteína de fusión el segundo dominio de unión a ADN (por ejemplo, dominio de unión de dedos de cinc genomanipulado) y un segundo semidominio de escisión como se describe en este documento; en los que la primera proteína de fusión se une a la primera secuencia y la segunda proteína de fusión se une a la segunda secuencia, colocando de ese modo el primer y el segundo semidominio de escisión genomanipulado de modo que formen un heterodímero que escinda la cromatina celular en la región de interés. En determinadas realizaciones, la cromatina celular se escinde en uno o más sitios entre la primera y la segunda secuencia a las que se unen las proteínas de fusión.

En realizaciones adicionales, un método para la escisión de cromatina celular en una región de interés comprende (a) seleccionar la región de interés; (b) manipular un primer dominio de unión a ADN (por ejemplo, dominio de unión de dedos de cinc) para que se una a una primera secuencia en la región de interés; (c) proporcionar un segundo dominio de unión a ADN (por ejemplo, dominio de unión de dedos de cinc) que se une a una segunda secuencia en la región de interés, en el que la segunda secuencia está ubicada entre 2 y 50 nucleótidos desde la primera secuencia; (d) expresar una primera proteína de fusión en la célula, comprendiendo la primera proteína de fusión el primer dominio de unión a ADN y un primer semidominio de escisión como se describe en este documento; y (e) expresar una segunda proteína de fusión en la célula, comprendiendo la segunda proteína de fusión el segundo dominio de unión a ADN y un segundo semidominio de escisión como se describe en este documento; en el que la primera proteína de fusión se une a la primera secuencia y la segunda proteína de fusión se une a la segunda secuencia, colocando de ese modo el primer y el segundo semidominio de escisión de modo que formen un heterodímero y la cromatina celular se escinda en la región de interés.

También se proporcionan métodos de alteración de una región de cromatina celular, por ejemplo, para introducir mutaciones dirigidas. En determinadas realizaciones, los métodos de alteración de la cromatina celular comprenden introducir en la célula una o más nucleasas dirigidas para crear una rotura bicatenaria en la cromatina celular en un sitio polinucleótido y un polinucleótido donador, que tiene homología con la secuencia de nucleótidos de la cromatina celular en la región de rotura. Los procesos celulares de reparación del ADN se activan por la presencia de la rotura bicatenaria y el polinucleótido donador se usa como molde para reparar la rotura, provocando la introducción de la totalidad o parte de la secuencia de nucleótidos del donador en la cromatina celular. Por tanto, una secuencia en la cromatina celular puede alterarse y, en determinadas realizaciones, puede convertirse en una secuencia presente en un polinucleótido donador.

Las alteraciones dirigidas incluyen, aunque sin limitación, mutaciones puntuales (es decir, conversión de un único par de bases en un par de bases diferente), sustituciones (es decir, conversión de una pluralidad de pares de bases en una secuencia diferente de longitud idéntica), inserciones de uno o más pares de bases, eliminaciones de uno o más pares de bases en cualquier combinación de las alteraciones de secuencia mencionadas anteriormente.

El polinucleótido donador puede ser ADN o ARN, puede ser lineal o circular y puede ser monocatenario o bicatenario. Puede suministrarse a la célula como ácido nucleico desnudo, como un complejo con uno o más agentes de suministro (por ejemplo, liposomas, poloxámeros) o contenido en un vehículo de suministro vírico, tal como, por ejemplo, un adenovirus o virus adenoasociado (AAV). Las secuencias donadoras pueden variar en longitud de 10 a 1000 nucleótidos (o cualquier valor integral de nucleótidos entre los mismos) o más largas.

La frecuencia de recombinación homóloga puede potenciarse deteniendo las células en la fase G2 del ciclo celular y/o activando la expresión de una o más moléculas (proteína, ARN) implicadas en la recombinación homóloga y/o inhibiendo la expresión o la actividad de proteínas implicadas en la unión de extremos no homólogos.

- 5 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el segundo dominio de unión de dedos de cinc puede manipularse para que se una a la segunda secuencia.

Además, en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las proteínas de fusión pueden estar codificadas por un único polinucleótido.

- 10 Para cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la cromatina celular puede estar en un cromosoma, episoma o genoma de orgánulo. La cromatina celular puede estar presente en cualquier tipo de célula incluyendo, aunque sin limitación, células procariotas y eucariotas, células fúngicas, células vegetales, células animales, células de mamífero, células de primate y células humanas.

- 15 En algunos aspectos, los métodos proporcionan organismos que comprenden proteínas de fusión con actividad *Fok1* condicionada, que comprenden las mutaciones descritas en este documento. En algunas divulgaciones, estos organismos son plantas. Estos métodos también se refieren a los tejidos de dichas plantas, incluyendo semillas.

- 20 En otras divulgaciones, se proporciona un método para la escisión de cromatina celular en dos o más regiones de interés. El método comprende (a) seleccionar la primera región de interés; (b) manipular un primer dominio de unión a ADN (por ejemplo, dominio de unión de dedos de cinc) para que se una a una primera secuencia en la primera región de interés; (c) proporcionar o manipular un segundo dominio de unión a ADN (por ejemplo, dominio de unión de dedos de cinc) que se une a una segunda secuencia en la primera región de interés, en el que la segunda secuencia está ubicada entre 2 y 50 nucleótidos desde la primera secuencia; (d) seleccionar la segunda región de interés; (e) proporcionar o manipular un tercer dominio de unión a ADN (por ejemplo, dominio de unión de dedos de cinc) para que se una a una primera secuencia en la segunda región de interés; (f) proporcionar o manipular un cuarto dominio de unión a ADN (por ejemplo, dominio de unión de dedos de cinc) que se une a una segunda secuencia en la segunda región de interés, en el que la segunda secuencia está ubicada entre 2 y 50 nucleótidos desde la primera secuencia; (g) expresar una primera proteína de fusión en la célula, comprendiendo la primera proteína de fusión el primer dominio de unión a ADN y un primer semidominio de escisión como se describe en este documento; y (h) expresar una segunda proteína de fusión en la célula, comprendiendo la segunda proteína de fusión el segundo dominio de unión a ADN y un segundo semidominio de escisión como se describe en este documento; en el que la primera proteína de fusión se une a la primera secuencia y la segunda proteína de fusión se une a la segunda secuencia, colocando de ese modo el primer y el segundo semidominio de escisión de modo que formen un heterodímero y la cromatina celular se escinda en la primera región de interés, (i) expresar una tercera proteína de fusión en la célula, comprendiendo la tercera proteína de fusión el tercer dominio de unión a ADN y un tercer semidominio de escisión como se describe en este documento y (j) expresar una cuarta proteína de fusión en la célula, comprendiendo la cuarta proteína el cuarto dominio de unión a ADN y un cuarto semidominio de escisión como se describe en este documento; en el que la tercera proteína de fusión se une a la primera secuencia en la segunda región de interés y la cuarta proteína de fusión se une a la segunda secuencia en la segunda región de interés, colocando de ese modo el tercer y el cuarto semidominio de escisión de modo que formen un heterodímero y se escinda la cromatina celular en la segunda región de interés.

- 45 Además, en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se manipula al menos un dominio de unión de dedos de cinc, por ejemplo, por métodos de diseño o de selección.

### Breve descripción de los dibujos

- 50 La **figura 1**, paneles A y B, representan la actividad de escisión de nucleasas de dedos de cinc que comprenden los mutantes del dominio de escisión indicados como se describe en este documento sobre un intervalo de temperaturas de los mutantes aislados. La figura 1A muestra los resultados cuando una cepa indicadora de levaduras se transformó con los vectores de mutante aislados, divididos en tres cultivos, e incubados a 22 °C, 30 °C y 37 °C. Después de la inducción de ZFN, se determinó la actividad de los mutantes y se presentó como una fracción de ZFN de tipo silvestre. La figura 1B muestra la expresión de ZFN mutante controlada por transferencia Western usando el anticuerpo antiFLAG. Para verificar una igual carga de proteína, se realizó transferencia Western de anticuerpo antiHistona 3 (anti-H3).

- 60 La **figura 2**, paneles A y B, representan la actividad de las variantes de ZFN ELD:KKK ELD:KKR en el fondo de ZFN específico de *53BPI*. La figura 2A representa la actividad de las construcciones de variante de ZFN específicas de *53BPI* que se nucleofectaron en células K562. Las células se recogieron 3 días después de la transfección. Se ensayaron dos cultivos de cada combinación (por ejemplo, EL/KK 5 y 6). Se usó el ensayo de Cel-1 (Surveyor™, Transgenomic) para determinar la frecuencia de inserciones y eliminaciones inducidas por ZFN (% de indel), mostrada en la figura 2A en la parte inferior de cada carril. Los indel inducidos por ZFN son una consecuencia de una rotura bicatenaria (DSB) como resultado de la escisión por ZFN del ADN, que después va seguido por reparación por la célula usando el proceso de unión de extremos no homólogos (NHEJ), que puede insertar o

eliminar pequeñas partes de ADN en el sitio de rotura durante la reparación. Las flechas indican los tamaños esperados de las bandas después de escisión por Cel-1. También se cultivó una alícuota de las células durante una semana adicional para determinar la estabilidad de las células modificadas en cultivos prolongados (día 10). La figura 2B representa la expresión de ZFN controlada por transferencia Western usando el anticuerpo antiFLAG. Como control de carga, se usó p65 anti-NFκB.

La **figura 3**, paneles A y B, muestran la actividad de mutantes en el fondo de ZFN específico de *KDR*. La figura 3A representa los resultados de ensayos de actividad de Cel-1 de parejas de ZFN específico de *KDR* en células K562, controlada en 3 y 20 días después de la nucleofección. La pareja de ZFN con los mutantes de *FokI* indicados usados en cada carril se muestra encima del carril y la actividad detectada por el ensayo de Cel-1 (como se describe anteriormente para la figura 2) se muestra en la parte inferior. GFP indica un control negativo. Las variantes de ZFN *FokI* ELD:KKK y ELD:KKR son más activas que ZFN heterodimérica obligada original (EL:KK). La figura 3B representa el control de la expresión de ZFN y la carga de proteína como se describe anteriormente para la figura 1.

La **figura 4** representa la actividad de las variantes de ZFN ELD:KKK y ELD:KKR en el fondo de ZFN específico de *GR*, donde la actividad se determina por el ensayo de Cel-1 como se describe anteriormente para la figura 2. La figura muestra los resultados de dos conjuntos de muestras para cada condición. Los carriles 1-14 son un conjunto y los carriles 15-26 son el otro conjunto. Los mutantes novedosos son más activos que la EL:KK heterodimérica obligada original a la hora de limitar las dosis de ZFN para ZFN altamente activas (compárense el carril 8 con los carriles 9 y 10 y el carril 20 con los carriles 21 y 22). Cantidades decrecientes de ZFN dirigidas a *GR* (mostradas a lo largo de la parte superior del panel) se nucleofectaron en K562, estas células se recogieron 3 días después de la transfección y se usó el ensayo de Cel-1 para determinar la frecuencia de indel inducidas por ZFN.

La **figura 5**, paneles A y B, representan la actividad de mutantes en tres parejas de ZFN específica de *RIPK1* diferentes (parejas A, B y C). La figura 5A representa ensayos de actividad de Cel-1 (como se describe anteriormente para la figura 2) para dos parejas de ZFN diferentes dirigidas al gen *RIPK1* (A y B) que nucleofectaron en células K562. Las células se recogieron 3 días después de la transfección y los ensayos se usaron para determinar la frecuencia de inserciones y eliminaciones (indel) inducidas por ZFN. El porcentaje de indel se muestra en la parte inferior de cada carril. La figura 5B muestra los resultados cuando se nucleofectaron células K562 con una tercera pareja de vectores de expresión de ZFN (C) dirigido al gen *RIPK1* e incubado durante 3 días a 37 °C (panel de la izquierda) o a 30 °C (panel de la derecha).

La **figura 6**, paneles A y B, muestran los resultados del ensayo de actividad de Cel-1 (como se describe anteriormente para la figura 2) de parejas de ZFN específica de *CCR-5* (véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0159996). La figura 6A muestra la actividad de homodimerización forzada de ZFN dirigidas a *CCR5* después de nucleofección de las variantes de *FokI* indicadas en células K562 usando el ensayo de Cel-1 para determinar la frecuencia de indel inducidas por ZFN en la diana heterodimérica *CCR5*, un sitio inespecífico homodimérico de ZFN *CCR5-L* (ABLIM2) y un sitio inespecífico homodimérico *CCR5-R* (PGC). La figura 6B representa el control de la expresión de ZFN y la carga de proteína como se describe anteriormente para la figura 1.

La **figura 7**, paneles A y B muestran los resultados de los ensayos de actividad de Cel-1 (como se describe anteriormente para la figura 2) de las variantes de *CCR5* descritas en la figura 6. La figura 7A representa los resultados de actividad de Cel-1 usando cantidades decrecientes de las variantes de *FokI* EL y ELD de *CCR5*. Estas construcciones se nucleofectaron en K562 y se usó el ensayo de Cel-1 para determinar la frecuencia de indel inducidas por ZFN en el sitio heterodímero *CCR5*. La figura 7B representa el control de la expresión de ZFN y la carga de proteína como se describe anteriormente para la figura 1.

La **figura 8**, paneles A y B, muestran los resultados del ensayo de actividad de Cel-1 de homodimerización forzada de mutantes del fondo ZFN específico de *GR*. La figura 8A representa los resultados de Cel-1 después de homodimerización forzada de ZFN dirigidas a *GR* después de nucleofección de las variantes de *FokI* indicadas en células K562 para determinar la frecuencia de indel inducidas por ZFN en el sitio heterodimérico *GR*. No se pudieron detectar indel en este ensayo en muestras distintas del tipo silvestre. La figura 8B representa el control de la expresión de ZFN y la carga de proteína como se describe anteriormente para la figura 1.

La **figura 9** representa los datos de citometría de flujo para células K562 tratadas con las construcciones indicadas en el fondo de ZFN dirigido a *GR* teñido con anticuerpos contra γ-H2AX que están dirigidos a DSB. Se indica el porcentaje de células positivas. El porcentaje de DSB observado para todas las parejas mutantes de *FokI* fue mucho menor que para *FokI* de tipo silvestre.

La **figura 10**, paneles A y B, representan la actividad de los mutantes de ZFN novedosos en células primarias. La figura 10A muestra los resultados del ensayo de actividad de Cel-1 (como se describe anteriormente para la figura 2) usando cantidades decrecientes de ZFN dirigidas a *CCR5* que se nucleofectaron en PBMC. Estas células se recogieron 3 días después de la transfección y se usó el ensayo de Cel-1 para determinar la frecuencia de indel inducidas por ZFN. La figura 10B representa los resultados en un gráfico de barras con tres parejas de ZFN diferentes (ZFN A, ZFN B y ZFN C, véase ejemplo 5) que están dirigidas al gen *PD1* que se nucleofectó por duplicado en PBMC. Las células se recogieron 3 y 10 días después de la transfección y se usó el ensayo de Cel-1

para determinar la frecuencia de indel inducidas por ZFN. El gráfico muestra los valores medios y las barras de error de las transfecciones duplicadas.

5 La **figura 11**, paneles A a C, representan la actividad de los mutantes de ZFN novedosos. La figura 11A muestra los resultados del ensayo de actividad de Cel-1 usando cantidades decrecientes de ZFN dirigidas a GR que se nucleofectaron en PBMC. Las células se recogieron 3 y 10 días después de la transfección y se usó el ensayo de Cel-1 para determinar la frecuencia de indel inducidas por ZFN. La figura 11B representa un gráfico de barras que muestra los valores medios +/- e.t.m. (error típico de la media) de las actividades relativas de las ZFN indicadas de seis transfecciones independientes en PBMC. Los valores P usan el ensayo de la T de dos muestras calculado por  
10 MicroCal Origins versión 7.5 (OriginLab®), que muestra la significación de las actividades indicadas con respecto a la variante EL-KK. La figura 11C representa el uso de las parejas de ZFN específicas de GR EL/KK y ELD/KKR nucleofectadas en células K562 para promover la integración dirigida de un ácido nucleico donador. El donador en este experimento comprendía un sitio de restricción BamHI novedoso de modo que tras la integración dirigida del ADN, un producción de amplificación de PCR de la zona diana podía cortarse por la enzima de restricción BamHI si se había producido TI. Los datos muestran que la pareja mutante de *FokI* ELD/KKR era más eficaz en promover TI que la pareja mutante de *FokI* EL/KK.

20 La **figura 12**, paneles A y B, representan la actividad de mutantes de *FokI* específicos para GR o CCR5. La figura 12A muestra los resultados del ensayo de actividad de Cel-I (como se describe anteriormente para la figura 2) usando mutantes de *FokI* de ZFN dirigidas a GR que se nucleofectaron en células K562. Véase la tabla 4 para una descripción específica de las ubicaciones de los aminoácidos mutados. La figura 12B resultados similares para ZFN dirigidas a CCR5. Los resultados demuestran que la pareja DA/RV es la menos activa de todas las parejas mutantes de *FokI* ensayadas.

25 La **figura 13** representa la actividad observada cuando se realiza homodimerización forzada de las parejas de *FokI*. La actividad se mide por el ensayo de actividad de Cel-1 (como se describe anteriormente para la figura 2). Las ZFN mostradas en la figura 13 son específicas para GR, y como puede observarse de la figura, el mutante de *FokI* KV es el único en este conjunto que muestra actividad de homodimerización apreciable.

30 La **figura 14** representa la actividad medida por el ensayo de actividad de Cel-I (descrito anteriormente para la figura 2) observada para la pareja de DA/RV potenciada que se ha modificado adicionalmente con mutaciones de *FokI* adicionales. La figura representa los resultados para parejas de ZFN específicas de CCR5 y también para las específicas de CXCR4, en las que el dominio *FokI* se ha alterado. Como puede observarse en los resultados, la mutación adicional aumenta la actividad del mutante DA/RV aproximadamente 2 veces.

35 La **figura 15** representa la actividad Cel-I de la pareja DA/RV potenciada DAD/RVR en un fondo de ZFN específico de KDR. La pareja de ZFN específica de KDR tiene actividad más débil para empezar, y los datos demuestran que el mutante DAD/RVR aún no tiene actividad detectable en este ensayo y por tanto es similar a la pareja DA/RV. En comparación, la pareja mutante de *FokI* de ZFN específica de KDR ELD/KKR muestra actividad (18-21 % de indel detectada).

45 La **figura 16** representa los resultados después de nucleofección de las células K562 con dos conjuntos de parejas de ZFN, específicos para CCR5 y CXCR4. El panel superior muestra los resultados del ensayo de Cel-I (como se describe anteriormente para la figura 2) para la diana CCR5 y el panel inferior muestra resultados similares para la diana CXCR4. Este experimento se realizó usando dos condiciones de incubación paralelas, variando únicamente que un conjunto se mantenía únicamente a 37 °C mientras que el otro conjunto se mantenía a 30 °C durante 3 días. La figura muestra que ambas parejas de ZFN eran simultáneamente activas.

50 La **figura 17** representa los resultados de escisión del ensayo de Cel-I en células K562 como anteriormente para la figura 16 excepto en que se analizaron cuatro sitios inespecíficos potenciales (n.º 3, n.º 5, n.º 7 y n.º 10) para la actividad de escisión. El experimento fue como anteriormente con dos condiciones de incubación. La combinación de la pareja mutante de *FokI* ELD/KKR-CCR5 con la pareja mutante de *FokI* DAD/RVR de CXCR4 dio actividad indetectable contra estas 4 dianas inespecíficas en este ensayo.

55 La **figura 18** representa los resultados de los mutantes de *FokI* descritos en esta invención en combinación con el mutante Sharkey (véase la tabla 4, y Guo *et al.*, *ibid*) ensayado para la actividad usando el ensayo de Cel-I. Las parejas de mutantes de *FokI* ensayadas fueron específicas para KDR (paneles superiores) o GR (paneles inferiores). La presencia de la mutación Sharkey parece aumentar la actividad de los otros mutantes de *FokI*.

60 La **figura 19** representa los resultados de actividad de los mutantes de *FokI* descritos en esta invención en combinación con el mutante Sharkey (véase la tabla 4, y Guo *et al.*, *ibid*) ensayado para la actividad usando el ensayo de Cel-I. Las parejas mutantes de *FokI* de ZFN ensayadas eran específicas para GR. La presencia de la mutación Sharkey parece aumentar la actividad de los otros mutantes de *FokI*. La figura 19A muestra los resultados aditivos de los mutantes de *FokI*, y la figura 19B muestra los resultados del control de la expresión y la cargar en gel  
65 como se describe para el ejemplo 1.



La **figura 20**, paneles A a D, representan los resultados de actividad de diversos mutantes de *FokI* + mutantes de *FokI* Sharkey que se fuerzan a homodimerizar como se ensaya por el ensayo de Cel-I. Como se muestra, los mutantes de *FokI* no forman complejos homodiméricos activos. Las figuras 20A y 20C muestran los resultados aditivos de los mutantes de *FokI*, y las figuras 20B y 20D muestran los resultados del control de la expresión y la carga en gel como se describe para el ejemplo 1.

La **figura 21**, paneles A y B, representan los resultados de actividad de los mutantes de *FokI* D:R y DD:RR en el contexto de las ZFN indicadas ensayadas por el ensayo de Cel-I. La figura 21B muestra los resultados del control de la expresión y la carga en gel como se describe para el ejemplo 1.

La **figura 22**, paneles A y B, representan los resultados de actividad de los diversos mutantes de *FokI* en el contexto de las ZFN indicadas a 37 °C (figura 22A) o 30 °C (figura 22B) ensayadas por el ensayo de Cel-I. El porcentaje de los indel se indica por debajo de los carriles.

## Descripción detallada

En este documento se divulgan semidominios de escisión genomanipulados y polipéptidos de fusión que comprenden estos semidominios de escisión genomanipulados útiles para escisión dirigida de cromatina celular y para alteración dirigida de una secuencia de nucleótidos celular, por ejemplo, por escisión dirigida seguida de unión de extremos no homólogos o por escisión dirigida seguida de recombinación homóloga entre un polinucleótido exógeno (que comprende una o más regiones de homología con la secuencia de nucleótidos celular) y una secuencia genómica.

Los semidominios de escisión genomanipulados ejemplares se muestran en la tabla 4. Las variantes incluyen mutaciones de modo que formen heterodímeros entre sí, pero no homodímeros. Esto aumenta la especificidad de escisión del ADN y/o aumenta la concentración del complejo pretendido (reduciendo o eliminando la competición de homodímeros). Cuando se incorporan en proteínas de fusión de nucleasa de dedos de cinc, estas variantes inducen la modificación génica en la diana pretendida (tanto en un locus endógeno como cuando se ensaya usando un ensayo indicador de GFP integrado) mientras se reduce significativamente la escisión de ADN en todo el genoma en comparación con los semidominios de escisión de tipo silvestre.

Por tanto, los semidominios de escisión genomanipulados descritos en este documento confieren significativamente función homodimérica, ya que forzar que dos copias de la misma variante interactúen reduce o anula la modificación génica. La función homodimérica reducida proporciona especificidad de escisión de ZFN mejorada *in vivo*, sin ninguna disminución en su expresión de ZFN o la capacidad de estimular la modificación del sitio diana deseado.

Además, en este documento se divulgan semidominios de escisión genomanipulados con actividad condicionada. Estos mutantes condicionados pueden actuar como homodímeros o heterodímeros, dependiendo del diseño. En determinadas divulgaciones, la actividad condicionada se refiere a un cambio en la actividad de escisión basado en la temperatura. Por tanto, estos mutantes condicionados pueden usarse en el desarrollo de líneas celulares u organismos completos tales como plantas, en las que puede inducirse actividad de escisión por el investigador a determinadas temperaturas mientras se mantiene en suspenso a otras temperaturas.

## General

La práctica de los métodos, así como la preparación y el uso de las composiciones divulgadas en este documento emplean, salvo que se indique otra cosa, técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, estructura y análisis de la cromatina, química computacional, cultivo celular, ADN recombinante y campos relacionados que pertenecen a las habilidades de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 y tercera edición, 2001; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; la serie METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Tercera edición, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; y METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

## Definiciones

Las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a un polímero desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico, en conformación lineal o circular, y en forma monocatenaria o bicatenaria. Para los fines de la presente divulgación, estos términos no deben interpretarse como limitantes con respecto a la longitud de un polímero. Los términos pueden abarcar análogos conocidos de nucleótidos naturales, así como nucleótidos que están modificados en la base, el glúcido y/o los restos fosfato (por ejemplo, estructuras fosforotioato). En general, un análogo de un nucleótido particular tiene la misma especificidad de emparejamiento de bases; es decir, un análogo de A formará parejas de bases con T.

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

5 "Unión" se refiere a una interacción no covalente específica de secuencia entre macromoléculas (por ejemplo, entre una proteína y un ácido nucleico). No todos los componentes de una interacción de unión tienen que ser específicos de secuencia (por ejemplo, contactos con los restos de fosfato en una estructura de ADN), siempre que la interacción como conjunto sea específica de secuencia. Dichas interacciones en general se caracterizan por una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $10^{-6}$  M<sup>-1</sup> o inferior. "Afinidad" se refiere a la fuerza de la unión: estando correlacionada la afinidad de unión aumentada con una menor  $K_d$ .

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

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

25 Los dominios de unión de dedos de cinc pueden "manipularse" para que se unan a una secuencia de nucleótidos predeterminada. Ejemplos no limitantes de métodos para manipular proteínas de dedos de cinc son diseño y selección. Una proteína de dedos de cinc diseñada es una proteína que no existe en la naturaleza cuyo diseño/composición es el resultado principalmente de criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen aplicación de normas de sustitución y algoritmos informáticos para procesar la información en una base de datos que almacena información de diseños y datos de unión de ZFP existentes. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 6 140 081; 6 453 242; y 6 534 261; véase también los documentos WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496.

35 Una proteína de dedos de cinc "seleccionada" es una proteína que no se encuentra en la naturaleza, cuya producción es el resultado principalmente de un proceso empírico tal como presentación en fagos, retención de interacción o selección de híbrido. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5 789 538; US 5 925 523; US 6 007 988; US 6 013 453; US 6 200 759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970, WO 01/88197 y WO 02/099084.

40 El término "secuencia" se refiere a una secuencia de nucleótidos de cualquier longitud, que puede ser ADN o ARN; puede ser lineal, circular o ramificada y puede ser monocatenaria o bicatenaria. La expresión "secuencia donadora" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se inserta en un genoma. Una secuencia donadora puede ser de cualquier longitud, por ejemplo, entre 2 y 10 000 nucleótidos de longitud (o cualquier valor entero entre ellos o por encima de ellos), preferiblemente entre aproximadamente 100 y 1000 nucleótidos de longitud (o cualquier número entero entre ellos), más preferiblemente entre aproximadamente 200 y 500 nucleótidos de longitud.

45 Una "secuencia no idéntica homóloga" se refiere a una primera secuencia que comparte un grado de identidad de secuencia con una segunda secuencia, pero cuya secuencia no es idéntica a la de la segunda secuencia. Por ejemplo, un polinucleótido que comprende la secuencia de tipo silvestre de un gen mutante es homólogo y no idéntico a la secuencia del gen mutante. En determinadas realizaciones, el grado de homología entre las dos secuencias es suficiente para permitir la recombinación homóloga entre ellas, utilizando mecanismos celulares normales. Dos secuencias no idénticas homólogas pueden ser de cualquier longitud y su grado de ausencia de homología puede ser tan pequeña como de un único nucleótido (por ejemplo, para la corrección de una mutación puntual genómica por recombinación homóloga dirigida) o tan grande como de 10 o más kilobases (por ejemplo, para la inserción de un gen en un sitio ectópico predeterminado en un cromosoma). Dos polinucleótidos que comprenden las secuencias no idénticas homólogas no tienen que ser de la misma longitud. Por ejemplo, puede usarse un polinucleótido exógeno (es decir, polinucleótido donador) de entre 20 y 10 000 nucleótidos o pares de nucleótidos.

50 Las técnicas para determinar la identidad de secuencia de ácido nucleico y aminoácidos son conocidas en la técnica. Típicamente, dichas técnicas incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ARNm para un gen y/o determinar la secuencia de aminoácidos codificada por la misma, y comparar estas secuencias con una segunda secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Las secuencias genómicas también pueden determinarse y compararse de este modo. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido

de dos polinucleótidos o secuencias polipeptídicas, respectivamente. Dos o más secuencias (polinucleótidas o de aminoácidos) pueden compararse determinando su porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad de dos secuencias, ya sean secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de las secuencias más cortas y multiplicado por 100. Típicamente, los porcentajes de identidad entre secuencias son de al menos un 70-75 %, preferiblemente un 80-82 %, más preferiblemente de un 85-90 %, incluso más preferiblemente un 92 %, aun más preferiblemente un 95 % y mucho más preferiblemente un 98 % de identidad de secuencia.

Como alternativa, el grado de similitud de secuencia entre polinucleótidos puede determinarse por hibridación de polinucleótidos en condiciones que permitan la formación de dobles hélices estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con una o más nucleasas específicas monocatenarias, y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Dos secuencias de ácido nucleico, o dos secuencias polipeptídicas, son sustancialmente homólogas entre sí cuando las secuencias muestran al menos aproximadamente un 70 %-75 %, preferiblemente un 80 %-82 %, más preferiblemente un 85 %-90 %, incluso más preferiblemente un 92 %, aun más preferiblemente un 95 % y mucho más preferiblemente un 98 % de identidad de secuencia sobre una longitud definida de las moléculas, determinada usando los métodos anteriores. Como se usa en este documento, sustancialmente homólogas también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con una secuencia de ADN o polipeptídica específica.

"Recombinación" se refiere a un proceso de intercambio de información genética entre dos polinucleótidos. Para los fines de esta divulgación, "recombinación homóloga (HR)" se refiere a la forma especializada de dicho intercambio que tiene lugar, por ejemplo, durante la reparación de roturas bicatenarias en células. Este proceso requiere homología de secuencia de nucleótidos, usa una molécula "donadora" para reparar frente a un molde una molécula "diana" (es decir, la que experimenta la rotura bicatenaria), y se conoce de forma variada como "conversión génica sin entrecruzamiento" o "conversión génica de tramo corto", porque da lugar a la transferencia de información genética del donador a la diana. Sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna, dicha transferencia puede implicar la corrección de emparejamientos incorrectos de ADN de doble hélice heterogénea que se forma entre la diana rota y el donador, y/o "hibridación de hebras dependiente de síntesis", en que el donador se usa para volver a sintetizar información genética que llegará a ser parte de la diana, y/o procesos relacionados. Dicha HR especializada a menudo provoca una alteración de la secuencia de la molécula diana de modo que parte o toda la secuencia del polinucleótido donador se incorpora en el polinucleótido diana.

"Escisión" se refiere a la rotura de la estructura covalente de una molécula de ADN. La escisión puede iniciarse por una diversidad de métodos incluyendo, aunque sin limitación, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Es posible tanto escisión monocatenaria como escisión bicatenaria, y puede producirse escisión bicatenaria como resultado de dos eventos de escisión monocatenarios distintos. La escisión del ADN puede provocar la producción de extremos romos o extremos cohesivos. En determinadas realizaciones, se usan polipéptidos de fusión para escisión de ADN bicatenaria dirigida.

Un "semidominio de escisión" es una secuencia polipeptídica que, junto con un segundo polipéptido (idéntico o diferente) forma un complejo que tiene actividad de escisión (preferiblemente actividad de escisión bicatenaria). Las expresiones "primer y segundo semidominio de escisión", "semidominios de escisión + y -" y "semidominios de escisión derecho e izquierdo" se usan indistintamente para hacer referencia a parejas de semidominios de escisión que dimerizan.

Un "semidominio de escisión genomanipulado" es un semidominio de escisión que se ha modificado para que forme heterodímeros obligados con otros semidominio de escisión (por ejemplo, otro semidominio de escisión genomanipulado).

Una "mutación condicionada" es una mutación que tiene actividad de escisión de tipo silvestre en determinadas condiciones ambientales permisivas y una actividad de escisión mutante en determinadas condiciones restrictivas. Las mutaciones condicionadas pueden ser sensibles al frío, donde la mutación provoca una actividad de escisión alterada a temperaturas más frías, pero tras exposición a temperaturas más calientes, la actividad de escisión vuelve más o menos al tipo silvestre. A la inversa, las mutaciones condicionadas pueden ser sensibles al calor (a menudo llamadas "termosensibles") donde la actividad de escisión de tipo silvestre se observa a temperaturas más frías, pero queda alterada tras la exposición a temperaturas más calientes. La actividad de escisión alterada puede manifestarse como actividad aumentada o disminuida.

"Cromatina" es la estructura nucleoproteínica que comprende el genoma celular. La cromatina celular comprende ácido nucleico, principalmente ADN y proteína, incluyendo histonas y proteínas cromosómicas que no son histonas. La mayoría de la cromatina celular eucariota existe en forma de nucleosomas, en los que un centro de nucleosoma comprende aproximadamente 150 pares de bases de ADN asociadas con un octámero que comprende dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4; y ADN conector (de longitud variable dependiendo del organismo) se extiende entre los centros de nucleosoma. Una molécula de histona HI en general está asociada con el ADN conector. Para los fines de la presente divulgación, se entiende que el término "cromatina" abarca todos los tipos de nucleoproteína celular, tanto procaríota como eucariota. La cromatina celular incluye tanto cromatina cromosómica como cromatina episómica.

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

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

10 Una "región accesible" es un sitio en la cromatina celular en que un sitio diana presente en el ácido nucleico puede unirse por una molécula exógena que reconoce el sitio diana. Sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna, se cree que una región accesible es una que no se compacta en una estructura nucleosómica. La estructura distintiva de una región accesible a menudo puede detectarse por su sensibilidad a sondas químicas y enzimáticas, por ejemplo, nucleasas.

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

20 Una molécula "exógena" es una molécula que normalmente no está presente en una célula, pero puede introducirse en una célula mediante uno o más métodos genéticos, bioquímicos u otros. La "presencia normal en la célula" se determina con respecto a la fase del desarrollo particular y condiciones ambientales de la célula. Por tanto, por ejemplo, una molécula que está presente únicamente durante el desarrollo embrionario del músculo es una molécula exógena con respecto a una célula muscular adulta. Asimismo, una molécula inducida por choque térmico es una molécula exógena con respecto a una célula no sometida a choque térmico. Una molécula exógena puede comprender, por ejemplo, una versión que funciona de una molécula endógena que funciona incorrectamente o una versión que funciona incorrectamente de una molécula endógena que funciona normalmente.

30 Una molécula exógena puede ser, entre otras cosas, una molécula pequeña, tal como se genera por un proceso de química combinatoria, o una macromolécula tal como una proteína, ácido nucleico, glúcido, lípido, glucoproteína, lipoproteína, polisacárido, cualquier derivado modificado de las moléculas anteriores, o cualquier complejo que comprenda una o más de las moléculas anteriores. Los ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN, pueden ser monocatenarios o bicatenarios; pueden ser lineales, ramificados o circulares; y pueden ser de cualquier longitud. Los ácidos nucleicos incluyen aquellos que pueden formar dobles hélices, así como ácidos nucleicos que forman triples hélices. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5 176 996 y 5 422 251. Las proteínas incluyen, aunque sin limitación, proteínas de unión a ADN, factores de transcripción, factores de remodelado de la cromatina, proteínas de unión a ADN metilado, polimerasas, metilasas, desmetilasas, acetilasas, desacetilasas, cinasas, fosfatasas, integrasas, recombinasas, ligasas, topoisomerasas, girasas y helicinas.

40 Una molécula exógena puede ser el mismo tipo de molécula que una molécula endógena, por ejemplo, una proteína o ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, un ácido nucleico exógeno puede comprender un genoma vírico infeccioso, un plásmido o episoma introducido en una célula, o un cromosoma que está normalmente presente en la célula. Los métodos para la introducción de moléculas exógenas en células son conocidos para los expertos en la materia e incluyen, aunque sin limitación, transferencia mediada por lípidos (por ejemplo, liposomas, incluyendo lípidos neutros y catiónicos), electroporación, inyección directa, fusión celular, bombardeo de partículas, coprecipitación con fosfato de calcio, transferencia mediada por DEAE-dextrano y transferencia mediada por vector vírico.

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

55 Una molécula de "fusión" es una molécula en que dos o más moléculas de subunidad están unidas, preferiblemente de forma covalente. Las moléculas de subunidad pueden ser el mismo tipo químico de molécula o pueden ser tipos químicos diferentes de moléculas. Ejemplos del primer tipo de molécula de fusión incluyen, aunque sin limitación, proteínas de fusión (por ejemplo, una fusión entre un dominio de unión a ADN de ZFP y un dominio de escisión) y ácidos nucleicos de escisión (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión descrita *supra*). Ejemplos del segundo tipo de molécula de fusión incluyen, aunque sin limitación, una fusión entre un ácido nucleico que forma triple hélice y un polipéptido, y una fusión entre un agente de unión al surco menor y un ácido nucleico.

60 La expresión de una proteína de fusión en una célula puede ser el resultado del suministro de la proteína de fusión a la célula o por suministro de un polinucleótido que codifica la proteína de fusión a una célula, en la que el polinucleótido se transcribe y el transcrito se traduce para generar la proteína de fusión. El ajuste en *trans*, la escisión de polipéptidos y el ligamiento de polipéptidos también pueden estar implicados en la expresión de una proteína en una célula. Se presentan métodos para el suministro de polinucleótidos y polipéptidos a las células en

otra parte en esta divulgación.

Un "gen", para los fines de la presente divulgación, incluye una región de ADN que codifica un producto génico (véase *infra*), así como todas las regiones de ADN que regulan la producción del producto génico, estén dichas  
5 secuencias reguladoras adyacentes o no a las secuencias codificantes y/o transcritas. Por consiguiente, un gen incluye, aunque sin limitarse necesariamente a, secuencias promotoras, terminadores, secuencias reguladoras de la traducción tales como sitios de unión al ribosoma y sitios internos de entrada al ribosoma, potenciadores, silenciadores, aislantes, elementos delimitantes, orígenes de replicación, sitios de adhesión a la matriz y regiones de control de locus.

"Expresión génica" se refiere a la conversión de la información, contenida en un gen, en un producto génico. Un producto génico puede ser el producto de transcripción directa de un gen (por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNr, ARN de antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína producida por la traducción de un ARNm. Los productos génicos también incluyen ARN que se modifican, por procesos tales como adición de  
15 capuchón, poliadenilación, metilación y edición, y proteínas modificadas por, por ejemplo, metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, miristilación y glucosilación.

"Modulación" de la expresión génica se refiere a un cambio en la actividad de un gen. La modulación de la expresión puede incluir, aunque sin limitación, activación génica y represión génica.

Las células "eucariotas" incluyen, aunque sin limitación, células fúngicas (tales como levaduras), células vegetales, células animales, células de mamífero y células humanas.

Una "región de interés" es cualquier región de cromatina celular tal como, por ejemplo, un gen o una secuencia no codificante dentro de o adyacente a un gen, en que se desea que se una a una molécula exógena. La unión puede ser con fines de escisión de ADN dirigida y/o recombinación dirigida. Una región de interés puede estar presente en un cromosoma, en un episoma, en un genoma organular (por ejemplo, mitocondrial, de cloroplasto) o en un genoma vírico infeccioso, por ejemplo. Una región de interés puede estar dentro de la región codificante de un gen, dentro de regiones no codificantes transcritas tales como, por ejemplo, secuencias líder, secuencias finalizadoras o intrones, o dentro de regiones no transcritas, en dirección 5' o en dirección 3' de la región codificante. Una región de interés puede ser tan pequeña como de un único par de nucleótidos o de hasta 2000 pares de nucleótidos de longitud, o cualquier valor entero de pares de nucleótidos.

Las expresiones "unión funcional" o "unido de forma funcional" (o "unido de manera funcional") se usan indistintamente con referencia a una yuxtaposición de dos o más componentes (tales como elementos de secuencia), en que los componentes se disponen de tal manera que los componentes funcionen normalmente y permitan la posibilidad de que al menos uno de los componentes puede mediar una función que se ejerce sobre al menos uno de los otros componentes. A modo de ilustración, una secuencia reguladora de la transcripción, tal como un promotor, está unida de forma funcional a una secuencia codificante si la secuencia reguladora de la transcripción controla el nivel de transcripción de la secuencia codificante en respuesta a la presencia o a la ausencia de uno o más factores reguladores de la transcripción. Una secuencia reguladora de la transcripción en general está unida de forma funcional en *cis* con una secuencia codificante, pero no tiene que estar directamente adyacente a la misma. Por ejemplo, un potenciador es una secuencia reguladora de la transcripción que está unido de forma funcional a una secuencia codificante, aunque no sea contiguo.

Con respecto a polipéptidos de fusión, la expresión "unido de forma funcional" puede hacer referencia al hecho de que cada uno de los componentes realiza la misma función en unión al otro componente que si no estuviera así unido. Por ejemplo, con respecto a un polipéptido de fusión en que se fusiona un dominio de unión a ADN de ZFP a un dominio de escisión, el dominio de unión a ADN de ZFP y el dominio de escisión están en unión funcional si, en el polipéptido de fusión, la parte del dominio de unión a ADN de ZFP puede unirse a su sitio diana y/o su sitio de unión, mientras que el dominio de escisión puede escindir el ADN en las cercanías del sitio diana.

Un "fragmento funcional" de una proteína, polipéptido o ácido nucleico es una proteína, polipéptido o ácido nucleico cuya secuencia no es idéntica a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa, pero retiene la misma función que la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa. Un fragmento funcional puede tener más, menos o el mismo número de restos que la molécula nativa correspondiente, y/o puede contener una o más sustituciones de aminoácidos o nucleótidos. Los métodos para determinar la función de un ácido nucleico (por ejemplo, función codificante, capacidad de hibridar con otro ácido nucleico) son bien conocidos en la técnica. Asimismo, los métodos para determinar la función proteínica son bien conocidos. Por ejemplo, la función de unión a ADN de un polipéptido puede determinarse, por ejemplo, por unión a filtro, desplazamiento de movilidad electroforética o ensayos de inmunoprecipitación. La escisión del ADN puede ensayarse por electroforesis en gel. Véase Ausubel *et al.*, *supra*. La capacidad de una proteína de interactuar con otra proteína puede determinarse, por ejemplo, por coimmunoprecipitación, ensayos de doble híbrido o complementación, tanto genética como bioquímica. Véanse, por ejemplo, Fields *et al.* (1989) *Nature* **340**:245-246; patente de Estados Unidos n.º 5 585 245 y documento PCT WO 98/44350.

**Semidominios de escisión genomanipulados**

Se describen semidominios de escisión genomanipulados (también denominados mutantes de dominio de dimerización) que minimizan o evitan la homodimerización, por ejemplo, en las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 20050064474; 20060188987 y 2008/0131962, incorporadas por referencia en su totalidad en este documento. Los restos aminoacídicos en las posiciones 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537 y 538 de *Fok I* son todos dianas para influir en la dimerización de los semidominios de escisión de *Fok I*. La numeración de los restos aminoacídicos en la proteína *Fok I* es de acuerdo con Wah et al., (1998) Proc Nat'l Acad Sci EE. UU. 95:10564-10569 como se muestra a continuación:

```

..SKIRTFGW VQNPQGFENL KRVVQVFDRN SKVHNEVKNI KIPTLVKESK 50 IQKELVAIMN
QHDLIYTYKE LVGTGTSIRS EAPCDAIQQA TIADQGNKKG 100 YIDNWSSDGF LRWAHALGFI
EYINKSDSFV ITDVGLAYSK SADGSAIEKE 150 ILIEAISSYP PAIRILTLE DGQHLLTKFDL
GKNLGFSGES GFTSLPEGIL 200 LDTLANAMPK DKGEIRNNWE GSSDKYARMI GGWLDKLGIV
KQGKKEFIIP 250 TLGKPDNKEF ISHAFKITGE GLKVLRRAGK STKFTRVPKR VYWEMLATNL
300 TDKEYVRTRR ALILEILIKA GSLKIEQIQD NLKKGDFDEV IETIENDIKG 350 LINTGIFIEI
KGRFYQLKDH ILQFVIPNRG VTKQLVKSEL EEKSELRHK 400 LKYVPHEYIE LIEIARNSTQ
DRILEMKVME FFMKVYGYRG KHLGGSRKPD 450 GAIYTVGSPY DYGIVVDTKA YSGGYNLPIG
QADEMQRYVE ENQTRNKHIN 500 PNEWKVVYPS SVTEPKFLFV SGHFVGNKYA QLTRLNHITN
CNGAVLSVEE 550 LLIGGEMIKA GTLTLEEVRR KFNNGEINF 579

```

En este documento se describen semidominios de escisión genomanipulados de *Fok I* que muestran actividad y especificidad aumentadas en comparación con dominios de escisión de *FokI* genomanipulados descritos previamente y/o dominios de escisión de tipo silvestre. Se muestran semidominios de escisión mutantes ejemplares en la tabla 3. Se muestran dominios de escisión genomanipulados ejemplares en la tabla 4. En determinadas realizaciones, el semidominio de escisión incluye mutaciones en al menos tres posiciones de restos aminoacídicos, en comparación con el tipo silvestre. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el semidominio de escisión incluye mutaciones en las posiciones 486, 499 y 496. En otras realizaciones, el semidominio de escisión comprende mutaciones en las posiciones 490, 538 y 537.

En una realización, la mutación en 490 reemplaza Glu (E) con Lys (K); la mutación en 538 reemplaza Ile (I) con Lys (K); la mutación en la posición 537 reemplaza His (H) con Lys (K) o Arg (R); la mutación en 486 reemplaza Gln (Q) con Glu (E); la mutación en la posición 499 reemplaza Ile (I) con Leucina (L); y la mutación en 496 reemplaza Asn (N) con Asp (D) o Glu (E). Específicamente, los semidominios de escisión genomanipulados descritos en este documento se prepararon mutando las posiciones 490 (E→K), 538 (I→K) y 537 (H→K o H→R) en un semidominio de escisión para producir semidominios de escisión genomanipulados denominados "E490K:I538K:H537K" (KKK) o "E490K:I538K:H537R" (KKR) y mutando las posiciones 486 (Q→E), 499 (I→L) o N→E) en otro semidominio de escisión para producir semidominios de escisión genomanipulados denominados "Q486E:I499L:N496E" (ELE) o "Q486E:I499L:N496D" (ELD). Los semidominios de escisión genomanipulados descritos en este documento forman mutantes heterodiméricos obligados en que se minimiza o anula la escisión aberrante, pero se mantiene la actividad en comparación con el tipo silvestre. Véanse los ejemplares.

En otras realizaciones, la mutación en la posición 487 reemplaza Arg (R) con Asp (D) y la Asn (N) en la posición 496 se reemplaza con Asp (D) (para producir R487D:N496D o "DD") en un semidominio de escisión y por mutación de la Asp (D) de tipo silvestre en la posición at position 483 en una Arg (R) y mutación de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 con Arg (R) (para producir D483R:H537R o "RR") en el otro semidominio de escisión. En otras realizaciones más, la mutación en 487 reemplaza Arg (R) con Asp (D); la mutación en la posición 499 reemplaza Ile (I) con Ala (A) y en la posición 496, la Asn (N) se reemplaza con Asp (D) (para producir "R487D:N496D:I499A" en un semidominio de escisión) y por mutación en la posición 483 (D→R), 538 (I→V) y 537 (H→R) para producir "D483R:H537R:I538V:" en el otro semidominio de escisión (o DAD y RVR).

En otras realizaciones, se generan mutaciones en otros dominios, por ejemplo, en las posiciones 418, 432, 441, 481, 523, 527 y/o 559. En determinadas realizaciones, las mutaciones generadas en las posiciones 418 y 441, por ejemplo, un reemplazo de la Ser (S) de tipo silvestre en la posición 418 con un resto de Pro (P) y el reemplazo de la Lys (K) de tipo silvestre en la posición 441 con una Glu (E), conocidas como "S418P:K441E" o "Sharkey", o donde Pro (P) reemplaza Ser (S) en 418, Leu (L) reemplaza Phe (F) en 432, Glu (E) reemplaza Lys (K) en 441, His (H) reemplaza Gln (Q) en 481, Tyr (Y) reemplaza His (H) en 523, Asp (D) reemplaza Asn (N) en 527 y Gln (Q) reemplaza Lys (K) en la posición 539, conocidas como S418P:F432L:K441E:Q481H:H523Y:N527D:K539Q o Sharkey'. Estas mutaciones pueden combinarse de cualquier manera con los dominios enumerados anteriormente para producir, por ejemplo, los siguientes mutantes de *FokI*:

- (a) EL-S: S418P:K441E:Q486E:I499L  
 (b) KK-S: S418P:K441E:E490K:I538K  
 (c) ELD-S: S418P:K441E:Q486E:N496D:I499L  
 5 (d) KKK-S: S418P:K441E:E490K:H537K:I538K  
 (e) KKR-S: S418P:K441E:E490K:H537R:I538K  
 (f) DA-S: S418P:K441E:R487D:I499A  
 (g) RV-S: S418P:K441E:D483R:I538V  
 (h) DAD-S: S418P:K441E:R487D:N496D:I499A  
 10 (i) RVR-S: S418P:K441E:D483R:H537R:I538V  
 (j) DD-S: S418P:K441E:R487D:N496D  
 (k) RR-S: S418P:K441E:D483R:H537R.

15 Los semidominios de escisión genomanipulados descritos en este documento pueden prepararse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio de semidominios de escisión de tipo silvestre (*Fok I*) como se describe en el ejemplo 5 de la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20050064474 y los ejemplos 5 y 38 de la publicación de patente internacional WO 07/014275.

### 20 **Proteínas de fusión**

Los semidominios de escisión genomanipulados descritos en este documento se usan ventajosamente en proteínas de fusión con proteínas de unión a ADN para dirigirse específicamente a sitios para escisión en cualquier célula.

25 En determinadas realizaciones, la proteína de unión a ADN comprende una proteína de dedos de cinc (ZFP). La selección de los sitio diana; las ZFP y los métodos para el diseño y la construcción de las proteínas de fusión (y polinucleótidos que codifican las mismas) son conocidos por los expertos en la materia y se describen en detalle en las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 20050064474 y 20060188987.

30 Las nucleasas (por ejemplo, ZFN) descritas en este documento pueden suministrarse a una célula diana por cualquier medio adecuado. Se describen métodos de suministro de proteínas que comprenden dedos de cinc, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 6 453 242; 6 503 717; 6 534 261; 6 599 692; 6 607 882; 6 689 558; 6 824 978; 6 933 113; 6 979 539; 7 013 219; y 7 163 824.

35 Las proteínas de fusión (nucleasas) como se describe en este documento también pueden suministrarse usando vectores que contienen secuencias que codifican una o más de las nucleasas (por ejemplo, ZFN).

Puede usarse cualquier sistema de vector incluyendo, aunque sin limitación, vectores plasmídicos, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, vectores adenovíricos, vectores poxvíricos; vectores herpesvíricos y vectores víricos adenoasociados, *etc.* Véanse, también, las patentes de Estados Unidos n.º 6 534 261; 6 607 882; 6 824 978; 6 933 113; 6 979 539; 7 013 219; y 7 163 824.

40 Pueden usarse métodos convencionales de transferencia génica de base vírica y sin base vírica para introducir ácidos nucleicos que codifican nucleasas (por ejemplo, ZFN) que comprenden dominios de escisión genomanipulados en células (por ejemplo, células de mamífero) y tejido diana. Dichos métodos también pueden usarse para administrar dichos ácidos nucleicos a células *in vitro*. En determinadas realizaciones, se administran ácidos nucleicos que codifican la una o más nucleasas para usos de genoterapia *in vivo* o *ex vivo*. Los sistemas de suministro de vector no vírico incluyen plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo y ácido nucleico en complejo con un vehículo de suministro tal como un liposoma o poloxámero. Los sistemas de suministro de vectores víricos incluyen virus de ADN y ARN, que tienen genomas episómicos o integrados después del suministro a la célula. Para una revisión de los procedimientos de genoterapia, véase Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); Nabel y Felgner, 50 *TIBTECH* 11:211-217 (1993); Mitani y Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11:167-175 (1993); Miller, *Nature* 357:455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995); Kremer y Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995); Haddada *et al.*, en *Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Böhm* (eds.) (1995); y Yu *et al.*, *Gene Therapy* 1:13-26 (1994).

55 Los métodos de suministro no vírico de ácidos nucleicos incluyen electroporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, conjugados de polimerización o lípido:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales y captación de ADN potenciada por agentes. También puede usarse sonoporación usando, por ejemplo, el sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) para el suministro de ácidos nucleicos.

60 Sistemas de suministro de ácidos nucleicos ejemplares adicionales incluyen los proporcionados por Amaxa Biosystems (Colonia, Alemania), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland) y BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA).

65 La lipofección se describe en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5 049 386; 4 946 787; y 4 897 355) y los reactivos de lipofección se venden comercialmente (por ejemplo, Transfectam™ y Lipofectin™). Los lípidos

catiónicos y neutros que son adecuados para la lipofección eficaz por reconocimiento de receptor de polinucleótidos incluyen los de Feigner, documento WO 91/17424, documento WO 91/16024. El suministro puede ser a células (administración *ex vivo*) o a tejidos diana (administración *in vivo*).

- 5 La preparación de complejos de lípido:ácido nucleico, incluyendo liposomas dirigidos tales como complejos inmunolipídicos, es bien conocida por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Cristal, *Science* 270:404-410 (1995); Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995); Behr et al., *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Remy et al., *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Gao et al., *Gene Therapy* 2:710-722 (1995); Ahmad et al., *Cancer Res.* 52:4817-4820 (1992); las patentes de Estados Unidos n.º 4 186 183, 4 217 344, 4 235 871, 4 261 975, 4 485 054, 4 501 728, 4 774 085, 4 837 028 y 4 946 787).

15 El uso de sistemas basados en virus de ARN o ADN para el suministro de ácidos nucleicos que codifican nucleasas (por ejemplo, ZFN) que comprenden semidominios de escisión genomanipulados como se describe en este documento, aprovechan procesos muy evolucionados para dirigir un virus a células específicas en el organismo y transportar la carga vírica al núcleo. Los vectores víricos pueden administrarse directamente a pacientes (*in vivo*) o pueden usarse para tratar células *in vitro* y las células modificadas se administran a los pacientes (*ex vivo*). Los sistemas basados en virus convencionales para el suministro de nucleasas como se describe en este documento incluyen, aunque sin limitación, vectores retrovíricos, lentivíricos, adenovíricos, adenoasociados, del virus de la variolovacuna y del virus del herpes simple para transferencia génica. La integración en el genoma hospedador es posible con métodos de transferencia génica retrovíricos, lentivíricos y víricos adenoasociados, que a menudo producen expresión a largo plazo del transgén insertado. Adicionalmente, se han observado altas eficacias de transducción en muchos tipos celulares y tejidos diana diferentes.

25 El tropismo de un retrovirus puede alterarse incorporando proteínas exógenas de la envuelta, expandiendo la población diana potencial de células diana. Los vectores lentivíricos son vectores retrovíricos que pueden transducir o infectar células que no están en división y típicamente producen altos títulos víricos. La selección de un sistema de transferencia génica retrovírico depende del tejido diana. Los vectores retrovíricos están compuestos de repeticiones terminales largas de acción en *cis* con capacidad de empaquetado de hasta 6-10 kb de secuencia exógena. Las LTR de acción en *cis* mínimas son suficientes para la replicación y el empaquetado de los vectores, que entonces se usan para integrar el gen terapéutico en la célula diana para proporcionar expresión transgénica permanente. Los vectores retrovíricos ampliamente usados incluyen los basados en virus de la leucemia murina (MuLV), virus de la leucemia del gibón (GaLV), virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Buchscher et al., *J. Virol.* 66:2731-2739 (1992); Johann et al., *J. Virol.* 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., *Virol.* 176:58-59 (1990); Wilson et al., *J. Virol.* 63:2374-2378 (1989); Miller et al., *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); documento PCT/US94/05700).

35 En aplicaciones en que se profiere expresión transitoria de una proteína de fusión de ZFP, pueden usarse sistemas basados en adenovirus. Los vectores basados en adenovirus tienen capacidad de eficacia de transducción muy alta en muchos tipos celulares y no requieren división celular. Con dichos vectores, se han obtenido altos títulos y altos niveles de expresión. Este vector puede producirse en grandes cantidades en un sistema relativamente simple. Los vectores víricos adenoasociados ("AAV") también se usan para transducir células con ácidos nucleicos diana, por ejemplo, en la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos, y para procedimientos de genoterapia *in vivo* y *ex vivo* (véase, por ejemplo, West et al., *Virology* 160:38-47 (1987); patente de Estados Unidos n.º 4 797 368; documento WO 93/24641; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994); Muzyczka, *J. Clin. Invest.* 94:1351 (1994). La construcción de vectores AAV recombinantes se describe en varias publicaciones, incluyendo la patente de Estados Unidos n.º 5 173 414; Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1984); Hermonat y Muzyczka, *PNAS* 81:6466-6470 (1984); y Samulski et al., *J. Virol.* 63:03822-3828 (1989).

50 Actualmente están disponibles al menos seis estrategias de vector vírico para transferencia génica en ensayos clínicos, que utilizan estrategias que implican la complementación de vectores defectuosos por genes insertados en líneas de células auxiliares para generar el agente transductor.

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

60 Los vectores víricos adenoasociados recombinantes (rAAV) son un sistema de suministro génico alternativo prometedor basado en el virus de tipo 2 adenoasociado de parvovirus defectuoso y no patógeno. Todos los vectores se obtienen de un plásmido que retiene únicamente las repeticiones terminales invertidas de 145 pb de AAV que flanquean el casete de expresión transgénica. La transferencia génica eficaz y el suministro transgénico estable debido a la integración en los genomas de la célula transducida son características clave para este sistema de vector. (Wagner et al., *Lancet* 351:9117 1702-3 (1998); Kearns et al., *Gene Ther.* 9:748-55 (1996)).

65



Los vectores adenovíricos (Ad) recombinantes de replicación defectuosa pueden producirse a alto título e infectan fácilmente varios tipos celulares diferentes. La mayoría de vectores adenovíricos se manipulan de modo que un transgén reemplaza los genes de Ad E1a, E1b y/o E3; posteriormente el vector de replicación defectuosa se propaga en células 293 humanas que suministran la función génica eliminada en *trans*. Los vectores Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos *in vivo*, incluyendo células diferenciadas que no están en división tales como las encontradas en hígado, riñón y músculo. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad de transporte. Un ejemplo del uso de un vector Ad en un ensayo clínico implicaba tratamiento con polinucleótidos para inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Sterman et al., *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9 (1998)). Ejemplos adicionales del uso de vectores adenovíricos para transferencia génica en ensayos clínicos incluyen Rosenecker et al., *Infection* 24:1 5-10 (1996); Sterman et al., *Hum. Gene Ther.* 9:7 1083-1089 (1998); Welsh et al., *Hum. Gene Ther.* 2:205-18 (1995); Alvarez et al., *Hum. Gene Ther.* 5:597-613 (1997); Topf et al., *Gene Ther.* 5:507-513 (1998); Sterman et al., *Hum. Gene Ther.* 7:1083-1089 (1998).

En determinadas realizaciones, el vector es un vector adenovírico. Por tanto, en este documento se describen vectores de adenovirus (Ad) para introducir secuencias heterólogas (por ejemplo, nucleasas de dedos de cinc (ZFN) en células.

Ejemplos no limitantes de vectores Ad que pueden usarse en la presente solicitud incluyen vectores Ad recombinantes (tales como con E1 eliminada), condicionalmente competentes para la replicación (tales como oncolíticos) y/o competentes en la replicación derivados de serotipos humanos y no humanos (por ejemplo, Ad5, Ad11, Ad35 o adenovirus-3 porcino); y/o vectores Ad quiméricos (tales como Ad5/35) o vectores Ad con tropismo alterado con proteínas de fibra (por ejemplo, knob o shaft) genomanipuladas (tales como inserciones peptídicas dentro del bucle HI de la proteína knob). También son útiles los vectores Ad "atenuados", por ejemplo, un vector Ad en que se han eliminados todos los genes adenovíricos, para reducir la inmunogenicidad y para aumentar el tamaño de la carga de ADN. Esto permite, por ejemplo, el suministro simultáneo de secuencias que codifican ZFN y una secuencia donadora. Dichos vectores atenuados son especialmente útiles cuando las secuencias donadoras incluyen transgenes grandes a integrar mediante integración dirigida.

Los vectores adenovíricos (Ad) recombinantes de replicación defectuosa pueden producirse a alto título e infectan fácilmente varios tipos celulares diferentes. La mayoría de vectores adenovíricos se manipulan de modo que un transgén reemplaza los genes de Ad E1a, E1b y/o E3; posteriormente el vector de replicación defectuosa se propaga en células que proporcionan una o más de las funciones génicas eliminadas en *trans*. Por ejemplo, las células 293 humanas suministran la función E1. Los vectores Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos *in vivo*, incluyendo células diferenciadas que no están en división tales como las encontradas en el hígado, riñón y músculo. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad de transporte. Un ejemplo del uso de un vector Ad en un ensayo clínico implicaba tratamiento con polinucleótidos para inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Sterman et al., *Hum. Gene Ther.* 7:1083-1089 (1998)).

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

En determinadas realizaciones, el vector Ad es un vector adenovírico quimérico, que contiene secuencias de dos o más genomas adenovíricos diferentes. Por ejemplo, el vector Ad puede ser un vector Ad5/35. Ad5/35 se crea reemplazando uno o más de los genes de proteína de fibra (knob, shaft, tail, penton) de Ad5 con el correspondiente gen de la proteína de fibra de un adenovirus del grupo B tal como, por ejemplo, Ad35. El vector Ad5/35 y las características de este vector se describen, por ejemplo, en Ni et al. (2005) *Hum Gene Ther* 16:664-677; Nilsson et al. (2004) *Mol Ther* 9:377-388; Nilsson et al. (2004) *J Gene Med* 6:631-641; Schroers et al. (2004) *Exp Hematol* 32:536-546; Seshidhar et al. (2003) *Virology* 311:384-393; Shayakhmetov et al. (2000) *J Virol* 74:2567-2583; y Sova et al. (2004), *Mol Ther* 9:496-509. Se usan células de empaquetado para formar partículas víricas que pueden infectar una célula hospedadora. Dichas células incluyen células 293, que empaquetan adenovirus, y células  $\psi$ 2 o células PA317, que empaquetan retrovirus. Los vectores víricos usados en genoterapia habitualmente se generan por una línea celular productora que empaqueta un vector de ácido nucleico en una partícula vírica. Los vectores típicamente contienen las secuencias víricas mínimas requeridas para el empaquetado y la posterior integración en un hospedador (si fuera aplicable), remplazándose otras secuencias víricas por un casete de expresión que codifica la proteína a expresar. Las funciones víricas perdidas se aportan en *trans* por la línea celular de empaquetado. Por ejemplo, los vectores AAV usados en genoterapia típicamente tienen solamente las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del genoma de AAV que son necesarias para el empaquetado y la integración en el genoma hospedador. El ADN vírico se empaqueta en una línea celular, que contiene un plásmido auxiliar que codifica los otros genes de AAV, concretamente *rep* y *cap*, pero que carece de las secuencias ITR. La línea celular también se infecta con adenovirus como auxiliar. El virus auxiliar promueve la replicación del vector AAV y la expresión de los genes de AAV a partir del plásmido auxiliar. El plásmido auxiliar no se empaqueta en cantidades importantes debido a la ausencia de secuencias ITR. La contaminación con adenovirus puede reducirse, por ejemplo, por tratamiento térmico al que el adenovirus es más sensible que el AAV.

En muchas aplicaciones de genoterapia, es deseable que el vector de genoterapia se suministre con un alto grado

de especificidad a un tipo tisular particular. Por consiguiente, un vector vírico puede modificarse para que tenga especificidad para un tipo celular dado expresando un ligando como una proteína de fusión con una carga de la envuelta vírica en la superficie externa del virus. El ligando se elige para que tenga afinidad por un receptor que se sabe que está presente en el tipo celular de interés. Por ejemplo, Han *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 92:9747-9751 (1995), informó de que el virus de la leucemia murina de Moloney puede modificarse para que exprese heregulina humana fusionada a gp70, y el virus recombinante infecta determinadas células de cáncer de mama humano que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. Este principio puede hacerse extensible a otras parejas de virus-célula diana, en que la célula diana expresa un receptor y el virus expresa una proteína de fusión que comprende un ligando para el receptor de superficie celular. Por ejemplo, puede manipularse un fago filamentoso para que presente fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, FAB o Fv) que tienen afinidad de unión específica por casi cualquier receptor celular elegido. Aunque la descripción anterior se aplica principalmente a vectores víricos, pueden aplicarse los mismos principios a vectores que no son víricos. Dichos vectores pueden manipularse para que contengan secuencias de captación específicas que favorecen la captación por células diana específicas.

Los vectores de genoterapia pueden suministrarse *in vivo* por administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o por aplicación tópica, como se describe a continuación. Como alternativa, los vectores pueden suministrarse a células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia tisular) o células madre hematopoyéticas donadoras universales, seguido de reimplante de las células en un paciente, habitualmente después de selección por células que hayan incorporado el vector.

La transfección celular *ex vivo* para diagnóstico, investigación o para genoterapia (por ejemplo, mediante reinfusión de las células transfectadas en el organismo hospedador) es bien conocida por los expertos en la materia. En una realización preferida, las células se aíslan del organismo del sujeto, se transfectan con un ácido nucleico de ZFN (gen o ADNc) y se vuelven a infundir de nuevo en el organismo del sujeto (por ejemplo, paciente). Diversos tipos celulares adecuados para transfección *ex vivo* son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Freshney *et al.*, *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (3.<sup>a</sup> ed. 1994)) y las referencias citadas en el mismo para un análisis sobre la manera de aislar y cultivar células de pacientes).

En una realización, se usan células madre en procedimientos *ex vivo* para transfección celular y genoterapia. La ventaja de usar células madre es que pueden diferenciarse en otros tipos celulares *in vitro*, o pueden introducirse en un mamífero (tal como el donador de las células) donde se injertarán en la médula ósea. Se conocen métodos para diferenciar células CD34+ *in vitro* en tipos de células inmunitarias clínicamente importantes usando citocinas tales como GM-CSF, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (véase Inaba *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1693-1702 (1992)).

Se aíslan células madre para transducción y diferenciación usando métodos conocidos. Por ejemplo, se aíslan células madre de células de médula ósea por selección de las células de médula ósea con anticuerpos que se unen a células indeseadas, tales como CD4+ y CD8+ (linfocitos T), CD45+ (linfocitos panB), GR-1 (granulocitos) e lad (células presentadoras de antígeno diferenciadas) (véase Inaba *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1693-1702 (1992)). En algunos casos, las células madre son células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

También pueden administrarse vectores (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, liposomas, etc.) que contienen ácidos nucleicos de ZFP terapéuticos directamente a un organismo para transducción de células *in vivo*. Como alternativa, puede administrarse ADN desnudo. La administración es por cualquiera de las vías normalmente usadas para introducir una molécula en contacto final con células sanguíneas o tisulares incluyendo, aunque sin limitación, inyección, infusión, aplicación tópica y electroporación. Están disponibles métodos adecuados de administración de dichos ácidos nucleicos y son bien conocidos por los expertos en la materia y, aunque puede usarse más de una vía para administrar una composición particular, una vía particular a menudo puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía.

Se divulgan métodos para la introducción de ADN en células madre hematopoyéticas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5 928 638. Vectores útiles para la introducción de transgenes en células madre hematopoyéticas, por ejemplo, células CD34+, incluyen adenovirus de tipo 35.

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

Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se está administrando, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas disponibles, como se describe a continuación (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17.<sup>a</sup> ed., 1989).

Como se indica anteriormente, los métodos divulgados y las composiciones pueden usarse en cualquier tipo de célula incluyendo, aunque sin limitación, células procariotas, células fúngicas, células arqueobacterianas, células vegetales, células de insecto, células animales, células de vertebrados, células de mamífero y células humanas. Las líneas celulares adecuadas para la expresión de proteínas son conocidas por los expertos en la materia e incluyen, aunque sin limitación, COS, CHO (por ejemplo, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (por ejemplo, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), perC6, células de insecto tales como *Spodoptera frugiperda* (Sf) y células fúngicas tales como *Saccharomyces*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*. También pueden usarse descendientes, variantes y derivados de estas líneas celulares.

## Aplicaciones

Los dominios de escisión divulgados se usan ventajosamente en combinación con dominios de unión a ADN tales como dominios de unión de proteínas de dedos de cinc (produciendo ZFN) para escindir ADN y minimizar la escisión en sitios inespecíficos (en comparación con los dominios de unión a ADN que comprenden dominios de escisión de tipo silvestre o de homodimerización). La escisión puede ser en una o más regiones de interés en la cromatina celular (por ejemplo, en un sitio deseado o predeterminado en un genoma, por ejemplo, en un gen, mutante o de tipo silvestre); para reemplazar una secuencia genómica (por ejemplo, una región de interés en la cromatina celular) con una secuencia homóloga no idéntica (es decir, recombinación dirigida); para eliminar una secuencia genómica por escisión del ADN en uno o más sitios en el genoma, cuyos de escisión después se unen por unión de extremos no homólogos (NHEJ); para cribar factores celulares que faciliten la recombinación homóloga; y/o para reemplazar una secuencia de tipo silvestre con una secuencia mutante, o para convertir un alelo en un alelo diferente. Diferentes métodos se describen en detalle, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20050064474; publicación de patente internacional WO 07/014275.

Por consiguiente, los semidominios de escisión genomanipulados divulgados pueden usarse en cualquier ZFN para cualquier método en que sea deseable la escisión dirigida específicamente y/o para reemplazar cualquier secuencia genómica con una secuencia homóloga no idéntica. Por ejemplo, una secuencia genómica mutante puede reemplazarse por su equivalente de tipo silvestre, proporcionando de ese modo métodos para el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades genéticas, trastornos hereditarios, cáncer y enfermedades autoinmunitarias. De un modo similar, un alelo de un gen puede reemplazarse por un alelo diferente utilizando los métodos de recombinación dirigida divulgados en este documento. De hecho, cualquier patología dependiente de una secuencia genómica particular, de cualquier manera, puede corregirse o aliviarse usando los métodos y las composiciones divulgados en este documento.

Las enfermedades genéticas ejemplares incluyen, aunque sin limitación, acondroplasia, acromatopsia, deficiencia de maltasa ácida, desaminasa de adenosina desaminasa (OMIM N.º 102700), adrenoleucodistrofia, síndrome de Aicardi, deficiencia de alfa-1 antitripsina, alfatalasemia, síndrome de insensibilidad a andrógenos, síndrome de Apert, displasia ventricular derecha arritmogénica, ataxia telangiectasia, síndrome de Barth, betatalasemia, síndrome del nevo azul, enfermedad de Canavan, enfermedades granulomatosas crónicas (CGD), síndrome del maullido del gato, fibrosis quística, enfermedad de Dercum, displasia ectodérmica, anemia de Fanconi, fibrodisplasia osificante progresiva, síndrome del X frágil, galactosemia, enfermedad de Gaucher, gangliosidosis generalizada (por ejemplo, GM1), hemocromatosis, mutación en la hemoglobina C en el 6.º codón de betaglobina (HbC), hemofilia, enfermedad de Huntington, síndrome de Hurler, hipofosfatasa, síndrome de Klinefelter, enfermedad de Krabbes, síndrome de Langer-Giedion, deficiencia de adhesión de leucocitos (LAD, OMIM N.º 116920), leucodistrofia, síndrome de QT largo, síndrome de Marfan, síndrome Moebius, mucopolisacaridosis (MPS), síndrome oncorrotuliano, diabetes insípida defrogénica, neurofibromatosis, enfermedad de Neimann-Pick, osteogénesis imperfecta, porfiria, síndrome de Prader-Willi, progeria, síndrome de Proteus, retinoblastoma, síndrome de Rett, síndrome Rubinstein-Taybi, síndrome de Sanfilippo, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), síndrome de Shwachman, enfermedad falciforme (anemia falciforme), síndrome de Smith-Magenis, síndrome de Stickler, enfermedad de Tay-Sachs, trombocitopenia, síndrome de radio ausente (TAR), síndrome de Treacher Collins, trisomía, esclerosis tuberosa, síndrome de Turner, trastorno del ciclo de la urea, enfermedad de von Hippel-Landau, síndrome de Waardenburg, el síndrome de Williams, enfermedad de Wilson, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome linfoproliferativo ligado al X (XLP, OMIM N.º 308240).

Las enfermedades ejemplares adicionales que pueden tratarse por escisión dirigida del ADN y/o recombinación homóloga incluyen inmunodeficiencias adquiridas, enfermedades de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, enfermedad de Gaucher, GM1, enfermedad de Fabry y enfermedad de Tay-Sachs), mucopolisacaridosis (por ejemplo, enfermedad de Hunter, enfermedad de Hurler), hemoglobinopatías (por ejemplo, enfermedades falciformes, HbC,  $\alpha$ -talasemia,  $\beta$ -talasemia) y hemofilias.

Dichos métodos también permiten el tratamiento de infecciones (víricas o bacterianas) en un hospedador (por ejemplo, mediante el bloqueo de la expresión de receptores víricos o bacterianos, previniendo de ese modo la infección y/o la propagación en un organismo hospedador) para tratar enfermedades genéticas.

La escisión dirigida de genomas víricos infecciosos o integrados puede usarse para tratar infecciones víricas en un

hospedador. Adicionalmente, la escisión dirigida de genes que codifican receptores para virus puede usarse para bloquear la expresión de dichos receptores, previniendo de ese modo la infección vírica y/o la propagación vírica en un organismo hospedador. La mutagénesis de genes que codifican receptores víricos (por ejemplo, los receptores CCR5 y CXCR4 para VIH) puede usarse para hacer que los receptores no puedan unirse al virus, previniendo de ese modo una nueva infección y bloqueando la propagación de infecciones existentes. Véase, la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2008/015996. Ejemplos no limitantes de virus o de receptores víricos que pueden ser diana incluyen el virus del herpes simple (HSV), tal como HSV-1 y HSV-2, virus de la varicela zóster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV) y citomegalovirus (CMV), HHV6 y HHV7. La familia de virus de la hepatitis incluye virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis delta (HDV), virus de la hepatitis E (HEV) y virus de la hepatitis G (HGV). Otros virus o sus receptores que pueden ser diana, incluyendo, aunque sin limitación, *Picornaviridae* (por ejemplo, poliovirus, etc.); *Caliciviridae*; *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la rubéola, virus del dengue, etc.); *Flaviviridae*; *Coronaviridae*; *Reoviridae*; *Birnaviridae*; *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la rabia, etc.); *Filoviridae*; *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, etc.); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe de tipos A, B y C, etc.); *Bunyaviridae*; *Arenaviridae*; *Retroviridae*; lentivirus (por ejemplo, HTLV-I; HTLV-II; VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.) VIH-II); virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), papilomavirus humano (VPH), virus de la gripe y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas. Véase, por ejemplo, *Virology*, 3.<sup>a</sup> Edición (W. K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2.<sup>a</sup> Edición (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds. 1991), para una descripción de estos y de otros virus. Los receptores para VIH, por ejemplo, incluyen CCR-5 y CXCR-4.

Por tanto, las variantes del dominio de escisión como se describe en este documento proporcionan amplia utilidad para mejorar la especificidad de ZFN en aplicaciones de modificación génica. Estos dominios de escisión variantes pueden incorporarse fácilmente en cualquier ZFN existente por mutagénesis dirigida al sitio o subclonación para mejorar la especificidad *in vivo* de cualquier dímero de ZFN.

Como se indica anteriormente, las composiciones y los métodos descritos en este documento pueden usarse para modificación génica, corrección génica y alteración génica. Ejemplos no limitantes de modificación génica incluyen integración dirigida basada en reparación dirigida por homología (HDR); corrección génica basada en HDR; modificación génica basada en HDR; alteración génica basada en HDR; alteración génica basada en NHEJ y/o combinaciones de HDR, NHEJ y/o hibridación monocatenaria (SSA). La hibridación monocatenaria (SSA) se refiere a la reparación de una rotura bicatenaria entre dos secuencias repetidas que existen en la misma orientación por extirpación de la DSB por exonucleasas 5'-3' para exponer las 2 regiones complementarias. Las hebras individuales que codifican las 2 repeticiones directas entonces se hibridan entre sí y el intermedio hibridado puede cesarse de modo que las colas monocatenarias (la parte del ADN monocatenario que no hibrida con ninguna secuencia) se digieren, los huecos se rellenan por la ADN polimerasa y los extremos de ADN se reúnen. Esto provoca la eliminación de secuencias ubicadas entre las repeticiones directas.

Las composiciones que comprenden dominios de escisión (por ejemplo, ZFN) y métodos descritos en este documento también pueden usarse en el tratamiento de diversas enfermedades genéticas y/o enfermedades infecciosas.

Las composiciones y métodos también pueden aplicarse a tratamientos basados en células madre incluyendo, aunque sin limitación: corrección de mutaciones en células somáticas por conversión génica de parche corto o integración dirigida para genoterapia monogénica; alteración de alelos negativos dominantes; alteración de genes necesarios para la entrada o la infección productiva de patógenos en células; manipulación tisular potenciada, por ejemplo, modificando la activación génica para promover la diferenciación o la formación de tejidos funcionales; y/o alteración de la actividad génica para promover la diferenciación o la formación de tejidos funcionales; bloqueo o inducción de la diferenciación, por ejemplo, por alteración de genes que bloquean la diferenciación para promover que las células madre se diferencien en una ruta de linaje específico, inserción dirigida de un gen o casete de expresión de ARNip que puede estimular la diferenciación de células madre, inserción dirigida de un gen o casete de expresión de ARNip que puede bloquear la diferenciación de células madre y permitir una mejor expansión y mantenimiento de la pluripotencia, y/o inserción dirigida de un gen indicador en el mismo marco de lectura con un gen endógeno que es un marcador de pluripotencia o estado de diferenciación que permitiría que un marcador fácil puntuara el estado de diferenciación de las células madre y la manera en que cambios en los medios, citocinas, condiciones de crecimiento, expresión de genes, expresión de moléculas de ARNip, ARNhc o miARN, exposición a anticuerpos contra marcadores de superficie celular o fármacos alteran este estado; transferencia nuclear de células somáticas, por ejemplo, pueden aislarse las células somáticas del propio paciente, modificarse el gen diana pretendido de la manera apropiada, generar los clones celulares (y controlar la calidad para asegurar la seguridad del genoma) y aislar y transferir los núcleos de estas células a óvulos no fertilizados para generar células hES específicas de paciente que podrían inyectarse directamente o diferenciarse antes de inyectarlas en el paciente, reduciendo o eliminando de este modo el rechazo tisular; células madre universales por inactivación de receptores de MHC (por ejemplo, para generar células de identidad inmunológica o completamente anulada). Los tipos celulares para este procedimiento incluyen, aunque sin limitación, linfocitos T, linfocitos B, células madre hematopoyéticas y células madre embrionarias. Adicionalmente, pueden usarse células madre pluripotentes inducidas (iPSC) que también se generarían a partir de las células somáticas del propio paciente. Por lo tanto, estas células madre o sus derivados (tipos celulares o tejidos diferenciados) podrían inyectarse potencialmente en cualquier

persona independientemente de su origen o histocompatibilidad.

Las composiciones y métodos también pueden usarse para tratamiento con células somáticas (por ejemplo, tratamiento con células autólogas y/o linfocito T universales por inactivación de MHC o receptores víricos, véase anteriormente), permitiendo de ese modo la producción de reservas de linfocitos T que se hayan modificado para potenciar sus propiedades biológicas. Dichas células pueden infundirse en una diversidad de pacientes independientemente de la fuente donadora de los linfocitos T y su histocompatibilidad con el destinatario.

Además de las aplicaciones terapéuticas, la especificidad aumentada proporcionada por las variantes descritas en este documento cuando se usan en ZFN puede usarse para mejoramiento de cultivos, manipulación de líneas celulares y la construcción de modelos de enfermedades. Los semidominios de escisión heterodiméricos obligados proporcionan un medio directo para mejorar las propiedades de ZFN, especialmente cuando la actividad homodimérica limita la eficacia.

Los semidominios de escisión genomanipulados descritos también pueden usarse en protocolos de modificación génica que requieren escisión simultánea en múltiples dianas para eliminar la región intermedia o para alterar dos locus específicos de una vez. La escisión en dos dianas requeriría expresión celular de cuatro ZFN, que potencialmente podría producir diez combinaciones de ZFN activas diferentes. Para dichas aplicaciones, la sustitución de estas variantes novedosas en el lugar del dominio de nucleasa de tipo silvestre eliminaría la actividad de las combinaciones indeseadas y reduciría las posibilidades de escisión inespecífica. Si la escisión en una determinada diana de ADN deseada requiere la actividad de la pareja de ZFN A+B, y la escisión simultánea en una segunda diana de ADN deseada requiere la actividad de la pareja de ZFN X+Y, entonces el uso de las mutaciones descritas en este documento puede evitar los emparejamientos de A con A, A con X, A con Y y así sucesivamente. Por tanto, estas mutaciones de *FokI* disminuyen la actividad de escisión no específica como resultado de formación de parejas "ilícitas" y permiten la generación de parejas de mutantes ortogonales más eficaces de ZFN (véanse las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 20080131962 y 20090305346 del mismo propietario que la presente).

Además de las aplicaciones descritas para los semidominios de escisión genomanipulados, también hay numerosas aplicaciones para las mutaciones condicionadas descritas en este documento. Las mutaciones sensibles al frío identificadas pueden usarse para crear organismos transgénicos que porten una copia integrada del ácido nucleico que codifica las mutaciones. Plantas que portan dichas mutaciones presentarían el fenotipo mutante de modo que la actividad de escisión sería quiescente a temperaturas más frías. Tras un desplazamiento a temperaturas más altas, la fusión presentaría actividad de escisión activa. Estos organismos mutantes podrían usarse para crear líneas con fines de obtención de cultivos donde podrían cruzarse líneas que contienen la mutación sensible al frío con líneas que portan una determinada diana de modo que, cuando la descendencia del cruce se cambie a temperaturas más altas, se produjera la escisión de la diana. Esto aumentaría la eficacia de dichos procesos porque reduciría el número de transformaciones en plantas con proteína donadora o de fusión que sería necesaria para conseguir un resultado deseado. También puede idearse el mismo escenario para mutantes condicionados termosensibles.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Preparación de ZFN

Se diseñaron ZFN dirigidas a *CCR5*, *53BP1*, *GR*, *KDR*, *RIPK1*, *CXCR4* y *PD-1* y se incorporaron en vectores plasmídicos esencialmente como se describe en Urnov *et al.*, (2005) *Nature* 435(7042):646-651, Perez *et al.*, (2008) *Nature Biotechnology* 26(7): 808-816, y la publicación de patente de Estados Unidos n.º: 2008/0131962 o se obtuvieron de Sigma Aldrich. Estas ZFN se construyeron y se ensayaron por ELISA y el ensayo de Cel-1 ("Cel-1") Surveyor™ (Transgenomics) como se describe en Miller *et al.*, (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:778-785 y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20050064474 y la publicación de patente internacional WO2005/014791. Además, véanse la publicación de patente de Estados Unidos n.º: 2008/0188000 para ZFN dirigidas a *GR*, y la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/281 432 que refiere a ZFN dirigidas a *PD-1*, la publicación de patente de Estados Unidos n.º: 2008/0159996 que se refiere a ZFN específicas de *CCR5* y la solicitud de patente de Estados Unidos 12/661 539 que se refiere a ZFN específicas de *CXCR4*.

Se divulgan ejemplos específicos de ZFP dirigidas a *RIPK1*, *KDR* y *53BP1* en la tabla 1. La primera columna de esta tabla es un nombre de referencia interna (número) para una ZFP. "F" se refiere al dedo y el número que sigue a "F" se refiere al número del dedo de cinc (por ejemplo, "F1" se refiere al dedo 1). La tabla 2 enumera sitios de unión diana en los genes diana. Los nucleótidos en el sitio diana que se ponen en contacto por las hélices de reconocimiento de ZFP se indican en letras mayúsculas; los nucleótidos que no entran en contacto se indican en minúscula.

**Tabla 1: Diseños de ZFP para 53BP1, KDR y RIPK1**

SBS n.º (diana)	Diseño					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
18346 (53BP1)	RSDHLST (SED ID NO: 1)	TSANLSR (SED ID NO: 2)	RSDNLSE (SED ID NO: 3)	TSGSLTR (SED ID NO: 4)	N/A	N/A
18347 (53BP1)	QSGALAR (SED ID NO: 5)	RSDNLTR (SED ID NO: 6)	QSGNLAR (SED ID NO: 7)	QSGNLAR (SED ID NO: 7)	QSGHLQR (SED ID NO: 8)	QSSDLRR (SED ID NO: 9)
19135 (KDR)	RSDLTSE (SED ID NO: 10)	TSGSLTR (SED ID NO: 4)	RSDNLSR (SED ID NO: 11)	QNAHRTT (SED ID NO: 12)	QSSNLAR (SED ID NO: 13)	RSDDLTR (SED ID NO: 14)
19136 (KDR)	DRSHLSR (SED ID NO: 15)	QSGNLAR (SED ID NO: 7)	DNPNLNR (SED ID NO: 16)	RSDDLRS (SED ID NO: 17)	RSDNLSE (SED ID NO: 3)	RNAHRIN (SED ID NO: 18)
19119 (RIPK1)	RSANLTR (SED ID NO: 19)	RSDNLSE (SED ID NO: 3)	ASKTRKN (SED ID NO: 20)	DRSNLSR (SED ID NO: 21)	TSANLSR (SED ID NO: 2)	N/A
19120 (RIPK1)	QSGALAR (SED ID NO: 5)	QSGNLAR (SED ID NO: 7)	RSDHLSA (SED ID NO: 22)	QSGHLSR (SED ID NO: 23)	N/A	N/A
19123 (RIPK1)	TSGSLSR (SED ID NO: 24)	QSSDLRR (SED ID NO: 9)	RSDLTSA (SEQ NO:25) ID	DNSNRIK (SEQ NO:26) ID	RSAALSR (SED ID NO: 27)	QSGDLTR (SED ID NO: 28)
19124 (RIPK1)	QSGHLSR (SED ID NO: 23)	RSDLSLA (SED ID NO: 29)	DRSNLTR (SED ID NO: 30)	RSDNLSQ (SED ID NO: 31)	ASNDRKK (SED ID NO: 32)	N/A
19121 (RIPK1)	RSDNLSR (SED ID NO: 11)	DSSTRKK (SED ID NO: 33)	RSDNLSV (SED ID NO: 34)	DRSHLAR (SED ID NO: 35)	QSGHLSR (SED ID NO: 23)	N/A
19122 (RIPK1)	QRSNLVR (SED ID NO: 36)	QSSDLTR (SED ID NO: 37)	GNVDLIE (SED ID NO: 38)	RSSNLSR (SED ID NO: 39)	RSDLSLV (SED ID NO: 40)	TNHNRTK (SED ID NO: 41)

**Tabla 2: Sitios diana de ZFN**

SBS n.º (diana)	Sitio diana
18346 (53BP1)	ttGTTTCAGGATTGGacacaacatcctag_ (SED ID NO: 42)
18347 (53BP1)	caGCTGGAGAAGAAcGAGGAGacggttaa_ (SED ID NO: 43)
19135 (KDR)	ctGCGGATAGTGAGGTTCCGgttcccat_ (SED ID NO: 44)
19136 (KDR)	tgAGGAAGGAGGACGAAGGCctctacac_ (SED ID NO: 45)
19119 (RIPK1, pareja A)	atGATGACGCCAGGAGcttcaccaccc_ (SED ID NO: 46)
19120 (RIPK1, pareja A)	gaGGAAGGGAAGTActccctggtgatgg_ (SED ID NO: 47)
19123 (RIPK1, pareja B)	gtGCAGTGAACCAGGCTGTTctgtggct_ (SED ID NO: 48)
19124 (RIPK1, pareja B)	gtTCCCAGgGACTTGGGAtgggtcctgt_ (SED ID NO: 49)
19121 (RIPK1, pareja C)	aaGGAGGCAAGGCCGAGgctgcatct_ (SED ID NO: 50)
19122 (RIPK1, pareja C)	aaGATGTGGAGCAAActGAAtaatgaag_ (SED ID NO: 51)

5

**Ejemplo 2: Cribado genético para ZFN *FokI* mutantes**

Usando *Saccharomyces cerevisiae* como sistema modelo, se aislaron mutantes de ZFN que presentaban un fenotipo sensible al frío con actividad de escisión que se disminuye enormemente a menor temperatura, pero adecuada a las más altas. Las mutaciones sensibles al frío son particularmente interesantes porque históricamente se ha demostrado que se producen en genes que codifican subunidades de complejos proteínicos multiméricos. Estas mutaciones afectan a las interacciones entre proteínas predominantemente a baja temperatura. Por tanto, aislar esta clase de mutantes reveló mutaciones no anuladoras que identifican restos importantes dentro de la superficie de contacto de dimerización.

10

15

La cepa indicadora de hibridación monocatenaria (SSA) y la construcción de la colección de mutantes se realizó como anteriormente. Se hizo mutagénesis aleatoria del dominio nucleasa de *FokI* usando PCR propensa a errores y la colección de mutantes se construyó por reparación de huecos en *Saccharomyces cerevisiae*. En resumen, la cepa indicadora se cotransformó con el fragmento de PCR mutagenizado (dominio *FokI*) y un vector plasmídico linealizado preparado de modo que los extremos del vector compartiera la secuencia de ADN con los extremos del fragmento de PCR. La recombinación homóloga entre el vector y el fragmento de PCR se produjo a una alta frecuencia y dio como resultado una colección de transformantes de levadura, que contenían un vector de expresión de ZFN mutado. El dominio de dedos de cinc de la nucleasa se une al gen *CCR-5* humano (denominado 8266) y se describe en detalle en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0159996.

20

25

La colección entonces se cribó o seleccionó para fenotipos de interés en levaduras de gemación, esencialmente como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2009/0111119. En resumen, se integraron dos construcciones indicadoras SSA independientes en el genoma de levadura de gemación. Ambos indicadores contenían un sitio de unión para un homodímero de la ZFN 8266. El indicador SSA *MEL1* contiene tanto marcadores

de selección positivos como marcadores de selección negativos. El gen *URA3* se usa para la selección positiva en medio ura- y para selección negativa usando ácido 5-fluoroorótico (5-FOA). El casete KanMX confiere resistencia dominante a geneticina (G418). La reconstitución del gen *MEL1* después de SSA se detectó usando sustratos cromogénicos [ $\alpha$ -D-galactopiranosido de p-nitrofenilo (PNPG) o 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-D-galactopiranosido (X-a-Gal)]. El indicador SSA *PHO5* contiene el casete de selección positiva NatMX que confiere resistencia dominante a nourseotricina (NAT) y la reconstitución del gen *PHO5* se detectó usando sustratos cromogénicos [p-nitrofenilfosfato de disodio (PNPP) o sal de p-toluidina de x-fosfato (X-Phos)]. Por lo tanto, una rotura bicatenaria (DSB) de ADN inducida por SSA inducida por ZFN 8266 funcional provocó la reconstitución de los genes indicadores y la eliminación de los marcadores de selección positivos y negativos.

El cribado genético para mutantes de *FokI* se realizó de la siguiente manera. En primer lugar, se realizó expresión inducible por galactosa de las ZFN a la temperatura no permisiva de 22 °C. Después de la recuperación, las células se incubaron en Kan (G418), NAT y medio ura- para eliminar todas las ZFN activas. Esta etapa seleccionó mutantes sensibles al frío potenciales, así como ZFN inactivas.

En segundo lugar, las células se cambiaron a 37 °C (temperatura permisiva) y se sembraron en medio que contenía 5-FOA y X-Phos. Únicamente las células que contenían una ZFN sensible al frío formaron colonias azules. Los plásmidos de estas células entonces se aislaron y se volvieron a transformar en la cepa indicadora para confirmar el fenotipo sensible al frío. Las mutaciones resultantes se identificaron por secuenciación directa del dominio *FokI*.

La tabla 3 muestra diversos mutantes identificado por el cribado. Las mutaciones que se ha predicho que confieren sensibilidad al frío se indican en la primera columna (basándose en la proximidad a la superficie de contacto del dímero en ZFN).

**Tabla 3: Mutantes sensibles al frío de ZFN**

Mutaciones				N.º de aislados
I499T				1
I538F				1
1538T				3
Q486L				2
Q486L	K448M			4
N496D	E484V			3
H537L	A482T	K559T	L563M	1
Q531R				2
Q531R	V512M			1
N500S	K402R	K427M	N578S	1
N500S	K469M			1
N476D				1
N476K				1
G474S				4
G474A				5
D467E				1

La actividad (con respecto al tipo silvestre) de las actividades de escisión sensibles al frío de los mutantes aislados se muestra en la figura 1A. La cepa indicadora se transformó con los vectores mutantes aislados, divididos en tres cultivos, e incubados a 22 °C, 30 °C y 37 °C. Después de la expresión, la actividad de los mutantes se determinó y presentó como una fracción de la actividad de la ZFN de tipo silvestre. El aumento en la actividad de escisión de ZFN correlacionada con la elevada temperatura de incubación indica que los mutantes aislados son sensibles al frío.

**Ejemplo 3: Diseño de semidominios de escisión de *FokI* genomanipulados novedosos**

Usando el modelo de estructura de ZFN descrito en Miller *et al.* (2007) Nat. Biotech. 25(7):778-85, se cartografió la posición de las mutaciones ensayadas en el ejemplo 2 y se descubrió que dos de los restos mutados (N496 y H537) están enfrentados entre sí en la superficie de contacto del dímero y se encuentran en cercana proximidad. El modelaje de esas mutaciones también mostró que las mutaciones H537R y N496D probablemente formarían puentes salinos y reforzarían la superficie de contacto de dimerización. La tabla 4 muestra la nomenclatura de diversos mutantes ensayados.

**Tabla 4: Nomenclatura del dominio de escisión genomanipulado**

Denominación del dominio de escisión	Mutaciones (resto de tipo silvestre-posición-resto mutante)
EL	Q486E +I499L

(continuación)

Denominación del dominio de escisión	Mutaciones (resto de tipo silvestre-posición-resto mutante)
ELD	Q486E + I499L + N496D
ELE	Q486E + I499L + N496E
KK	E490K + I538K
KKK	E490K + I538K + H537K
KKR	E490K + I538K + H537R
REL	H537R+Q486E+I499L
DKK	N496D+E490K+I538K
DD	R487D + N496D
DAD	R487D + N496D + I499A
RR	D483R + H537R
RVR	D483R + H537R +I538V
KIK*	E490K + H537K
KIR*	E490K + H537R
DA**	R487D +I499A
EA**	Q486E + I499A
KV**	E490K +I538V
RV**	D483R + I538V
Sharkey***	S418P+K441E
EL-Sharkey	Q486E + I499L+ S418P+K441E
KK-Sharkey	E490K + I538K+ S418P+K441E
ELD-Sharkey	Q486E + I499L + N496D+ S418P+K441E
KKK-Sharkey	E490K + I538K + H537K+ S418P+K441E
KKR -Sharkey	E490K + I538K + H537R+ S418P+K441E
DA-Sharkey	R487D + I499A+ S418P+K441E
EA-Sharkey	Q486E + I499A+ S418P+K441E

\*Nota: Para los mutantes KIK y KIR, el aminoácido en la posición 538 es una isoleucina como en el tipo silvestre. La nomenclatura para KIK y KIR usa la "I" para distinguir estos mutantes de los mutantes KK.  
\*\* Descrito en Szczepek et al., (2007) Nature Biotechnology 25(7) pág. 786-93.  
\*\*\*Descrito en Guo et al., *ibid*

5 Se compararon diversas combinaciones por parejas de los mutantes triples (por ejemplo, ELD:KKK, ELD:KKR, ELE:KKK y ELE:KKR) para la actividad de escisión frente a las parejas EL:KK (los mutantes EL:KK se describen en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0131962) en una diversidad de fondos de ZFN. Los plásmidos que contienen ZFN entonces se nucleofectaron en células K562 o PMBC. Para determinar la actividad de ZFN en el locus apropiado, se realizaron ensayos de emparejamiento incorrecto de Cel-1 esencialmente según las instrucciones del fabricante (Trangenomic SURVEYOR™). Las células se recogieron y se preparó el ADN cromosómico usando un kit Quickextract™ de acuerdo con las directrices del fabricante (Epicentre®). La región apropiada del locus diana se amplificó por PCR usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Accuprime™ (Invitrogen). Las reacciones de PCR se calentaron hasta 94 °C y se enfriaron gradualmente hasta temperatura ambiente. Se mezclaron aproximadamente 200 ng del ADN hibridado con 0,33 µl de enzima Cel-1 y se incubaron durante 20 minutos a 42 °C. Los productos de reacción se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en tampón Tris-borato-EDTA 1X.

15 Como se muestra en las figuras 2 a 5, las diversas combinaciones de los mutantes triples son más activas que la ZFN heterodimérica obligada original (EL:KK). En particular, la figura 2 muestra los resultados del ensayo de Cel-1 de las variantes de ZFN ELD:KKK, ELD:KKR, ELE:KKK,ELE:KKR, ELD:KIK, ELD:KIR, ELE:KIK y ELE:KIR en ZFN dirigidas a *53BP1* 3 y 10 días después de la transfección de las ZFN en células K562. La figura 3 muestra los resultados del ensayo de Cel-1 de variantes de ZFN ELD:KKK y ELD:KKR en ZFN dirigidas a *KDR* y 20 días después de la transfección de las ZFN en células K562. La figura 4 muestra los resultados del ensayo de Cel-1 de los dominios de escisión genomanipulados de *FokI* ELD; KKR y ELD:KKK en el contexto de ZFN específicas de *GR* en células K562. La figura 4 también muestra las actividades de escisión usando cantidad decrecientes de plásmido de expresión para la transfección (de 400 ng a 16 ng), con dos conjuntos diferentes de muestras (carriles 1-14 y carriles 15-26). Estos resultados muestran que a 80 ng de plásmido de expresión introducido, los mutantes ELD:KKR y ELF:KKK eran ambos más activos que los mutantes EL:KK (compárese el carril 8 con los carriles 9 y 10 y el carril 20 con los carriles 21 y 22).

30 La figura 5 muestra las actividades de escisión de los mutantes ELD:KKR y ELD:KKK en tres fondos de ZFN específicos de *RIPK1* diferentes. Los nuevos mutantes eran ambos más activos que el mutantes EL:KK en la pareja A de *RIPK1* y la pareja B de *RIPK1*. en la figura 5B, los nuevos mutantes en el fondo de la pareja C se ensayaron tanto a 37 °C como a 30 °C donde se encontró que la actividad de todas las parejas de ZFP aumentaba a 30 °C



(véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º: 2009/0111119).

#### **Ejemplo 4: Actividad de dominios de escisión genomanipulados como homodímeros**

5 Los nuevos mutantes también se ensayaron para su capacidad de escindir activamente el ADN como homodímeros forzados. En estos ensayos, se fusionan dominios de unión de dedos de cinc con un dominio de escisión de *FokI* que es igual en ambos miembros de la pareja. Por tanto, para observar cualquier actividad, el dominio de *FokI* debe homodimerizar consigo mismo ("homodimerización forzada"). La homodimerización forzada de ZFN dirigidas a *CCR5* se ensayó por nucleofección de variantes de *FokI* en células K562 (véase la figura 6) y se usó el ensayo de  
10 Cel-1 para determinar la frecuencia de indel inducidas por ZFN en la diana heterodimérica *CCR5*, un sitio inespecífico homodimérico de ZFN *CCR5-L* (ABLIM2) y un sitio inespecífico homodimérico *CCR5-R* (PGC). Para estos experimentos, las mutaciones se hicieron en la pareja 8266 específica de *CCR5* y 8196z y después se ensayaron. Por tanto, en los carriles marcados "WT", se usó la pareja 8266/8196z. Después, para cada pareja mutante ensayada, se preparó una pareja similar con las mutaciones idénticas, de modo que los carriles EL:EL  
15 indican una pareja que contiene 8266-EL y 8196z-EL y así sucesivamente.

Como puede observarse a partir de la Figura 6, mientras que los homodímeros KK, KKK y KKR no muestran actividad de escisión detectable en el sitio diana heterodimérico *CCR5*, hay corte limitado por los homodímeros EL:EL y ELD:ELD. Las variantes ELD:ELD tienen una actividad aproximadamente 1,5 veces inferior en comparación  
20 con EL:EL que indica especificidad aumentada. De forma importante, el examen de los sitios inespecíficos conocidos ABLIM2 y PGC no muestran actividad de escisión detectable por ninguno de los mutantes.

Para confirmar adicionalmente la mejora en la especificidad del dominio de escisión ELD, estos mismos homodímeros forzados se ensayaron en concentraciones decrecientes en células K562. Como puede observarse a  
25 partir de la Figura 7, a todas las concentraciones de ADN ensayadas, ELD:ELD presenta una actividad homodimérica inferior en comparación con EL:EL. También se ensayaron homodímeros de ZFN específicos de *GR* forzados (véase la figura 8) y no hubo actividad de escisión detectable. En algunas realizaciones, el mutante I499A se usó para reemplazar la mutación I449L para disminuir adicionalmente cualquier homodimerización de ELD potencial. En este caso, la homodimerización forzada de la ZFN específica de *CCR5* EAD no dio actividad de  
30 escisión detectable.

Además, estas células también se ensayaron para DSB usando un anticuerpo específico para H2AX que se acumula en sitios DSB en el genoma. Las células tañidas se clasificaron por citometría de flujo, y los resultados se muestran  
35 en la figura 9. Como puede verse a partir de la figura, hay muy poca tinción excepto para a pareja WT, lo que indica un nivel bajo de DSB en el genoma en presencia de las parejas de ZFN que contienen los dominios de *FokI* mutados.

#### **Ejemplo 5: Actividad de los semidominios genomanipulados en células primarias**

40 Las construcciones también se ensayaron en células primarias. Se nucleofectaron cantidades decrecientes de construcciones de ZFN dirigidas a *CCR5* que contenían las mutaciones indicadas, en PBMC, como se describe en Perez *et al.*, *ibid*. Las células se recogieron tres días después de la transfección y se usó el ensayo de Cel-1 para determinar la frecuencia de indel inducidas por ZFN. Como puede observarse de la figura 10A, los mutantes ELD:KKK y ELD:KKR eran bastante activos en estas células incluso a concentraciones inferiores. Se hicieron  
45 estudios similares con ZFN dirigidas a *PD-1* y se presentan en la figura 10B. Se prepararon construcciones de semidominio genomanipuladas en tres parejas de ZFN específicas de *PD-1* donde la pareja A comprendía la pareja 12942 y 12974, la pareja B comprendía la pareja 12942 y 25016, mientras que la pareja C comprendía la pareja 12942 y 25029 (véase la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/281 432). Los resultados se presentan en la figura 10B en un formato gráfico y demuestran que los mutantes ELD:KKR y ELD:KKK tenían actividad superior en  
50 comparación tanto con las parejas WT como las parejas EL:KK.

Los mutantes preparados en el fondo de ZFN específica de *GR* también se ensayaron en PBMC para la actividad como se muestra en la figura 11A. En este ejemplo, se ensayaron cantidades decrecientes de los mutantes en los días 3 y 10 después de la transfección. Se descubrió que los nuevos mutante tenían actividad aumentada en  
55 comparación la pareja EL:KK. En la figura 11B, se presentan los valores medios de experimentos que se repitieron en seis transfecciones independientes en PBMC. Los valores son la media +/- error típico de la media de las actividades relativas en comparación con la pareja EL:KK. Los valores P usan el ensayo de la T de dos muestras y de muestran la reproducibilidad de estos resultados.

#### **Ejemplo 6: Integración dirigida en la DSB, comparación de EL:KK y ELD:KKR**

Las ZFN mutantes de *FokI* EL:KK y ELD:KKR también se compararon para su uso en promover la integración dirigida (TI). Para este experimento, se preparó un ácido nucleico donador que contenía un sitio de restricción BamHI novedoso. Después de la TI satisfactoria, la región que rodea el sitio diana de ZFN se amplificó por PCR, y  
65 después el producto de PCR se sometió a restricción con BamHI para escindir el sitio de restricción recién introducido. La secuencia del ADN donador se muestra a continuación:

ADN donador de TI:

ggaagftaaagcccatggttctaataacaatgaacattatggtatgcccacttaacaccatcattcatatgatagcactttctta  
 tagtgttaccttatgctccctgaccaaactcccagacatcaactgtacttttctattttatctagatcttttgtattgttttaaat  
 acttctgcccattagaggacctaggagccaccctctctcccctcttaactgatatttagcctttcatgggctttgcatataat  
 ggaaattcaaaatcccacctgagaaatgaaaaccaagtagaggaaaataaactcttcaaaacacacactaccttccactg  
 ctctttgaagaaaactttacagctccacaagtaagactccataatgacatcctgaagcttcatcagagcacaccaggcag  
 agttgggagGTGGTCCTGTTGttgaggcatccagtcagacgggatccagccatactcactgctGTTGAG  
 GAGCTggatggaggagagcttacctgtgctctcatgctggggctaaagaaggggaagaacagtgttatgatttaactgt  
 caaaggaatatcaaaatacagttctcttagcttctcacttcatagtcagaatgctcacagtgaactctggcttcaagtctagca  
 ggactaaaatatcctagctaaatatatcaaatcatggtatattcttctttaaacaataagaatgaggtcatttcttttgaagt  
 gtctcaaaatagaatggtgtggttctggtcacttctctcttttttttttttttagatgcttaggattttttataatcacg

(SEQ ID NO:52)

5 En esta secuencia, los sitios de unión de ZFN se muestran en letras mayúsculas, y el sitio de restricción BamHI  
 introducido está subrayado. Para estos experimentos, los mutantes de *FokI* se ensayaron en el fondo de ZFN  
 específica de *GR* y como se muestra en la figura 11C, se hicieron usando dos concentraciones de plásmido  
 10 ELD/KKR era más eficaz para producir la introducción del donador que la pareja EL/KK, a ambas concentraciones  
 ensayadas.

**Ejemplo 7: Comparación de la actividad de mutantes de *FokI* DA:RV frente a ELD:KKR o ELD:KKK**

15 Se construyeron parejas de ZFN que contenían las mutaciones de *FokI* en fondos de ZFN específicos de *GR* y  
 también en específicos de *CCR5*. Estas entonces se ensayaron frente a sus dianas endógenas en células K562,  
 como se describe anteriormente y se ensayaron para la actividad de escisión usando el ensayo de emparejamiento  
 incorrecto de Cel-I como se describe anteriormente. En cada conjunto de experimentos, se usaron 80 ng de ADN  
 que codifica las ZFN en la etapa de nucleofección. En el día 3 después de la transducción, se realizaron los ensayos  
 20 de Cel-I y los resultados se muestran en la figura 12, que muestra los resultados para la escisión específica de *GR* y  
 específica de *CCR5*. Los datos demuestran que la pareja de *FokI* DA:RV presentaba actividad mucho menor que las  
 parejas EL:KK, ELD:KKK y ELD:KKR. La pareja EA:KV, sin embargo, mostró actividad en este ensayo.

25 A continuación, se ensayaron las diversas ZFN para su capacidad de homodimerizar por homodimerización forzada  
 (véase el ejemplo 4). Típicamente, no es deseable que dos dominios mutantes de *FokI* tengan la capacidad de  
 homodimerizar porque esto puede aumentar la posibilidad de escisión inespecífica indeseada. Los experimentos se  
 realizaron como anteriormente excepto en que se usaron 400 ng de plásmido que contiene ZFN para cada  
 nucleofección. Los resultados se muestran en la figura 13 y demuestran que el mutante de *FokI* KV tiene la  
 30 capacidad de homodimerizar a un grado significativo. Por tanto, aunque se descubrió que la pareja EA:KV tenía  
 actividad comparable a la pareja ELD:KKR en este ensayo de Cel-I (véase la figura 12), el hecho de que el mutante  
 de *FokI* KV pudiera homodimerizar y presentar actividad de escisión lo hace menos deseable a causa del riesgo  
 aumentado de escisión inespecífica.

**Ejemplo 8: Potenciación de la actividad de los mutantes de *FokI* DA:RV.**

35 Los mutantes de *FokI* DA:RV se examinaron entonces para observar si sería posible aumentar su actividad  
 combinándolos con otras mutaciones de *FokI*. Por tanto, se prepararon parejas de DA:RV para que incluyeran las  
 mutaciones N496D y H537R que producen una pareja DAD:RVR. Los resultados del ensayo de actividad de Cel-I  
 para las parejas específicas de *CCR5* y específicas de *CXCR4* que incluyen estos mutantes se muestran en la figura  
 40 14. Se realizaron experimentos como se describe previamente usando 80 ng de plásmido por transducción. Como  
 puede verse a partir de la figura, la adición de las mutaciones N496D y H537R aumentó la actividad de escisión.  
 También se encontraron resultados similares usando estas mutaciones en el fondo de ZFN específico de *GR* (figura  
 14).

45 La combinación DA:RV + N496D y H537R también se ensayó en un fondo de pareja de ZFN menos activo. En este  
 experimento, se eligieron ZFN específicas de *KDR* y los resultados del ensayo de Cel-I se muestran en la figura 15.

En esta figura, la actividad de ambos mutantes DA:RV y DAD:RVR no fue detectable. Por tanto, la adición de la mutaciones N496D y H537R sirve de ayuda en algunas ZFN, pero no puede rescatar las pareja de ZFN que tienen actividad débil o indetectable.

## 5 Ejemplo 9: Ensayo de parejas ortogonales para escisión doble específica simultánea

Puede ser deseable realizar escisión simultánea en dos sitios diana dentro de un genoma. Para una especificidad añadida, lo mejor sería que únicamente las parejas de ZFN que escinden en un locus deseado puedan dimerizar de forma productiva de modo que una pareja activa tenga la especificidad deseada. Para conseguir este objetivo, las parejas no deben poder homodimerizar o heterodimerizar en *trans* para crear una pareja activa. En otras palabras, si la diana 1 se escinde por la pareja de ZFN A+B, y la diana 2 se escinde por la pareja de ZFN X+Y, serían indeseables emparejamientos de A+A (homodímeros), A+X y A+Y (transheterodímeros), por ejemplo. Por tanto, las parejas ELD/KKR + DAD/RVR específicas para CCR5 y CXCR4 se ensayaron conjuntamente con la esperanza de que el semidominio de escisión ELD específico de CCR5 no pudiera heterodimerizar en *trans* con los semidominios DAD específico de CXCR5 o RVR específico de CXCR4. Además, se prepararon variantes de la pareja ELD/KKR de modo que la mutación D en la posición 496 en el mutante ELD y la mutación R en la posición 537 en KKR se intercambiaran para formar una pareja REL/DKK (H537R+Q486E+I499L/ N496D+E490K+I538K). Además, las parejas ELD/KKR + DD/RR para CCR5 y CXCR4 también se ensayaron conjuntamente.

Los resultados del ensayo de actividad de Cel-I se muestran en las figuras 16 y 22. En este experimento, las condiciones ensayadas fueron una incubación convencional a 37 °C, así como una incubación a 30 °C (véase la solicitud de patente de Estados Unidos 12/800599 del mismo propietario que la presente). En resumen, después de la transducción, las células se mantuvieron a 37 °C durante 3 días o a 30 °C durante 3 días. Después de incubación durante 3 días, se realizaron ensayos de Cel-I para observar si ambas dianas se escindían, donde el ensayo de Cel-I específico de CCR5 se muestra en la parte superior en la figura 16 y el ensayo de Cel-I específico de CXCR4 se muestra en la parte inferior.

Estos resultados indican que la escisión en ambas dianas CCR5 y CXCR4 se podían conseguir en una única etapa usando estas parejas de mutantes ortogonales.

Los mutantes se ensayaron además para examinar la escisión inespecífica potencial. Se hizo un análisis *in silico* para identificar sitios inespecíficos potenciales que pudieran parecerse a una diana que pudiera reconocerse por una pareja de ZFN transheterodimérica de CCR5-CXCR4 ilícita. En estos experimentos, los cuatro candidatos principales para escisión inespecífica se examinaron por el ensayo de Cel-I, donde las secuencias para los sitios inespecíficos se enumeran a continuación en la tabla 5.

**Tabla 5: Sitios inespecíficos potenciales**

Marcador	Par	Locus	Secuencia diana*
n.º 3	CCR5-L CXCR4-R	C1orf210	CaTCATCCTCATCTTCAGCcACCTGTGGGcGG (SED ID NO: 53)
n.º 5	CCR5-L CXCR4-R	TBC1D5	GGcaATaCTCATCTTCACTGACCTGaGGGTGG (SED ID NO: 54)
n.º 7	CCR5-R CXCR4-L	CD274	ActCCcTactTcaACATAAACTGCAAAAGG (SED ID NO: 55)
n.º 10	CCR5-R CXCR4-L	FRYL	AGACacCTTcaACTGCTTAAACTGaAAAAGG (SED ID NO: 56)

\* Las letras mayúsculas en la secuencia diana indican puntos de contacto potenciales, las letras minúsculas indican nucleótidos en la secuencia que no se piensa que entren en contacto con la ZFP.

Las transducciones se ensayaron como anteriormente usando ambas condiciones de incubación a 37 °C y 30 °C, y los resultados se muestran en las figuras 17 y 22. Como se muestra en la Figura 17, la pareja de CCR5 ELD/KKR en combinación la pareja de CXCR4 ELD/KKR dio alguna escisión en los sitios inespecíficos n.º 3, n.º 5 y n.º 10. La combinación de la pareja de CCR5 ELD/KKR con la pareja de CXCR4 REL/DKK también dio alguna escisión en los sitios n.º 3, n.º 5 y n.º 10. Sin embargo, la pareja de CCR5 ELD/KKR, combinada con la pareja de CXCR4 DAD/RVR no dio escisión detectable en estos sitios inespecíficos. Además, como se muestra en la Figura 22, la pareja de CCR5 ELD/KKR, combinada con la pareja de CXCR4 DD/RR no dio escisión detectable en estos sitios inespecíficos.

Estos resultados demuestran que estos mutantes de *FokI* pueden usarse en configuraciones para permitir la escisión simultánea de más de un sitio diana al mismo tiempo, mientras se disminuye la escisión inespecífica indeseable.

## 50 Ejemplo 10: Evaluación de mutantes de *FokI* emparejados con el mutante Sharkey

Se ha descrito un conjunto de mutantes de *FokI* que se cree que potencian la eficacia de escisión del ADN (véase Guo *et al, ibid*), que se conocen como los mutantes de *FokI* Sharkey (S418P+K441E) y Sharkey' (S418P+F432L+K441E+Q481H+H523Y+N527D+K559Q). Por tanto, el mutante Sharkey se ensayó en combinación con los diversos mutantes de *FokI* descritos en este documento para observar si la actividad de escisión podía potenciarse adicionalmente por la presencia de las mutaciones Sharkey. Las combinaciones de mutantes se hicieron en los fondos de ZFN específico de *GR* y específico de *KDR* y se ensayaron para la actividad de escisión usando el ensayo de Cel-I como se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 18 y demuestran que las

5 actividades de las mutaciones parecen ser aditivas. Por ejemplo, la comparación de los carriles 10 y 11 con los carriles 12 y 13 en el panel del día 3 muestra que la actividad NHEJ detectada (indel) iban de un 11-12 para la pareja específica de *GR* ELD/KKR hasta un 20 % de indel para la pareja ELD-S/KKR-S. Asimismo, la comparación de los carriles 10 y 11 con los carriles 12 y 13 para las ZFN específicas de *KDR* en el día 3 iban de aproximadamente un 26-28 % de indel detectables hasta un 48-50 % de indel detectables.

10 Además, los mutantes de *FokI* Sharkey también se combinaron con los mutantes de *FokI* DA/RV y DAD/RVR en el fondo de ZFN específica de *GR*, y se ensayaron para la actividad usando el ensayo de actividad de Cel-1. Los resultados se presentan en la figura 19A y muestran que las mutaciones de *FokI* son aditivas en términos de actividad. (Compárense los carriles 4 y 5 con los carriles 6 y 7).

15 Las combinaciones de mutantes también se ensayaron para observar si la presencia de la mutación Sharkey aumentaba la cantidad de escisión por homodimerización en un ensayo de homodimerización forzado como se describe anteriormente en el ejemplo 4. La figura 20 muestra los resultados de los mutantes específicos de *GR*, con o sin la mutación Sharkey añadida. Como puede verse a partir de la figura, los mutantes no estaban alterados de forma detectable en la capacidad de homodimerización. Asimismo, los mutantes DA-S/RV-S y DAD-S/RVR-S también se ensayaron para observar si había un aumento en la homodimerización en el fondo de ZFN específica de *GR*. Los resultados se muestran en la figura 21A y demuestran que no había un aumento en la homodimerización productiva. La figura 21B demuestra una carga igual de todos los carriles.

20 **Ejemplo 11: Potenciación de la actividad de los mutantes de *FokI* D:R**

25 Los mutantes de *FokI* D:R (R487D:D483R) (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2008/0131962 y 2009/0305346) se examinaron para observar si sería posible aumentar su actividad combinándolos con otras mutaciones de *FokI*. En resumen, se prepararon las parejas D:R para que incluyeran las mutaciones N496D y H537R produciendo la pareja DD:RR y se realizó el ensayo de Cel-I como se describe anteriormente.

30 Como se muestra en la Figura 21, la adición de las mutaciones N496D y H537R aumentó la actividad de escisión.

En resumen, estos resultados demuestran que los mutantes de *FokI* descritos en este documento y los datos presentados aquí demuestran que los mutantes novedosos son más activos y presentan menos actividad de escisión inespecífica que los mutantes de *FokI* descritos previamente.

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a ADN de dedos de cinc y un polipéptido que comprende un semidominio de escisión de *FokI* de tipo silvestre genomanipulado, en la que el semidominio de escisión genomanipulado comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en:
- 5
- i) mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 486, 499 y 496 en las que el resto de Gln (Q) de tipo silvestre en la posición 486 se reemplaza con un resto de Glu (E), el resto de Ile (I) de tipo silvestre en la posición 499 se reemplaza con un resto de Leu (L) o Ala (A) y el resto de Asn (N) de tipo silvestre en la posición 496 se reemplaza
- 10 con un resto de Asp (D) o Glu (E);
- ii) mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 487 y 496 en la que el resto de Arg (R) de tipo silvestre en la posición 487 se reemplaza con un resto de Asp (D) y el resto de Asn (N) de tipo silvestre en la posición 496 se reemplaza con un resto de Asp (D) o Glu (E);
- 15 iii) mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 487, 499 y 496 en la que el resto de Arg (R) de tipo silvestre en la posición 487 se reemplaza con un resto de Asp (D), el resto de Ile (I) de tipo silvestre en la posición 499 se reemplaza con un resto de Leu (L) o Ala (A) y el resto de Asn (N) de tipo silvestre en la posición 496 se reemplaza con un resto de Asp (D) o Glu (E);
- iv) mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 483 y 537 en la que el resto de Asp (D) de tipo silvestre en la posición 483 se reemplaza con un resto de Arg (R) y el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 se reemplaza con un resto de Lys (K) o Arg (R);
- 20 v) mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 490 y 537 en la que el resto de Glu (E) de tipo silvestre en la posición 490 se reemplaza con un resto de Lys (K) y el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 se reemplaza con un resto de Lys (K) o Arg (R);
- vi) mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 490, 537 y 538 en la que el resto de Glu (E) de tipo silvestre en la posición 490 se reemplaza con un resto de Lys (K), el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 se reemplaza con un resto de Lys (K) o Arg (R) y el resto de Ile (I) de tipo silvestre en la posición 538 se reemplaza con un resto de Lys (K) o Val (V) y
- 25 vii) mutaciones de sustitución en los restos de aminoácido 483, 538 y 537 en la que el resto de Asp (D) de tipo silvestre en la posición 483 se reemplaza con un resto de Arg (R), el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 se reemplaza con un resto de Lys (K) o Arg (R) y el resto de Ile (I) de tipo silvestre en la posición 538 se reemplaza con un resto de Lys (K) o Val (V),
- 30
- en la que los restos de aminoácido se enumeran con respecto a *FokI* de tipo silvestre.
- 35
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el semidominio de escisión genomanipulado comprende un polipéptido en que el resto de Gln (Q) de tipo silvestre en la posición 486 se reemplaza con un resto de Glu (E), el resto de Iso (I) de tipo silvestre en la posición 499 se reemplaza con un resto de Leu (L) y el resto de Asn (N) de tipo silvestre en la posición 496 se reemplaza con un resto de Asp (D) o Glu (E).
- 40
3. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el semidominio de escisión genomanipulado comprende un polipéptido en que el resto de Glu (E) de tipo silvestre en la posición 490 se reemplaza con un resto de Lys (K), el resto de Iso (I) de tipo silvestre en la posición 538 se reemplaza con un resto de Lys (L) y el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 se reemplaza con un resto de Lys (K) o un resto de Arg (R).
- 45
4. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el semidominio de escisión genomanipulado comprende un polipéptido en que el resto de Glu (E) de tipo silvestre en la posición 490 se reemplaza con un resto de Lys (K) y el resto de His (H) de tipo silvestre en la posición 537 se reemplaza con un resto de Lys (K) o un resto de Arg (R).
- 50
5. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el semidominio de escisión genomanipulado comprende un polipéptido en que el resto de Arg (R) de tipo silvestre en la posición 487 se reemplaza con un resto de Asp (D) y el resto de Asn (N) de tipo silvestre en la posición 496 se reemplaza con un resto de Asp (D).
- 55
6. La proteína de fusión de la reivindicación 5, en la que además el resto de Ile (I) de tipo silvestre en la posición 499 se reemplaza con una Ala (A).
- 60
7. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el semidominio de escisión genomanipulado comprende mutaciones en los restos de aminoácido 483 y 537, en la que el resto de Asp (D) de tipo silvestre en la posición 483 se reemplaza con un resto de Arg (R) y el resto His (H) de tipo silvestre en la posición 537 se reemplaza con un resto de Arg (R).
- 65
8. La proteína de fusión de la reivindicación 1, que comprende además una mutación aminoacídica adicional en una o más de las posiciones 418, 432, 441, 481, 483, 486, 487, 490, 496, 499, 523, 527, 537, 538 y 559.
9. Un heterodímero que comprende una primera proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y una segunda nucleasa de dedos de cinc.

10. Un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
11. Una célula aislada que comprende el polinucleótido de la reivindicación 10 o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 5 12. Un método *in vitro* para escindir cromatina celular genómica en una región de interés, comprendiendo el método:
- (a) seleccionar una primera secuencia de nucleótidos en la región de interés;
- 10 (b) manipular un primer dominio de unión de dedos de cinc para que se una a la primera secuencia de nucleótidos;
- (c) expresar una primera proteína de fusión en una célula, comprendiendo la primera proteína de fusión el dominio de unión de dedos de cinc genomanipulado y un semidominio de escisión genomanipulado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;
- 15 (d) expresar una segunda proteína de fusión en la célula, comprendiendo la segunda proteína de fusión un segundo dominio de unión de dedos de cinc genomanipulado para que se una a una segunda secuencia de nucleótidos y un segundo semidominio de escisión genomanipulado, estando localizada la segunda secuencia de nucleótidos entre los nucleótidos 2 y 50 de la primera secuencia de nucleótidos; en el que la primera proteína de fusión se une a la primera secuencia de nucleótidos, la segunda proteína de fusión se une a la segunda secuencia de nucleótidos y el primer y segundo dominio de escisión genomanipulado forman un heterodímero que escinde la cromatina celular en la región de interés.
- 20 13. El método *in vitro* de la reivindicación 12, que comprende además poner en contacto la célula con un polinucleótido que comprende una tercera secuencia de nucleótidos, en el que la tercera secuencia de nucleótidos es homóloga, pero no idéntica, a la primera secuencia de nucleótidos; en el que la escisión de la cromatina celular en la región de interés facilita la recombinación homóloga entre la primera secuencia de nucleótidos y la tercera secuencia de nucleótidos, provocando una alteración en la primera secuencia de nucleótidos.
- 25 14. Un método *in vitro* de escisión de al menos dos sitios diana en cromatina celular genómica, comprendiendo el método: escindir al menos un primer y segundo sitio diana en cromatina celular genómica, en el que cada sitio diana se escinde usando una pareja de proteínas de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 30 15. Uso de al menos dos proteínas de fusión de cualquier de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el primer semidominio de escisión de *FokI* genomanipulado forma, con el segundo semidominio de escisión de *FokI* genomanipulado, un complejo heterodimérico para dirigir específicamente la escisión *in vitro* de la cromatina celular.
- 35 16. Uso *in vitro* de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para administrar ácidos nucleicos que codifican nucleasas de dedos de cinc a células.
- 40 17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la administración de ácidos nucleicos que codifican nucleasas de dedos de cinc a células se suministra por vectores adenovíricos recombinantes.

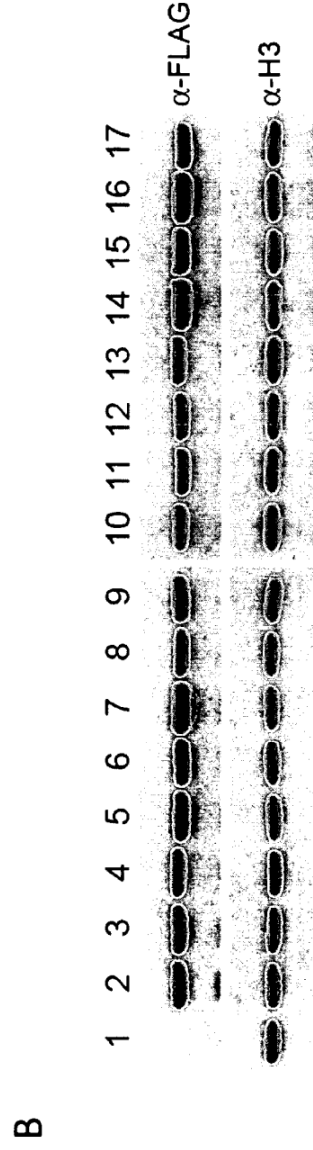
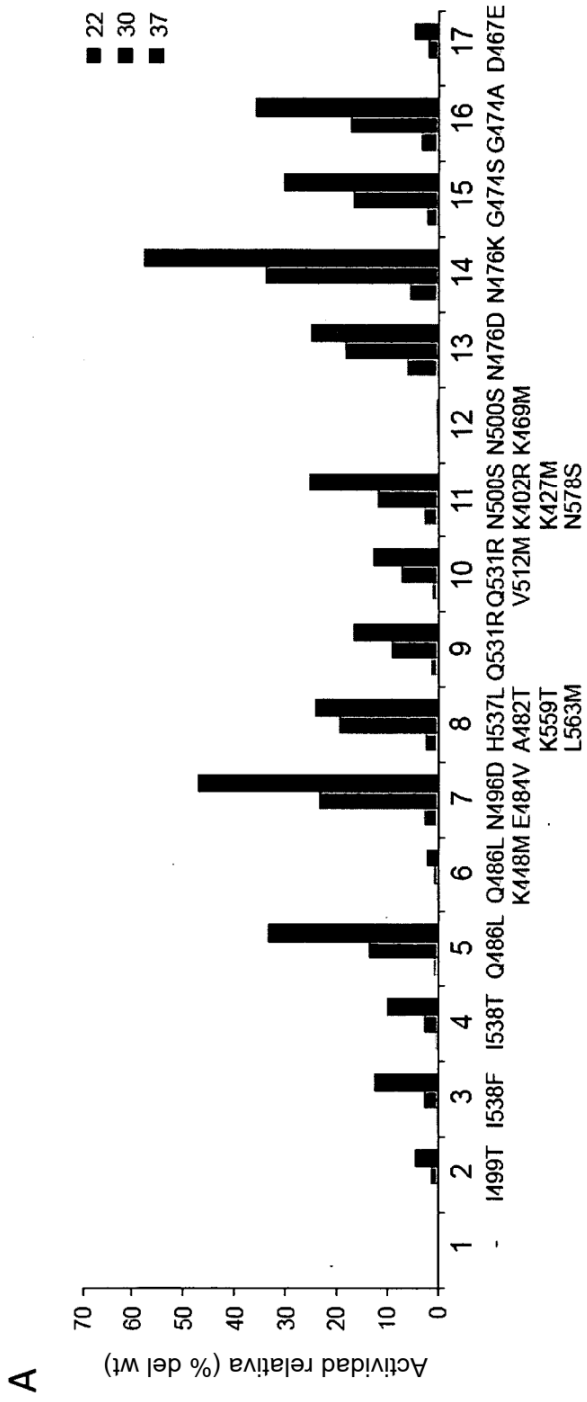


Figura 1

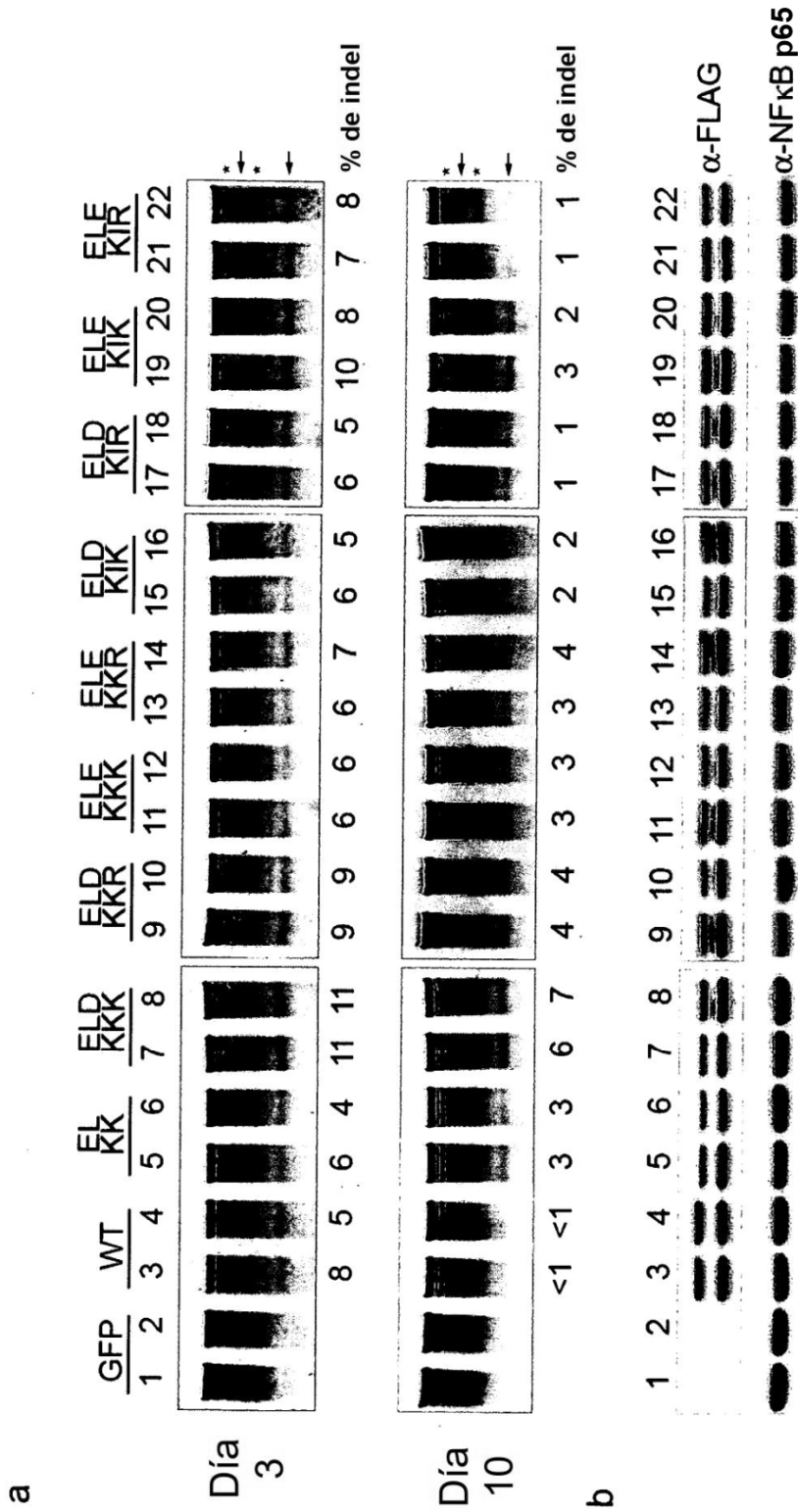


Figura 2



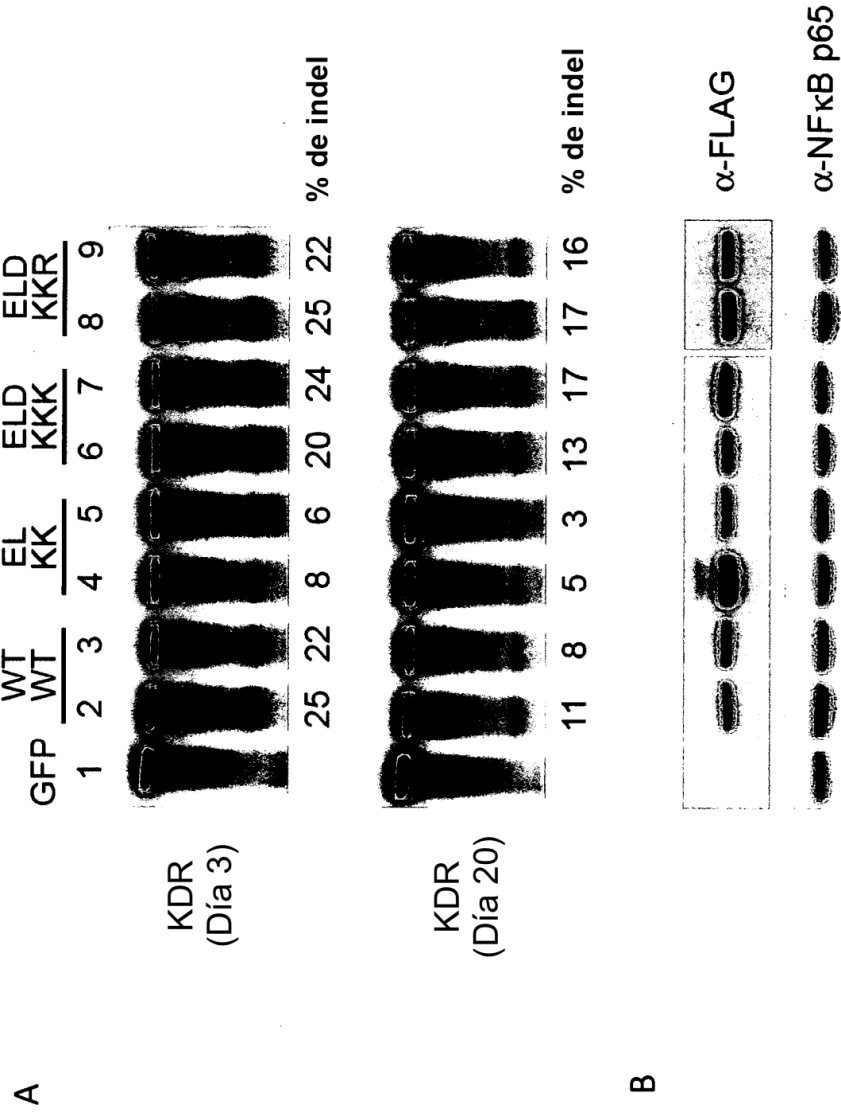


Figura 3

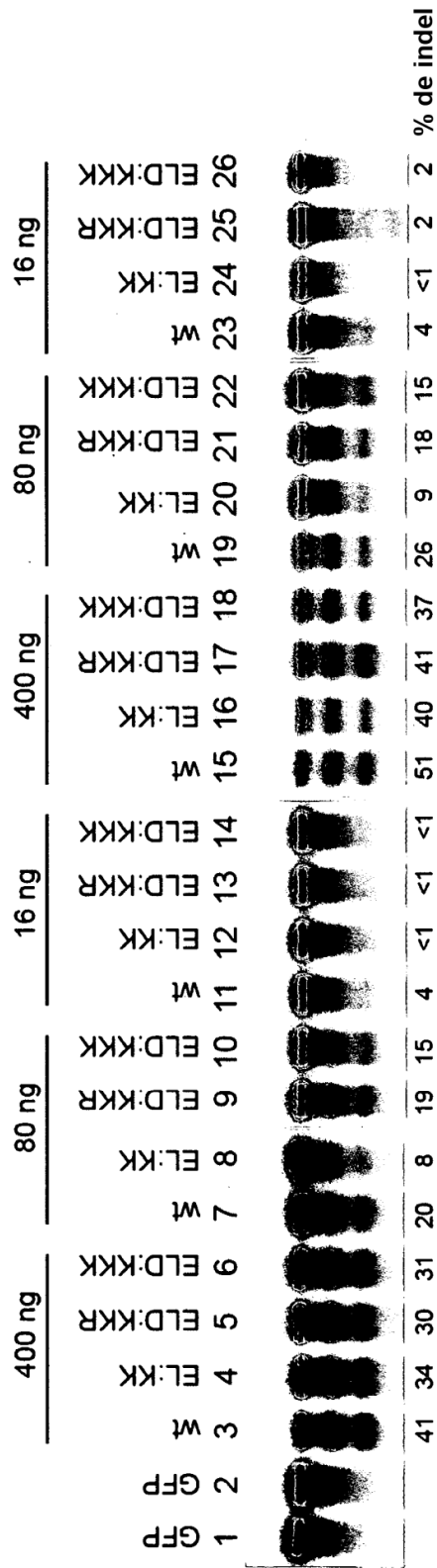


Figura 4

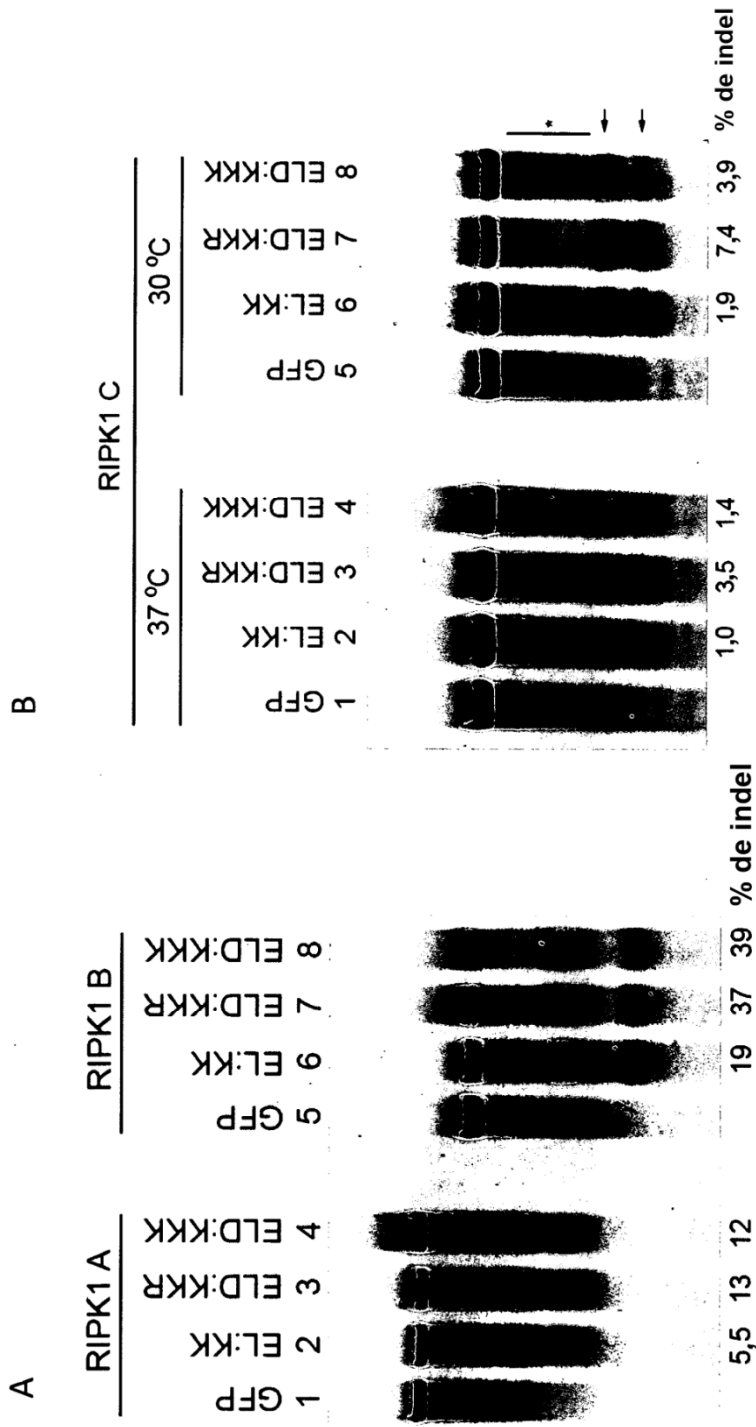


Figura 5

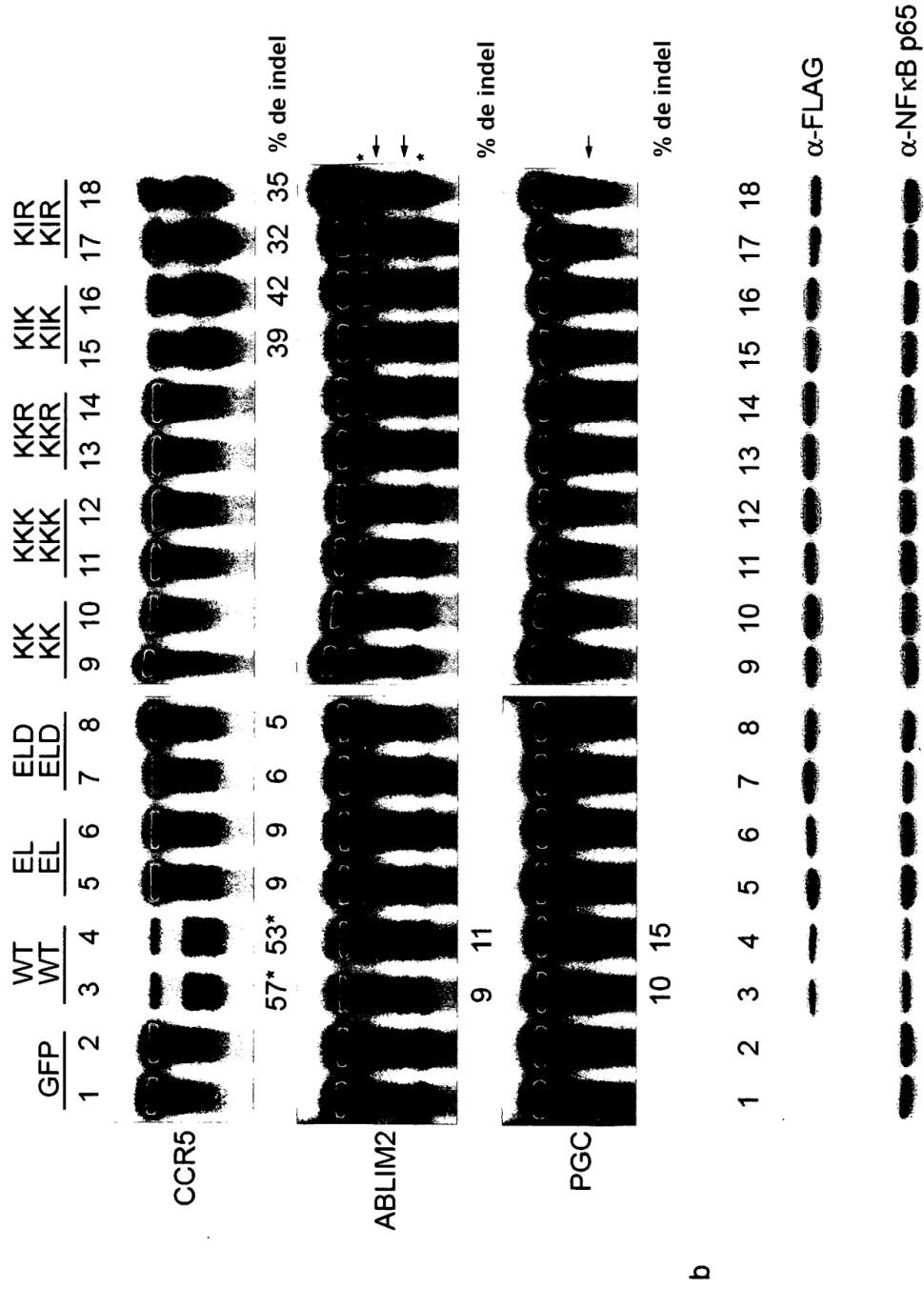


Figura 6

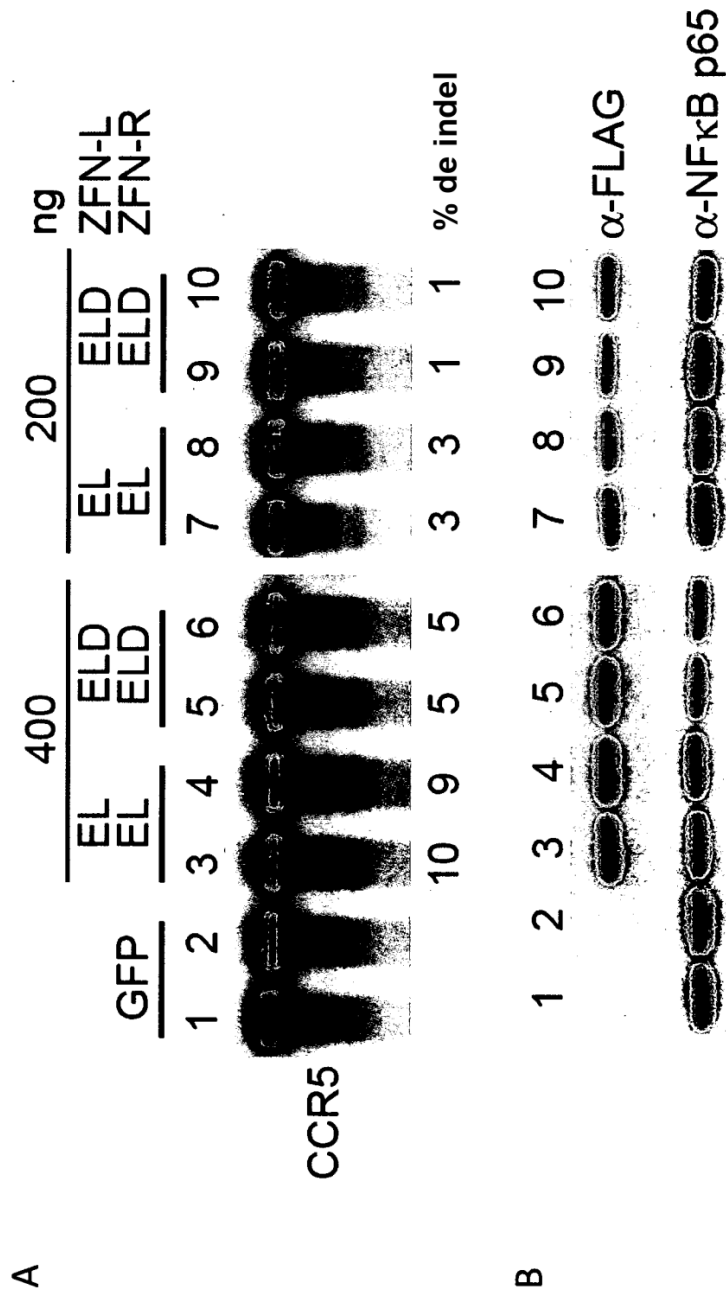
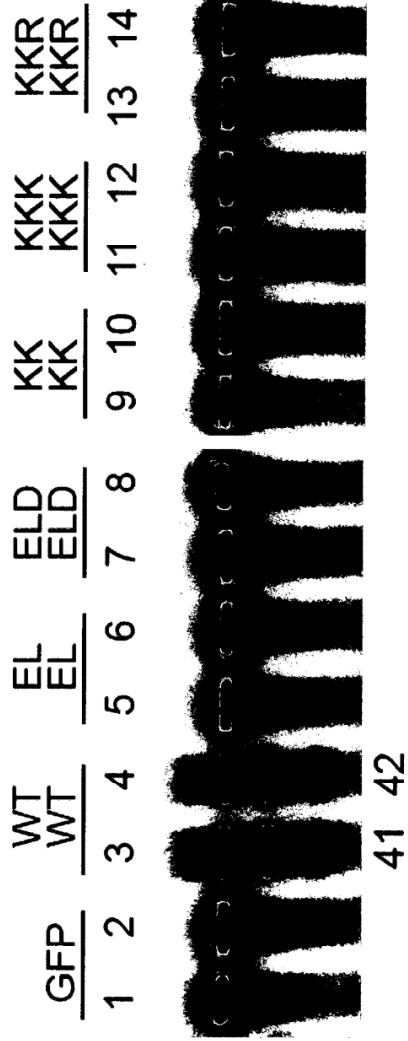


Figura 7

a



b

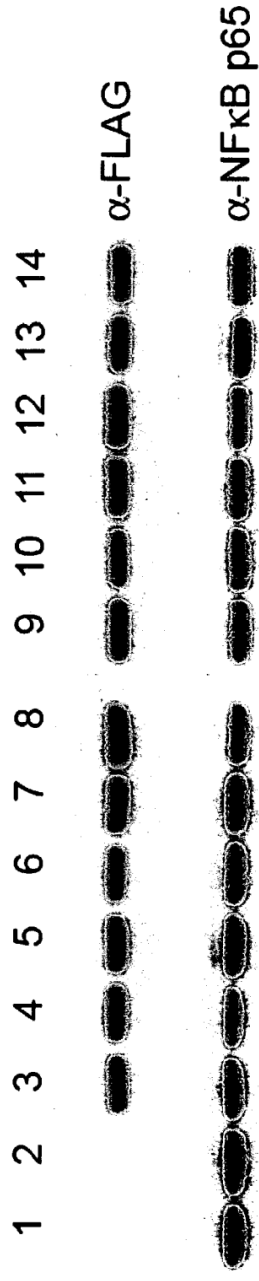


Figura 8

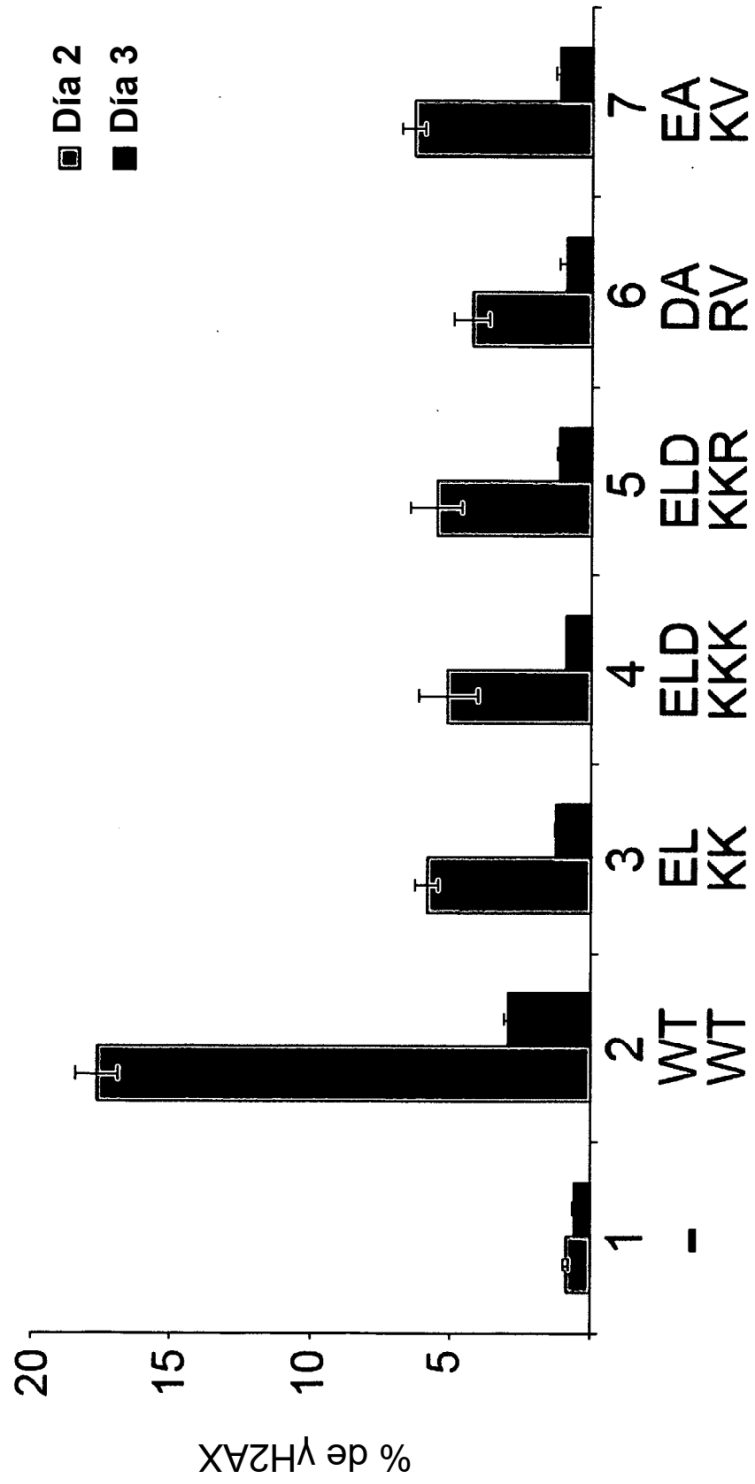


Figura 9

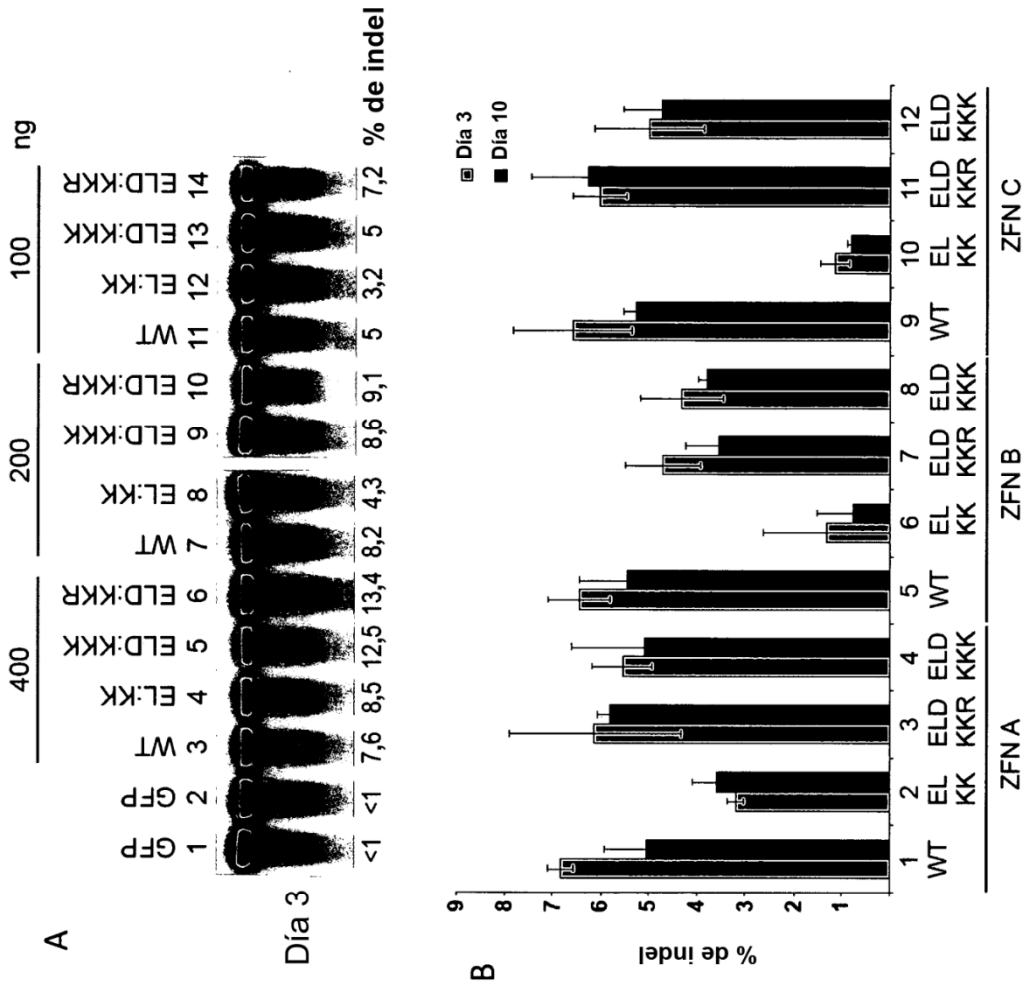


Figura 10



Figura 11A

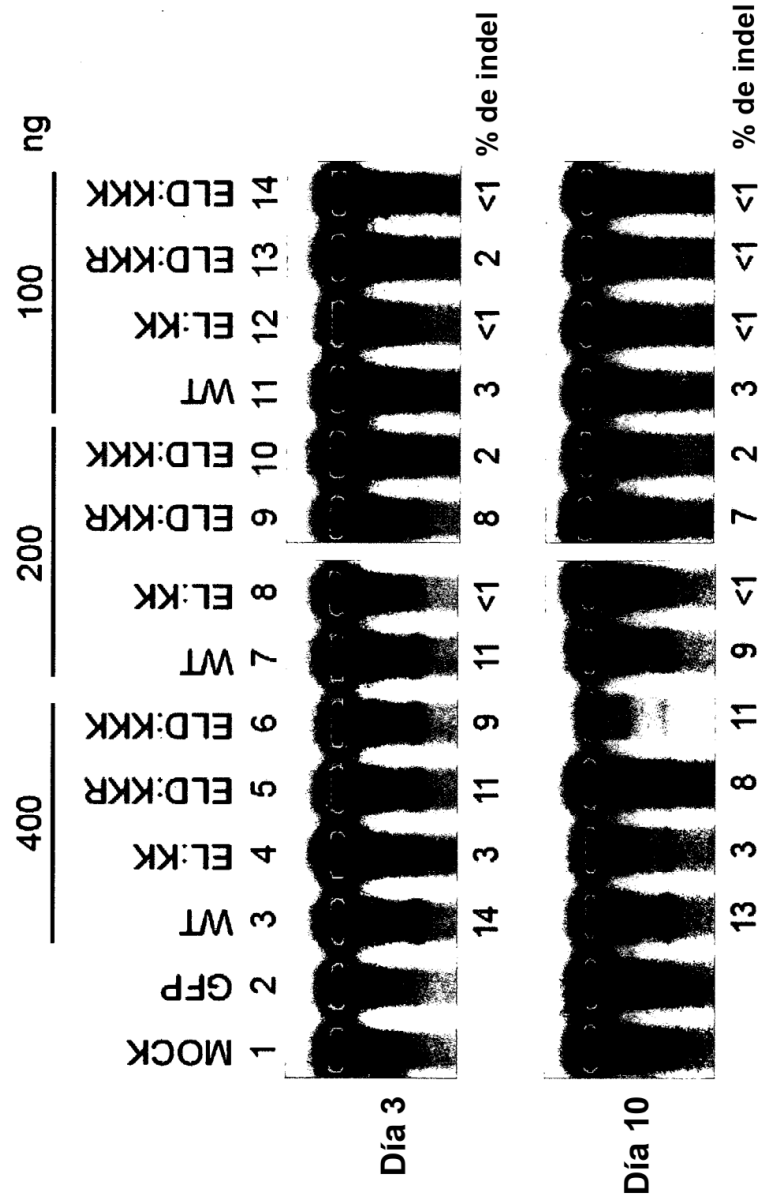
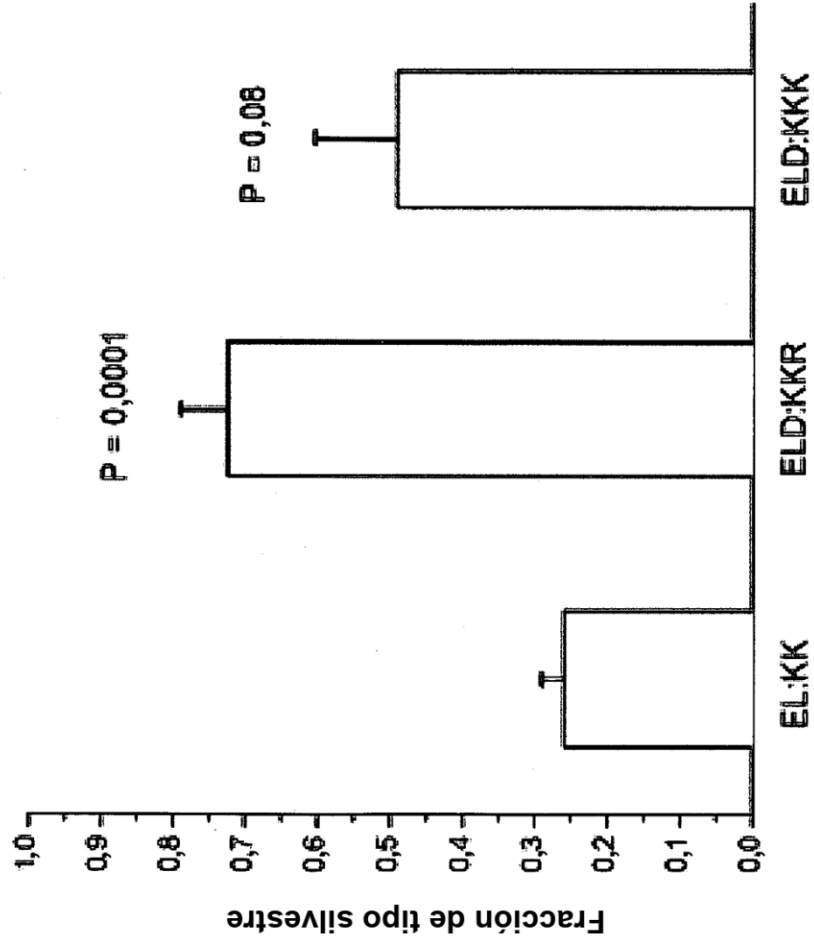


Figura 11B



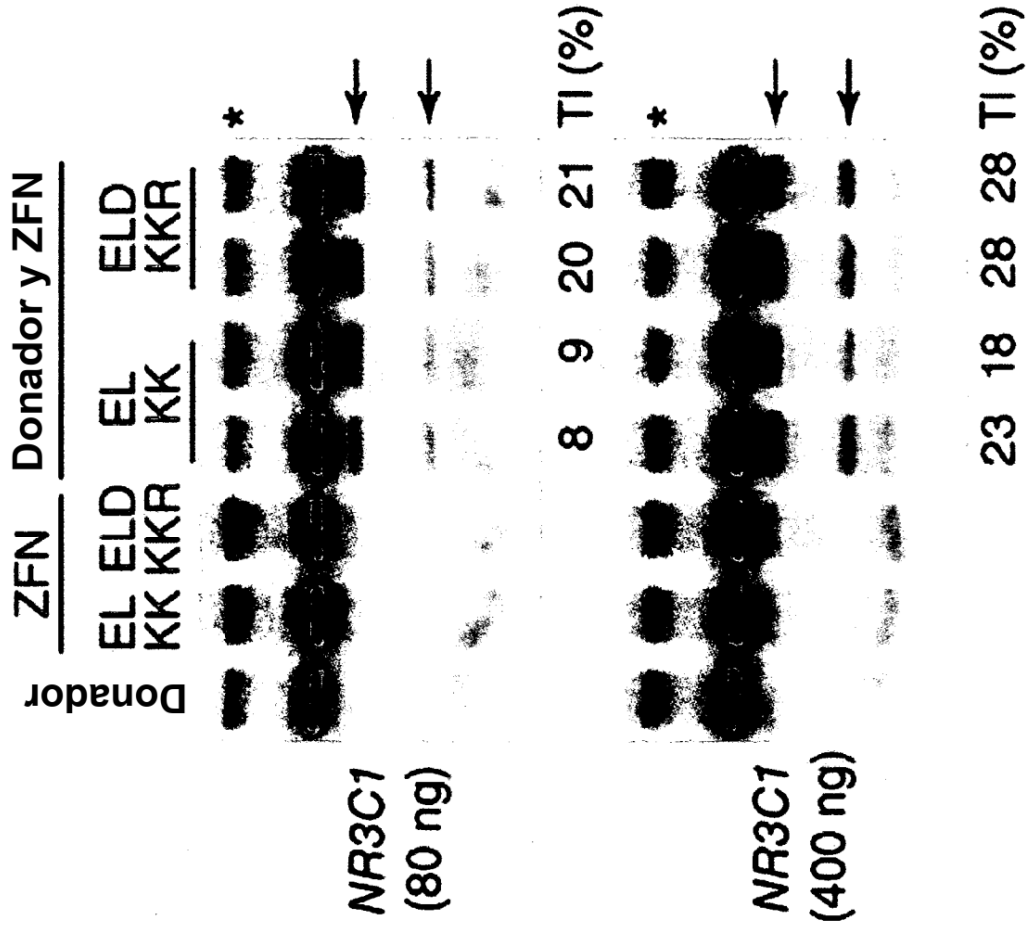


Figura 11C

Figura 12

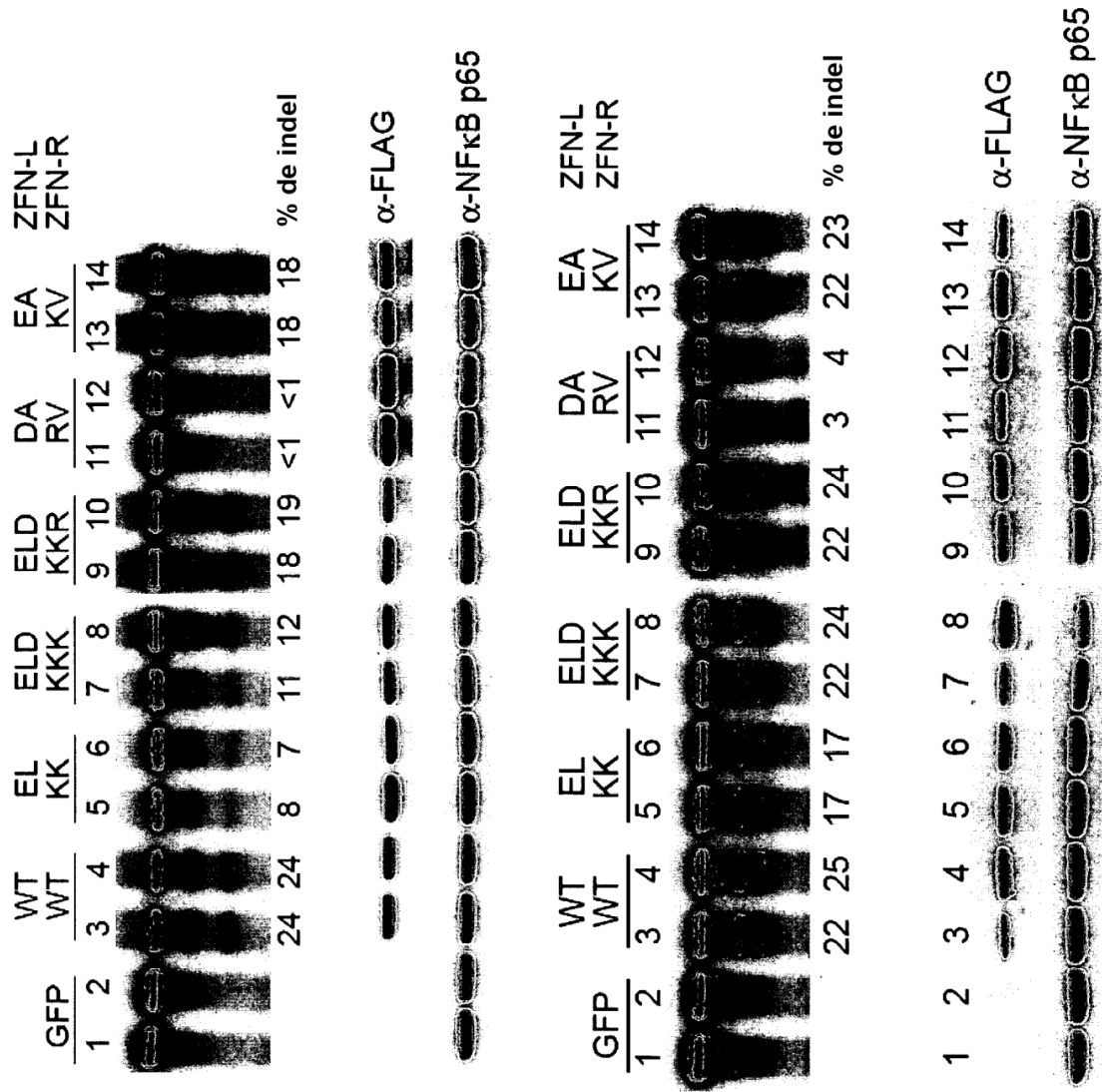


Figura 13

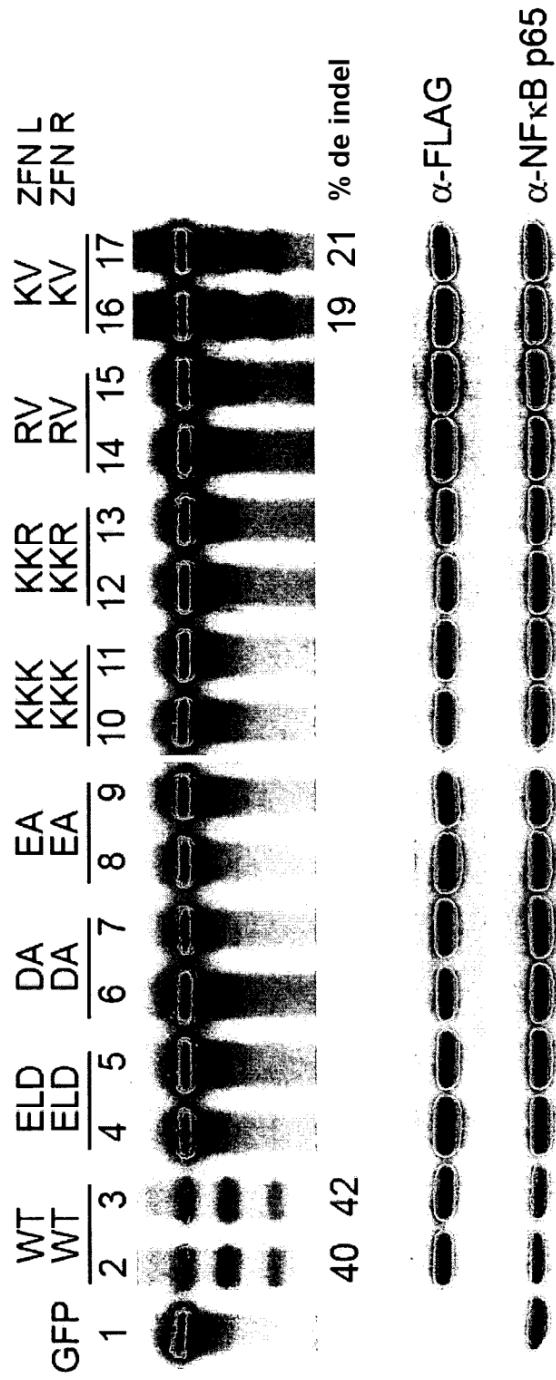
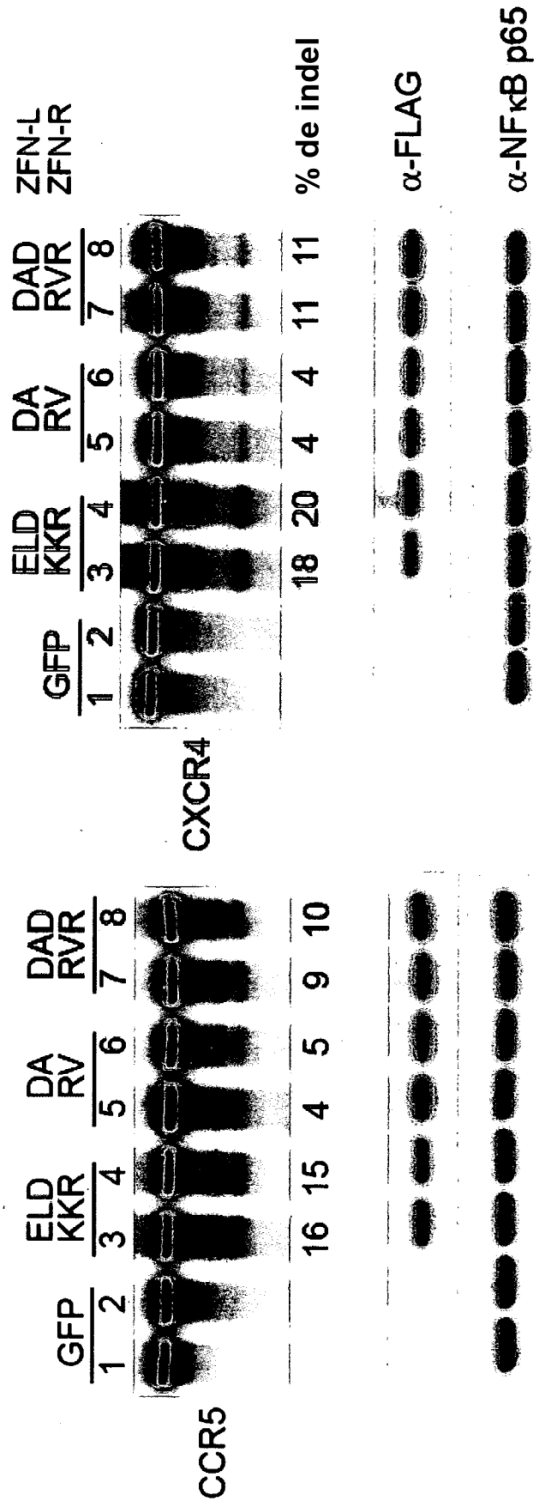


Figura 14



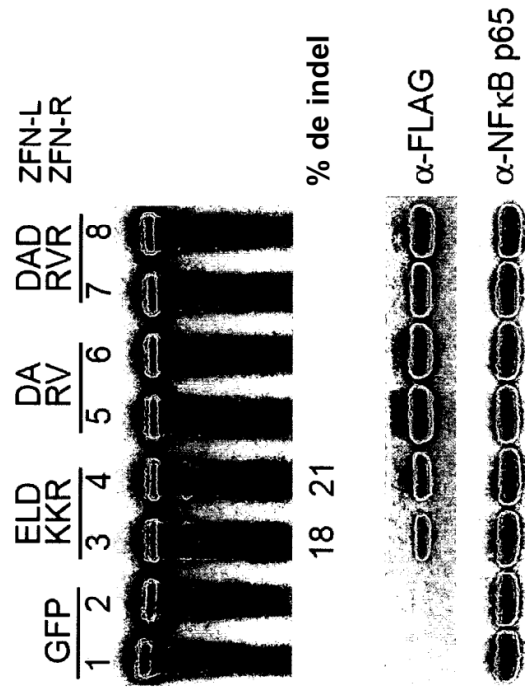
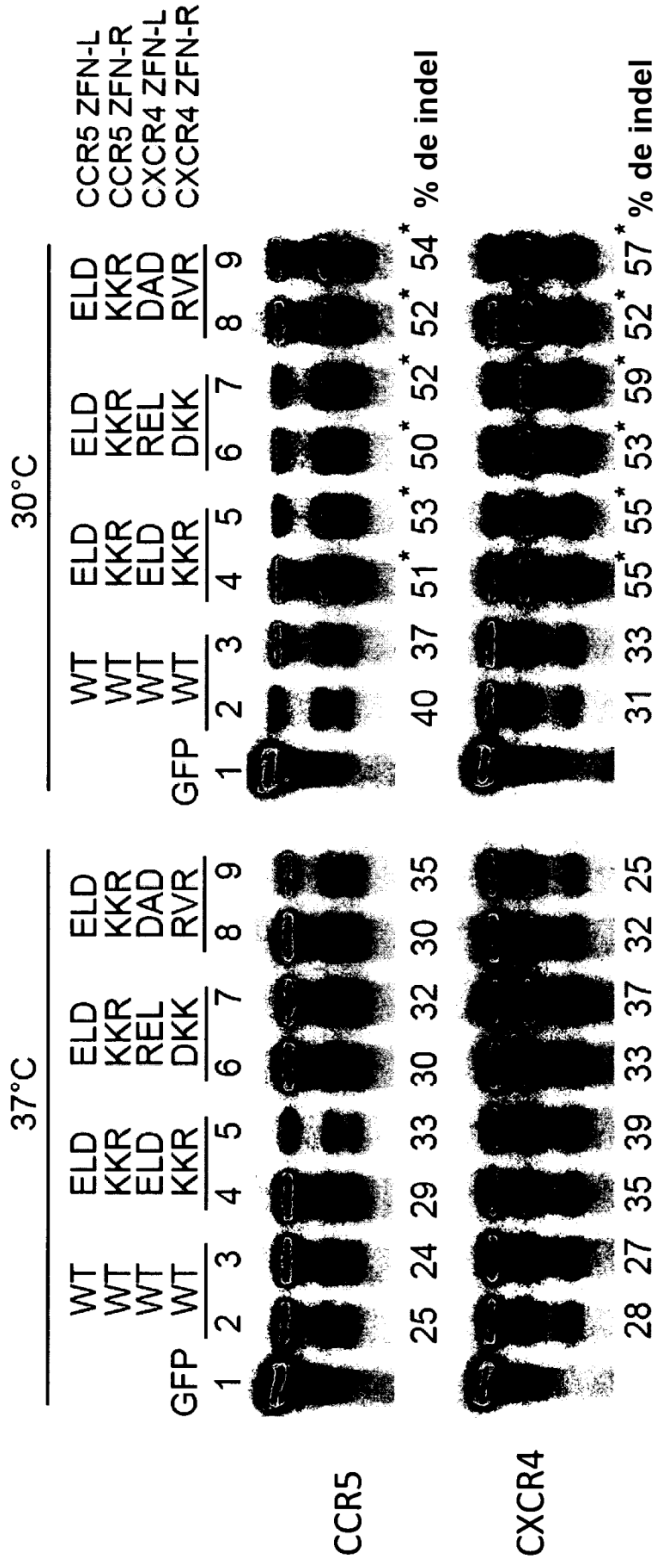


Figura 15-KDR

Figura 16



\* = estimación debida a saturación



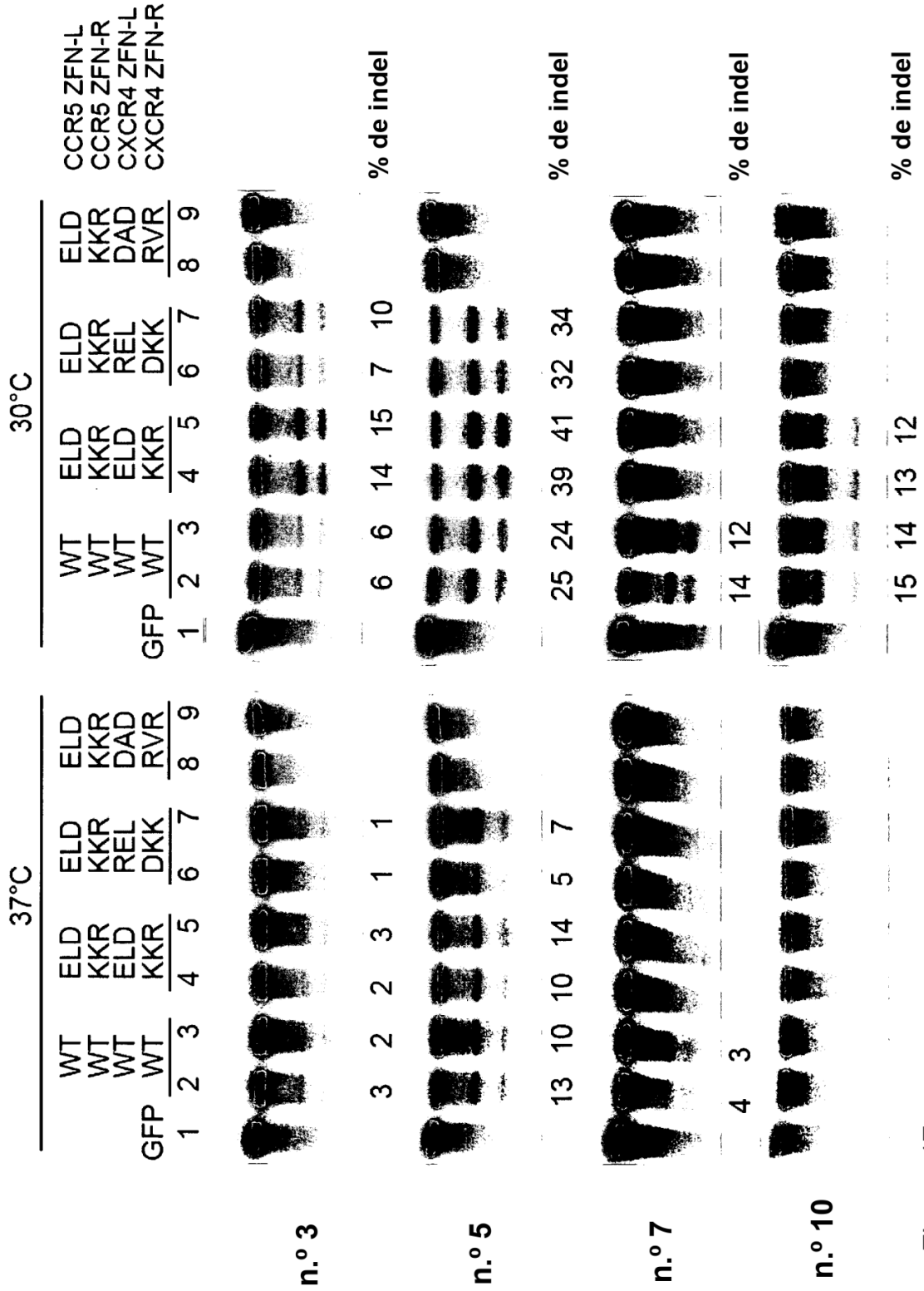


Figura 17

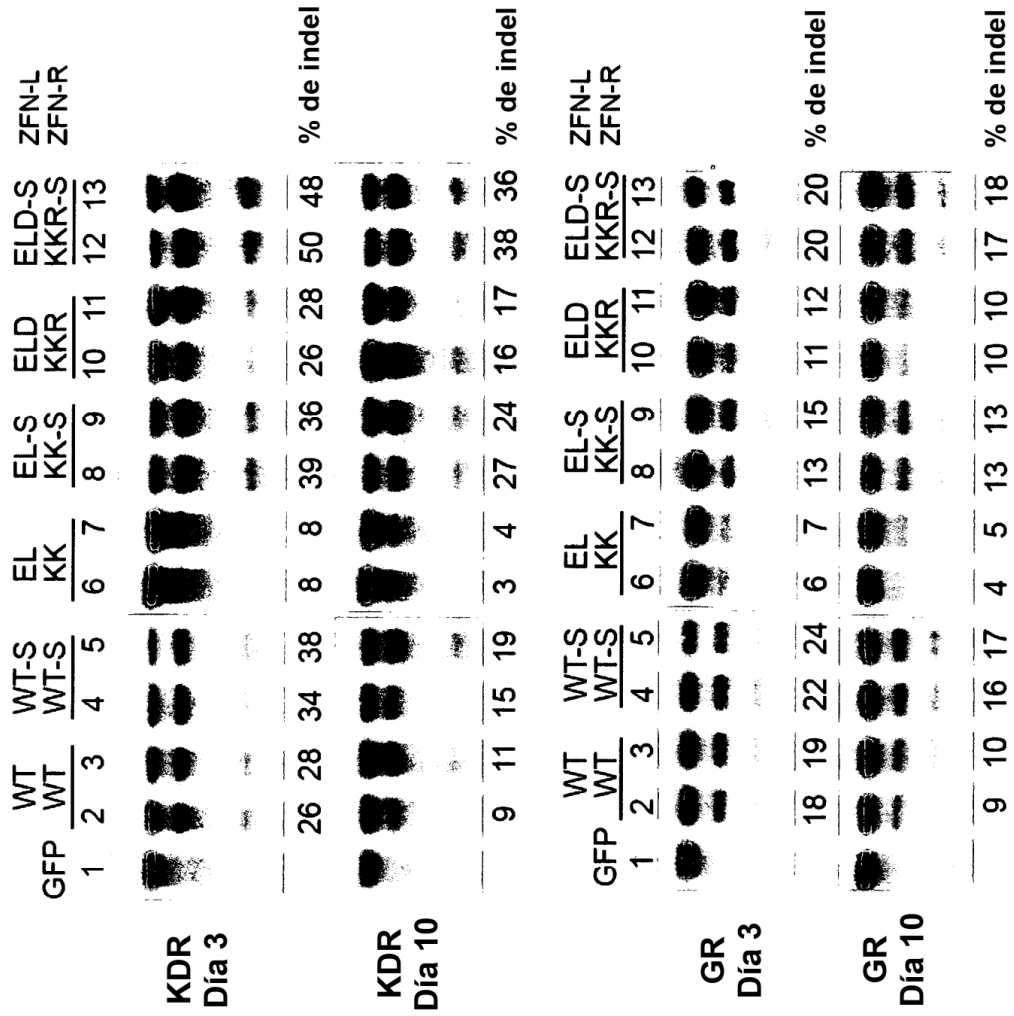


Figura 18

Figura 19

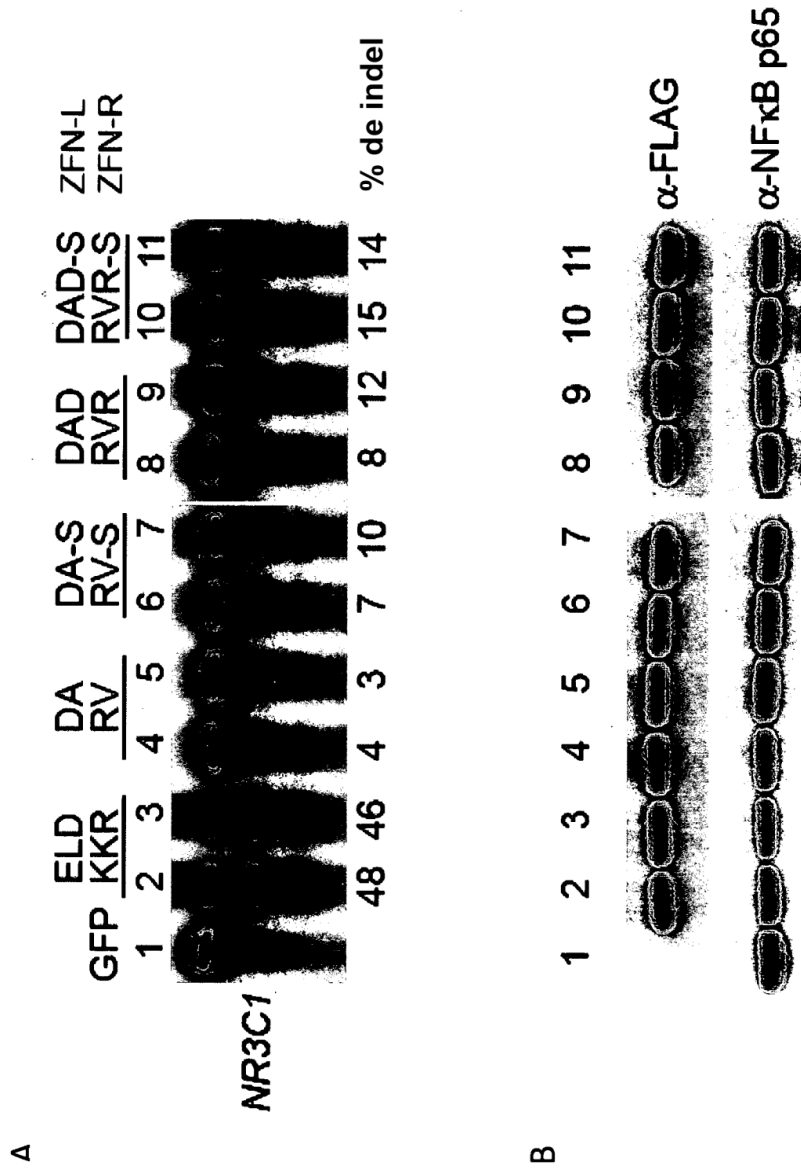


Figura 20

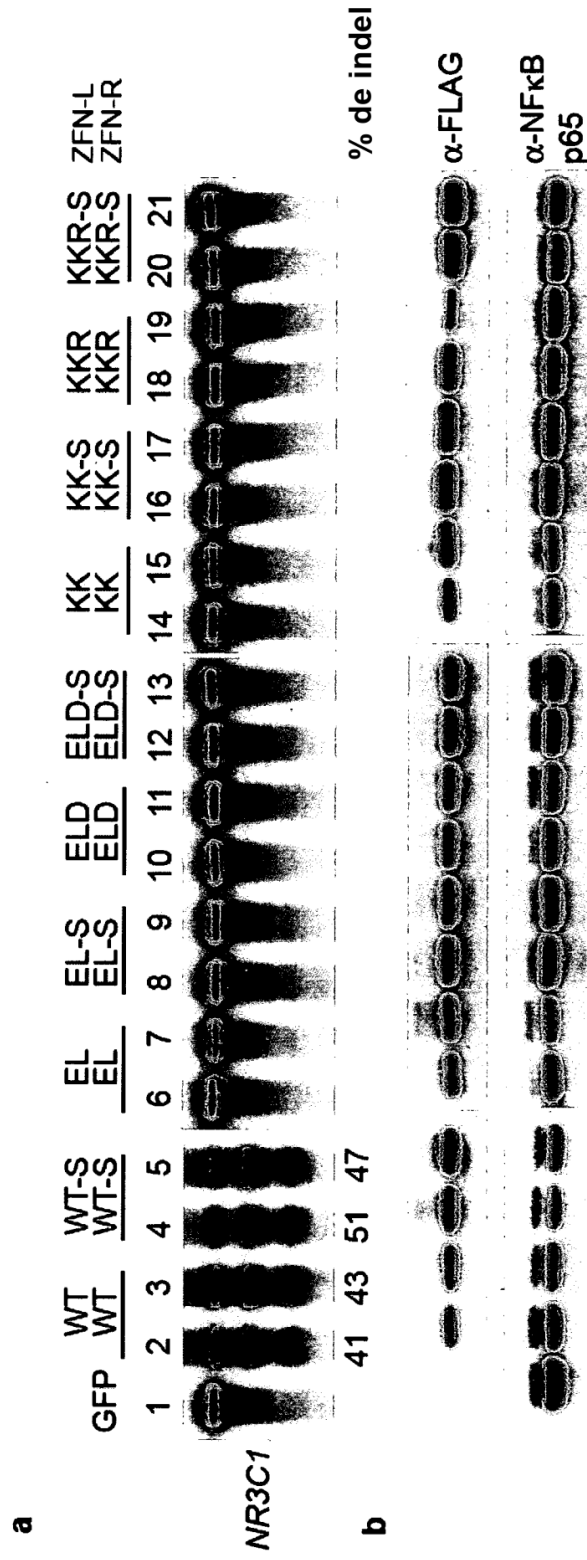


Figura 20



Figura 21A



Figura 21B

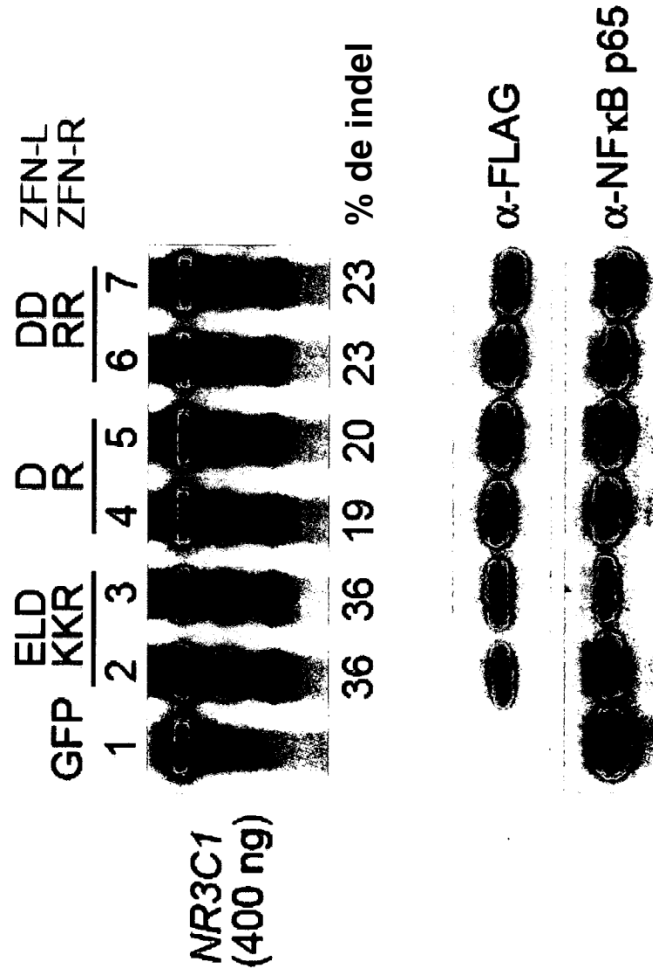


Figura 22

