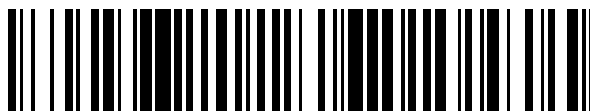


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 801 749**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2011** **E 17205646 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** **EP 3311822**

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

30 Prioridad:

17.11.2010 US 927557

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

13.01.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 801 749 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para modular PD1

Campo técnico

La presente divulgación pertenece a los campos de la modificación por ingeniería del genoma y la identificación de nucleasas.

Antecedentes

Se ha demostrado que las nucleasas, incluyendo las nucleasas de dedos de cinc y las endonucleasas de asentamiento tales como Scel, que se modifican por ingeniería para unirse específicamente a sitios diana, son útiles en la modificación por ingeniería del genoma. Por ejemplo, las nucleasas de dedos de cinc (ZFN) son proteínas que comprenden dedos de cinc específicos del sitio modificados por ingeniería fusionados a un dominio de nucleasa. Tales ZFN se han usado con éxito para la modificación del genoma en una variedad de especies diferentes. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes estadounidenses 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; y la publicación internacional WO 07/014275. Estas ZFN se pueden usar para crear una rotura de doble cadena (DSB) en una secuencia de nucleótidos diana, lo que aumenta la frecuencia de recombinación homóloga en el locus elegido como diana más de 1000 veces. Adicionalmente, la reparación imprecisa de una DSB específica del sitio por medio de una unión de extremos no homólogos (NHEJ) también puede dar como resultado una alteración génica. La creación de dos de tales DSB da como resultado la eliminación de regiones arbitrariamente grandes.

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

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

La solicitud de patente estadounidense 2009/0111119 A1 se refiere a identificar nucleasas funcionales en levadura que se unen a diferentes sitios diana. Más concretamente, se describen diversos ensayos para examinar e identificar rápidamente nucleasas modificadas por ingeniería biológicamente activas, tales como ZFN en el sistema de levadura y en particular que una proteína de dedos de cinc se une a un sitio diana en un gen de PD-1 humano (véase el ejemplo 5).

Además, el documento WO 2011/097036 se refiere a proporcionar nucleasas FokI mutantes modificadas por ingeniería que muestran una actividad y especificidad potenciadas en comparación con los dominios de escisión silvestres. En el ejemplo 1 se da a conocer la preparación de ZFN dirigidas al gen de PD-1 y en el ejemplo 5 sólo se notifica la actividad de los semidominios modificados por ingeniería en células primarias dirigidas al gen de PD-1 para tres pares de ZFN específicas de PD1, concretamente el par A, que comprende 12942 y 12974, el par B, que comprende 12942 y 25016, y el par C, que comprende 12942 y 25029.

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

Sumario

La presente divulgación se refiere al desarrollo de nucleasas dirigidas a PD1, por ejemplo, meganucleasas y

nucleasa de dedos de cinc (ZFN) modificadas por ingeniería.

La presente divulgación demuestra proteínas de dedos de cinc activas específicas para PD1 de seres humanos y roedores y proteínas de fusión, incluyendo factores de transcripción de proteínas de dedos de cinc (ZFP-TF) o nucleasas de dedos de cinc (ZFN), que comprenden estas proteínas de dedos de cinc específicas para PD1. Las proteínas que comprenden proteínas de dedos de cinc específicas de PD1 de la divulgación se pueden usar con propósitos terapéuticos y de investigación, incluso para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno en el que PD1 se expresa de manera aberrante, o cuando la ruta de PD1 se usa de manera aberrante debido a la sobreexpresión de un ligando de PD1. Por ejemplo, la elección como diana por nucleasa de dedos de cinc del locus de PD1 en células T se puede usar para bloquear la supresión inmunitaria dependiente de PD1 tanto en enfermedades infecciosas crónicas como en neoplasias malignas. Alternativamente, un locus de PD1 defectuoso se puede remediar usando inserción dirigida dependiente de ZFN de secuencias silvestres, o se puede usar un factor de transcripción de proteína de dedos de cinc (ZFP TF) para modular (por ejemplo, regular por incremento o regular por disminución) la expresión defectuosa de PD1. Adicionalmente, se puede usar un ZFP TF que elige como diana el locus de PD1 para modular un gen de PD1 silvestre.

La presente invención se refiere a una célula aislada que comprende una inserción o una delección en un gen de PD1 endógeno dentro de, o entre, las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 60 del gen de PD1 endógeno, en la que la inserción o delección se realiza tras la escisión del gen de PD1 endógeno mediante nucleasas de dedos de cinc primera y segunda, comprendiendo cada nucleasa de dedos de cinc un dominio de unión a ADN de dedos de cinc y un dominio de nucleasa, en la que la primera nucleasa de dedos de cinc comprende un dominio de unión a ADN de dedos de cinc que se une al sitio diana mostrado en SEQ ID NO: 56, comprendiendo el dominio de unión a ADN de dedos de cinc una proteína denominada 12942 ó 22237 tal como se muestra en la tabla 2 y la segunda nucleasa de dedos de cinc comprende un dominio de unión a ADN de dedos de cinc que se une al sitio diana mostrado en SEQ ID NO: 60, comprendiendo el dominio de unión a ADN de dedos de cinc una proteína denominada 18759, 25005, 25006, 25010, 25011, 25012, 25013, 25014, 25015, 25017, 25022, 25023, 25025, 25027, 25028, 25030, 25031, 25032, 25034, 25036, 25040 y 25041 tal como se muestra en la tabla 2.

En una realización preferida, en el presente documento se proporciona una célula aislada según la invención, en la que la inserción o delección inactiva el gen de PD1 mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ).

En otra realización preferida, en el presente documento se proporciona una célula aislada según la invención, en la que se inserta una secuencia exógena en el gen de PD1, en la que la secuencia exógena está flanqueada por secuencias que tienen homología con el gen de PD1 de tal manera que la secuencia exógena se integra mediante recombinación homóloga. En una realización preferida, la secuencia exógena codifica una proteína.

En una realización preferida, la célula aislada según la invención es una célula primaria o una célula madre. Preferiblemente, la célula primaria es una célula mononuclear de sangre periférica o un linfocito, o la célula madre es una célula madre embrionaria, una célula madre pluripotente inducida, una célula madre hematopoyética, una célula madre neuronal o una célula madre mesenquimatosa. Más preferiblemente, el linfocito es una célula T o una célula infiltrante de tumor (TIL).

En otra realización preferida, en el presente documento se proporciona la célula aislada según la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno, en la que la enfermedad o trastorno es un cáncer, una infección viral o una enfermedad autoinmunitaria, caracterizados por expresión aberrante de un gen de PD1. Más preferiblemente, la enfermedad o trastorno se trata adicionalmente administrando una o más terapias antivirales o anticancerosas adicionales al sujeto.

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

En otro aspecto más, en el presente documento se proporcionan ZFP-TF que pueden modular la expresión de un gen de PD1. En ciertos aspectos, los dominios de dedos de cinc de los ZFP-TF comprenden las hélices de reconocimiento que no se producen de forma natural mostradas en las tablas 1 ó 5 y/o se unen a los sitios diana mostrados en las tablas 2 ó 6. En otro aspecto, en el presente documento se dan a conocer métodos y composiciones para la regulación del gen de PD1. En ciertos aspectos, los métodos comprenden introducir una proteína de fusión que comprende una proteína de dedos de cinc que está modificada por ingeniería para unirse a un sitio diana en un gen de PD1 (o polinucleótido que codifica una proteína de fusión) en células de un paciente con una enfermedad o trastorno en los que la enfermedad o trastorno se caracteriza por la expresión aberrante de PD1 y/o el uso indeseable de la ruta de PD1, provocado por sobreexpresión de los ligandos de PD1. Los métodos pueden usarse en el tratamiento y/o la prevención de infecciones crónicas tales como el VIH y el VHC. De forma similar, los métodos y composiciones se pueden usar en el tratamiento y/o la prevención del cáncer y enfermedades malignas. Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar y/o prevenir incluyen carcinomas de pulmón, cánceres de páncreas, cánceres de hígado, cánceres de hueso, cánceres de mama, cánceres colorrectales, leucemias, cánceres de ovario, linfomas y cánceres de cerebro.

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar como tratamiento independiente, o se pueden usar combinados con otras terapias antivirales o anticancerosas. Estos métodos y composiciones se pueden proporcionar con terapias antivirales o anticancerosas de forma secuencial o se pueden administrar simultáneamente. Los métodos y composiciones dados a conocer también se pueden usar para modular la expresión de PD1 en un paciente aquejado de una enfermedad autoinmunitaria o se pueden usar para tratar a un paciente de este tipo mediante la integración en un alelo de PD1 silvestre o un alelo de PD1 con características alteradas si este paciente portaba un alelo defectuoso o indeseable. Se pueden construir líneas celulares para alterar específicamente esa secuencia del gen de PD1 para crear sistemas de examen para seleccionar compuestos terapéuticos que pueden alterar la regulación o funcionalidad de un gen de PD1.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra la alteración del gen de PD1 en PBMC humanas usando nucleasas de dedos de cinc específicas de PD1, tal como se determina mediante el ensayo de nucleasas SURVEYOR™ basado en Cel-1 que mide el porcentaje de mutaciones insertadas por unión de extremos no homólogos (NHEJ) que se induce cuando se introducen las ZFN indicadas en estas células. Las células se trataron con pares de ZFN que combinaban cada uno la ZFN 12942 con una variante de ZFN diferente que se unía a la cadena opuesta de ADN y formaba una nucleasa funcional tras la unión al locus diana con 12942. El número de SBS para la segunda ZFN del par se indica debajo de cada gráfico. La barra más a la izquierda de cada par muestra los porcentajes de NHEJ tres días después de la nucleofección para células incubadas a 37°C. La barra en segundo lugar desde la izquierda en cada par indicado muestra los porcentajes de NHEJ diez días después de la nucleofección para células incubadas a 37°C. La barra en segundo lugar desde la derecha en cada par indicado muestra los porcentajes de NHEJ tres días después de la nucleofección para células incubadas a 30°C y la barra más a la derecha de cada par indicado muestra los porcentajes de NHEJ diez días después de la nucleofección para células incubadas a 30°C.

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

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

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

La figura 5 representa los resultados para los pares de ZFN específicas de PD1 sometidas a pruebas en células T CD4+ y analizadas usando el ensayo de Cel-I para determinar la actividad de edición del genoma. En estas células, se observó hasta el 44% de edición con algunos pares.

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

La figura 7 es un gráfico que representa los resultados para ZFN específicas de PD1 sometidas a prueba en células T CD8+. En este experimento, los ARNm que codificaban las ZFN específicas de PD1 se transdujeron a células T CD8+ y el porcentaje de modificación de PD1 se analizó mediante el ensayo de Cel I. Se relacionó la cantidad de modificación observada con la cantidad de ARNm usado, dando cantidades menores de ARNm de entrada como resultado porcentajes menores de modificación de la diana. Estos resultados demuestran que las ZFN específicas

de PD1 descritas en el presente documento pueden modificar el locus de PD1 en líneas celulares y en células T primarias.

Descripción detallada

5 En el presente documento se describen composiciones y métodos para sistemas de examen *in vivo* de alto rendimiento para identificar nucleasas funcionales. En particular, los ensayos usan un sistema indicador para monitorizar la capacidad de una nucleasa para inducir una rotura de doble cadena en su sitio diana. Además, los ensayos se pueden usar para determinar el efecto de la nucleasa sobre el crecimiento celular (toxicidad).

10 La tecnología de las nucleasas modificadas por ingeniería se basa en la modificación por ingeniería de proteínas de unión a ADN que se producen de forma natural. Por ejemplo, se ha descrito la modificación por ingeniería de endonucleasas de asentamiento con especificidades de unión a ADN personalizadas. Chames *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res* 33(20): e178; Arnould *et al.* (2006) *J. Mol. Biol.* 355:443-458. Además, también se ha descrito la modificación por ingeniería de ZFP. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.534.261; 6.607.882; 6.824.978; 6.979.539; 6.933.113; 7.163.824; y 7.013.219.

15 Además, las ZFP se han unido a dominios de nucleasa para crear ZFN, una entidad funcional que puede reconocer su diana génica pretendida a través de su dominio de unión a ADN modificado por ingeniería (ZFP) y la nucleasa hace que el gen se corte cerca del sitio de unión a ZFP. Véase, por ejemplo, Kim *et al.* (1996) *Proc Nat'l Acad Sci USA* 93(3):1156-1160. Más recientemente, se han usado ZFN para la modificación del genoma en una variedad de organismos. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes estadounidenses 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; y la publicación internacional WO 07/014275.

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

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

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

General

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

55 Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan de manera intercambiable y se refieren a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido, en conformación lineal o circular, y en forma o bien de una o bien de dos cadenas. Para los propósitos de la presente divulgación, estos términos no deben interpretarse como

limitativos con respecto a la longitud de un polímero. Los términos pueden abarcar análogos conocidos de nucleótidos naturales, así como nucleótidos que están modificados en los restos de base, azúcar y/o fosfato (por ejemplo, estructuras principales de fosforotioato). En general, un análogo de un nucleótido particular tiene la misma especificidad de apareamiento de bases; es decir, un análogo de A experimentará apareamiento de bases con T.

- 5 Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. El término también se aplica a polímeros de aminoácidos en los que uno o más aminoácidos son análogos químicos o derivados modificados de los correspondientes aminoácidos que se producen de manera natural.

- 10 “Unión” se refiere a una interacción no covalente, específica de secuencia, entre macromoléculas (por ejemplo, entre una proteína y un ácido nucleico). No se necesita que todos los componentes de una interacción de unión sean específicos de secuencia (por ejemplo, contactos con residuos de fosfato en una estructura principal de ADN), siempre que la interacción en su conjunto sea específica de secuencia. Tales interacciones se caracterizan generalmente por una constante de disociación (K_d) de 10^{-6} M⁻¹ o inferior. “Afinidad” se refiere a la fuerza de unión: estando una mayor afinidad de unión correlacionada con una K_d más baja.

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

- 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 al ADN de una manera específica de secuencia a través de uno o más dedos de cinc, que son regiones de secuencia de aminoácidos dentro del dominio de unión cuya estructura se estabiliza a
25 través de la coordinación de un ion de cinc. El término proteína de unión a ADN de dedos de cinc a menudo se abrevia como proteína de dedos de cinc o ZFP.

- Los dominios de unión de dedos de cinc se pueden “modificar por ingeniería” para que se unan a una secuencia de nucleótidos predeterminada. Los ejemplos no limitativos de métodos para la modificación por ingeniería de proteínas de dedos de cinc son el diseño y la selección. Una proteína de dedos de cinc diseñada es una proteína que no se
30 produce en la naturaleza, cuyo diseño/composición provienen principalmente de criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computarizados para procesar información en una base de datos que almacena información de diseños de ZFP existentes y datos de unión. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 6.140.081; 6.453.242; y 6.534.261; véanse también los documentos WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496.

- 35 Una proteína de dedos de cinc “seleccionada” es una proteína que no se encuentra en la naturaleza, cuya producción proviene principalmente de un procedimiento empírico tal como presentación en fagos, trampa de interacción o selección híbrida. 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 “Escisión” se refiere a la rotura de la estructura principal covalente de una molécula de ADN. La escisión se puede iniciar mediante una variedad de métodos incluyendo, pero sin limitarse a, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Son posibles tanto la escisión de cadena sencilla como la escisión de doble cadena, y la escisión de doble cadena se puede producir como resultado de acontecimientos distintos de escisión de cadena sencilla. La escisión del ADN puede dar como resultado la producción o bien de extremos romos o bien de extremos
45 en bisel. En ciertos aspectos, se usan polipéptidos de fusión para la escisión de ADN de doble cadena dirigida.

- Un “semidominio de escisión” es una secuencia polipeptídica que, junto con un segundo polipéptido (ya sea idéntico o diferente) forma un complejo que tiene actividad de escisión (preferiblemente actividad de escisión de doble
50 cadena). Los términos “primer y segundo semidominios de escisión”; “semidominios de escisión + y -” y “semidominios de escisión derecho e izquierdo” se usan de manera intercambiable para referirse a pares de semidominios de escisión que se dimerizan.

Un “semidominio de escisión modificado por ingeniería” es un semidominio de escisión que se ha modificado para formar heterodímeros obligados con otro semidominio de escisión (por ejemplo, otro semidominio de escisión modificado por ingeniería). Véanse también las solicitudes de patente estadounidense n.ºs 10/912.932 y 11/304981 y la solicitud provisional estadounidense n.º 60/808.486 (presentada el 25 de mayo de 2006).

- 55 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 o bien de cadena sencilla o bien de doble cadena. El término “secuencia donadora” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se inserta en un genoma. Una secuencia donadora puede tener cualquier longitud, por ejemplo, entre 2 y 10.000 nucleótidos de longitud (o cualquier valor

entero entre los mismos o superior), preferiblemente entre aproximadamente 100 y 1.000 nucleótidos de longitud (o cualquier número entero entre los mismos), más preferiblemente entre aproximadamente 200 y 500 nucleótidos de longitud. La "cromatina" es la estructura de la nucleoproteína que comprende el genoma celular. La cromatina celular comprende ácido nucleico, principalmente ADN, y proteína, incluyendo histonas y proteínas cromosómicas distintas de histona. La mayor parte de la cromatina celular eucariota existe en forma de nucleosomas, en la que un núcleo de nucleosoma comprende aproximadamente 150 pares de bases de ADN asociados con un octámero que comprende dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4; y ADN ligador (de longitud variable dependiendo del organismo) se extiende entre núcleos de nucleosoma. Una molécula de histona H1 está generalmente asociada con el ADN ligador. Para los propósitos de la presente divulgación, se pretende que el término "cromatina" abarque todos los tipos de nucleoproteínas celulares, tanto procariotas como eucariotas. La cromatina celular incluye cromatina tanto cromosómica como episómica.

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

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

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

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

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

Una molécula "exógena" es una molécula que normalmente no está presente en una célula, pero que 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 etapa de desarrollo particular y las condiciones ambientales de la célula. Por lo tanto, por ejemplo, una molécula que sólo está presente durante el desarrollo embrionario del músculo es una molécula exógena con respecto a una célula muscular adulta. De manera similar, una molécula inducida por choque térmico es una molécula exógena con respecto a una célula que no se ha sometido a choque térmico. Una molécula exógena puede comprender, por ejemplo, una versión funcional de una molécula endógena defectuosa o una versión defectuosa de una molécula endógena que funciona normalmente.

Una molécula exógena puede ser, entre otras cosas, una molécula pequeña, tal como se genera mediante un procedimiento de química combinatoria, o una macromolécula tal como una proteína, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, glicoproteína, lipoproteína, polisacárido, cualquier derivado modificado de las moléculas anteriores o cualquier complejo que comprende una o más de las moléculas anteriores. Los ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN, pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena; pueden ser lineales, ramificados o circulares; y pueden tener cualquier longitud. Los ácidos nucleicos incluyen aquellos que pueden formar dúplex, así como ácidos nucleicos formadores de tríplex. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.176.996 y 5.422.251. Las proteínas incluyen, pero no se limitan a, proteínas de unión a ADN, factores de transcripción, factores de remodelación de la cromatina, proteínas de unión a ADN metilado, polimerasas, metilasas, desmetilasas, acetilasas, quinasas, fosfatasas, integrasas, recombinasas, ligasas, topoisomerasas, girasas y helicasas.

Una molécula exógena puede ser el mismo tipo de molécula que una molécula endógena, por ejemplo, una proteína

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

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

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

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

Un “gen”, para los propósitos de la presente divulgación, incluye una región de ADN que codifica un producto génico (véase más abajo), así como también todas las regiones de ADN que regulan la producción del producto génico, tanto si dichas secuencias reguladoras son adyacentes a secuencias codificantes y/o transcritas como si no. De acuerdo con esto, un gen incluye, pero no se limita 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, aisladores, elementos limítrofes, orígenes de replicación, sitios de anclaje a la matriz y regiones de control de locus.

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

La “modulación” de la expresión génica se refiere a un cambio en el nivel de expresión de un gen. La modulación de la expresión puede incluir, pero no se limita a, la activación génica y la represión génica. La modulación también puede ser completa, es decir en la que la expresión génica está totalmente inactivada o se activa hasta niveles silvestres o más allá; o puede ser parcial, en la que la expresión génica está parcialmente reducida, o parcialmente activada hasta una fracción de los niveles silvestres. Las células “eucariotas” incluyen, pero no se limitan a, células fúngicas (tales como levaduras), células vegetales, células animales, células de mamíferos y células humanas (por ejemplo, células T).

Los términos “unión operativa” y “operativamente unido” (o “unido de manera operable”) se usan de manera intercambiable con referencia a una yuxtaposición de dos o más componentes (tales como elementos de secuencia), en la que los componentes están dispuestos de manera que ambos componentes funcionan normalmente y permiten la posibilidad de que al menos uno de los componentes pueda mediar una función que se ejerce sobre al menos uno de los otros componentes. A modo de ilustración, una secuencia reguladora de la transcripción, tal como un promotor, está operativamente unida a una secuencia codificante si la secuencia reguladora de la transcripción controla el nivel de transcripción de la secuencia codificante en respuesta a la presencia o ausencia de uno o más factores reguladores de la transcripción. Generalmente, una secuencia reguladora de la transcripción está operativamente unida en *cis* con una secuencia codificante, pero no es necesario que esté directamente adyacente a la misma. Por ejemplo, un potenciador es una secuencia reguladora de la transcripción que está operativamente unida a una secuencia codificante, aunque no sean contiguas.

Con respecto a los polipéptidos de fusión, el término “operativamente unido” puede referirse al hecho de que cada uno de los componentes realiza la misma función en unión con el otro componente que si no estuvieran unidos de este modo. Por ejemplo, con respecto a un polipéptido de fusión en el que un dominio de unión a ADN de ZFP está

fusionado a un dominio de escisión, el dominio de unión a ADN de ZFP y el dominio de escisión están en unión operativa si, en el polipéptido de fusión, la porción de 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 la vecindad del sitio diana. De manera similar, con respecto a un polipéptido de fusión en el que un dominio de unión a ADN de ZFP está fusionado a un dominio de activación o represión, el dominio de unión a ADN de ZFP y el dominio de activación o represión están en unión operativa si, en el polipéptido de fusión, la porción de dominio de unión a ADN de ZFP puede unirse a su sitio diana y/o su sitio de unión, mientras que el dominio de activación puede regular por incremento la expresión génica o el dominio de represión puede regular por disminución la expresión génica.

Un "fragmento funcional" de una proteína, polipéptido o ácido nucleico es una proteína, polipéptido o ácido nucleico cuya secuencia no es idéntica a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa, pero conserva la misma función que la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa. Un fragmento funcional puede presentar más, menos o el mismo número de residuos que la molécula nativa correspondiente y/o puede contener una o más sustituciones de aminoácidos o nucleótidos. Los métodos para determinar la función de un ácido nucleico (por ejemplo, función codificante, capacidad para hibridarse a otro ácido nucleico) se conocen bien en la técnica. De manera similar, los métodos para determinar la función de proteínas se conocen bien. Por ejemplo, la función de unión a ADN de un polipéptido se puede determinar, por ejemplo, mediante ensayos de unión a filtro, desplazamiento de movilidad electroforética o inmunoprecipitación. La escisión de ADN se puede someter a ensayo mediante electroforesis en gel. Véase Ausubel *et al.*, citado anteriormente. La capacidad de una proteína para interaccionar con otra proteína se puede determinar, por ejemplo, mediante co-inmunoprecipitación, ensayos de dos híbridos o complementación, tanto genética como bioquímica. Véanse, por ejemplo, Fields *et al.* (1989) *Nature* 340:245-246; patente estadounidense n.º 5.585.245 y documento PCT WO 98/44350.

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

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

Visión general

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

Por tanto, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento permiten la modulación de un gen de PD1. La expresión de PD1 puede desactivarse, silenciarse, regularse por incremento o regularse por disminución usando ZFP TF o ZFN específicos de PD1, dependiendo de la necesidad. La expresión de PD1 puede regularse por disminución con ZFP-TF o una o más ZFN específicas de PD1, por ejemplo, en pacientes aquejados de enfermedades infecciosas crónicas o cánceres, y puede regularse por incremento en pacientes, por ejemplo, pacientes con enfermedad autoinmunitaria. Los métodos y composiciones de la divulgación también proporcionan agentes terapéuticos que comprenden un polinucleótido que codifica los ZFP TF y/o nucleasas específicos de PD1, en los que el polinucleótido se administra directamente al paciente. Además, la divulgación proporciona métodos y composiciones en los que el polinucleótido que codifica los ZFP TF y/o nucleasas se puede incorporar en un vector tal como un vehículo de suministro viral para la administración sistémica como agente terapéutico a un paciente afectado.

Dominios de unión a ADN

En el presente documento se describen composiciones que comprenden un dominio de unión a ADN que se une específicamente a un sitio diana en un gen de PD1. Se puede usar cualquier dominio de unión a ADN en las composiciones y métodos dados a conocer en el presente documento, incluyendo, pero sin limitarse a, un dominio de unión a ADN de dedos de cinc o un dominio de unión a ADN de una meganucleasa.

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

Un dominio de unión de dedos de cinc modificado por ingeniería puede tener una especificidad de unión novedosa, en comparación con una proteína de dedos de cinc que se produce de forma natural. Los métodos de modificación por ingeniería incluyen, pero no se limitan a, diseño racional y varios tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, el uso de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos triplete (o cuadruplete) y secuencias de aminoácidos de dedos de cinc individuales, en las que cada secuencia de nucleótidos triplete o cuadruplete está asociada con una o más secuencias de aminoácidos de dedos de cinc que se unen a la secuencia triplete o cuadruplete particular. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 6.453.242 y 6.534.261 de titularidad conjunta.

Se dan a conocer métodos de selección a modo de ejemplo, incluyendo presentación de fagos y sistemas de dos híbridos, en las patentes estadounidenses 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.410.248; 6.140.466; 6.200.759; y 6.242.568; así como los documentos WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 y GB 2.338.237. Además, la potenciación de la especificidad de unión para dominios de unión de dedos de cinc se ha descrito, por ejemplo, el documento WO 02/077227 de titularidad conjunta.

Además, como se da a conocer en estas y otras referencias, los dominios de dedos de cinc y/o proteínas de dedos de cinc de múltiples dedos pueden unirse entre sí usando cualquier secuencia de ligador adecuada, incluyendo, por ejemplo, ligadores de 5 o más aminoácidos de longitud. Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para secuencias de ligador a modo de ejemplo de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier combinación de ligadores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína. Además, la potenciación de la especificidad de unión para los dominios de unión de dedos de cinc se ha descrito, por ejemplo, en el documento WO 02/077227 de titularidad conjunta.

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

Además, tal como se da a conocer en estas y otras referencias, los dominios de dedos de cinc y/o proteínas de dedos de cinc de múltiples dedos pueden unirse entre sí usando cualquier secuencia de ligador adecuada, incluyendo, por ejemplo, ligadores de 5 o más aminoácidos de longitud. Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para secuencias de ligador a modo de ejemplo de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier combinación de ligadores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína.

Alternativamente, el dominio de unión a ADN puede derivarse de una nucleasa. Por ejemplo, se conocen las secuencias de reconocimiento de endonucleasas de asentamiento y meganucleasas tales como I-SceI, I-CeuI, PI-PsPI, PI-Sce, I-SceIV, I-Csml, I-PanI, I-Scell, I-Ppol, I-ScellI, I-Crel, I-TevI, I-TevII y I-TevIII. Véanse también la patente estadounidense n.º 5.420.032; la patente estadounidense n.º 6.833.252; Belfort *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon *et al.* (1989) *Gene* 82:115-118; Perler *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 y el catálogo de New England Biolabs. Además, la especificidad de unión a ADN de las endonucleasas de asentamiento y las meganucleasas puede modificarse por ingeniería para unirse a sitios diana no naturales. Véanse, por ejemplo, Chevalier *et al.* (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth *et al.* (2006) *Nature* 441:656-659; Paques *et al.* (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; publicación de patente estadounidense n.º 20070117128.

En ciertas realizaciones, el dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc modificada por ingeniería que

se une (de una manera específica de secuencia) a un sitio diana en un gen de PD1 y modula la expresión de PD1. Las ZFP pueden unirse selectivamente o bien a un alelo de PD1 mutante o bien a una secuencia de PD1 silvestre. Los sitios diana de PD1 incluyen normalmente al menos un dedo de cinc pero pueden incluir una pluralidad de dedos de cinc (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más dedos). Por lo general, las ZFP incluyen al menos tres dedos. Algunas de las ZFP incluyen cuatro, cinco o seis dedos. Las ZFP que incluyen tres dedos reconocen normalmente un sitio diana que incluye 9 ó 10 nucleótidos; las ZFP que incluyen cuatro dedos reconocen normalmente un sitio diana que incluye de 12 a 14 nucleótidos; mientras que las ZFP que tienen seis dedos pueden reconocer sitios diana que incluyen de 18 a 21 nucleótidos. Las ZFP también pueden ser proteínas de fusión que incluyen uno o más dominios reguladores, en las que estos dominios reguladores pueden ser dominios de activación o represión transcripcional.

Proteínas de fusión

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

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

Resultará evidente para los expertos en la técnica que, en la formación de una proteína de fusión (o un ácido nucleico que codifica la misma) entre un dominio de unión a ADN y un dominio funcional, son adecuados como dominio funcional o bien un dominio de activación o bien una molécula que interacciona con un dominio de activación. Esencialmente cualquier molécula que puede reclutar un complejo activador y/o actividad activadora (tal como, por ejemplo, acetilación de histonas) al gen diana es útil como dominio activador de una proteína de fusión. Los dominios aislantes, dominios de localización y proteínas de remodelación de cromatina tales como dominios que contienen ISWI y/o proteínas de dominio de unión a metilo adecuados para su uso como dominios funcionales en moléculas de fusión se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente estadounidense 2002/0115215 y 2003/0082552 de titularidad conjunta y en el documento WO 02/44376 de titularidad conjunta.

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

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

Las fusiones entre un componente polipeptídico de un dominio funcional (o un fragmento funcional del mismo), por un lado, y un dominio de unión a ADN no proteico (por ejemplo, antibiótico, intercalador, elemento de unión al surco menor, ácido nucleico) por el otro, se construyen mediante métodos de conjugación bioquímica conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, el catálogo de Pierce Chemical Company (Rockford, IL). Se han descrito métodos y composiciones para realizar fusiones entre un elemento de unión al surco menor y un polipéptido. Mapp *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3930-3935.

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

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

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

Se dan a conocer dominios funcionales a modo de ejemplo adicionales, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.534.261 de titularidad conjunta y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0160940.

También se pueden seleccionar dominios funcionales que se regulan mediante pequeñas moléculas o ligandos exógenos. Por ejemplo, se puede emplear la tecnología RheoSwitch® en la que un dominio funcional sólo adopta su conformación activa en presencia del ligando externo RheoChem™ (véase por ejemplo el documento US 20090136465). Por lo tanto, la ZFP puede estar operativamente unida al dominio funcional regulable en la que la actividad resultante del ZFP-TF está controlada por el ligando externo. En ciertos aspectos, la proteína de fusión comprende un dominio de unión a ADN y dominio de escisión (nucleasa). Como tal, la modificación genética se puede lograr usando una nucleasa, por ejemplo, una nucleasa modificada por ingeniería. La tecnología de nucleasas modificadas por ingeniería se basa en la modificación mediante ingeniería de proteínas de unión a ADN que se producen de forma natural. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento son ampliamente aplicables y pueden implicar cualquier nucleasa de interés. Los ejemplos de nucleasas incluyen meganucleasas y nucleasas de dedos de cinc. La nucleasa puede comprender dominios heterólogos de unión a ADN y de escisión (por ejemplo, nucleasas de dedos de cinc; dominios de unión a ADN de meganucleasa con dominios de escisión heterólogos) o, alternativamente, el dominio de unión a ADN de una nucleasa que se produce de forma natural se puede alterar para unirse a un sitio diana seleccionado (por ejemplo, una meganucleasa que se ha modificado por ingeniería para unirse a un sitio diferente del sitio de unión relacionado). Por ejemplo, se ha descrito la modificación por ingeniería de endonucleasas de asentamiento con especificidades de unión a ADN personalizadas, véanse Chames *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res* 33(20):e178; Arnould *et al.* (2006) *J. Mol. Biol.* 355:443-458 y Grizot *et al.*, (2009) *Nucleic Acids Res*, 7 de julio, publicación e. Además, también se ha descrito la modificación por ingeniería de ZFP. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.534.261; 6.607.882; 6.824.978; 6.979.539; 6.933.113; 7.163.824; y 7.013.219.

En ciertos aspectos, la nucleasa es una meganucleasa (endonucleasa de asentamiento). Las meganucleasas producidas de forma natural reconocen sitios de escisión de 15-40 pares de bases y se agrupan habitualmente en cuatro familias: la familia LAGLIDADG, la familia GTY-YIG, la familia de cajas His-Cyst y la familia HNH. Las endonucleasas de asentamiento a modo de ejemplo incluyen I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-ParI, I-Scell, I-PpoI, I-ScellI, I-Crel, I-TevI, I-TevII y I-TevIII. Sus secuencias de reconocimiento se conocen. Véanse también la patente estadounidense n.º 5.420.032; la patente estadounidense n.º 6.833.252; Belfort *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon *et al.* (1989) *Gene* 82:115-118; Perler *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 y el catálogo de New England Biolabs.

Los dominios de unión a ADN de meganucleasas que se producen de forma natural, principalmente de la familia LAGLIDADG, se han usado para promover la modificación del genoma específica del sitio en plantas, levaduras, *Drosophila*, células de mamíferos y ratones, pero este enfoque se ha limitado o bien a la modificación de genes homólogos que conservan la secuencia de reconocimiento de la meganucleasa (Monet *et al.* (1999), *Biochem. Biophysics. Res. Common.* 255:88-93) o bien a genomas previamente modificados por ingeniería en los que se ha

introducido una secuencia de reconocimiento (Route *et al.* (1994), *Mol. Celda. Biol.* 14:8096-106; Chilton *et al.* (2003), *Plant Physiology*. 133:956-65; Puchta *et al.* (1996), *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93:5055-60; Rong *et al.* (2002), *Genes Dev.* 16:1568-81; Gouble *et al.* (2006), *J. Gene Med.* 8(5):616-622). En consecuencia, se han realizado intentos para modificar por ingeniería meganucleasas que muestran especificidad de unión novedosa en sitios relevantes desde el punto de vista médico o biotecnológico (Porteus *et al.* (2005), *Nat. Biotechnol.* 23:967-73; Sussman *et al.* (2004), *J. Mol. Biol.* 342:31-41; Epinat *et al.* (2003), *Nucleic Acids Res.* 31:2952-62; Chevalier *et al.* (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth *et al.* (2006) *Nature* 441:656-659; Paques *et al.* (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; publicaciones de patentes estadounidenses n.ºs 20070117128; 20060206949; 20060153826; 20060078552; y 20040002092). Además, también se han unido operativamente dominios de unión a ADN que se producen de forma natural o modificados por ingeniería a partir de meganucleasas a un dominio de escisión de una nucleasa heteróloga (por ejemplo, FokI).

En otras realizaciones, la nucleasa es una nucleasa de dedos de cinc (ZFN). Las ZFN comprenden una proteína de dedos de cinc que se ha modificado por ingeniería para unirse a un sitio diana en un gen de elección y dominio de escisión o un semidominio de escisión.

Como se indicó anteriormente, los dominios de unión de dedos de cinc pueden modificarse por ingeniería para unirse a una secuencia de elección. Véanse, por ejemplo, Beerli *et al.* (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo *et al.* (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan *et al.* (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal *et al.* (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo *et al.* (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416. Un dominio de unión de dedos de cinc modificado por ingeniería puede tener una especificidad de unión novedosa, en comparación con una proteína de dedos de cinc que se produce de forma natural. Los métodos de modificación por ingeniería incluyen, pero no se limitan a, diseño racional y varios tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, el uso de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos triplete (o cuadruplete) y secuencias de aminoácidos de dedos de cinc individuales, en las que cada secuencia de nucleótidos triplete o cuadruplete está asociada con una o más secuencias de aminoácidos de dedos de cinc que se unen a la secuencia triplete o cuadruplete particular. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 6.453.242 y 6.534.261 de titularidad conjunta.

Se dan a conocer métodos de selección a modo de ejemplo, incluyendo presentación de fagos y sistemas de dos híbridos, en las patentes estadounidenses 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.410.248; 6.140.466; 6.200.759; y 6.242.568; así como los documentos WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 y GB 2.338.237. Además, la potenciación de la especificidad de unión para dominios de unión de dedos de cinc se ha descrito, por ejemplo, en el documento WO 02/077227 de titularidad conjunta.

Selección de sitios diana; las ZFN y los métodos para el diseño y la construcción de proteínas de fusión (y polinucleótidos que codifican las mismas) los conocen los expertos en la técnica y se describen en detalle en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.ºs 20050064474 y 20060188987.

Además, como se da a conocer en estas y otras referencias, los dominios de dedos de cinc y/o proteínas de dedos de cinc de múltiples dedos pueden unirse entre sí usando cualquier secuencia de ligador adecuada, incluyendo, por ejemplo, ligadores de 5 o más aminoácidos de longitud. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para las secuencias de ligador a modo de ejemplo de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier combinación de ligadores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína.

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

De manera similar, se puede derivar un semidominio de escisión a partir de cualquier nucleasa o porción de la misma, como se ha expuesto anteriormente, que requiere dimerización para la actividad de escisión. En general, se requieren dos proteínas de fusión para la escisión si las proteínas de fusión comprenden semidominios de escisión.

Alternativamente, se puede usar una única proteína que comprende dos semidominios de escisión. Los dos semidominios de escisión se pueden derivar a partir de la misma endonucleasa (o fragmentos funcionales de la misma), o cada semidominio de escisión se puede derivar a partir de una endonucleasa diferente (o fragmentos funcionales de la misma). Además, los sitios diana para las dos proteínas de fusión están dispuestos preferiblemente, uno con respecto al otro, de manera que la unión de las dos proteínas de fusión a sus sitios diana respectivos coloca los semidominios de escisión en una orientación espacial entre sí que permite que los

semidominios de escisión formen un dominio de escisión funcional, por ejemplo, mediante dimerización. Por lo tanto, en ciertos aspectos, los bordes cercanos de los sitios diana están separados por 5-8 nucleótidos o por 15-18 nucleótidos. Sin embargo, puede intervenir cualquier número entero de nucleótidos o pares de nucleótidos entre dos sitios diana (por ejemplo, desde 2 hasta 50 pares de nucleótidos o más). En general, el sitio de escisión se encuentra entre los sitios diana.

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

Una enzima de restricción tipo IIS a modo de ejemplo, cuyo dominio de escisión puede separarse del dominio de unión, es *Fok I*. Esta enzima en particular es activa de cómo dímero. Bitinaite *et al.* (1998) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95:10.570- 10.575. Por consiguiente, para los propósitos de la presente divulgación, la porción de la enzima *Fok I* usada en las proteínas de fusión dadas a conocer se considera un semidominio de escisión. Por lo tanto, para la escisión de la doble cadena dirigida y/o el reemplazo dirigido de secuencias celulares usando fusiones de dedos de cinc-*Fok I*, se pueden usar dos proteínas de fusión, cada una de las cuales comprende un semidominio de escisión de *FokI*, para reconstituir un dominio de escisión catalíticamente activo. Alternativamente, también se pueden usar una única molécula de polipéptido que contiene un dominio de unión de dedos de cinc y dos semidominios de escisión de *FokI*. Los parámetros para la escisión dirigida y la alteración de la secuencia dirigida usando fusiones de dedos de cinc-*Fok I* se proporcionan en otra parte de esta divulgación.

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

Se describen enzimas de restricción de tipo IIS a modo de ejemplo en la publicación internacional WO 07/014275. Las enzimas de restricción adicionales también contienen dominios de unión y escisión separables, y estos se contemplan en la presente divulgación. Véase, por ejemplo, Roberts *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:418-420.

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

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

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

Los semidominios de escisión modificados por ingeniería descritos en el presente documento se pueden preparar usando cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio de semidominios de escisión silvestres (*Fok I*) como se describe en el ejemplo 5 de la publicación de patente estadounidense n.º 20050064474 y el ejemplo 38 de las publicaciones de patentes estadounidenses n.ºs 2007/0305346 y 2008/0131962 y las solicitudes provisionales de patentes estadounidenses n.ºs 61/337.769, presentada en 8 de febrero de 2010 y 61/403.916, presentada el 23 de septiembre de 2010.

Pueden diseñarse fácilmente constructos de expresión de nucleasas usando métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes estadounidenses 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; y la publicación internacional WO 07/014275. En ciertos aspectos, la expresión de la nucleasa está bajo el control de un promotor inducible, por ejemplo el promotor de galactoquinasa que se activa (desreprime) en presencia de rafinosa y/o galactosa y se reprime en presencia de glucosa. En particular, se induce el promotor de la galactoquinasa y se expresa(n) la(s) nucleasa(s) después de cambios sucesivos en la fuente de carbono (por ejemplo, de glucosa a rafinosa a galactosa). Otros ejemplos no limitativos de promotores inducibles incluyen *CUP1*, *MET15*, *PHO5* y promotores sensibles a tet.

Suministro

Las proteínas (por ejemplo, las ZFP), los polinucleótidos que codifican las mismas y las composiciones que comprenden las proteínas y/o los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden suministrarse a una célula diana mediante cualquier medio adecuado. Las células adecuadas incluyen células y/o líneas celulares eucariotas y procariotas. Los ejemplos de tales células o líneas celulares generadas a partir de tales células incluyen COS, CHO (por ejemplo, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (por ejemplo, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), y células perC6, así como células de insecto tales como *Spodoptera fugiperda* (Sf) o células fúngicas tales como *Saccharomyces*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*. En ciertos aspectos, la línea celular es una línea celular CHO-K1, MDCK o HEK293. Las células primarias adecuadas incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y otros subconjuntos de células sanguíneas tales como células T CD4+ o células T CD8+. Las células adecuadas también incluyen células madre tales como, a modo de ejemplo, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre hematopoyéticas, células madre neuronales y células madre mesenquimatosas.

Los métodos de suministro de proteínas que comprenden proteínas de dedos de cinc como se describe en el presente documento se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 6.453.242; 6.503.717; 6.534.261; 6.599.692; 6.607.882; 6.689.558; 6.824.978; 6.933.113; 6.979.539; 7.013.219; y 7.163.824.

Las proteínas de dedos de cinc como se describe en el presente documento también pueden suministrarse usando vectores que contienen secuencias que codifican una o más proteínas de dedos de cinc. Se puede usar cualquier sistema de vector incluyendo, pero sin limitarse a, vectores plasmídicos, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales, vectores poxvirales; vectores de herpesvirus y vectores de virus adenoasociados, etc. Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 6.534.261; 6.607.882; 6.824.978; 6.933.113; 6.979.539; 7.013.219; y 7.163.824. Además, resultará evidente que cualquiera de estos vectores puede comprender una o más secuencias que codifican proteínas de dedos de cinc. Por lo tanto, cuando se introducen una o más ZFP en la célula, las ZFP pueden portarse en el mismo vector o en vectores diferentes. Cuando se usan múltiples vectores, cada vector puede comprender una secuencia que codifica una o múltiples ZFP.

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

Los métodos de suministro no viral de ácidos nucleicos incluyen electroporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, policonjugados o conjugados de lípidos:ácidos nucleicos, ADN desnudo, viriones artificiales y captación de ADN potenciada por agentes. También se puede usar sonoporación usando, por ejemplo, el sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) para el suministro de ácidos nucleicos.

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

La preparación de complejos de lípido:ácido nucleico, incluyendo liposomas dirigidos tales como complejos de inmunolípidos, se conoce bien por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Crystal, *Science* 270:404-410 (1995); Blaese *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995); Behr *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2:710-722 (1995)); Ahmad *et al.*, *Cancer Res.* 52:4817-4820 (1992)); patentes estadounidenses n.ºs 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028 y 4.946.787).

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

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

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

En aplicaciones en las que se prefiere la expresión transitoria, se pueden usar sistemas basados en adenovirus. Los vectores basados en adenovirus pueden presentar una eficacia de transducción muy alta en muchos tipos de células y no requieren división celular. Con tales vectores, se han obtenido altos títulos y altos niveles de expresión. Este vector se puede producir en grandes cantidades en un sistema relativamente simple. También se usan vectores de virus adenoasociados ("AAV") para transducir células con ácidos nucleicos diana, por ejemplo, en la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos, y para procedimientos de terapia génica *in vivo* y *ex vivo* (véanse, por ejemplo, West *et al.*, *Virology* 160:38-47 (1987); la patente estadounidense n.º 4.797.368; el documento WO 93/24641; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994); Muzyczka, *J. Clin. Invest.* 94:1351 (1994)). La construcción de vectores de AAV recombinantes se describe en varias publicaciones, incluyendo la patente estadounidense 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).

Actualmente, están disponibles al menos seis enfoques de vectores virales para la transferencia génica en ensayos clínicos, que usan enfoques que implican la complementación de vectores defectuosos mediante genes insertados en líneas celulares cooperadoras para generar el agente transductor.

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

Los vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) son prometedores sistemas de suministro génico alternativos basados en el virus adenoasociado tipo 2 de parvovirus defectuoso y no patógeno. Todos los vectores se derivan de un plásmido que sólo conserva las repeticiones terminales invertidas de AAV de 145 pb que flanquean el casete de expresión transgénica. La transferencia génica eficiente y el suministro de transgenes 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)). También se pueden

usar otros serotipos de AAV, incluyendo AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 y AAV8, de acuerdo con la presente invención.

Se pueden producir vectores adenovirales (Ad) recombinantes deficientes para la replicación con un título alto e infectan fácilmente varios tipos de células diferentes. La mayoría de los vectores de adenovirus están modificados por ingeniería de forma que un transgén reemplaza a los genes E1a, E1b y/o E3 de Ad; posteriormente, se propaga el vector de defectuoso para la replicación en células 293 humanas que suministran la función génica deletionada en *trans*. Los vectores de Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos *in vivo*, incluyendo células diferenciadas que no están en división tales como las que se encuentran en el hígado, el riñón y el músculo. Los vectores de Ad convencionales tienen una gran capacidad de carga. Un ejemplo del uso de un vector de Ad en un ensayo clínico implicó la terapia de polinucleótidos para la inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Sterman *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9 (1998)). Los ejemplos adicionales del uso de vectores de adenovirus para la transferencia 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).

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

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

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

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

Las células adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células y/o líneas celulares eucariotas y procariotas. Los ejemplos no limitativos de tales células o líneas celulares generadas a partir de tales células incluyen COS, CHO (por ejemplo, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79,

B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (por ejemplo, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T) y células perC6 así como células de insecto tales como *Spodoptera fugiperda* (Sf) o células fúngicas tales como *Saccharomyces*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*. En ciertos aspectos, la línea celular es una línea celular CHO-K1, MDCK o HEK293. Además, pueden aislarse células primarias y usarse *ex vivo* para la reintroducción en el sujeto que se debe tratar después del tratamiento con las ZFN. Las células primarias adecuadas incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y otros subconjuntos de células sanguíneas tales como, pero sin limitarse a, células T CD4+ o células T CD8+. Las células adecuadas también incluyen células madre tales como, a modo de ejemplo, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre hematopoyéticas, células madre neuronales y células madre mesenquimatosas.

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

Se aíslan células madre para la transducción y la diferenciación usando métodos conocidos. Por ejemplo, se aíslan células madre a partir de células de la médula ósea mediante lavado de células de la médula ósea con anticuerpos que se unen a células no deseadas, tales como CD4+ y CD8+ (células T), CD45+ (células panB), GR-1 (granulocitos) e IAD (células presentadoras de antígeno diferenciadas) (véase Inaba *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1693-1702 (1992)).

En algunas realizaciones también pueden usarse células madre que se han modificado. Por ejemplo, células madre que se han hecho resistentes a la apoptosis pueden usarse como composiciones terapéuticas en las que las células madre también contienen los ZFP TF de la invención. Puede producirse resistencia a la apoptosis, por ejemplo, desactivando BAX y/o BAK usando ZFN específicas de BAX o BAK (véase la solicitud de patente estadounidense n.º 12/456.043) en las células madre, o aquellas que se alteran en una caspasa, nuevamente usando ZFN específicas de caspasa-6, por ejemplo. Estas células pueden transfectarse con los ZFP TF que se sabe que regulan PD1 mutante o silvestre.

Los vectores (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, liposomas, etc.) que contienen ácidos nucleicos de ZFP terapéuticos también se pueden administrar directamente a un organismo para la transducción de células *in vivo*. Alternativamente, se puede administrar ADN desnudo. La administración se realiza mediante cualquiera de las vías normalmente usadas para introducir una molécula para que entre en última instancia en contacto con células sanguíneas o tisulares, incluyendo, pero sin limitarse a, inyección, infusión, aplicación tópica y electroporación. Hay métodos disponibles adecuados para administrar tales ácidos nucleicos y los conocen bien los expertos en la técnica, y aunque se puede usar más de una vía para administrar una composición particular, una vía particular puede proporcionar a menudo una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía.

Se dan a conocer métodos para la introducción de ADN en células madre hematopoyéticas, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.928.638. Los vectores útiles para la introducción de transgenes en células madre hematopoyéticas, por ejemplo, células CD34+ incluyen adenovirus tipo 35.

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

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

Aplicaciones

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

Las enfermedades y estados en los que se pueden usar ZFP TF o ZFN que reprimen PD1 como agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades infecciosas crónicas y cáncer. Las enfermedades y estados en los que la activación de un gen de PD1 puede ser útil como tratamiento terapéutico incluyen enfermedades autoinmunitarias tales como el lupus eritematoso sistémico (LES). Los polinucleótidos que codifican

ZFP TF o ZFN se pueden usar como agentes terapéuticos en sí mismos, o se pueden incorporar en vectores para su suministro.

Los métodos y composiciones que comprenden ZFP-TF que reprimen un alelo de PD1 y/o ZFN específicas de PD1 también pueden usarse junto con otros agentes terapéuticos diseñados para tratar una enfermedad infecciosa crónica o cáncer. Estas ZFP o ZFN (o polinucleótidos que codifican estas ZFP o ZFN) se pueden administrar simultáneamente (por ejemplo, en las mismas composiciones farmacéuticas) o pueden administrarse secuencialmente en cualquier orden. Se puede tratar cualquier tipo de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinomas de pulmón, cáncer de páncreas, cánceres de hígado, cánceres de hueso, cánceres de mama, cánceres colorrectales, cánceres de ovario, leucemias, linfomas, cánceres de cerebro y similares. De forma similar, los ZFP TF diseñados para activar un alelo de PD1 se pueden usar con otros agentes terapéuticos diseñados para tratar una enfermedad autoinmunitaria.

Las composiciones para el tratamiento también incluyen composiciones celulares en las que una copia mutante del alelo de PD1 dentro de células aisladas de un paciente se ha modificado para dar un alelo de PD1 silvestre usando una ZFN específica de PD1. Estas células modificadas *ex vivo* se reintroducen entonces en el paciente. Además, también se contemplan métodos y composiciones que comprenden células madre modificadas. Por ejemplo, las composiciones de células madre en las que una copia mutante del alelo de PD1 dentro de las células madre se ha modificado para dar un alelo de PD1 silvestre usando una ZFN específica de PD1. En otras realizaciones, se proporcionan composiciones de células madre en las que un alelo de PD1 silvestre dentro de las células madre se ha modificado usando ZFN específicas de PD1. Estas composiciones se pueden usar junto con otros agentes terapéuticos. Estas composiciones pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo, en las mismas composiciones farmacéuticas) o pueden administrarse secuencialmente en cualquier orden.

Los métodos y composiciones de la divulgación también son útiles para el diseño y la implementación de modelos *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo, modelos animales de infección crónica, cáncer o autoinmunidad, que permiten el estudio de estos trastornos y el descubrimiento adicional de agentes terapéuticos útiles.

Los siguientes ejemplos se refieren a realizaciones a modo de ejemplo de la presente divulgación en las que la nucleasa comprende una ZFN. Se apreciará que esto es únicamente con fines a modo de ejemplo y que se pueden usar otras nucleasas, por ejemplo, endonucleasas de asentamiento (meganucleasas) con dominios de unión a ADN modificados por ingeniería y/o fusiones de origen natural de dominios de unión a ADN de endonucleasas de asentamiento (meganucleasas) modificadas por ingeniería y dominios de escisión heterólogos.

Ejemplos

Ejemplo 1: identificación de ZFN específicas de PD1 biológicamente activas de manera persistente

Se ensamblaron ZFN contra el gen de PD1 humano y se sometieron a prueba mediante ensayos ELISA y CEL1 como se describe en Miller *et al.* (2007) *Nat. Biotechnol.* 25: 778-785 y la publicación de patente estadounidense n.º 20050064474 y la publicación de patente internacional WO2005/014791.

En la tabla 1 se dan a conocer ejemplos específicos de ZFP. La primera columna de esta tabla es un nombre de referencia interno (número) para una ZFP. La tabla 2 enumera sitios de unión a la diana en PD1. "F" se refiere al dedo y el número que sigue a "F" se refiere a qué dedo de cinc (por ejemplo, "F1" se refiere al dedo 1).

Tabla 1: proteínas de dedos de cinc dirigidas a PD1 humano

ES 2 801 749 T3

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

12972	DDWNLSQ (SEQ ID NO:22)	RSANLTR (SEQ ID NO:17)	RSDHLSQ (SEQ ID NO:18)	TSSNRKT (SEQ ID NO:19)	DRSNLSR (SEQ ID NO:20)	RSDALAR (SEQ ID NO:21)
18759	RSSALSR (SEQ ID NO:23)	RPLALKH (SEQ ID NO:24)	RNDHRKN (SEQ ID NO:12)	TRPVLKR (SEQ ID NO:25)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A
22237	QSGHLSR (SEQ ID NO:1)	RSDSLSV (SEQ ID NO:2)	HNDSRKN (SEQ ID NO:3)	RANSLLR (SEQ ID NO:26)	RSDHLTQ (SEQ ID NO:5)	N/A
25005	RPSTLHR (SEQ ID NO:27)	RSEDLTR (SEQ ID NO:28)	RNNNLRT (SEQ ID NO:29)	TRPVLKR (SEQ ID NO:25)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A
25006	RPSTLHR (SEQ ID NO:27)	RSEDLTR (SEQ ID NO:28)	TNWHLRT (SEQ ID NO:30)	TRPVLKR (SEQ ID NO:25)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A
25010	RPSTLHR (SEQ ID NO:27)	RSEDLTR (SEQ ID NO:28)	RTPHLTL (SEQ ID NO:31)	TRPVLKR (SEQ ID NO:25)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A
25011	RPSTLHR (SEQ ID NO:27)	RSEDLTR (SEQ ID NO:28)	RSAQLAT (SEQ ID NO:32)	TRPVLKR (SEQ ID NO:25)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A
25012	RPSTLHR (SEQ ID NO:27)	RSEDLTR (SEQ ID NO:28)	RCTHLYL (SEQ ID NO:33)	TRPVLKR (SEQ ID NO:25)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A
25013	RPSTLHR (SEQ ID NO:27)	RSEDLTR (SEQ ID NO:28)	RPTQRYs (SEQ ID NO:34)	TRPVLKR (SEQ ID NO:25)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A
25014	RPSTLHR (SEQ ID NO:27)	RSEDLTR (SEQ ID NO:28)	RANHREC (SEQ ID NO:35)	TRPVLKR (SEQ ID NO:25)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A
25015	RPSTLHR (SEQ ID NO:27)	RSEDLTR (SEQ ID NO:28)	RANHREC (SEQ ID NO:35)	TRPVLKR (SEQ ID NO:25)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A
25016	RKFARPS (SEQ ID NO:36)	RNFSRSD (SEQ ID NO:37)	HPHHRMC (SEQ ID NO:38)	TRPVLKR (SEQ ID NO:25)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A
25017	RPSTLHR (SEQ ID NO:27)	RSEDLTR (SEQ ID NO:28)	RMGRLST (SEQ ID NO:39)	TRPVLKR (SEQ ID NO:25)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A
25022	RPSTLHR (SEQ ID NO:27)	RSEDLTR (SEQ ID NO:28)	RHSRLTT (SEQ ID NO:40)	TRPVLMR (SEQ ID NO:41)	DRSALAR (SEQ ID NO:9)	N/A

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

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

ES 2 801 749 T3

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

25031	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60)
25032	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60)
25034	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60)
25036	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60)
25040	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60)
25041	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO:60)

Se realizaron ensayos iniciales de actividad *in vitro* en muestras de células nucleofectadas como se ha descrito anteriormente. En resumen, el plásmido que codifica las fusiones ZFP-*Fok I* se introdujo en células K562 mediante transfección usando el kit de nucleofección Amaxa™ de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Para la transfección, se mezclaron dos millones células K562 con cantidades variables de cada plásmido de expresión de nucleasa de dedos de cinc y 100 µl de disolución V de Amaxa™. Se transfectaron las células en un dispositivo Amaxa Nucleofector II™ usando el programa T-16. Inmediatamente después de la transfección, se dividieron las células en dos matraces diferentes y se hicieron crecer en medio RPMI (Invitrogen) suplementado con FBS al 10% en CO₂ al 5% o bien a 30°C o bien a 37°C durante cuatro días.

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

Tabla 3: NHEJ de PD1 %

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

Como se muestra en la tabla 3, el tratamiento de células con ZFN contra el exón 5 provoca la pérdida de una mayor proporción de células con genoma editado de la población, mientras que la señal de edición de genoma en células tratadas con ZFN diseñadas contra el exón 1 es mucho más estable.

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

También se sometieron a prueba los constructos en muestras de PBMC primarias que se habían mantenido o bien a 30°C o bien a 37°C durante o bien 3 o bien 10 días (véase la tabla 4). En resumen, se obtuvieron PBMC de AIIcells y se cultivaron en RPMI + FBS al 10% + L-glutamina al 1% (30 mg/ml) + IL-2 (1 ng/ml, Sigma) y se activaron con perlas anti-CD3/CD28 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dyna). Se sembraron las células a 3E5 células/ml en un volumen de 1 ml en una placa de 24 pocillos.

Se construyeron vectores adenovirales que contenían los pares de ZFN de interés como se describe (véase la

publicación de patente estadounidense 20080159996) y se añadieron dos días más tarde a una MOI de 10, 30 ó 100 (MOI calculada basándose en el título de infección).

Se recogieron las células 3 ó 10 días después de la exposición al virus y se determinó la eficacia de modificación génica usando un ensayo de nucleasa SURVEYOR™ basado en Cel-I, realizado como se describe en la publicación de patente internacional WO 07/014275. Véase también Oleykowski *et al.* (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:4597-4602; Qui *et al.* (2004) *BioTechniques* 36:702-707; Yeung *et al.* (2005) *BioTechniques* 38:749-758.

Para los pares de ZFN mostrados en la tabla 4, se sometió a prueba cada ZFN en combinación con ZFN 12942. La actividad se mide mediante el porcentaje de actividad NHEJ según se mide mediante el ensayo de nucleasa SURVEYOR™ basado en Cel-1 descrito anteriormente.

También se sometieron a prueba pares adicionales de ZFN específicas de PD1 para determinar la actividad en PBMC primarias como se describió anteriormente y los resultados se muestran en la tabla 4. En los datos mostrados en la tabla 4, el monómero 12942 específico de PD1 siempre se emparejó con la segunda ZFN enumerada en la tabla 4 para formar un par activo (es decir, se emparejó ZFN 12942 con cada una de ZFN 12947 a 25041). Véase también la figura 1 (las muestras son como se indica en la tabla 4).

Tabla 4: actividad de ZFN de PD1

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

25027	6,0	9,5	5,9	6,6	16
25028	4,3	5,2	4,8	6,2	17
25029	8,1	12,8	7,6	14,3	18
25030	7,6	9,6	5,4	10,7	19
25031	9,4	14,5	3,8	15,3	20
25032	6,7	4,2	6,6	6,0	21
25034	4,9	4,7	6,2	4,1	22
25036	8,3	4,2	6,9	9,7	23
25040	6,1	3,6	3,6	4,6	24
25041	7,9	11,2	5,2	4,5	25

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

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

Se recogieron las células 3 ó 10 días después de la nucleofección y se determinó la eficacia de modificación génica usando un ensayo de nucleasa SURVEYOR™ basado en Cel-1, realizado como se describe en la publicación de patente internacional WO 07/014275. Véanse también Oleykowski *et al.* (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:4597- 4602; Qui *et al.* (2004) *BioTechniques* 36:702-707; Yeung *et al.* (2005) *BioTechniques* 38:749-758.

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

También se sometieron a prueba estas ZFN en el sistema de levadura como se describe en la publicación estadounidense n.º 20090111119.

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

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

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

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

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

Núm. SBS	Sitio diana
14534	gtGCTGCAGTTGAGCTGgcaatcagggt (SEQ ID NO:75)
14534- FokI KK	gtGCTGCAGTTGAGCTGgcaatcagggt (SEQ ID NO:75)
14536	ccCAAGTGAATGACCAGGGTactgccc (SEQ ID NO:76)
14536-FokI EL	ccCAAGTGAATGACCAGGGTactgccc (SEQ ID NO:76)
14545	caGCTGCCCCAACAGGCAtgactccaca (SEQ ID NO:77)
14545- FokI KK	caGCTGCCCCAACAGGCAtgactccaca (SEQ ID NO:77)
14546	atGATCTGGAAGCGGGCatcctggacgg (SEQ ID NO:78)
14546- FokI EL	atGATCTGGAAGCGGGCatcctggacgg (SEQ ID NO:78)

El día 1, se procesaron esplenocitos recogidos de ratones Pmel TCR transgénicos/Rag1 -/- para dar una suspensión de una sola célula y se resuspendieron en medio completo (RPMI-1640, suero bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, 2- mercaptoetanol 50 µM) con 25 µl de Invitrogen Mouse T-Activator CD3/CD28 Dynabeads/10⁶ células. Se sembraron las células en placa de 24 pocillos a 2 x 10⁶ células/ml (2 ml/pocillo). El día 3, se recogieron las células, se separaron de las perlas usando un imán y se contaron. Se realizó la transfección de esplenocitos siguiendo el protocolo proporcionado con el kit de nucleofección Amaxa™. En resumen, se resuspendieron 1x 10⁷ células viables en 100 µl de disolución Amaxa Nucleofector y se transfectaron o bien con 4 µg de plásmido que contenía el par 14546 y 14545 de ZFN, o bien con 4 µg de plásmido mut PD1 Fok1 que contenía el par 14546-FokI EL y 14545-FokI KK de ZFN, 2,5 µg de vector Amaxa pmax GFP, o un control sin ADN, usando Amaxa Nucleofector (programa X-01). Se cultivaron las células en 2 ml de medio Amaxa Mouse T Cell Nucleofector completamente suplementado a 30°C después de la transfección. Al día siguiente, se retiró un ml de medio Amaxa Mouse T Cell Nucleofector y se reemplazó por un ml de medio completo suplementado con IL-2 10 U/ml. Dos días después, se recogieron las células y se contaron. Se sembraron dos millones de células de cada uno de los grupos en pocillos recubiertos con anticuerpo anti-CD3 en una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, se recogieron las células y se tiñeron con PE anti-PD1; PE-Cy7 anti-CD3 y APC anti-CD8. Se analizaron las células en un instrumento BD FACSCalibur. Las gráficas muestran el % de células CD3+CD8+ positivas para PD1 en cada grupo y la mediana de la fluorescencia de PD1 para cada grupo (véase la figura 3). Los datos muestran que la expresión de PD1 disminuye en las células que recibieron las ZFN específicas de PD1, incluso en presencia de estimulación anti-CD3.

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

Ejemplo 3: actividad de ZFN específicas de PD1 humano en TIL

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

Tabla 7: expresión y viabilidad de PD1 en TIL

	Estimulación con CD3			Extractos de tumores		
	GFP	12942 EL / 12947 KK	12942/12947	GFP	12942 EL / 12947 KK	12942/12947
Expresión de PD1	32,2%	31,5%	14,1%	22,9%	13,8%	7,5%
% de viabilidad de TIL	30,3%	34,2%	45,6%	18%	32%	47,9%
% de viabilidad de células tumorales	N/A	N/A	N/A	45,7%	33,1%	19,6%
% PD1 + células divididas	1,6%	0,9%	0,3%	1,1%	0,3%	0,1%
% PD1 - células divididas	3,9%	3,0%	2,1%	3,0%	1,4%	0,8%

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

Ejemplo 4: Purificación de células T humanas primarias con PD1 editado

Se sometieron a prueba los pares de ZFN específicas de PD1 que se habían elaborado adicionalmente en células T CD4+ como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Como se ve en figura 5, se observó una edición de hasta el 44% con algunos pares. En este experimento, "control positivo" indica el corte usando el par de ZFN 25025/12942

en células T CD8+ realizado anteriormente en diferentes condiciones experimentales.

Se eligió un par principal, 25029/12942 para uso adicional en el aislamiento de células con PD1 modificado. En resumen, en estos experimentos, se trataron células T CD4+ con ARNm que codificaba las ZFN específicas de PD1, se cultivaron en condiciones de "30 grados" y a continuación se estimularon con una primera exposición a perlas anti-CD3/CD8 (Dynal) como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1, lo cual estimula la fuerte expresión de los transgenes de ZFN y promueve la escisión en el locus de PD1 (véase la publicación de patente estadounidense n.º 20080311095). Después de esta primera estimulación, se reestimularon las células y se sometieron a un procedimiento de purificación, o bien mediante FAC o bien mediante cromatografía de afinidad.

En resumen, se trataron las células T CD4+ o bien con ZFN específicas de CCR5 (véase la publicación de patente estadounidense 20080159996) o bien con las ZFN específicas de PD1. Se recogieron células y se analizaron para determinar la edición de PD1 mediante el ensayo de Cel-I (descrito anteriormente), i) después de la primera estimulación, ii) después de la segunda estimulación pero antes de cualquier purificación, iii) después de la clasificación celular para CD25+ (un marcador de activación), PD1(-) usando la metodología convencional, o iv) después de la cromatografía de afinidad usando una matriz producida o bien con anticuerpo anti-PD1 o bien con anticuerpo anti-CD25.

Como se muestra en figura 6, usando la técnica de clasificación celular (en la que se aislaron células que eran positivas para CD25 pero negativas para PD1), se encontró que hasta el 56% de las células recuperadas estaban modificadas según se sometió a ensayo mediante el ensayo de Cel-I. Las células PD1(-) purificadas mediante la técnica de cromatografía de afinidad (en la que se sometieron células a matrices de afinidad producidas usando anticuerpos anti-PD1, anticuerpos anti-CD25 o ambos) mostraron una modificación de PC1 global de hasta el 42% según se somete a ensayo mediante análisis de Cel-1.

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

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

Muestra	% NHEJ mediante Cel I	% NHEJ mediante secuenciación	Número de modificadas*	inserciones	deleciones
4	43	62	54 de 87	3 de 54	51 de 54
8	56	81	65 de 80	4 de 65	61 de 65
13	42	59	43 de 73	1 de 43	42 de 43

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

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

Como se muestra en figura 7, la cantidad de modificación observada, descrita como "% NHEJ", está relacionada con la cantidad de ARNm usado, dando menores cantidades de ARNm de entrada como resultado menores porcentajes de modificación de la diana.

Estos resultados demuestran que las ZFN específicas de PD1 descritas en el presente documento pueden modificar el locus de PD1 en líneas celulares y en células T primarias.

Lista de secuencias

<110> SANGAMO BIOSCIENCES, INC.

<120> Métodos y composiciones para modular PD1

<130> 55817P EP-WO-2

<140> Documento PCT/US2011/061201
 <141> 17-11-2011
 <150> 12/927.557
 <151> 17-11-2010
 5 <160> 110
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 1
 Gln Ser Gly His Leu Ser Arg
 1 5
 15 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 2
 Arg Ser Asp Ser Leu Ser Val
 1 5
 <210> 3
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 3
 His Asn Asp Ser Arg Lys Asn
 30 1 5
 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 4
Arg Ser Asp Asp Leu Thr Arg
 1 5
 <210> 5
 5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 10 <400> 5
Arg Ser Asp His Leu Thr Gln
 1 5
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 6
Arg Ser Ala Ala Leu Ser Arg
 1 5
 20 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 7
Arg Ser Asp His Leu Thr Thr
 1 5
 <210> 8
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 8

Asp Arg Ser Ala Leu Ser Arg
1 5
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 9
Asp Arg Ser Ala Leu Ala Arg
1 5
 10 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 10
Arg Ser Ala Ala Leu Ala Arg
1 5
 <210> 11
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 11
Arg Ser Asp Asp Leu Ser Lys
 25 **1 5**
 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 12
Arg Asn Asp His Arg Lys Asn
1 5

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 13
Arg Ser Asp His Leu Ser Glu
 1 5
 <210> 14
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 15 <400> 14
Thr Ser Ser Asp Arg Thr Lys
 1 5
 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 15
Gln Ser Ala Ser Arg Lys Asn
 1 5
 25 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 16
Arg Ser Asp Val Leu Ser Glu
 1 5
 <210> 17
 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 17

Arg Ser Ala Asn Leu Thr Arg

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 18

Arg Ser Asp His Leu Ser Gln

1 5

15 <210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 19

Thr Ser Ser Asn Arg Lys Thr

1 5

<210> 20

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 20

Asp Arg Ser Asn Leu Ser Arg

1 5

30 <210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 21

Arg Ser Asp Ala Leu Ala Arg
1 5

5 <210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 22

Asp Asp Trp Asn Leu Ser Gln
1 5

<210> 23

<211> 7

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 23

Arg Ser Ser Ala Leu Ser Arg
1 5

20 <210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 24

Arg Pro Leu Ala Leu Lys His
1 5

<210> 25

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 25

Thr Arg Pro Val Leu Lys Arg
1 5

<210> 26

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 26

Arg Ala Asn Ser Leu Leu Arg
1 5

10 <210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 27

Arg Pro Ser Thr Leu His Arg
1 5

<210> 28

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 28

Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg
1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 29

Arg Asn Asn Asn Leu Arg Thr
1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 30

Thr Asn Trp His Leu Arg Thr
1 5

10 <210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 31

Arg Thr Pro His Leu Thr Leu
1 5

<210> 32

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 32

Arg Ser Ala Gln Leu Ala Thr
1 5

25 <210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 33

Arg Cys Thr His Leu Tyr Leu
1 5

<210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 34
Arg Pro Thr Gln Arg Tyr Ser
 1 5
 <210> 35
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 15 <400> 35
Arg Ala Asn His Arg Glu Cys
 1 5
 <210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 36
Arg Lys Phe Ala Arg Pro Ser
 1 5
 25 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 37
Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp
 1 5
 <210> 38
 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 38

His Pro His His Arg Met Cys

1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 39

Arg Met Gly Arg Leu Ser Thr

1 5

15 <210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 40

Arg His Ser Arg Leu Thr Thr

1 5

<210> 41

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 41

Thr Arg Pro Val Leu Met Arg

30 **1 5**

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 42

Arg Ala Asn His Arg Val Cys
1 5

5 <210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 43

Arg Ser Thr His Leu Leu Gly
1 5

<210> 44

<211> 7

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 44

Arg Ser Cys Gly Leu Trp Ser
1 5

20 <210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 45

Arg Asn Ala Ala Leu Thr Arg
1 5

<210> 46

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 46
Cys Asn Ala Ala Leu Thr Arg
 1 5
 <210> 47
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 47
Arg Glu Glu His Arg Ala Thr
 10 1 5
 <210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 48
Arg His His His Leu Ala Ala
 1 5
 <210> 49
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 25 <400> 49
Arg Pro Met His Leu Thr Asn
 1 5
 <210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 50

Arg Ser Pro His Leu Tyr His
1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 51

Arg Cys Glu Ala Leu His His
1 5

10 <210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 52

Asp Arg Ser Ala Gln Ala Arg
1 5

<210> 53

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 53

Arg Leu Pro Ala Leu Leu Ser
1 5

25 <210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 54

His Asn Ala Ala Leu Thr Arg
1 5

<210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 55
Arg Thr Tyr Asn Arg Thr Gln
1 5

<210> 56

10 <211> 28
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 56
 ccagggcgcc tgtgggatct gcatgcct 28

15 <210> 57
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 57

20 cagtcgtctg ggcggtgcta caactggg 28
 <210> 58
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 58
 gaacacaggc acggctgagg ggtcctcc 28
 <210> 59
 <211> 28
 <212> ADN

30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 59
 ctgtggacta tggggagctg gatttcca 28
 <210> 60
 <211> 19

35 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 60
 cagtcgtctg ggcggtgct
 <210> 61
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 61
Thr Ser Gly Ser Leu Ser Arg
 10 1 5
 <210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 62
Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
 1 5
 <210> 63
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 25 <400> 63
Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg
 1 5
 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 64
Gln Ser Ser His Leu Thr Arg
 1 5

<210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 65
Arg Ser Asp Asn Leu Arg Glu
 1 5
 <210> 66
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 15 <400> 66
Arg Ser Asp Ser Leu Ser Lys
 1 5
 <210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 67
Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu
 1 5
 25 <210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 68
Glu Arg Ala Asn Arg Asn Ser
 1 5
 <210> 69
 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 69

Asp Arg Ser Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 70

Asp Arg Ser His Leu Ala Arg

1 5

15 <210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 71

Arg Ser Asp Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 72

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 72

Gln Ser Ala Asn Arg Thr Lys

30 **1 5**

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 73

Arg Ser Asp Thr Leu Ser Glu

1 5

5 <210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 74

Ala Asn Ser Asn Arg Ile Lys

1 5

<210> 75

<211> 28

15 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 75

gtgctgcagt tgagctggca atcagggt 28

<210> 76

20 <211> 28

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 76

cccaagtgaatgaccagggtacctgccg 28

25 <210> 77

<211> 28

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 77

30 cagctgccccacagggcatgactccaca 28

<210> 78

<211> 28

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

35 <400> 78

atgatctgga agcgggcatc ctggacgg 28

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de desconocido: secuencia de motivo de meganucleasa

<400> 79

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1 5

10 <210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 80

Gln Ser Ala Asn Arg Thr Thr

1 5

15 <210> 81

<211> 75

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 81

ggctgctcca ggcattgcaga tcccacaggg gccctggcca gtcgtctggg cgggtgctaca 60

actgggctgg cggcc 75

<210> 82

<211> 75

<212> ADN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 82

ggctgctcca ggcattgcaga tcccacaggg gccctggccc agtcgtctgg gcggtgctac 60

aactgggctg gcggc 75

<210> 83

<211> 75

30 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 83

	ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctgggcc agtcgtctgg gcggtgctac	60
	aactgggctg gcggc	75
	<210> 84	
	<211> 75	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 84	
	ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctggcca agtcgtctgg gcggtgctac	60
	aactgggctg gcggc	75
	<210> 85	
	<211> 75	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 85	
	ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctgggcc agtcgtctgg gcggtgctac	60
	aactgggctg gcggc	75
	<210> 86	
15	<211> 75	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 86	
	ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctggcca agtcgtctgg gcggtgctac	60
	aactgggctg gcggc	75
20	<210> 87	
	<211> 75	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 87	
	ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctggcca ggccagtcgt ctgggcggtg	60
25	ctacaactgg gctgg	75
	<210> 88	
	<211> 75	
	<212> ADN	

<213> *Homo sapiens*
 <400> 88
 ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggg gccctggcca gccagtcgtc tgggcggtgc 60
 tacaactggg ctggc 75
 <210> 89
 5 <211> 75
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 89
 ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggg gccctggcca ggccagtcgt ctgggcggtg 60
 ctacaactgg gctgg 75
 10 <210> 90
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 90
 ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggg gccctgggcc cagtcgtctg ggcggtgcta 60
 caactgggct ggcgg 75
 15 <210> 91
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 91
 ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggg gccctggcca agtcgtctgg gcggtgctac 60
 aactgggctg gcggc 75
 <210> 92
 <211> 75
 <212> ADN
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 92
 ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggg gccctggccc agtcgtctgg gcggtgctac 60
 aactgggctg gcggc 75
 <210> 93

	<211> 75		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 93		
	ggctgctcca ggcattgcaga tcccacaggg gccctggccg gccagtcgtc tgggcgggtgc	60	
5	tacaactggg ctggc	75	
	<210> 94		
	<211> 75		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
10	<400> 94		
	ggctgctcca ggcattgcaga tcccatcagg cggcctggcc agtcgtctgg gcggtgctac	60	
	aactgggctg gcggc	75	
	<210> 95		
	<211> 75		
	<212> ADN		
15	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 95		
	ggctgctcca ggcattgcaga tcccacaggg gccctgggccc agtcgtctgg gcggtgctac	60	
	aactgggctg gcggc	75	
	<210> 96		
	<211> 68		
20	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 96		
	ggctgctcca ggcattgcaga tcccacaggg gccctcgtct gggcgggtgct acaactgggc	60	
	tggcggccc	68	
25	<210> 97		
	<211> 53		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 97		
30	ggctgctcca ggcattgcaga tgtctgggcg gtgctacaac tgggtggcg gcc	53	
	<210> 98		

	<211> 62	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 98	
	ggctgctcca ggcacgcaga tcccacaggg gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg	60
5	cc	62
	<210> 99	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 99	
	ggctgctaca actgggctgg cggcc	25
	<210> 100	
	<211> 56	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 100	
	ggctgctcca ggcacgcaga tcccacaggg gccctgctac aactgggctg gggcc	56
	<210> 101	
	<211> 55	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 101	
	ggctgctcca ggcacgcaga tcccacaggg cggctgctaca actgggctgg cggcc	55
	<210> 102	
25	<211> 62	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 102	
	ggctgctcca ggcacgcaga tcccacagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg	60
	cc	62
30	<210> 103	
	<211> 62	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

	<400> 103		
	ggctgctcca ggcattgcaga tcccacaggc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg	60	
	cc	62	
	<210> 104		
	<211> 74		
5	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 104		
	ggctgctcca ggcattgcaga tcccacaggc gcccgccag tcgtctgggc ggtgctacaa	60	
	ctgggctggc ggcc	74	
	<210> 105		
10	<211> 74		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 105		
	ggctgctcca ggcattgcaga tcccacaggc gcctggccag tcgtctgggc ggtgctacaa	60	
	ctgggctggc ggcc	74	
15	<210> 106		
	<211> 74		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 106		
	ggctgctcca ggcattgcaga tcccacaggc gccctggccag tcgtctgggc ggtgctacaa	60	
20	ctgggctggc ggcc	74	
	<210> 107		
	<211> 53		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
25	<400> 107		
	ggctgctcca ggcattgcagt cgtctggcg gtgctacaac tgggctggcg gcc	53	
	<210> 108		
	<211> 62		
	<212> ADN		
30	<213> <i>Homo sapiens</i>		

ES 2 801 749 T3

<400> 108

ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60

cc 62

<210> 109

<211> 74

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 109

ggctgctcca ggcatgcaga tcccacaggc gccctgccag tcgtctgggc ggtgctacaa 60

ctgggctggc ggcc 74

<210> 110

10 <211> 59

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 110

ggctgctcca ggcatgcaga tccagtcgtc tggcggtgc tacaactggg ctggcggcc 59

15

REIVINDICACIONES

1. Célula aislada que comprende una inserción o una delección en un gen de PD1 endógeno dentro de, o entre, las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 60 del gen de PD1 endógeno, en la que la inserción o delección se realiza tras la escisión del gen de PD1 endógeno mediante nucleasas de dedos de cinc primera y segunda, comprendiendo cada nucleasa de dedos de cinc un dominio de unión a ADN de dedos de cinc y un dominio de nucleasa, en la que la primera nucleasa de dedos de cinc comprende un dominio de unión a ADN de dedos de cinc que se une al sitio diana mostrado en SEQ ID NO: 56, comprendiendo el dominio de unión a ADN de dedos de cinc una proteína denominada 12942 ó 22237 tal como se muestra en la tabla 2 y la segunda nucleasa de dedos de cinc comprende un dominio de unión a ADN de dedos de cinc que se une al sitio diana mostrado en SEQ ID NO: 60, comprendiendo el dominio de unión a ADN de dedos de cinc una proteína denominada 18759, 25005, 25006, 25010, 25011, 25012, 25013, 25014, 25015, 25017, 25022, 25023, 25025, 25027, 25028, 25030, 25031, 25032, 25034, 25036, 25040 y 25041 tal como se muestra en la tabla 2.
2. Célula aislada según la reivindicación 1, en la que la inserción o delección inactiva el gen de PD1 mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ).
3. Célula aislada según la reivindicación 1, en la que se inserta una secuencia exógena en el gen de PD1, en la que la secuencia exógena está flanqueada por secuencias que tienen homología con el gen de PD1 de tal manera que la secuencia exógena se integra mediante recombinación homóloga.
4. Célula aislada según la reivindicación 3, en la que la secuencia exógena codifica una proteína.
5. Célula aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la célula es una célula primaria o una célula madre.
6. Célula aislada según la reivindicación 5, en la que la célula primaria es una célula mononuclear de sangre periférica o un linfocito, o la célula madre es una célula madre embrionaria, una célula madre pluripotente inducida, una célula madre hematopoyética, una célula madre neuronal o una célula madre mesenquimatosa.
7. Célula aislada según la reivindicación 6, en la que el linfocito es una célula T o una célula infiltrante de tumor (TIL).
8. Célula aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno, en la que la enfermedad o trastorno es un cáncer, una infección viral o una enfermedad autoinmunitaria, caracterizados por la expresión aberrante de un gen de PD1.
9. Célula aislada según la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno de manera que la enfermedad o trastorno se trata adicionalmente administrando una o más terapias antivirales o anticancerosas adicionales al sujeto.

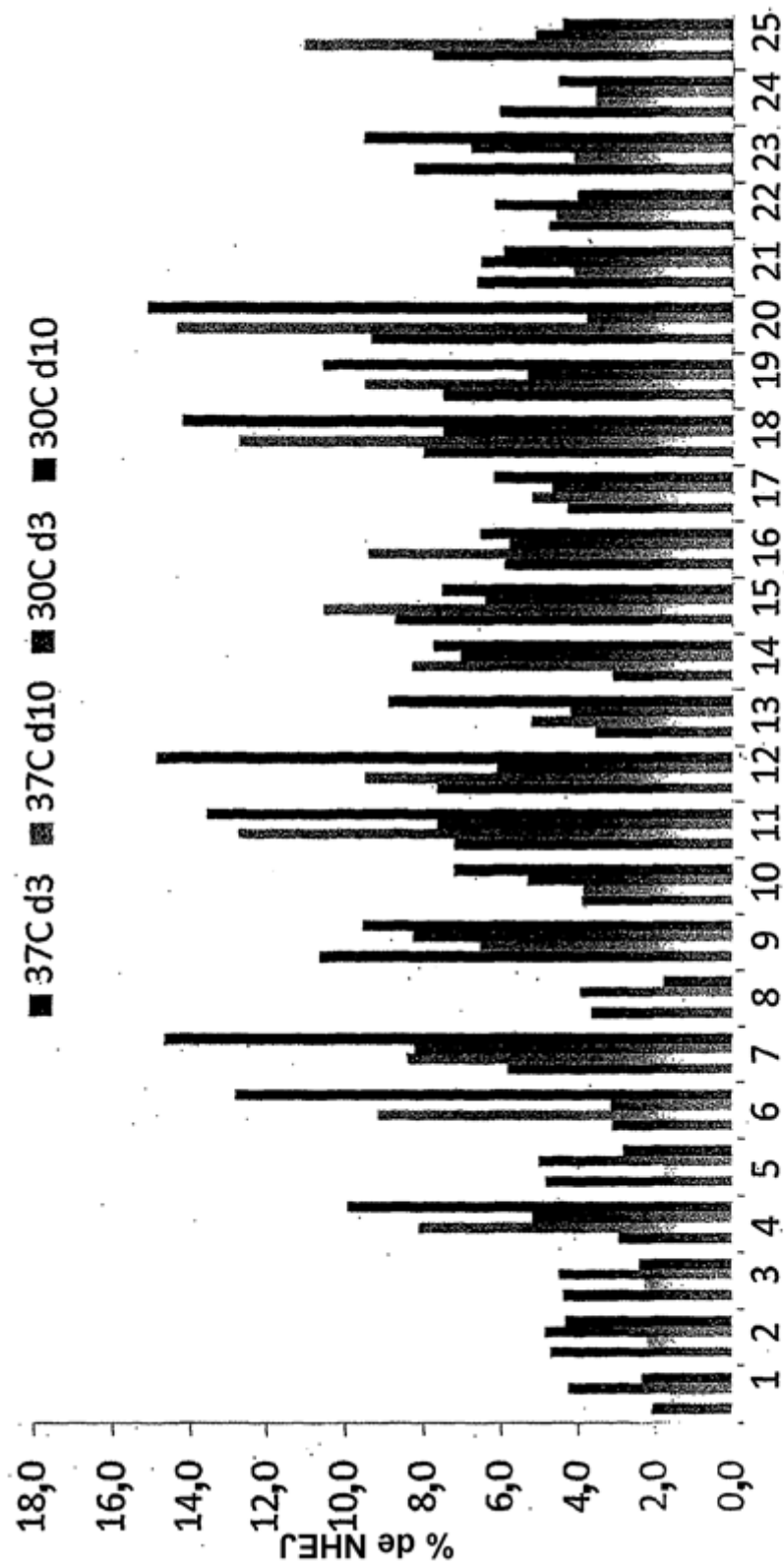


Figura 1

Figura 2

 ***** (* = sitios de unión a ZFN)
 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctggccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc WT PD1

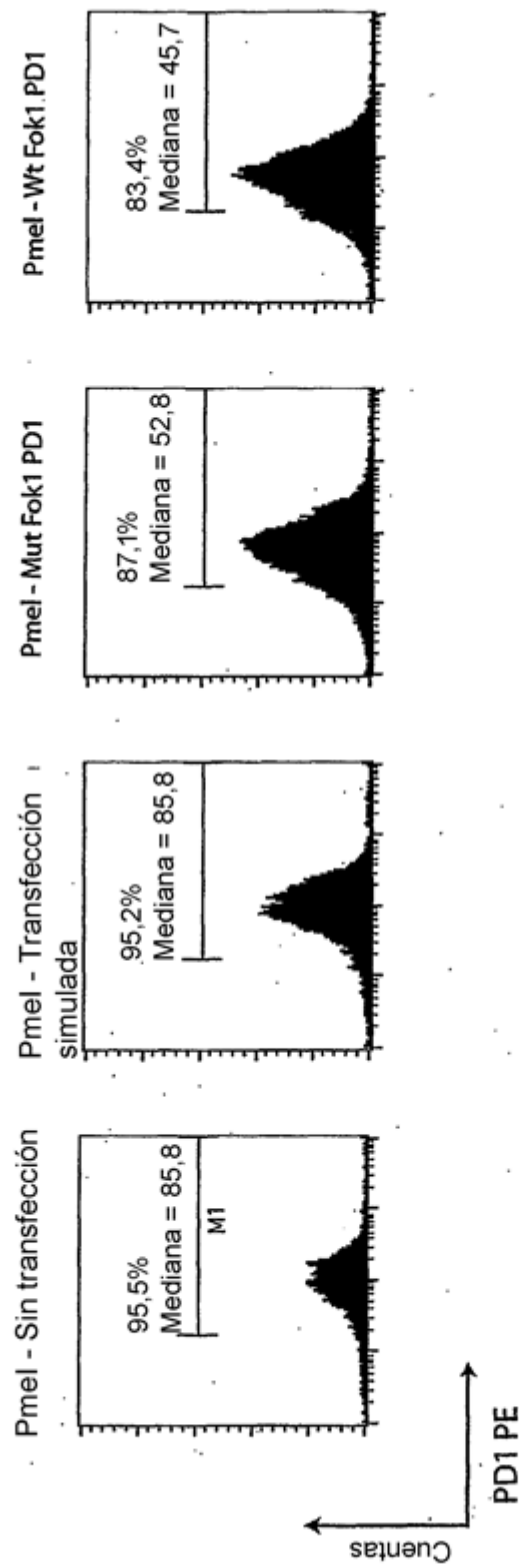
Inserciones:

1 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctggccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc +1
 3 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctggccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc +1
 1 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctggccAagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc +1
 4 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctggccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc +1
 1 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctggccAagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc +1
 2 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctGGCCAGgcccagtcgtctggcggtgctacaactggctgg +5
 1 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctGGCCAGgcccagtcgtctggcggtgctacaactggctgg +4
 2 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctGGCCAGgcccagtcgtctggcggtgctacaactggctgg +5
 1 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctGGCCagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc +2
 1 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctggccAagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc +1
 1 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctggccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc +1
 1 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctGGCGggcccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcc +4
 1 ggctgctccaggcâtgcagatcccaTcaggcgccctggcccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc +1
 4 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccctGGgcccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc +1

Delecciones:

1 ggctgctccaggcâtgcagatccacacaggcgccc-----tgcctggcggtgctacaactggctggcgcc -7
 1 ggctgctccaggcâtgcagat-----gtctggcggtgctacaactggctggcgcc -22
 1 ggctgctccaggcâtgcagatcccaagg-----cgtctggcggtgctacaactggctggcgcc -13
 1 ggc-----tgcctacaactggctggcgcc -50
 1 ggctgctccaggcâtgcagatcccaaggcgccctg-----ctacaactggctggcgcc -19
 1 ggctgctccaggcâtgcagatccca-----ggcggtgctacaactggctggcgcc -20
 1 ggctgctccaggcâtgcagatccca-----cagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc -13
 1 ggctgctccaggcâtgcagatcccaagg-----cgtctggcggtgctacaactggctggcgcc -13
 1 ggctgctccaggcâtgcagatcccaaggccc-ggcccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc -1
 1 ggctgctccaggcâtgcagatcccaaggcg-cctggcccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc -1
 1 ggctgctccaggcâtgcagatcccaaggcgccctg-ccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc -1
 2 ggctgctccaggcâtgcagatcccaaggcgccctg-----cagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc -22
 1 ggctgctccaggcâtgcagatcccaagg-----cgtctggcggtgctacaactggctggcgcc -13
 1 ggctgctccaggcâtgcagatcccaaggcgccct-gccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc -1
 1 ggctgctccaggcâtgcagat-----ccagtcgtctggcggtgctacaactggctggcgcc -16

Figura 3: la transfección de células T Pmel con ADN o bien de Mut Fok1 o bien de WT Fok1 disminuye la expresión de PD1 tras la estimulación anti-CD3



	Sin transfección	Transfección simulada	14546 Fok I EL +14545 FokI KK	14546 + 14545
% de expresión de PD1	95,5%	95,2%	87,1%	83,4%

Figura 4: la expresión de PD1 todavía estaba reducida a las 72 horas en células T Pmel transfectadas con ADN o bien de Mut Fok1 o bien de WT Fok1

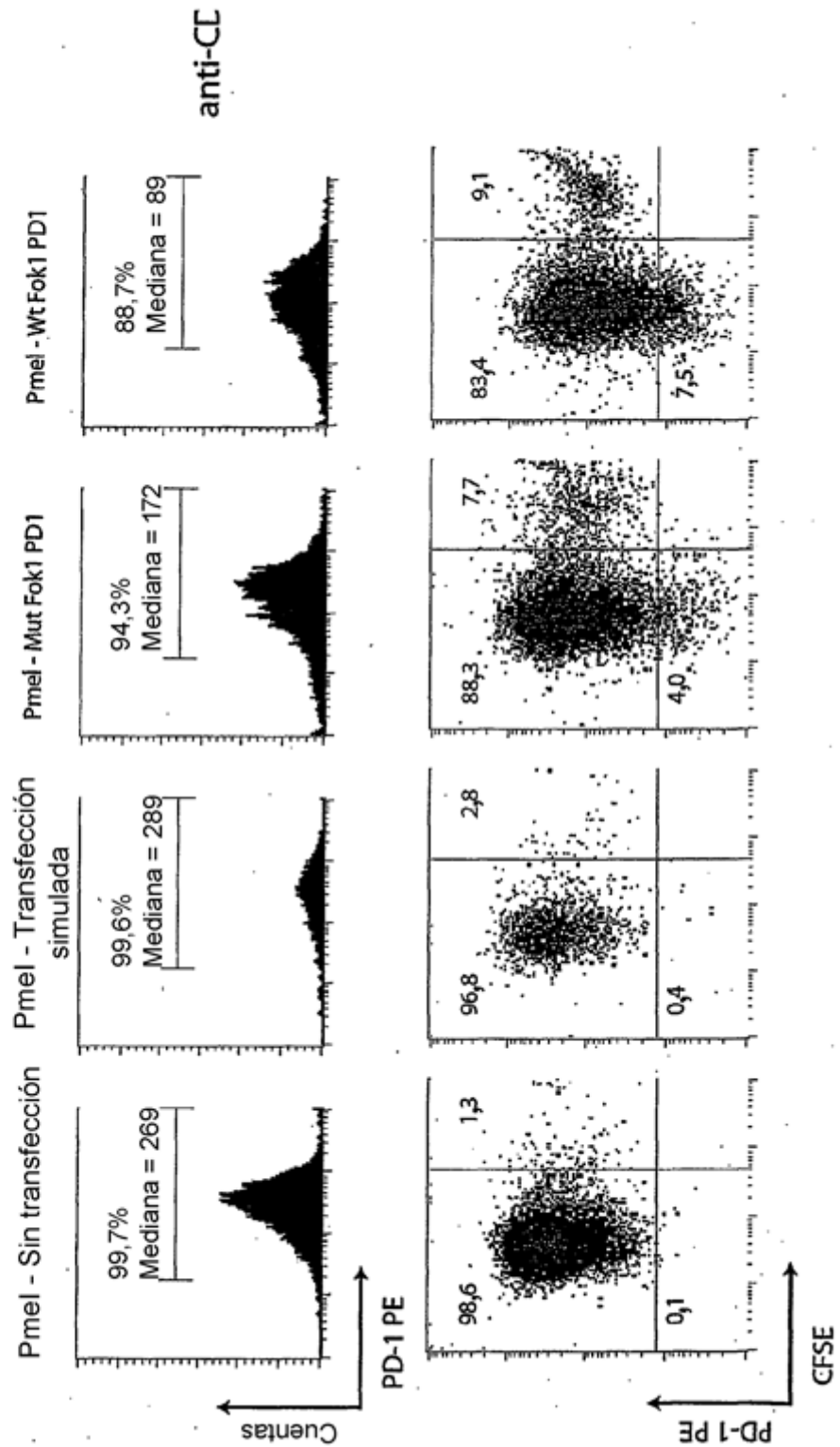
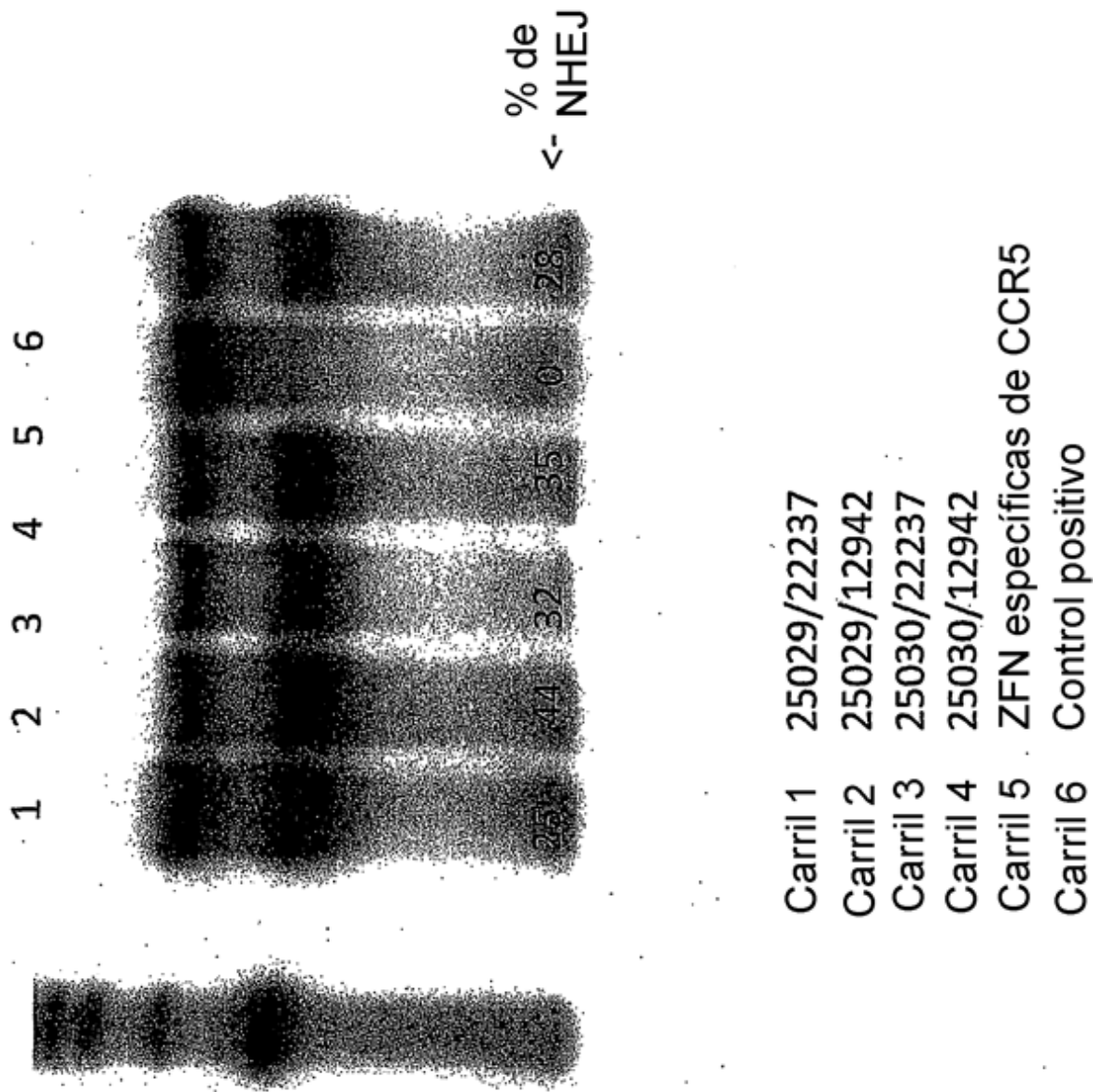
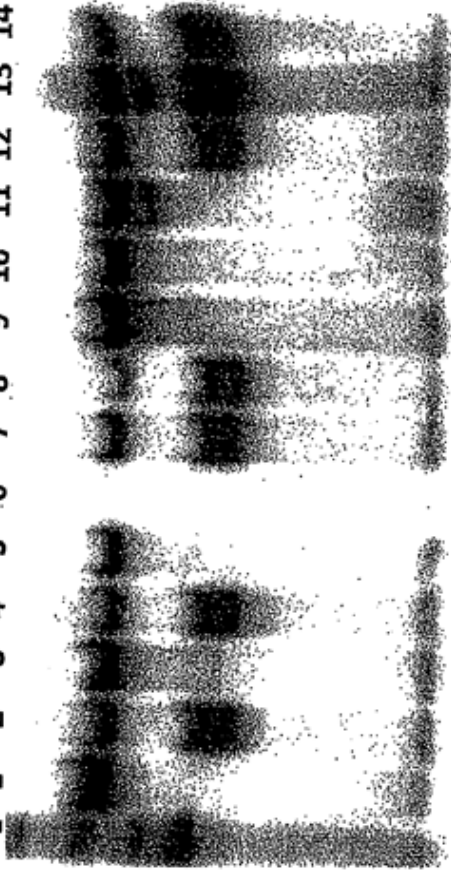


Figura 5



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

Figura 6



N.º muestra	Contenido de muestra	% de NHEJ
1	ZFN de CCR5, 1ª estimulación	0
2	ZFN de PD1, 1ª estimulación	41,8
3	ZFN de CCR5, 2ª estimulación antes de clasificación	0
4	ZFN de PD1, 2ª estimulación antes de clasificación	42,6
5	ZFN de CCR5, 2ª estimulación tras clasificación para PD1+ CD25+	0
6	ZFN de CCR5, 2ª estimulación tras clasificación para PD1- CD25+	0
7	ZFN de PD1, 2ª estimulación tras clasificación para PD1+ CD25+	36,6
8	ZFN de PD1, 2ª estimulación tras clasificación para PD1- CD25+	56,4
9	ZFN de CCR5, 2ª estimulación, purificación con perlas PD1+	0
10	ZFN de CCR5, 2ª estimulación, purificación con perlas PD1-, CD25	0
11	ZFN de CCR5, 2ª estimulación, purificación con perlas PD1-, CD25-	0
12	ZFN de PD1, 2ª estimulación, purificación con perlas PD1+	29,6
13	ZFN de PD1, 2ª estimulación, purificación con perlas PD1-, CD25+	42
14	ZFN de PD1, 2ª estimulación, purificación con perlas PD1-, CD25-	48

