



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0718747-5 A2



(22) Data de Depósito: 13/11/2007
(43) Data da Publicação: 03/12/2013
(RPI 2239)

(51) Int.Cl.:
C12N 9/22

(54) Título: VARIANTES MEGANUCLEASE QUE
CLAVAM UMA OU SEQUÊNCIA ALVO DE DNA A
PARTIR DO GENE HPRT E USOS DAS MESMAS.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 14/11/2006 IB PCT/IB2006/004084,
25/06/2007 IB PCT/IB2007/002881

(73) Titular(es): Collectis

(72) Inventor(es): Agnès Gouble, Julianne Smith, Sylvestre Grizot

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT IB2007004281 de 13/11/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/059382de
22/05/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VARIANTES
MEGANUCLEASE QUE CLIVAM UMA OU SEQUÊNCIA ALVO DE DNA A
PARTIR DO GENE HPRT E USOS DAS MESMAS"**.

A presente invenção refere-se a uma variante de meganuclease
5 que cliva uma sequência alvo de DNA a partir do gene HPRT, a um vetor
que codifica a variante, a uma célula, um animal ou uma planta modificados
pelo vetor e ao uso da dita variante de meganuclease e produtos derivados
para engenharia de genoma e terapia de genoma.

Meganucleases são por definição endonucleases de sequência
10 específica com grandes sítios de clivagem (>14 bp) que distribuem quebras
de duplo filamento de DNA (DSBs) em locais específicos em células vivas
(Thierry and Dujon, Nucleic Acids Res., 1992, 20, 5625- 5631). Meganuclea-
ses têm sido usadas para estimular recombinação homólogo na vizinhança
de suas sequências alvo em células e plantas cultivadas (Rouet et al , Mol.
15 Cell. Biol., 1994, 14, 8096-106; Chouluka et al, Mol. Cell. Biol., 1995, 15,
1968-73; Donoho et al, Mol. Cell. Biol, 1998, 18, 4070-8; Elliott et al, Mol.
Cell. Biol., 1998, 18, 93-101; Sargent et al, Mol. Cell. Biol, 1997, 17, 267-77;
Puchta et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 5055-60; Chiurazzi et al,
Plant Cell, 1996, 8, 2057-2066), tornando recombinação induzida por mega-
20 nuclease um método eficiente e robusto para engenharia de genoma.

O uso de recombinação induzida por meganuclease tem sido
muito limitado pelo repertório de meganucleases naturais, e a maior limita-
ção da tecnologia atual é a exigência para a indução anterior de um sítio que
cliva meganuclease no locus de interesse. Assim, a fabricação de meganu-
25 cleases artificiais com especificidades de substrato personalizadas está sob
investigação intensa. Tais proteínas poderiam ser usadas para clivar se-
quências de cromossômo genuínas e abrir novas perspectivas para enge-
nharia de genoma em uma ampla faixa de aplicações. Por exemplo, mega-
nucleases poderia ser usada para nocautear genes endógenos ou nocautear
30 sequências exógenas no cromossoma. Isto pode ser também usado para
correção de gene, e em princípio, para a correção de mutações ligadas a
doenças monogênicas.

Na natureza, meganucleases são essencialmente representadas por endonucleases residentes (HEs), uma família de endonucleases codificada por elementos genéticos móveis, cuja função é iniciar quebra de duplo filamento de DNA (DSB)-induzindo eventos de recombinação em um processo referido como residente (Chevalier and Stoddard, *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, 3757-74; Kostriken et al, *Cell*; 1983, 35, 167-74; Jacquier and Dujon, *Cell*, 1985, 41, 383-94). Milhares de HEs têm sido identificadas em bactérias, eucariótes, e archae (Chevalier and Stoddard, pré-citado); entretanto, a probabilidade de encontrar um Sítio de clivagem de HE em um gene escolhido é muito baixa.

Dada sua função biológica e suas propriedades de clivagem excepcionais em termos de eficácia e especificidade, HEs proveem elevações ideais para derivar novas endonucleases para engenharia de genoma.

HEs pertencem a quatro maiores famílias. A família LAGLIDADG, nomeada após um motivo peptídico conservado envolvido no centro catalítico, é o mais amplo e o melhor grupo caracterizado (Chevalier and Stoddard, pré-citado). Sete estruturas são agora disponíveis. Equanto mais proteínas desta família são monoméricas e exibem dois motivos LAGLIDADG, umas poucas têm apenas um motivo, mas dimerizam para clivar sequências alvo palindrômicas ou pseudopalindrômicas.

Embora o peptídeo LAGLIDADG seja apenas a região conservada entre membros da família, essas proteínas compartilham uma estrutura muito similar (Figura 1A). O núcleo catalítico é flanqueado por dois Domínios de ligação por DNA com uma perfeita simetria de dobradura para homodímeros tais como I-Crel (Chevalier et al, *Nat. Struct. Biol.*, 2001, 8, 312-6) e I-Msol (Chevalier et al *J. Mol. Biol.*, 2003, 329, 253-69), e com uma pseudosimetria para monômeros tal como I-SceI (Moure et al, *J. Mol. Biol*, 2003, 334, 685-95), I-Dmol (Silva et al., *J. Mol. Biol.*, 1999, 286, 1123-36) ou I-Anil (Bolduc et al., *Genes Dev.*, 2003, 17, 2875-88). Ambos os monômeros ou ambos os domínios (para proteínas monoméricas) contribuem para o núcleo catalítico, organizado em torno de cátions divalentes. Logo acima do núcleo catalítico, os dois peptídeos LAGLIDADG têm também um papel importante

na interface de dimerização. A ligação de DNA depende duas dobraduras $\beta\beta\alpha\beta\beta$ em formato de sela, estabelecendo nas duas maiores aberturas de DNA. A análise da Estrutura I-CreI ligada ao seu objetivo natural mostra que em cada monômero, oito resíduos (Y33, Q38, N30, K28, Q26, Q44, R68 e R70) estabelecem interação direta com sete bases nas posições $\pm 3, 4, 5, 6, 7, 9$ e 10 (Jurica et al., Mol. Cell., 1998, 2, 469-76). Em adição, alguns resíduos estabelecem contato mediado por água com muitas bases; por exemplo S40, K28 e N30 com o par de base na posição $+8$ e -8 (Chevalier et al., 2003, pré-citado). Outros domínios podem ser encontrados, por exemplo, em inteínas tais como PI-P/wI (Ichihyanagi et al., J. Mol. Biol., 2000, 300, 889-901) e PI-SceI (Moure et al., Nat. Struct. Biol., 2002, 9, 764-70), cujo domínio de unir proteína está também envolvido na ligação de DNA.

A preparação de Hes artificiais de cadeia simples e quiméricas funcionais, por fusão do domínio I-DmI N- terminal com um monômero I-CreI (Epinat et al, Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952-62; Chevalier et al, Mol. Cell., 2002, 10, 895- 905; Steuer et al, Chembiochem., 2004, 5, 206-13; Pedidos PCT Internacionais WO 03/078619 e WO 2004/031346) demonstrou a plasticidade de Proteínas LAGLIDADG: diferentes monômeros ou domínios de núcleo poderiam ser fundidos em uma única proteína, para obter novas meganucleases clivando novas sequências alvo (não-palindrômicas).

Além do mais, diferentes grupos usaram uma abordagem racional para localmente alterar a especificidade de I-CreI (Seligman et al, Genetics, 1997, 147, 1653- 64; Sussman et al, J. Mol. Biol., 2004, 342, 31-41; Seligman et al, Nucleic Acids Res., publicado em 13 de setembro de 2006; Arnould et al, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458 e Pedidos PCT Internacionais WO 2006/097853 e WO 2006/097784), I-SceI (Doyon et al, J. Am. Chem. Soc, 2006, 128, 2477-2484), PI-SceI (Gimble et al, J. Mol. Biol., 2003, 334, 993-1008) e I-MsoI (Ashworth et al, Nature, 2006, 441, 656-659)

Milhares de derivados de I-CreI com especificidade alterada foram arquitetados combinando a abordagem semirracional e Seleção de Alta Capacidade (HTS; Arnould et al (pré-citado); Pedidos PCT Internacionais WO 2006/097853 e WO 2006/097784); resíduos Q44, R68 e R70 ou Q44,

R68, D75 e 177 de I-Crel foram mutagenizados e uma coleta de variantes com especificidade alterada nas posições ± 3 a 5 (5NNN DNA alvo) foram identificados por seleção.

5 Em seguida, duas variantes diferentes (Figura 1B; direita superior e esquerda inferior) foram combinadas e montadas em uma endonuclease heterodimérica funcional (figura 1B; direita inferior) capaz de clivar um alvo quimérico resultante da fusão de uma metade diferente de cada sequência alvo de DNA de variante (Figura 1B; Arnould et al., pré-citado; Pedido PCT Internacional WO 2006/097854). De forma interessante, as novas proteínas
10 mativeram dobraduras e estabilidade próprias, alta atividade, e uma especificidade limitada.

Portanto, uma estratégia de duas etapas pode ser usada para personalizar a especificidade de meganuclease LAGLIDADG natural. A primeira etapa é para mutagenizar localmente uma meganuclease LAGLI-
15 DADG natural tal como I-Crel e para identificar coletas de variante com especificidade alterada por seleção. A segunda etapa é para prevalecer a modularidade dessas proteínas, e usar uma abordagem de combinação para preparar novas meganucleases, que clivam o sítio de escolha (Figura 1B). A geração de coleta de novas meganucleases, e a capacidade de combiná-las
20 montando dois monômeros/domínios de núcleo diferentes consideravelmente enriquece o número de sequências de DNA que podem ser alvejadas, mas não ainda saturadas todas as sequências potenciais.

Para alcançar um grande número de sequências, seria extremamente valioso ser capaz de identificar subdomínios independentes que
25 poderiam ser combinados (Figura 1C).

Entretanto, uma abordagem de combinação é muito mais difícil de se aplicar dentro de um único monômero ou domínio do que entre monômeros uma vez que a estrutura da interface de ligação é muito compacta e duas estruturas $\beta\beta$ diferentes que são responsáveis por virtualmente todas
30 as interações específicas de base não constituem subdomínios separados, mas são parte de uma única dobradura. Por exemplo, na parte interna das regiões de ligação de DNA de I-Crel, a trinca gtc é ligada por um resíduo da

primeira estrutura (Q44), e dois resíduos da segunda estrutura (R68 e R70; ver Figura IB de Chevalier et al., 2003, pré-citado). Em adição, o impacto cumulativo de uma série de mutação poderia eventualmente romper a própria dobradura.

5 No lugar desta falta de modularidade aparente no nível da estrutura, o inventor demonstrou que resíduos 28 a 40 e 44 a 77 de I-Crel formam dois subdomínios funcionais separáveis, capazes de ligar partes distintas de um meio sítio de endonuclease residente.

10 Montando dois subdomínios a partir de monômeros ou domínios de núcleo diferentes dentro do mesmo monômero, o inventor elaborou variantes de endonuclease residente (homodimérica) funcionais, que são capazes de clivar alvos quiméricos palindrômicos (Figura 1C). Além do mais, uma ampla abordagem de combinação é permitida montando quatro subdomínios diferentes para formar novas moléculas heterodiméricas que são capazes de
15 clivar alvos quiméricos não-palindrômicos (Figura 1D). Os diferentes subdomínios podem ser modificados separadamente para construir novas especificidades de clivagem e combinar em uma variante de meganuclease (homodímero, heterodímero, molécula de cadeia simples) que é capaz de clivar um alvo a partir de um gene de interesse.

20 O gene fosforibosiltransferase de hipoxantina (HPRT) é um gene de cópia único localizado no Cromossoma X e assim presente em uma cópia (células XY) ou expressos a partir de apenas um alelo (células XX). Por exemplo, O gene do camundongo e do humano HPRTs estão disponíveis no banco de dados NCBI, sob o número de acesso NC_000086 e NC 000023,
25 respectivamente. Ambos os genes têm 9 éxons (Figura 2) que são transcritos para um mRNA de bases 1289 (camundongo; número de acesso NM 013556) ou mRNA bases 1331 (humano; número de acesso NM_000194), contendo o ORF HPRT a partir das posições 88 a 744 (camundongo) ou 86 a 742 (humano). O mRNA do Hamster Chinês (*Cricetus sp.*) é uma sequência de bases 1301 (número de acesso J00060.1) contendo o ORF H-
30 PRT a partir das posições 91 a 747.

Fosforibosiltransferase de hipoxantina é uma enzima que catali-

sa a conversão de 5-fosforribosil-1-pirofosfato e hipoxantina, guanina, ou 6-mercaptapurina para o 5'-mononucleotídeos e pirofosfato correspondentes. A enzima é importante na biossíntese da purina bem como na função do sistema nervoso central. Dada sua função biológica, o Gene HPRT é usado

5 como um marcador selecionável para os experimentos que objetivam gene. Comparados a outros marcadores de seleção, HPRT tem a vantagem de ser ambos um marcador de seleção positivo ou um negativo. Em adição, mutações no gene HPRT são associadas com a Síndrome de Lesch-Nyhan.

Gene alvo do HPRT de camundongo foi realizado primeiramente

10 em células estaminais derivadas de embrião (ES) por Thomas, K.R. e M.R. Cappechi (Cell, 1987, 51, 503- 512). Entretanto, eficiências permanecem muito baixas (cerca de 10^{-7} de células transfectadas). A capacidade de gerar uma quebra de duplo filamento no locus de HPRT provê um meio para significativamente melhorar a recombinação homólogo no locus. Usando alvo de

15 gene clássico, Donoho et al. (Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 4070-4078) introduziu-se sítios de clivagem para a meganuclease 1-SceI no Gene HPRT de camundongo. Em uma segunda etapa, eles poderiam induzir alvo de gene em 1% das células por co-transformação com uma matriz de reparo e um vetor de expressão I-SceI.

20 Assim, uma meganuclease artificial alvejando Locus de HPRT irá permitir inserções de gene eficiente (Figura 3A). A capacidade para inserir eficientemente genes nestes locus tem a vantagem de permitir níveis de expressão reproduzíveis bem como linhas de tempo previsíveis para gerar inserções.

25 Adicionalmente, como foi descrito para camundogos (van der Lugt et al. Gene, 1991, 105, 263-267; Selfridge et al, Somat. Cell. Mol. Genet, 1992, 18, 325- 336), HPRT pode ser usado como um marcador selecionável para experimentos que objetivam gene alvo.

O procedimento alvo de gene de recolocação dupla, que foi originalmente sugerido por Reid e cooperadores (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 30 1990, 87, 4299-4303) é baseado em marcadores selecionáveis de HPRT (MaGIn et al., Gene, 1992, 122, 289- 296), para produzir camundongos com

alterações de gene súbitas. Este procedimento é baseado no uso de minigenes de fosforribosiltransferase de hipoxantina (HPRT) em células estaminais embrionárias deficientes de HPRT e a capacidade de selecionar ambos para e contra expressão HPRT.

5 Na primeira etapa, para inativar o alvo, uma região do locus alvo é recolocada com um minigene HPRT, com HAT (hipoxantina/aminopterina/timidina; (Littlefield J.W., Science, 1964, 145, 709-) seleção para expressão de marcador HPRT. HAT é uma mistura de hipoxantina de sódio, aminopterina e timidina. Aminopterina é um potente antagonista de ácido fólico, 10 que inibe reductase de di-hidrofolato bloqueando a nova síntese de nucleosídeo. Células podem apenas sobreviver em HAT se os percursos selvagens de purina e pirimidina forem ativos. Hipoxantina é o substrato para recurso selvagem de purina. Assim, mutantes de HPRT são incapazes de utilizar o percurso selvagem de purina e são sensíveis à seleção de HAT.

15 Na segunda etapa alvo o minigene de HPRT é por si só recolocado com uma região alterada do gene alvo para reconstituir o locus, com seleção para perda de marcador HPRT usando o análogo de purina 6-tioguanina (6-TG).

20 Entretanto, isto exige que as células antes da introdução do marcador contenham um HPRT de gene inativo. Assim, uma meganuclease artificial alvejando o Gene HPRT poderia ser usada para inativar o Gene HPRT (Figura 3 A e B).

A Síndrome de Lesch-Nyhan é um distúrbio inerente transmitido como um carácter que é causado por uma deficiência de HPRT e caracteri- 25 zado por hiperuricemia, incapacidade motora severa e comportamento auto-prejudicial. Uma coleta muito heterogênea de mutações associadas com a doença Lesch-Nyhan ou fenótipos clínicos menos severos com apenas algumas porções da síndrome completa, têm sido identificados. Estratégias de terapia gênica atuais são baseadas em uma abordagem complementar, em 30 que uma cópia extra aleatoriamente inserida mas funcional do gene proporciona a função da cópia endógena mutada. Em contraste, recombinação induzida por meganuclease deveria permitir a correção precisa de mutações in

situ (Figura 3C) e assim evita o risco devido a transgenes inseridos aleatoriamente encontrados com abordagens de terapia atuais (Hacein-Bey-Abina et al, Science, 2003, 302, 415-419).

5 A forma mais precisa de corrigir um defeito genético é usar uma matriz de reparo com uma cópia não mutada do gene, resultando em uma revisão da mutação (Figura 3C). Entretanto, a eficiência da correção do gene diminui conforme a distância entre a mutação e o DBS cresce, com uma diminuição de 5 vezes por 200 bp de distância. Portanto, uma dada meganuclease pode ser usada para corrigir apenas mutações na vizinhança de seu
10 alvo DNA. Uma alternativa, chamada "knock-in de éxon" é e mostrada na figura 3D. Neste caso, uma meganuclease que cliva na parte 5' do gene pode ser usada para sequências exônicas funcionais a jusante da mutação prejudicial. Embora este método coloque o transgene em sua localização regular, ele também resulta na duplicação de éxons, que impactam na longa
15 faixa que permanece para ser avaliada. Em adição, elementos de atuação cis deveriam ser colocados naturalmente em uma íntrom a montante da clivagem, seu ambiente imediato seria modificado e sua função própria também seria explorada, este método tem uma vantagem tremenda: uma única meganuclease poderia ser usada para muitos pacientes diferentes.

20 O inventor indentificou uma série de alvos de DNA no gene HPRT que poderiam ser clivados por Variantes I-Crel (Figuras 2 e 19). A abordagem de combinação descrita na figura 1D foi usada para montar quatro conjuntos de mutações em endonucleases residentes heterodiméricas com especificidade completamente construída, para clivar os alvos de DNA a partir do gene HPRT. Essas variantes I-Crel que são capazes de clivar um alvo
25 de DNA genômico a partir do gene HPRT podem ser usadas para engenharia de genoma no Locus de HPRT ("knock-out" e "knock-in") e para usar HPRT como um marcador selecionável para engenharia de genoma em qualquer locus (Figura 3A e 3B).

30 Em adição, essas meganucleases poderiam ser usadas para reparar as Mutações de HPRT associadas com a Síndrome de Lesch-Nyhan (Figura 3C e 3D).

A invenção refere-se ao uso de uma variante I-Crel ou um derivado de cadeia simples para induzir uma modificação de local específico no gene HPRT, para finalidades não-terapêuticas, em que a variante I-Crel ou derivado de cadeia simples tem pelo menos uma substituição em um dos

5 dois subdomínios funcionais do domínio núcleo LAGLIDADG situado a partir das posições 26 a 40 e 44 a 77 de I-Crel, e é capaz de clivar uma sequência alvo de DNA selecionada a partir dos grupos consistindo nas sequências SEQ ID NO: 1 a 14.

A atividade de clivagem da variante como definido na presente

10 invenção pode ser medida por qualquer ensaio de clivagem, *in vitro* ou *in vivo*, bem-conhecido, tal como aqueles descritos no Pedido PCT Internacional WO 2004/067736, Arnould et al. (J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458), Epinat et al. (Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952-2962) e Chames et al. (Nucleic Acids Res., 2005, 33, el 78). Por exemplo, a atividade de clivagem da varian-

15 te da invenção pode ser medida por um ensaio de recombinação de repetição direta, em leveduras ou células de mamífero, usando um vetor de relatório. O vetor de relatório compreende duas cópias não-funcionais, truncadas de um gene de relatório (repetições diretas) e a sequência alvo de DNA genômica dentro da sequência de intervenção, clonado em uma levedura ou

20 um vetor de expressão de mamífero. Expressão da variante resulta em uma endonuclease funcional que é capaz de clivar a sequência alvo de DNA genômica. Esta clivagem induz recombinação homólogo entre as repetições diretas, resultando em um gene de relatório funcional, cuja expressão pode ser monitorada por ensaio apropriado.

25 **Definições**

- Resíduos de aminoácido em uma sequência de polipeptídeo são designados aqui de acordo com o código de uma carta, em que, por exemplo, Q significa Gln ou Resíduo de glutamina, R significa Arg ou resíduo de Arginina e D significa Asp ou Resído de ácido aspártico.

30 - Nucleotídeos são designados como segue: código de uma carta é usado para designar a baede de um nucleosídeo: a é adenina, t é timina, c é citosina, e g é guanina. Para os nucleotídeos degenerados, r repre-

senta g ou a (nucleotídeos de purina), k representa g ou t, s representa g ou c, w representa a ou t, m representa a ou c, y representa t ou c (nucleotídeos de pirimisina), d representa g, a ou t, v representa g, a ou c, b representa g, t ou c, h representa a, t ou c, e n representa g, a, t ou c.

5 - por "meganuclease", é pretendida uma endonuclease tendo uma sequência alvo de DNA de filamento duplo de 14 a 40 pb. A meganuclease é ou uma enzima dimérica, em que cada domínio é monômero ou uma enzima monomérica compreendendo os dois domínios em um único polipeptídeo.

10 - por "domínio de meganuclease" é pretendida a região que interage com uma metade do alvo de DNA de uma meganuclease e é capaz de associar-se com outro domínio da mesma meganuclease que interage com outra metade do alvo de DNA para formar uma meganuclease funcional capaz de clivar o alvo de DNA.

15 - por "variante de meganuclease" ou "variante" é pretendida uma meganuclease obtida por recolocação de pelo menos um resíduo na sequência de aminoácido da meganuclease tipo selvagem (meganuclease natural) com um aminoácido diferente.

20 - por "variante funcional" é pretendida uma variante que é capaz de clivar uma sequência alvo de DNA, preferivelmente o alvo é um novo alvo que não é clivado pela meganuclease de origem. Por exemplo, tais variantes têm variações de aminoácido nas posições em contato com a sequência alvo de DNA ou interagindo direta ou indiretamente com o alvo de DNA.

25 - por "variante de meganuclease com nova especificidade" é pretendida uma variante tendo um padrão de diferentes alvos clivados a partir daquele da endonuclease residente de origem. Os termos "nova especificidade", "especificidade modificada", "nova especificidade de clivagem", "nova especificidade de substrato" que são equivalentes e usados indiferentemente, referem-se à especificidade da variante no que se refere aos nucleotídeos da sequência alvo de DNA.

30

 - por "I-Crel" é pretendida o I-Crel tipo selvagem tendo a sequência SWISSPROT P05725 (SEQ ID NO: 143) ou código de acesso pdb

1g9y (SEQ ID NO: 144).

- por "domínio de núcleo LAGLIDADG" ou "domínio de núcleo" é pretendido "Domínio de núcleo de Endonuclease residente LAGLIDADG" que é a dobradura $\alpha_1\beta_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$ das endonucleases residentes da família LAGLIDADG, correspondente à sequência de cerca de cem resíduos de aminoácido. O domínio compreende quatro filamentos beta (β_1 , β_2 , β_3 , β_4) dobrados em uma folha beta que interage com uma metade do alvo de DNA. Este domínio é capaz de associar-se com outro Domínio de núcleo de Endonuclease residente LAGLIDADG que interage com uma metade do alvo de DNA para formar uma endonuclease funcional capaz de clivar o alvo de DNA. Por exemplo, no caso do I-CreI de endonuclease residente dimérica (163 aminoácidos), o Domínio de núcleo de Endonuclease residente LAGLIDADG corresponde aos resíduos 6 a 94.

- por "meganuclease de cadeia simples" "meganuclease quimérica de cadeia simples", "endonuclease quimérica de cadeia simples", "derivado de meganuclease de cadeia simples", "derivado de meganuclease quimérica de cadeia simples" ou "derivado de cadeia simples" é pretendida uma meganuclease compreendendo dois Domínios de Endonuclease residente LAGLIDADG ou domínios de núcleo ligados por um espaçador peptídico. A meganuclease de cadeia simples é capaz de clivar uma sequência alvo de DNA quimérica compreendendo uma metade diferente de cada sequência alvo de meganuclease de origem.

- por "subdomínio" é pretendida a região de um domínio de núcleo de endonuclease residente LAGLIDADG que interage com uma parte distinta de uma metade de sítio de alvo de DNA de endonuclease residente. Dois subdomínios diferentes se comportam independentemente e a mutação em um subdomínio não altera a ligação e a clivagem de propriedades de outro subdomínio. Portanto, dois subdomínios ligam parte distinta de uma metade de sítio de alvo de DNA de endonuclease residente.

- por "estrutura beta" é pretendido dois filamentos beta da folha beta antiparalela de um Domínio de núcleo de Endonuclease residente LAGLIDADG ($\beta_1\beta_2$ ou, $\beta_3\beta_4$) que são conectados por uma alça ou uma volta,

- por "sítio de I-Crel" é pretendida uma sequência de DNA de duplo filamento de 22 a 24 que é clivada por sítios I-Crel. I-Crel incluem o sítio residente I-Crel tipo selvagem (natural) não-palindrômico e as sequências palindrômicas derivadas tais como a sequência 5'- L₁₂C₋₁₁a₋₁₀a₋₉a₋₈a₋₇c₋₆g₋₅t₋₄c₋₃g₋₂t₋₁a₊₁c₊₂g₊₃a₊₄c₊₅g₊₆t₊₇t₊₈t₊₉t₊₁₀g₊₁₁a₊₁₂ também chamada C1221 (SEQ ID NO :16; figura 10).

- por "alvo de DNA", "Sequência alvo de DNA", "sequência alvo", "sítio alvo", "alvo", "sítio"; "sítio de interesse"; "sítio de reconhecimento", "sequência de reconhecimento", "sítio de reconhecimento residente", "sítio residente", "sítio de clivagem" é pretendida uma sequência de polinucleosídeo não-palindrômica ou parcialmente palindrômica (pseudo-palindrômica) palindrômica de duplo filamento de 20 a 24 bp que é reconhecida e clivada por uma Endonuclease residente LAGLIDADG tais como I-Crel, ou uma variante, ou uma meganuclease quimérica de cadeia simples derivada de I-Crel. Esses termos referem-se a uma localização de DNA distinta, preferivelmente uma localização genômica, em que uma quebra de duplo filamento (clivagem) é para ser induzida pela endonuclease. O alvo de DNA é definido pela sequência 5' a 3' de um filamento do polinucleosídeo de duplo filamento, como indicado acima para C1221. A clivagem do alvo de DNA ocorre nos nucleotídeos nas posições +2 e -2, respectivamente para o filamento de sentido e antissentido. A menos que de outra maneira indicado, a posição na qual a clivagem do alvo de DNA por uma variante de meganuclease I-Cre I ocorre, corresponde ao sítio de clivagem de HE no filamento de sentido do alvo de DNA.

- por "meio sítio de alvo de DNA", "meio sítio de clivagem" ou "meio sítio" é pretendida a porção do alvo de DNA que é ligada por cada domínio de núcleo de Endonuclease residente LAGLIDADG.

- por "alvo DNA quimérico" ou "alvo de DNA híbrido" é pretendida a fusão de uma metade diferente de duas sequências alvo de meganuclease residente. Em adição, pelo menos uma metade do alvo pode compreender a combinação de nucleotídeos que são ligados a pelo menos dois subdomínios separados (alvo de DNA combinado).

- por "sequência alvo de DNA a partir do gene HPRT" é pretendida uma sequência de 20 a 24 bp de um gene HPRT que é reconhecido e clivado por uma variante de meganuclease.

5 - por "Gene HPRT" é pretendido o gene HPRT de um vertebrado.

- por "vetor" é pretendida uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual ele foi ligado.

- por "homólogo" é pretendida uma sequência com identidade suficiente para outra sequência levar a uma recombinação homólogo entre
10 sequências, mais particularmente pelo menos 95% de identidade, preferivelmente 97% de identidade e mais preferivelmente 99%.

- "identidade" refere-se à identidade de sequência entre duas moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeos. A identidade pode ser determinada comparando uma posição em cada sequência que pode ser alinhada
15 para finalidades de comparação. Quando uma posição na sequência comparada está ocupada pela mesma base, em seguida as moléculas são idênticas naquelas posições. Um grau de similaridade ou identidade entre ácido nucleico ou sequências de aminoácido é uma função do número de nucleotídeos idênticos ou de combinação nas posições compartilhadas pelas se-
20 quências de ácido nucleico. Vários algoritmos de alinhamento e/ou programas podem ser usados para calcular a identidade entre duas sequências, incluindo FASTA, ou BLAST que estão disponíveis como parte do pacote de análise da sequência GCG (University of Wisconsin, Madison, Wis.), e podem ser usadas com, por exemplo, parâmetros padrão.

25 - "indivíduo" inclui mamíferos, bem como outros vertebrados (por exemplo, pássaros, peixe e répteis). Os termos "mamífero" e "mamíferos", como usados aqui, referem-se a qualquer animal vertebrado, incluindo monotremos, marsupiais e de placenta, que amamentam seus filhotes e dão vida a vivíparos (eutharian ou mamíferos de placenta) ou ovíparos (metatharian ou mamíferos sem placenta). Exemplos de espécies de mamíferos in-
30 cluem seres humanos e outros primatas (por exemplo, macacos, chimpanzés), roedores (por exemplo, ratos, camundongos, porquinhos-da-índia) e

outros tais como, por exemplo: vacas, porcos e cavalos.

- por "mutação" é pretendida a substituição, deleção, inserção de uma ou mais nucleotídeos/aminoácidos em um polinucleosídeo (gene cDNA,) ou uma sequência de polipeptídeo. A mutação pode afetar a sequência de código de um gene ou sua sequência irregular. Ela pode também afetar a estrutura da sequência genômica ou a estrutura/estabilidade do mRNA codificado.

- "doença genética" refere-se a qualquer doença, parcial ou completamente, direta ou indiretamente, devido a uma anormalidade em um ou vários genes. A anormalidade pode ser uma mutação. A doença genética pode ser recessiva ou dominante.

Em uma modalidade preferida do uso de acordo com a presente invenção, as substituições no subdomínio situado a partir das posições 44 a 77 de I-Crel estão nas posições 44, 68, 70, 75 e/ou 77.

Em outras modalidades preferidas do uso de acordo com a presente invenção, as substituições no subdomínio situado a partir das posições 26 a 40 de I-Crel estão nas posições 26, 28, 30, 32, 33, 38 e/ou 40.

Em outras modalidades preferidas do uso de acordo com a presente invenção, a variante I-Crel ou derivado de cadeia simples compreende a substituição de outros resíduos de aminoácido contactando a sequência alvo de DNA ou interagindo com a estrutura principal de DNA com as bases de nucleosídeo, diretamente ou via uma molécula de água; esses resíduos de interação I-Crel são bem-conhecidos na técnica.

Em outras modalidades preferidas do uso de acordo com a presente invenção, a variante I-Crel ou derivado de cadeia simples compreende uma ou mais substituições adicionais que melhoram a ligação e/ou atividade de clivagem da variante no que se refere ao alvo de DNA do gene HPRT como definido acima; essas substituições estão situadas na sequência I-Crel inteira ou apenas na metade terminal C de I-Crel (posições 80 a 163)

Preferivelmente, as substituições adicionais estão na posição de I-Crel selecionadas a partir do grupo consistindo nas posições: 2, 9, 19, 42, 43, 54, 66, 69, 72, 81, 82, 86, 90, 92, 96, 100, 103, 104, 105, 107, 108, 109,

110, 113, 120, 125, 129, 130, 131, 132, 135, 136, 137, 140, 143, 151, 154, 155, 157, 158, 159, 161 e 162.

5 Mais preferivelmente a substituição está na mutação G19S ou G19A que aumenta a atividade de clivagem da variante *I-Crel* /derivados de cadeia simples. Ainda mais preferivelmente, a mutação é a mutação G19S que adicionalmente prejudica a formação de um homodímero funcional. A mutação G19S é vantajosamente introduzida em um ou dois monômeros de uma variante de heterodímero *I-Crel*, de modo a obter uma meganuclease tendo atividade de clivagem melhorada e especificidade de clivagem melho-
10 rada.

Em outra modalidade preferida do uso de acordo com a presente invenção, as substituições são recolocações dos aminoácidos iniciais nos aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em: A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T, Y, C, V, L, W, M e I.

15 Por exemplo:

- a lisina (K) na posição 28 pode ser mutada em: R,
- a aspargina (N) na posição 30 pode ser mutada em: S, C, R, Y,
Q, D e T,
- a serina (S) na posição 32 pode ser mutada em: D, T, R, G e
20 W,
- a tirosina (Y) na posição 33 pode ser mutada em: H, T, G, R, C,
Q, D e S,
- a glutamina (Q) na posição 38 pode ser mutada em: W, S, T,
G, E, A, Y, C, D e H
- 25 - a serina (S) na posição 40 pode ser mutada em: Q, A, T e R,
- a glutamina (Q) na posição 44 pode ser mutada em: N, T, R, K,
D, Y e A,
- a arginina (R) na posição 68 pode ser mutada em: K, Q, E, A,
Y, N, H e T,
- 30 - a arginina (R) na posição 70 pode ser mutada em: S, H, N e K,
- o ácido aspártico (D) na posição 75 pode ser mutado em: R, S,
N, Y, E, H e Q, e

- a isoleucina (I) na posição 77 pode ser mutado em: T, W, Y, K, N, R, H, D, F, E, Q e L.

Em adição, as variantes I-Crel como definido na presente invenção podem incluir um ou mais resíduos inseridos no terminal NH₂ e/ou terminal COOH da sequência I-Crel. Por exemplo, uma derivação (epítipo ou sequência de poli-histina) é introduzida no terminal NH₂ e/ou terminal COOH; a derivação é útil para a detecção e/ou a purificação da variante.

A variante I-Crel como definida na invenção pode ser um homodímero ou um heterodímero resultante da associação de um primeiro monômero tendo pelo menos uma mutação nas posições 26 a 40 ou 44 a 77 de I-Crel e um segundo monômero que é I-Crel ou um variante I-Crel.

Em outras modalidades preferidas do uso de acordo com a presente invenção, a variante I-Crel é um heterodímero, resultando da associação de um primeiro e um segundo monômero tendo diferentes mutações nas posições 26 a 40 e/ou 44 a 77 de I-Crel.

Em uma modalidade mais preferida, pelo menos um monômero tem pelo menos duas substituições, um em cada um dos dois subdomínios funcionais situado a partir das posições 26 a 40 e 44 a 77 de I-Crel.

Mais preferivelmente, o heterodímero consiste em um primeiro e um segundo monômero selecionado a partir dos seguintes pares de sequência: SEQ ID NO: 83 e 97, SEQ ID NO: 84 e 98, SEQ ID NO: 85 e 99, SEQ ID NO: 32 e 52, SEQ ID NO: 32 e 53, SEQ ID NO: 32 e 54, SEQ ID NO: 32 e 55, SEQ ID NO: 32 e 56, SEQ ID NO: 32 e 57, SEQ ID NO: 32 e 58, SEQ ID NO: 32 e 60, SEQ ID NO: 32 e 65, SEQ ID NO: 32 e 66, SEQ ID NO: 32 e 67, SEQ ID NO: 32 e 68, SEQ ID NO: 32 e 69, SEQ ID NO: 32 e 70, SEQ ID NO: 32 e 71, SEQ ID NO: 32 e 72, SEQ ID NO: 32 e 73, SEQ ID NO: 32 e 74, SEQ ID NO: 75 e 56, SEQ ID NO: 76 e 56, SEQ ID NO: 77 e 56, SEQ ID NO: 78 e 56, SEQ ID NO: 79 e 56, SEQ ID NO: 80 e 56, SEQ ID NO: 81 e 56, SEQ ID NO: 82 e 56, SEQ ID NO: 86 e 96, SEQ ID NO: 87 e 100, SEQ ID NO: 88 e 101, SEQ ID NO: 89 e 102, SEQ ID NO: 90 e 103, SEQ ID NO: 91 e 104, SEQ ID NO: 92 e 105, SEQ ID NO: 93 e 106, SEQ ID NO: 94 e 107, SEQ ID NO: 95 e 108, SEQ ID NO: 147 e 148.

O derivado de cadeia simples da variante *I-CreI* como definido na presente invenção é uma proteína de fusão compreendendo dois monômeros ou dois domínios de núcleo de uma Meganuclease LAGLIDADG ou uma combinação de ambos, em que pelo menos um monômero ou domínio de núcleo tem uma sequência de variante *I-CreI* tendo pelo menos uma substituição nas posições 26 a 40 e/ou 44 a 77 de *I-CreI*, como definido acima.

As sequências alvo de DNA que são clivadas pela variante *I-CreI* ou derivado de cadeia simples estão situadas no ORF HPRT e essas sequências cobrem todo o ORF HPRT (Tabela I e figura 2).

Tabela I: Posição de alvos e identidade em mamíferos:

SEQ ID NO:	Posição no gene HPRT	Posição no mRNA HPRT de Hamster Chinês SEQ ID NO: 15	Posição no mRNA HPRT de camundongo SEQ ID NO: 145	Posição no mRNA HPRT de humano SEQ ID NO: 146	Identidade com a sequência de Hamster Chinês	Identidade com a sequência de humano	Identidade com a sequência de humano
1	Exon 1 -19 to +2	72-93	69-90	67-98	22/22	19/22	17/22
2	Exon 2 42-63	159-180	156-177	154-175	22/22	19/22	18/22
3	Exon 2 81-102	198-219	195-216	193-214	22/22	21/22	20/22
4	Exon 3 17-38	244-262	241-259	239-257	22/22	21/22	20/22
5	Exon 3 57-78	281-302	278-299	276-297	22/22	21/22	21/22
6	Exon 3 89-110	313-334	310-331	308-329	22/22	22/22	22/22
7	Exon 3 94-115	318-339	315-336	313-334	22/22	22/22	21/22
8	Exon 3 138-159	372-393	369-390	367-388	22/22	21/22 ²	21/22 ²
9	Exon 6 9-30	501-522	498-547	496-545	22/22	22/22	20/22 ²
10	Exon 6 37-58	529-550	526-547	524-545	22/22	21/22 ²	18/22
11	Exon 6 38-59	530-551	527-548	525-546	22/22	21/22 ²	18/22
12	Exon 8 4-25	626-647	623-644	621-642	22/22	22/22	22/22
13	Exon 9 9-30	708-729	705-726	703-724	22/22	21/22	21/22
14	Exon 9 46-67	745-766	742-763	740-761	22/22	19/22 ³	21/22 ²

1: A posição é relativa ao início do Éxon correspondente exceto para SEQ ID NO: 1 alvo cuja posição é indicada relativamente ao códon iniciação ATG.

2: 100 % de identidade nas posições ± 3 a 5 e 8 a 10 sem nenhum intervalo

5 3: 100 % de identidade nas posições ± 3 a 5 e 8 a 10 sem intervalo no meio.

As sequências alvo de DNA estão presentes no gene HPRT de pelo menos um mamífero (ser humano ou animal).

Por exemplo, as sequências alvo SEQ ID NO: 6 e 12 estão presentes pelo menos nos Genes HPRT de ser humano, camundongo e Hamster Chinês (Criteculus sp.).

As sequências alvo SEQ ID NO: 7 e 9 estão presentes em pelo menos ambos os camundongo e Gene HPRT de Hamster Chinês.

As sequências alvo SEQ ID NO: 1 a 5, 8, 10, 11, 13 e 14 estão presentes pelo menos no Gene HPRT de Hamster Chinês.

Em adição, sequências alvo tendo identidade de sequência com os nucleotídeos na posição ± 3 a 5 e ± 8 a 10 das sequências SEQ ID NO: 8 e 14 estão presentes pelo menos nos genes HPRT de ser humano e camundongo. Sequências alvo tendo identidade de sequência com os nucleotídeos na posição ± 3 a 5 e ± 8 a 10 das sequências SEQ ID NO: 10 e 11 estão presentes pelo menos no Gene HPRT de camundongo (identidade de sequência não é encontrada como o Gene HPRT de ser humano). A sequência alvo tendo identidade de sequência com os nucleotídeos na posição ± 3 a 5 e ± 8 a 10 da sequência SEQ ID NO: 9 está presente pelo menos no gene HPRT de ser humano.

Portanto, as variantes I-Crel que clivam uma das sequências alvo de DNA SEQ ID NO: 6 e 12 são capazes de induzir uma modificação de sítio específico pelo menos no Gene HPRT de ser humano, camundongo e Hamster Chinês. Em adição, as variantes I-Crel que clivam a sequências alvo de DNA SEQ ID NO: 9 são capazes de induzir uma modificação de sítio específico ambos no Gene HPRT de camundongo e Hamster Chinês, e para algumas delas, também no Gene HPRT de ser humano. As variantes I-Crel que clivam a sequências alvo de DNA SEQ ID NO: 8 são capazes de induzir uma modificação de sítio específico no Hamster Chinês e para algumas delas, também no Gene HPRT de camundongo e/ou ser humano; a posição da modificação no gene HPRT corresponde à posição do sítio de clivagem de DNA genômico (posição +2 no filamento de sentido do alvo de DNA genômico (isto é posições: 101 (Éxon 3), 16 (Éxon 8), 21 (Éxon 6), 150 (Éxon 3),

respectivamente para as sequências SEQ ID NO: 6, 12, 9 e 8).

As variantes I-CreI que clivam a sequência alvo de DNA SEQ ID NO: 7 são capazes de induzir uma modificação de sítio específico pelo menos no Gene HPRT de camundongo e Hamster Chinês (mas não na posição correspondente no Gene HPRT de ser humano). Em adição, as variantes I-CreI que clivam a sequências alvo de DNA SEQ ID NO: 10 e 11 são capazes de induzir uma modificação de sítio específico no Gene HPRT de Hamster Chinês e para algumas delas, também no Gene HPRT de camundongo (mas não na posição correspondente no gene HPRT de ser humano); a posição da modificação no gene HPRT corresponde às posições 106 (Éxon 3), 51 (Éxon 6) e 52 (Éxon 6), respectivamente.

As variantes I-CreI que clivam a sequência alvo de DNA SEQ ID NO: 14 são capazes de induzir uma modificação de sítio específico no Gene HPRT de Hamster Chinês e para algumas delas, também no gene HPRT de ser humano (mas não na posição correspondente no gene HPRT de camundongo); a posição da modificação no gene HPRT corresponde à posição 68 (Éxon 9).

As variantes I-CreI que clivam uma das sequências alvo de DNA SEQ ID NO: 1 a 5 e 13 são capazes de induzir uma modificação de sítio específico pelo menos no Gene HPRT de Hamster Chinês (mas não na posição correspondente no gene HPRT de ser humano ou camundongo); a posição da modificação no gene HPRT corresponde às posições -7 a partir do ATG (Éxon 1), 54 (Éxon 2), 93(Éxon 2), 29 (Éxon 3), 69(Éxon 3), 93(Éxon 9) e 21 (Éxon 9), respectivamente.

Exemplos de variantes heterodiméricas que clivam cada alvo de DNA são apresentados na tabela II e Figura 19.

Tabela II: Sequência de variantes I-Crel heterodiméricas que clivam tendo um alvo de DNA a partir do gene HPRT

Primeiro Monômero I-Crel (SEQ ID NO : 83, 84, 85, 32, 75 a 82, 147 86 a 95)	Segundo Monômero I-Crel (SEQ ID NO: 97 a 99, 52 a 58, 60, 65 a 74, 56, 148, 96 e 100 a 108)	Alvo
28K30Q32D33Y38Q40S44N68K70S75R77T	28K30N32S33G38C40S44Q68R70R75N77I	1
28K30D32S33R38Q40S44N68Q70S75S77V	28K30N32S33T38G40S44T68R70S75Y77T	2
28K30T32S33G38Q40S44Q68R70S75R77Y	28K30N32S33T38Q40R44N68E70S75R77K	3
28K30N32S33H38Q40S44Q68R70R75D77I	28K30N32T33H38Q40S44R68A70S75N77N	4
	28K30S32S33Q38Q40S44R68Y70S75D77N	
	28K30N32T33H38Q40S44R68Y70S75D77N	
	28K30N32T33H38Q40S44R68Y70S75D77R	
	28K30N32S33T38Y40S44K68Y70S75E77V	
	28K30N32R33D38Q40S44K68Y70S75D77R	
	28K30N32S33S38D40S44K68Y70S75D77R	
	28K30N32S33Y38Q40S44R68Y70S75N77I	
	28R30N32S33S38Y40Q44R68A70S75N77N	
	28R30N32S33S38Y40Q44R68A70S75H77Y	
	28R30N32T33S38Y40Q44R68Y70S75N77N 140M	
	28K30N32T33H38H40S44Q68Y70S75D77R	
	28K30N32T33H38Q40S44K68Y70S75D77R	
	28K30N32T33H38Q40S44Q68N70S75H77R	
	28K30N32T33H38Q40S44Q68R70S75H77R	
	28K30N32T33H38Q40S44Q68H70S75H77H	
	28K30N32T33H38Q40S44Q68H70S75H77H 92R	
	28K30N32T33H38Q40S44K68Y70S75D77R 92R96R107R132V140A143A	
28K30N32S33H38Q40S44Q66C68R70R75 D77I 137V155R162P	28K30N32S33T38Y40S44K68Y70S75E77V	4
9L28K30N32S33H38Q40S44Q68R70R75D7 7I 100I108V154G155P161P		
2Y28K30N32S33H38Q40S44Q68R70R75D 77I 109V125A		
28K30N32S33H38Q40S44Q68R70R75D77I 113S136S		
2I28K30N32S33H38Q40S44Q68R70R75D7 7I 81V86I110G131R135Q151A157V		
28K30N32S33H38Q40S44Q68R70R71R75 D77I103I129A130G		
28K30N32S33H38Q40S44Q68R69V70R75 D77I 82R90R120V139R158M		
28K30N32S33H38Q40S44Q54L68R70R75D 77I 86D100R104M105A136S159R		
28K30N32S33H38Q40A42A43LS44Q68R70R 75D77I		
	28K30N32T33H38Q40S44R68Y70S72T75N 77N	

Tabela II continuação

Primeiro Monômero I-Crel (SEQ ID NO : 83, 84, 85, 32, 75 a 82, 147 86 a 95)	Segundo Monômero I-Crel (SEQ ID NO: 97 a 99, 52 a 58, 60, 65 a 74, 56, 148, 96 e 100 a 108)	Alvo
28K30N32T33Y38W40S44N68R70S75Y77I	28K30R32S33Y38E40S44Q68H70H75N77I	5
28K30N32S33T38Q40A44N68K70S75R77T	28K30N32S33H38T40S44N68R70N75N77I	6
28K30N32S33H38S40S44R68R70S75N77D	28K30N32S33G38Q40Q44Q68A70K75N77I	7
28K30N32S33G38T40S44N68K70S75H77F	28K30C32S33T38Q40S44Q68Y70S75R77Q	8
28K30K32S33R38Q40S44D68Y70S75S77R	28K30N32S33T38Q40Q44N68K70S75H77F	9
28K30N32S33T38Q40T44R68Y70S75E77Y	28K30N32S33R38T40S44R68T70S75N77N	10
28K30N32T33T38Q40S44Y68R70S75Y77V	28K30N32G33T38Q40S44N68Y70S75R77Y	11
28K30Y32T33C38Q40S44Q68R70S75D77K	28K30N32W33T38Q40S44Q68R70R75N77I	12
28K30N32S33H38G40S44N68R70S75Y77N	28K30N32S33T38A40S44Q68R70S75N77L	13
28K30N32S33Y38Q40S44A68R70S75Q77E	28K30N32S33C38Y40S44R68Y70S75D77I	14

A sequência de cada variante é definida por seus resíduos de aminoácido nas posições indicadas. Por exemplo, a primeira variante heterodimérica da Tabela II consiste em um primeiro monômero tendo K, Q, D, Y, Q, S, N, K, S, R e T nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40, 44, 68, 70, 75 e 77, respectivamente e um segundo monômero tendo K, N, S, G, C, S, Q, R, R, N, e I nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40, 44, 68, 70, 75 e 77, respectivamente. As posições são indicadas para referência à sequência I-Crel SWISSPROT P05725 ou código de acesso pdb Ig9y; I-Crel tem K, N, S, Y, Q, S, Q, R, R, D e I nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40, 44, 68, 70, 75 e 77, respectivamente. As posições que não são indicadas não são mutados e assim correspondem à sequência I-Crel tipo selvagem.

Em outras modalidades preferida do uso de acordo com a presente invenção, a Variante I-Crel ou derivado de cadeia simples são combinados com um constructo de DNA alvo compreendendo uma sequência para ser introduzida flanqueados por sequências que compartilham homologies com as regiões do gene HPRT que circundam o sítio de clivagem de DNA genômico da Variante I-Crel ou derivado de cadeia simples, como definido acima.

Preferivelmente, sequência homólogas de pelo menos 50 bp, preferivelmente mais do que 100 bp e mais preferivelmente mais do que 200 bp são usados. De fato, homologies de DNA compartilhadas são localizadas nas regiões que flanqueiam a jusante e a montante o sítio da quebra e a sequência de DNA a ser introduzida deve ser localizada entre dois braços. A

sequência a ser introduzida compreende um gene de interesse exógeno ou uma sequência para inativar ou deletar o Gene HPRT ou parte do mesmo.

Tais alterações de DNA cromossomiais podem ser usadas para preparar "knock-out" e knock-in de HPRT em animais em que o gene HPRT é inativado ("knock-out") e eventualmente recolocado com um gene de interesse exógeno (knock-in).

Consequentemente, tais alterações de DNA cromossomiais são também usadas para preparar linhagens celulares de vertebrados geneticamente modificados (mamíferos incluindo ser humano) em que Gene HPRT endógeno é inativado e um transgene é eventualmente inserido no Locus de HPRT. Em adição, seguinte a inativação do gene HPRT endógeno, HPRT pode ser usado como um marcador de seleção positivo (seleção para expressão de marcador HPRT com HAT) em procedimentos alvo de gene adicionais em qualquer locus dos cromossomas de animal/célula deficiente de HPRT.

A matéria objeto da presente invenção é também um método para preparar knock-in ou "knock-out" de HPRT em animal, compreendendo pelo menos a etapa de:

- (a) introduzir em uma célula precursora pluripotente ou um embrião de uma animal, uma variante I-Crel ou um derivado de cadeia simples, como definido acima, de modo a induzir uma clivagem de duplo filamento em um sítio de interesse do gene HPRT compreendendo um reconhecimento de DNA e sítio de clivagem da variante I-Crel ou um derivado de cadeia simples, simultânea ou consecutivamente,
- (b) introduzir em uma célula precursora de animal ou embrião da etapa (a) um DNA alvo, em que o DNA alvo compreende (1) homologias de compartilhamento de DNA para a região ao redor do sítio de clivagem do HE e (2) DNA que conserta o sítio de interesse na recombinação entre o DNA alvo e o DNA cromossomial, de modo a gerar uma célula precursora de animal genomicamente modificada ou embrião tendo

consertado o sítio de interesse por recombinação homólogo,

- (c) desenvolver a célula precursora animal genomicamente modificada pu embrião da etapa (b) em um animal quimérico, e
- (d) derivar um animal transgênico a partir do animal quimérico da etapa (C).

5

Preferivelmente, a etapa (c) compreende a introdução da célula precursora genomicamente modificada na etapa (b) em blastócitos de modo a gerar animais quiméricos.

10

A matéria objeto da presente invenção é também um método para preparar um knock-in ou "knock-out" de HPRT em célula, compreendendo pelo menos a etapa de:

- (a) introduzir em uma célula, uma Variante I-Crel ou derivado de cadeia simples, como definido acima, de modo a induzir uma clivagem de duplo filamento em um sítio de interesse do gene HPRT compreendendo um reconhecimento de DNA e um sítio de clivagem para a variante I-Crel ou derivado de cadeia simples, simultânea ou consecutivamente,
- (b) introduzir na célula da etapa (a), um DNA alvo, em que o DNA alvo compreende (1) Homologias de compartilhamento de DNA para a região em volta do sítio de clivagem de HE e (2) DNA que conserta o sítio de interesse na recombinação entre o DNA alvo e o DNA cromossomial, de modo a gerar uma célula recombinante tendo consertado o sítio de interesse por recombinação homólogo,
- (c) isolar a célula recombinante da etapa (b), por qualquer meio apropriado.

15

20

25

O DNA alvo é introduzido na célula sob condições apropriadas para introdução do DNA alvo no sítio de interesse.

30

Em uma modalidade preferida, o constructo de DNA alvo é inserido em um vetor.

Alternativamente, o Gene HPRT pode ser inativado pelo conserto da quebra de duplo filamento por junção de extremidade não-homóloga (Figura 3B).

5 A matéria objeto da presente invenção é também um método para preparar um an "knock-out" de HPRT em animal, compreendendo pelo menos a etapa de:

- 10 (a) introduzir em uma célula precursora pluripotente ou um embrião de um animal, uma Variante I-Cre1 ou derivado de cadeia simples, como definido acima, de modo a induzir uma clivagem de duplo filamento em um sítio de interesse do gene HPRT compreendendo um reconhecimento de DNA e um sítio de clivagem da variante I-Cre1 ou derivado de cadeia simples, e desse modo gerar célula precursora genomicamente modificada ou embrião tendo consertado a quebra de duplo filamento por junção de extremidade não-homóloga,
- 15 (b) desenvolver a célula precursora animal genomicamente modificada ou embrião da etapa (a) em um animal quimérico, e
- 20 (c) derivar um animal transgênico a partir de um animal quimérico da etapa (b). Preferivelmente, a etapa (b) compreende a introdução da célula precursora genomicamente modificada obtida na etapa (a), em blastócitos, de modo a gerar animais quiméricos.

25 A matéria objeto da presente invenção é também um método para preparar uma célula deficiente de HPRT, compreendendo pelo menos a etapa de:

- 30 (a) introduzir em uma célula, uma variante I-Cre1 ou derivado de cadeia simples, como definido acima, de modo a induzir uma clivagem de duplo filamento em um sítio de interesse do gene HPRT compreendendo um reconhecimento de DNA e um sítio de clivagem da variante I-Cre1 ou derivado

de cadeia simples, e desse modo gerar célula deficiente de HPRT genomicamente modificada tendo consertado a quebra de duplo filamento, por junção de extremidade não-homóloga, e

- 5 (b) isolar a célula deficiente de HPRT genomicamente modificada da etapa(a), por qualquer meio apropriado.

A célula que é modificada pode ser qualquer célula de interesse. Para preparar animais transgênicos/"knock-out", as células são células precursoras pluripotentes tais como células estaminais derivadas de embrião (ES), que são bem-conhecidas na técnica. A variante I-Cre1 /derivado de cadeia simples podem ser providos diretamente para as células ou através de um vetor de expressão compreendendo a sequência de sequência de polinucleosídeo que codifica a meganuclease e adequada para sua expressão na célula usada.

10

- 15 O animal é preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um roedor de laboratório (camundongos, ratos, porquinhos-da-Índia), ou uma vaca, proco, cavalo ou cabra.

Em adição, a perda do gene HPRT endógeno nas células modificadas pode ser usada selecionada usando a 6-tioguanina análoga de purina (6-TG).

20

Em outra modalidade preferida do uso de acordo com a presente invenção, a variante I-Cre1 ou derivado de cadeia simples é codificada por um fragmento de polinucleotídeo. O polinucleosídeo pode modificar um monômero de uma variante heterodimérica ou homodimérica, ou dois domínios/monômeros de uma endonuclease quimérica de cadeia simples.

25

Em uma modalidade mais preferida, o fragmento de polinucleosídeo é inserido em um vetor que é adequado para sua expressão nas células usadas. O vector compreende vantajosamente um constructo de DNA alvo como definido acima. Preferivelmente, o vector compreende dois fragmentos de polinucleotídeo diferentes, cada um codificando um dos monômeros de uma variante I-Cre heterodimérico, como definido acima.

30

Um vetor que pode ser usado na presente invenção inclui, mas

não é limitado a, um vetor viral, um plasmídio, um vetor RNA ou uma molécula de RNA ou DNA circular ou linear que pode consistir em ácidos nucleicos cromossomiais, não-cromossomiais, semissintéticos ou sintéticos. Vetores preferidos são aqueles capazes de replicação (vetor episomal) e/ou expressão de ácidos nucleicos aos quais eles são ligados (vetores de expressão). Um grande número de vetores adequados são conhecidos por aqueles versados na técnica e comercialmente disponíveis.

Vetores virais incluem retrovírus, adenovírus, parvovírus (por exemplo, vírus associados a adeno), coronavírus, vírus de RNA de filamento negativo tais como ortomixovírus (por exemplo, vírus da influenza), rabdovírus (por exemplo, vírus de estomatite da raiva e vesicular), paramixovírus (por exemplo, sarampo e Sendai), vírus de RNA de filamento positivo tais como picor-navírus e alfavírus, e vírus de DNA de filamento duplo incluindo adenovírus, herpesvírus (por exemplo, vírus da Herpes Simplex tipos 1 e 2, vírus Epstein-Barr, citomegalovírus), e poxvírus (por exemplo, vaccinia, fowlpox e canarypox). Outros vírus incluem vírus Norwalk, togavírus, flavivírus, reovírus, papovavírus, hepadnavírus, e vírus da hepatite, por exemplo. Exemplos de retrovírus incluem: avian leukosis-sarcoma, vírus de mamífero tipo C, tipo B, vírus tipo D, grupo HTLV-BLV, lentivírus, spumavírus (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

Vetores preferidos incluem vetores lentivirais, e particularmente vetores lentivirais de auto-inativação. Vetores podem compreender marcadores selecionáveis, por exemplo: neomicina fosfotransferase, histidinol desidrogenase, di-hidrofolato reductase, higromicin fosfotransferase, timidina quinase do vírus do herpes simples, adenosina deaminase, glutamina sintetase, e hipoxantina-guanina fosforribosil transferase para cultura de célula eucariótica; TRP1 para *S. cerevisiae*; tetraciclina, rifampicin ou resistência à ampicilina em *E. coli*.

Preferivelmente os ditos vetores são vetores de expressão, em que a(s) seqüência(s) que codifica(m) a variante/derivado de cadeia simples

da invenção é(são) colocada(s) sob controle de elementos de controle transcripcionais e traduzidos apropriados para permitir a produção ou síntese da variante. Portanto, o polinucleotídeo é compreendido em um cassete de expressão. Mais particularmente, o vetor compreende uma origem de replicação operativamente ao polinucleotídeo de codificação, um sítio de ligação de ribossoma, um sítio de junção de RNA (quando o DNA genômico é usado), um sítio de poliadenilação e um sítio de terminação de transcrição. Ele também pode compreender um melhorador. A seleção do promotor dependerá da célula na qual o polipeptídeo é expresso. Preferivelmente, quando a variante é um heterodímero, os dois polinucleotídeos que codificam cada um dos monômeros são incluídos em um vetor que é capaz de acionar a expressão de ambos os polinucleotídeos, simultaneamente. Promotores adequados incluem promotores induzíveis e/ou específicos de tecido. Exemplos de promotores induzíveis são: promotor de metalotionina eucariótico que é induzido por níveis aumentados de metais pesados, promotor lacZ procariótico que é induzido em resposta a isopropil- β -D-tiogalacto-piranosida (IPTG) e promotor de choque térmico eucariótico que é induzido por temperatura aumentada. Exemplos de promotores específicos de tecido são creatina quinase do músculo esquelético, antígeno específico de próstata (PSA), α -antitripsin protease, proteínas A e B de tensoativo ser humano (SP), genes de proteína de soro de leite ácido e β -caseína.

O DNA alvo é introduzido na célula sob condições apropriadas para introdução do DNA alvo no sítio de interesse.

Para preparar células/animais de knock-in o DNA que conserta o sítio de interesse compreende a sequência de um gene de interesse exógeno, e eventualmente um marcador de seleção, tal como o gene HPRT.

Para preparar células/animais de "knock-out" o DNA que conserta o sítio de interesse compreende sequências que inativam o gene de interesse endógeno.

A matéria objeto da presente invenção é também para o uso de uma variante I-Crel ou um derivado de cadeia simples como definido acima, para a preparação de um medicamento para prevenir, melhorar ou curar

uma doença genética associada com uma mutação no gene HPRT em um indivíduo em necessidade do mesmo, o medicamento sendo administrado por qualquer meio ao indivíduo.

5 Neste caso, o uso da variante I-Crel ou um derivado de cadeia simples como definido acima, compreende pelo menos a etapa de (a) induzir em tecidos somáticos do indivíduo uma clivagem de duplo filamento em um sítio de interesse do gene HPRT compreendendo pelo menos um sítio de clivagem e um de interesse da variante, e (b) introduzir no indivíduo um DNA
10 alvo, em que o DNA alvo compreende (1) Homologias de compartilhamento de DNA para a região em volta do sítio de clivagem de HE e (2) DNA que conserta o sítio de interesse na recombinação entre o DNA alvo e o DNA cromossomal. O DNA alvo é introduzido no indivíduo sob condições apropriadas para introdução do DNA alvo no sítio de interesse.

De acordo com a presente invenção, a clivagem de duplo fila-
15 mento é induzida, ou *in toto* por administração da meganuclease a um indivíduo, ou *ex vivo* por introdução da meganuclease nas células somáticas removidas de um indivíduo e retornadas no indivíduo após modificação.

Em uma modalidade preferida do uso, a Variante I-Crel ou derivado de cadeia simples é combinada com um constructo de DNA alvo que
20 compreende uma sequência que repara uma mutação no gene HPRT flanqueado por sequências que compartilham homologias com as regiões do gene HPRT que circundam o sítio de clivagem de DNA genômico da variante I-Crel ou derivado de cadeia simples, como definido acima.

Para corrigir o gene HPRT, a clivagem do gene ocorre na vizinhança da mutação, preferivelmente, dentro 500 bp da mutação (Figura 3C).
25 O constructo alvo compreende um fragmento de gene HPRT que tem pelo menos 200 bp de sequência homóloga flanqueando o sítio de clivagem de DNA genômico (matriz de reparo mínimo) para reparar a clivagem, e inclui a sequência correta do gene HPRT para reparar a mutação (Figura 3C). Con-
30 sequentemente, o constructo alvo para a correção do gene compreende ou consiste na matriz de reparo mínimo; é preferivelmente de 200 pb a 6000 pb, mais preferivelmente de 1000 pb a 2000 pb.

Para restaurar um gene funcional (Figura 3D), a clivagem do gene ocorre a montante da mutação. Preferivelmente a mutação é a primeira mutação conhecida na sequência do gene, de modo que todas as mutações a jusante do gene podem ser corrigidas simultaneamente. O constructo alvo compreende os exões a jusante do sítio de clivagem de DNA genômico fundidos no quadro (como no cDNA) e com um sítio de poliadenilação para parar a transcrição em 3'. A sequência a ser introduzida (constructo de knock-in de éxon) é flanqueada por sequências de íntrons ou éxons em volta do sítio de clivagem de HE, de modo a permitir a transcrição do gene construído (gene Éxon knock-in) em um mRNA capaz de codificar para uma proteína funcional (Figura 3D). Por exemplo, o constructo de knock-in de éxon é flanqueado pelas sequências a montante e a jusante.

Em outra modalidades preferida do dito uso, a variante I-Crel ou derivado de cadeia simples é codificada por um vetor. Preferivelmente, o vetor compreende o constructo de DNA alvo, como definido acima.

Em outra modalidade preferida do uso, a doença genética é a Síndrome de Lesch Nyhan.

A matéria o da presente invenção é também uma composição caracterizada pelo fato de que ela compreende pelo menos uma variante I-Crel ou derivado de cadeia simples e/ou pelo menos um vetor de expressão que codifica a variante/molécula de cadeia simples, como definido acima, e um excipiente farmacologicamente aceitável.

Em uma modalidade preferida da composição, ela compreende um constructo de DNA alvo que compreende uma sequência que repara uma mutação no gene HPRT, flanqueado por sequências que compartilham homologias com o sítio de clivagem de DNA genômico da variante, como definido acima. A sequência que repara a mutação é ou um fragmento do gene com a sequência correta ou um constructo de knock-in de éxon, como definido acima.

Preferivelmente, o constructo de DNA alvo é ou incluído em um vetor recombinante ou ele é incluído em um vetor de expressão compreendendo o polinucleosídeo(s) que codifica a variante/derivado de cadeia sim-

ples, como definido na presente invenção.

A matéria objeto da presente invenção é também produtos contendo pelo menos uma variante I-Crel /derivado de cadeia simples ou um vetor de expressão que codifica a meganucleases, e um vetor incluindo um
5 constructo alvo, como definido acima, como uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou sequencial na prevenção ou tratamento ou de uma doença genética associada com uma mutação no gene HPRT.

A matéria objeto da presente invenção é também um método para prevenir, melhorar ou curar uma doença genética associada com uma
10 mutação no gene HPRT em um indivíduo em necessidade do mesmo, o método compreendendo pelo menos a etapa de administrar ao indivíduo a composição como definido acima, por qualquer meio.

Para finalidades da terapia, a variante I-Crel /derivado de cadeia simples e um excipiente farmacologicamente aceitável são administrados em
15 uma quantidade terapêuticamente eficaz. Tal uma combinação é dita ser combinada em uma "quantidade terapêuticamente eficaz" se a quantidade administrada for fisiologicamente significativa, se sua presença resulta em uma mudança significativa na fisiologia do recipiente. No presente contexto, um agente é fisiologicamente significativo se sua presença resulta em uma
20 diminuição na severidade de um ou mais sintomas da doença alvejada e em uma correção de genoma da lesão ou anormalidade.

Em uma modalidade dos usos de acordo com a presente invenção, a variante I-Crel /derivado de cadeia simples é substancialmente não-imunogênica, isto é, produzir pouca ou nenhuma resposta imunológica ad-
25 versas. Uma variedade de métodos para melhorar ou eliminar reações imunológicas prejudiciais deste tipo pode ser usada de acordo com a invenção. Em uma modalidade preferida, a variante I-Crel/derivado de cadeia simples e substancialmente livre de N-formil metionina. Outra forma de evitar reações imunológicas não desejadas é conjugar meganucleases para polietileno glicol ("PEG") ou polipropileno glicol ("PPG") (preferivelmente de um peso mo-
30 lecular médio (MW) de 500 a 20,000 dáltons). Conjugação com PEG ou PPG, como descrita por Davis et al. (US 4.179.337) por exemplo, pode pro-

ver conjugados de endonuclease não imunogênicos, fisiologicamente ativos, solúveis em água com atividade antiviral. Métodos similares também usando um copolímero de polietileno-polipropileno glicol são descritos em Saifer et al (US 5.006.333).

5 A variante I-Crel ou derivado de cadeia simples pode ser usada ou como um constructo/vetor de polipeptídeo ou como um polinucleosídeo que codifica o polipeptídeo. Ele é introduzido em células, *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, por qualquer meio conveniente bem-conhecido por aqueles versados na técnica, que são apropriados para o tipo de célula particular, sozinho ou
10 em associação com pelo menos um veículo apropriado e/ou com o DNA alvo. Uma vez em uma célula, a meganuclease e se presente, o vetor compreendendo DNA alvo e/ou ácido nucleico que codifica a meganuclease são importados ou translocados pela célula do citoplasma para o sítio de ação no núcleo.

15 A variante I-Crel ou derivado de cadeia simples (polipeptídeo) pode ser vantajosamente associada com: lipossomas, polietilenoimina (PEI), e/ou peptídeos de translocação de membrana (Bonetta, *The Scientist*, 2002, 16, 38; Ford et al, *Gene Ther.*, 2001, 8, 1-4 ; Wadia e Dowdy, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, 13, 52- 56); no caso posterior, a sequência da variante I-
20 *Cre*/derivado de cadeia simples é fundida com a sequência de um peptídeo de translocação de membrana (proteína de fusão).

Vetores compreendendo DNA alvo e/ou ácido nucleico que codifica a meganuclease pode ser introduzido em uma célula por uma variedade de métodos (por exemplo, injeção, absorção direta, bombardeamento de
25 projéteis, lipossomas, eletroporação). Meganucleases pode ser estável ou transientemente expressa em células usando vetores de expressão. Técnicas de expressão em células eucarióticas são bem-conhecidas por aqueles versados na técnica. (Ver *Current Protocols in Human Genetics*: Chapter 12 "Vectors For Gene Therapy" & Chapter 13 "Delivery Systems for Gene The-
30 rapy"). Opcionalmente, pode ser preferível incorporar um sinal de localização nuclear na proteína recombinante para assegurar que ele é expresso dentro do núcleo.

A matéria objeto da presente invenção é também uma variante I-Crel/derivado de cadeia simples, um fragmento de polinucleotídeo que codifica a variante ou um derivado de cadeia simples, um vetor que compreende o fragmento de polinucleosídeo e/ou um constructo alvo de DNA, uma célula hospedeiro procariótica ou eucariótica e modificada por um polinucleotídeo ou um vetor como definido acima, preferivelmente um vetor de expressão.

A matéria objeto da presente invenção é também um animal transgênico não-humano ou uma planta transgênica, em que toda ou parte de sua célula é modificada por um polinucleotídeo ou um vetor como definido acima.

Como usado aqui, uma célula refere-se a uma célula procariótica, tal como uma célula bacteriana, ou uma célula eucariótica, tal como uma célula de animal, planta ou levedura.

A variante I-Crel como definido na presente invenção é obtenível por um método para variantes I-Crel de construção capazes de clivar uma sequência alvo de DNA genômica a partir de um gene de vertebrado, compreendendo pelo menos as etapas de:

- (a) construir uma primeira série de Variantes I-Crel tendo pelo menos uma substituição no primeiro subdomínio funcional do domínio núcleo LAGLIDADG situado a partir das posições 26 a 40 de I-Crel,
- (b) construir uma segunda série de Variantes I-Crel tendo pelo menos uma substituição em um segundo subdomínio funcional do domínio núcleo LAGLIDADG situado a partir das posições 44 a 77 de I-Crel,
- (c) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir da primeira série de etapa (a) que são capazes de clivar um sítio I-Crel mutante em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições -10 a -8 do Sítio I-Crel foi recolocada com uma trinca de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo em cag, art, cct, ttg, gac, atg, ttt, ttc, tgg, gtc, aag, gag e (ii) a trinca de nucleotídeo nas posições +8 a +10 foi recolocado

com a sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que é substituída na posição -10 a -8 do sítio I-*Crel* (isto é: ctg, aat, agg, caa, gtc, cat, aaa, gaa, cca, gac, ctt, e ctc, respectivamente),

- 5 (d) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir da segunda série de etapa (b) que são capazes de clivar um sítio I-*Crel* mutante em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições -5 a -3 do sítio I-*Crel* foi recolocada com uma trinca de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo em: gac, 10 taa, tca, gtg, gct, tgt, tgg, ctg, ttg, tag, e gag, e (ii) a trinca de nucleotídeo nas posições +3 a +5 foi recolocada com a sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que e substituída na posição -5 a -3 do sítio I-*Crel* (isto é: 15 gtc, tta, tga, cac, agc, aca, cca, cag, caa, cta e ctc, respectivamente),
- (e) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir da primeira série de etapa (a) que são capazes de clivar um sítio de I-*Crel* mutante em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições +8 a +10 do sítio I-*Crel* foi recolocada uma trinca de 20 nucleotídeo selecionado a partir do grupo consistindo em: cat, cga, tat, ggg, tac, taa, cag, gca, aca, gaa, tga, atg, e (i-i) a trinca de nucleotídeo nas posições -10 a -8 foi recolocado com a sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que é substituído na posição +8 a +10 do sítio 25 I-*Crel* (isto é: atg, tcg, ata, ccc, gta, tta, ctg, tgc, tgt, ttc, tca e cat, respectivamente),
- (f) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir da segunda série de etapa (b) que são capazes de clivar um sítio de I-*Crel* mutante em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições +3 a +5 do sítio I-*Crel* foi recolocada com a trinca de 30 nucleotídeo selecionado a partir do grupo consistindo em: tec, tat, gtg, gaa, tgg, tac, ttt, aca, agc, gcg, tcc, act, caa e

aag, e (ii) a trinca de nucleotídeo nas posições -5 a -3 foi recolocada com a sequência complementar reversa do qual é substituída na posição +3 a +5 do sítio I-Crel (isto é: gga, ata, cac, ttc, cca, gta, aaa, tgt, gct, cgc, gga, agt, ttg e ctt, respectivamente),

5

- (g₁) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir das etapas (c) a (f) que são capazes de clivar um alvo DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14.

De acordo com uma primeira modalidade da invenção, a variante I-Crel é obténível por um método compreendendo pelo menos as etapas (a) a (f) como definido acima, e as etapas adicionais de:

10

- (g₂) combinar variantes diferentes obtidas em qualquer uma das etapas (c) a (f) uma com a outra ou com I-Crel, para formar heterodímeros, e

15

- (h₂) selecionar e/ou peneirar os heterodímeros a partir da etapa (g₂) que são capazes de clivar o alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14.

De acordo com uma segunda modalidade da invenção, a variante I-Crel é obténível por um método compreendendo pelo menos as etapas (a) a (f) como definido acima, e as etapas adicionais de:

20

- (g₃) combinar em uma variante única, as mutações nas posições 26 a 40 e 44 a 77 de duas variantes a partir da etapa (c) e etapa (d), para obter uma nova variante I-Crel homodimérica que cliva uma sequência em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições -10 a -8 é idêntica à trinca de nucleotídeo que está presente nas posições -10 a -8 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, (ii) a trinca de nucleotídeo nas posições +8 a +10 é idêntica à sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que está presente nas posições -10 a -8 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, (iii) a trinca de nucleotídeo nas posições -5 a -3 é idêntico à trinca de nucleotídeo

25

30

- que está presente nas posições -5 a -3 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14 (iv) a trinca de nucleotídeo nas posições +3 a +5 é idêntica à sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que está presente nas posições -5 a -3 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, e/ou,
- 5
- (h₃) combinar em uma variante única, as mutações nas posições 26 a 40 e 44 a 77 de duas variantes a partir da etapa (e) e etapa (f), para obter uma nova variante I-Crel homodimérica que cliva uma sequência em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições +3 a +5 é idêntica à trinca de nucleotídeo que está presente nas posições +3 a +5 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, (ii) a trinca de nucleotídeo nas posições -5 a -3 é idêntica à sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que está presente nas posições +3 a +5 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, (iii) a trinca de nucleotídeo nas posições +8 a +10 do sítio I-Crel foi recolocada com a trinca de nucleotídeo que está presente nas posições +8 a +10 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14 e (iv) a trinca de nucleotídeo nas posições -10 a -8 é idêntica à sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo nas posições +8 a +10 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, e
- 10
- 15
- 20
- 25
- (i₃) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir das etapas (g₃) ou (h₃) que são capazes de clivar um alvo DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14.
- De acordo com uma modalidade da invenção, a variante I-Crel é obtenível por um método compreendendo pelo menos as etapas (a) a (f), a
- 30 etapa (g₃) e/ou a etapa (h₃) como definido acima, e as etapas adicionais de:
- (i₄) combinar as variantes obtidas na etapa (g₃) com as variantes obtidas na etapa (h₃), I-Crel ou as variantes obtidas na

- etapa (e) ou etapa (f), para formar heterodímeros, ou
- (i'₄) combinar as variantes obtidas na etapa (h₃) com I-CreI ou as variantes obtidas na etapa (c) ou etapa (d), para formar heterodímeros, e
- 5 (j₄) selecionar e/ou peneirar os heterodímeros a partir da etapa (i₄) ou (i'₄) que são capazes de clivar um alvo DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14.

A seleção e/ou peneiração nas etapas (c), (d), (e), (f), (g₁), (h₂), (i₃) e (j₄) pode ser realizada usando um ensaio de clivagem *in vitro* ou *in vivo*, como descrito no Pedido PCT Internacional WO 2004/067736, Epinat et al. (Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952-2962), Chames et al. (Nucleic Acids Res., 2005, 33, e178), e Arnould et al. (J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458). Preferivelmente, etapas (c), (d), (e), (f), (g₁), (h₂), (i₃) e/ou (j₄) são realizadas *in vivo*, sob condições onde a quebra de duplo filamento na sequência alvo de DNA mutada que é gerada pela variante leva à ativação de um marcador de seleção positivo ou um gene de relatório, por reparo mediado por recombinação da quebra de duplo filamento de DNA, como descrito no Pedido PCT Internacional WO 2004/067736, Epinat et al. (Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952-2962), Chames et al. (Nucleic Acids Res., 2005, 33, e178), e Arnould et al. (J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458).

As etapas (a) e (b) podem compreender a introdução de mutações adicionais a fim de melhorar a ligação e/ou propriedades de clivagem dos mutantes, particularmente nas outras posições que estão em contato com a sequência alvo de DNA ou que estão interagindo direta ou indiretamente com o alvo de DNA. Essas etapas podem ser realizadas gerando bibliotecas de combinação como descrito no Pedido PCT Internacional WO 2004/067736 e Arnould et al. (J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458).

A combinação (intermolecular) das variantes na etapa (g₂), (i₄), e (i'₄) é realizada co-expressando, ou duas variantes diferentes a partir das etapas (c) e (d), (e) e (f), (g₃) e (h₃), (g₃) e (e), (g₃) e (f), (h₃) e (c), (h₃) e (d), ou uma variante a partir de qualquer uma das etapas (c) a (f), (g₃) ou (h₃) com I-CreI, de modo a permitir a formação de heterodímeros. Por exemplo,

células hospedeiro podem ser modificadas a partir de um ou dois vetores de expressão recombinantes que codificam a variante(s). As células são, em seguida, cultivadas sob condições que permitem a expressão das variantes, de modo que heterodímeros são formados nas células hospedeiro, como descrito no Pedido PCT Internacional WO 2006/097854 e Arnould et al. (J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458).

A combinação (intramolecular) de mutações nas etapas (g₃) e (h₃) pode ser realizada amplificando fragmentos de sobreposição que compreendem cada um dos dois subdomínios por técnicas PCR de sobreposição bem-conhecidas.

Em adição, a etapa (g₃) e/ou (h₃) pode adicionalmente compreender a introdução de mutações aleatórias na variante toda ou em parte da variante, em particular a metade do terminal C da variante (posições 80 a 163). Isto pode ser realizado gerando bibliotecas de mutagenese aleatória em um grupo de variantes, de acordo com métodos de mutagenese padrão que são bem-conhecidos na técnica e comercialmente disponíveis.

A matéria objeto da presente invenção é também uma variante I-Crel tendo mutações nas posições 26 a 40 e/ou 44 a 77 de I-Crel que é útil para construção das variantes capazes de clivar um alvo de DNA a partir do gene HPRT, de acordo com a presente invenção. Em particular, a invenção engloba as variantes I-Crel como definido na etapa (c) a (f) do método para construção das Variantes I-Crel, como definido acima, incluindo as variantes da sequência SEQ ID NO: 24 a 47 e 129 a 142. A invenção também engloba as variantes I-Crel como definido na etapa (g₃) e (h₃) do método para construção das variantes I-Crel, como definido acima, incluindo as variantes da sequência SEQ ID NO: 52 a 60.

Endonucleases quiméricas de cadeia simples capazes de clivar um alvo de DNA a partir do gene de interesse são derivadas a partir das variantes de acordo com a invenção por métodos bem-conhecidos na técnica (Epinat et al., Nucleic acids Res., 2003, 31, 2952-62; Chevalier et al., Mol. Cell., 2002, 10, 895-905; Steuer et al., Chembiochem., 2004, 5, 206-13; Pedidos PCT Internacionais WO 03/078619 e WO 2004/031346). Quaisquer de

tais métodos podem ser aplicados para a construção de endonucleases quiméricas de cadeia simples derivadas a partir das variantes como definido na presente invenção.

Os fragmentos de polinucleosídeos tendo a sequência do constructo de DNA alvo ou a sequência que codifica a variante I-Crel ou derivado de cadeia simples como definido na presente invenção, podem ser preparados por qualquer método conhecido por uma pessoa versada na técnica. Por exemplo, eles são ampliados a partir do modelo de DNA, por reação de cadeia de polimerase com iniciadores específicos. Preferivelmente os códon dos cDNAs que codificam a variante I-Crel ou derivado de cadeia simples são escolhidos em favor da expressão das proteínas no sistema de expressão desejado.

A variante I-Crel ou derivado de cadeia simples como definido na presente invenção pode ser obtida e introduzida em uma célula hospedeiro por técnicas de engenharia genética e DNA recombinante bem-conhecidas.

A variante I-Crel ou derivado de cadeia simples como definido na presente invenção são produzidos expressando polipeptídeos como definido acima; preferivelmente os polipeptídeos são expressos ou co-expressos (no caso da variante somente) em uma célula hospedeiro ou um animal/planta transgênico modificados por um vetor de expressão ou dos vetores de expressão (no caso da variante somente), sob condições adequadas para a expressão ou co-expressão dos polipeptídeos, e a variante ou derivado de cadeia simples é recuperada a partir da cultura de célula hospedeiro ou a partir do animal/planta transgênico.

A prática da presente invenção irá empregar, a menos que de outra maneira indicado, técnicas convencionais de biologia celular, cultura celular, biologia molecular, biologia transgênica, microbiologia, DNA recombinante, e imunologia, que estão dentro da habilidade da técnica. Tais técnicas são explicadas completamente na literatura. Ver, por exemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual,

Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleoside Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. HigGlns eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Harries & S. J. HigGlns eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson and M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., New York), specifically, Vols.154 and 155 (Wu et al. eds.) and Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); and Manipulating the mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986).

Em adição às características precedentes, a invenção adicionalmente compreende características que irão surgir a partir das descrições que se seguem, as quais referem-se a exemplos que ilustram as variantes de meganuclease I-Crel e seus usos de acordo com a invenção, bem como aos desenhos em anexo nos quais:

- figura 1 ilustra a estrutura modular de endonucleases residentes e abordagem de combinação para projetar meganucleases customizadas. Uma estrutura tridimensional. **A.** da endonuclease residente I-Crel ligada a seu alvo de DNA. O núcleo catalítico é cercado por duas dobraduras $\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$ formando uma interface de interação em formato de sela acima da abertura maior de DNA. **B.** Diferentes sequências de ligação a partir da sequência alvo de I-Crel (direita superior e esquerda inferior) podem ser combinadas para obter heterodímeros ou moléculas de fusão de cadeia simples clivando alvos não-palindrômicos (direita inferior). **C.** A identificação de subunidades independentes menores, isto é, uma subunidade dentro de um único monômero ou dobradura $\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$ (direita superior e esquerda inferior)

poderia permitir o projeto de novas moléculas quiméricas (direita inferior), por combinação de mutações dentro do mesmo monômero. Tais moléculas das duas etapas de formador permitiriam uma abordagem de combinação maior, envolvendo quatro diferentes subdomínios. Em uma primeira etapa, pares de novas meganucleases poderiam ser combinadas em novas moléculas ("meia meganuclease") clivando alvos palindrômicos derivados a partir de um que quer clivar. Em seguida a combinação de tal "meia meganuclease" pode resultar em uma espécie heterodimérica clivando o alvo de interesse. Assim a identificação de um número pequeno de clivadores para cada subdomínio permitiria o projeto de um número muito maior de novas endonucleases com especificidades personalizadas.

- figura 2 representa o gene Hipoxantina-Guanina Fosforribosil Transferase e o mRNA correspondente. Os éxons são encaixotados e o tamanho de cada éxon no gene de camundongo (número de acesso NC 000086) é indicado; diferenças no tamanho com o gene humano (NC 000023) são também indicadas. Os sítios de clivagem (SEQ ID NO: 1 a 14) das variantes I-Crel são indicados acima dos éxons. O mRNA HPRT Criteculus sp. (número de acesso J00060.1; SEQ ID NO: 15) é representado abaixo do gene. O ORF é indicado como uma caixa cinza. O sítio alvo HprCH3 é indicado com sua sequência (SEQ ID NO: 4) e posição.

- figura 3 ilustra quatro diferentes estratégias para a utilização de uma meganuclease clivando o gene Hipoxantina-Guanina Fosforribosil Transferase (HPRT). **A.** inserção do gene e/ou inativação do gene. Na clivagem por uma meganuclease e recombinação com uma matriz de reparo contendo um gene de interesse (inserção de gene) ou um cassete de inativação (inativação de gene), flaqueado por sequências que compartilham homologia com as sequências em volta do sítio de clivagem, a inserção de gene ou inativação de gene ocorre. **B.** Inativação de gene por junção de extremidade não-homóloga. Na clivagem por uma meganuclease, as extremidades de DNA são degradadas e rejuntadas por Junção de Extremidade Não-homóloga (NHEJ), e inativação de gene ocorre. **C.** Correção de gene. Uma mutação ocorre dentro do gene HPRT. Na clivagem por uma meganuclease e recom-

binação com uma matriz de reparo a mutação prejudicial é corrigida. **D.** Knock-in de sequências exônicas. Uma mutação ocorre dentro do gene *H-PRT*. A transcrição do mRNA mutado é caracterizada abaixo do gene. Na matriz de reparo, éxons localizados a jusante do sítio de clivagem são fundidos no quadro (como em um cDNA), com um sítio de polipeptídeo para parar transcrição no 3'. Sequências de íntrons e éxons podem ser usadas como regiões homólogas. Knock-in de sequências exônicas resulta em um gene construído, transcrito para um mRNA capaz de codificar para uma proteína funcional.

10 - figura 4 representa a sequência de nucleotídeo que codifica a proteína suspensa e as sequências dos iniciadores degenerados usados para a construção de bibliotecas Ulib4 e Ulib5. **A.** A suspensão (SEQ ID NO: 111) é o ORF *I-Crel* incluindo a substituição de códon D75N, a inserção de um códon de alanina (A) após o códon de iniciação ATG e três códons adicionais (AAD) na extremidade 3'. **B.** Iniciadores (SEQ ID NO: 112, 113, 114),

15 - figura 5 ilustra exemplos de padrões e os números de mutantes clivando cada alvo. **A.** Exemplos de perfis. Cada nova endonuclease é perfilada em leveduras em uma série de 64 alvos palindrômicos, arranjados como na figura 5B, diferindo da sequência C1221 (SEQ ID NO: 16; figura 8B), nas posições ± 8 , ± 9 e ± 10 . Cada sequência alvo é nomeada após a trinca -10, -9, -8 (10NNN). Por exemplo, GGG corresponde ao alvo tcgggacgtcgtacgacgtccccga (SEQ ID NO: 122; figura 8B). Meganucleases são testadas 4 vezes contra os 64 alvos. Alvos clivados por *I-Crel* (D75), *I-Crel* N75 ou dez variantes derivadas são visualizadas por pontos pretos ou cinzas. **B.** Números de mutantes clivando cada alvo, e a intensidade média de clivagem. Cada sequência é nomeada após a trinca -10, -9, -8 (10NNN). O número de proteínas que clivam cada alvo é mostrado abaixo, e o nível de coloração cinza é proporcional à intensidade de sinal média obtida com esses cortadores em leveduras.

30 - figura 6 representa os padrões de clivagem das variantes *I-Crel* na posição 28, 30, 33, 38 e/ou 40. para cada uma das 141 variantes *I-Crel* obtidas após seleção, e definidas por resíduos na posição 28, 30, 33, 38, 40,

70 e 75, clivagem foi monitorada em leveduras com os 64 alvos derivados do alvo palindrômico C1221 clivado por I-Crel, por substituição dos nucleotídeos nas posições ± 8 a 10. Alvos são designados por três cartas, correspondentes aos nucleotídeos na posição -10, -9 e -8. Por exemplo, GGG corresponde ao alvo tcgggacgtcgtacgacgtcccga (SEQ ID NO: 122). Valores (encaixotados) correspondem à intensidade da clivagem, avaliada por um software apropriado após varredura do filtro, ao passo que (0) indica nenhuma clivagem.

- figura 7 representa a localização das mutações na proteína e no alvo de DNA, em um homodímero I-Crel ligado a seu alvo. Os dois conjuntos de mutações (resíduos 44, 68 e 70; resíduos 30, 33 e 38) são mostrados em preto no monômero na esquerda. Os dois conjuntos de mutações são claramente distintos espacialmente. Entretanto, não existe nenhuma evidência estrutural para subdomínios distintos. Regiões cognatas no sítio de alvo de DNA (região -5 a -3; região -10 a -8) são mostradas em cinza em uma metade do sítio.

- figura 8: definição de alvo de derivado I-Crel (A e B) e Perfil (C e D). Todos os alvos são derivados de C1221, um alvo palindrômico clivado por I-Crel tipo selvagem, e mostrado no topo de A e B. **A.** Uma primeira série de 64 alvos é derivada por mutagênese das posições ± 5 a ± 3 (em caixas cinzas). Uns poucos exemplos são mostrados abaixo. Interações com resíduos de I-Crel 44, 68 e 70 são mostradas. **B.** Uma segunda série de 64 alvos é derivada por mutagênese das posições ± 10 a ± 8 (in em caixas cinzas). Uns poucos exemplos são mostrados abaixo. Posições ± 8 , ± 9 e ± 10 não são contactadas por resíduos 44, 68 e 70. **C.** Organização dos alvos como na Figura 8D. Para os painéis esquerdos, as três cartas na tabela indicam as bases nas posições -5, -4, -3 (por exemplo, GGG significa tcaaaacggggtaccccggttttga (SEQ ID NO: 115)). Para os painéis direitos, as três cartas indicam as bases nas posições -10, -9, -8 (por exemplo, GGG significa tcgggacgtcgtacgacgtcccga (SEQ ID NO: 122)). **D.** Perfil. Dez variantes I-Crel clivando o alvo C1221, incluindo I-Crel N75 (QRR) são perfiladas com dois conjuntos de 64 alvos (± 5 a ± 3 na esquerda, e ± 10 a ± 8 na direita). Alvos

são dispostos como na Figura 8C. O alvo C1221 (quadriculado) é encontrado em ambos os conjuntos. Mutantes são identificados por três cartas correspondentes aos resíduos encontrados na posição 44, 68 e 70 (exemplo: QRR é Q44, R68, R70), e todos eles têm uma mutação D75N adicional.

5 - figura 9 representa a localização das mutações na proteína e no alvo de DNA, em um homodímero I-Crel ligado ao seu alvo. Os dois conjuntos de mutações (resíduos 44, 68 e 70; resíduos 28, 30, 33, 38 e 40) são mostrados em preto no monômero na esquerda. Os dois conjuntos de mutação são claramente distintos espacialmente. Entretanto, não existe nenhuma
10 evidência estrutural para subdomínios distintos. Regiões cognatas no sítio de alvo de DNA (região -5 a -3; região -10 a -8) são mostradas em cinza em uma metade do sítio.

 - figura 10 representa a série HprCH3 de alvos e derivados fechados. 10GAG_P, 10CAT_P e 5CTT_P (SEQ ID NO: 17 a 19) são deriva-
15 dos fechados encontrados para serem clivados por mutantes I-Crel. Eles diferem de C1221 (SEQ ID NO: 16) por motivos encaixotados. C1221, 10GAG_P, 10CAT_P e 5CTT_P foram primeiro descritos como sequências 24 bp, mas dados estruturais sugerem que apenas as 22 bp sejam relevantes para proteína/interação de DNA. Entretanto, posições ± 12 são indicadas
20 entre parênteses. No alvo HprCH3.2 (SEQ ID NO: 20), a sequência atga no meio do alvo é recolocada com gtac, as bases encontradas em C1221. HprCH3.3 (SEQ ID NO: 21) é a sequência palindrômica derivada da parte esquerda de HprCH3.2, e HprCH3.4 (SEQ ID NO: 22) é a sequência palindrômica derivada da parte direita de HprCH3.2. Como mostrado na figura, os
25 botivos encaixotados de 10GAG_P, 10CAT_P e 5CTT_P são encontrados na série HprCH3 dos alvos.

 - figura 11 ilustra a clivagem de HprCH3.3 por mutantes 10NNN_P. A figura exhibe um exemplo de seleção primária de I-Crel com o
30 alvo HprCH3.3. Clones positivos são encaixotados. As sequências de mutantes positivos na posição G1, H6 e H7 são KNDTQS/QRRDI (SEQ ID NO: 24), KNT PQS/QRRDI (SEQ ID NO: 44) e KNTTQS/QRRDI (SEQ ID NO: 45), respectivamente (mesma nomenclatura como para a tabela III).

- figura 12 ilustra a clivagem de HprCH3.4 por mutantes combinatórios. A figura exibe um exemplo de seleção primária de mutantes combinatórios I-Crel com o alvo HprCH3.4. As sequências de mutantes positivos na posição A9 e B1 são KNTHQS/RYSND (SEQ ID NO: 54) e KNSYQS/RYSNI (SEQ ID NO: 60), respectivamente (mesma nomenclatura como para a tabela IV).

- figura 13 ilustra clivagem de HprCH3.2 r HprCH3 por mutantes combinatórios heterodiméricos. **A.** Seleção secundária de combinações de mutantes I-Crel com o alvo HprCH3.2. **B.** Seleção secundária das mesmas combinações de mutantes I-Crel com o alvo HprCH3.

- figura 14 ilustra a clivagem do alvo HprCH3. Um série de mutantes I-Crel reduzindo HprCH3.4 foram otimizados e co-expressos com um mutante HprCH3.3. A clivagem é testada com o alvo HprCH3. Mutantes exibindo clivagem melhorada de HprCH3 são circulados. No filtro mostrado, C9 corresponde ao heterodímero 28R, 32S, 33S, 38Y, 40Q, 44R, 68, 70S, 75N, 77N (SEQ ID NO: 65) + 33H (SEQ ID NO: 32), E6 corresponde ao 28R, 32S33S, 38Y, 40Q, 44R, 68A, 70S, 75H, 77Y (SEQ ID NO: 66) + 33H (SEQ ID NO: 32) e F3 corresponde ao 28K, 32T, 33H, 38Q, 40S, 44K, 68Y, 70S, 75D, 77R, 92R, 96R, 107R, 132V, 140A, 143A (SEQ ID NO:74) + 33H (SEQ ID NO: 32). H11 é o heterodímero original (um mutante clivando HprCH3.4, KSSQQS/RYSND (SEQ ID NO:53), co-expresso com um mutante clivando HprCH3.3, KNSHQS/QRRDI, (SEQ ID NO: 32). H12 é um controle positivo.

- figura 15 ilustra a clivagem do alvo HprCH3. Uma série de mutantes I-Crel reduzindo HprCH3.3 foram otimizados e expressos com um mutante reduzindo HprCH3.4. A clivagem é testada com o alvo HprCH3. Mutantes exibindo clivagem eficientes de HprCH3 são circulados. No primeiro filtro, B10 corresponde ao heterodímero 33H, 71R, 103I, 129A e 130G (SEQ ID NO: 80) + 33T, 38Y, 44K, 68Y, 70S, 75E, e 77V (SEQ ID NO: 56). No segundo filtro, H3 corresponde ao heterodímero 2I, 33H, 81V, 86I, 110G, 131R, 135Q, 151A e 157V (SEQ ID NO:79) + 33T, 38Y, 44K, 68Y, 70S, 75E e 77V (SEQ ID NO: 56). H12 é um controle positivo.

- figura 16 representa o mapa do vetor pCLS1055.

- figura 17 representa o mapa do vetor pCLS0542.

- figura 18 representa o mapa do vetor pCLSI 107.

- figura 19 ilustra as sequências de alvo de DNA que são apresentadas no gene HPRT *Citriculus griseus* e a variante I-Crel correspondente que são capazes de clivar o alvo de DNA. O alvo de DNA é apresentado (coluna 3), com seu primeiro nucleosídeo (início, coluna 1) e último nucleosídeo (final, coluna 2); as posições são indicadas relativamente para a sequência de mRNA HPRT (número de acesso J00060.1). A sequência de cada variante heterodimérica é definida pelos resíduos de aminoácido nas posições indicadas no primeiro monômero (coluna 4) e do segundo monômero (coluna 5). Por exemplo, a primeira variante heterodimérica da figura 19 consiste em um primeiro monômero tendo K, Q, D, Y, Q, S, N, K, S, R e T nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40, 44, 68, 70, 75 e 77, respectivamente e um segundo monômero tendo K, N, S, G, C, S, Q, R, R, N e I nas posições 28, 30, 32, 38, 40, 44, 68, 70, 75 e 77, respectivamente. As posições são indicadas pela referência à sequência I-Crel SWISSPROT P05725 ou código de acesso pdb 1g9y; I-Crel tem K, N, S, Y, Q, S, Q, R, R, D, I, nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40, 44, 68, 70, 75 e 77, respectivamente. As posições que não são indicadas não são mutadas e assim correspondem à sequência I-Crel tipo selvagem.

- figura 20 ilustra um projeto de sistema de relatório em células de mamífero. O gene de resistência à puromicina, interrompido por sítio de clivagem I-SceI 132 bp a jusante do códon de início, está sob o controle do promotor EFl α (1). O transgene foi estavelmente expresso em células CHO-K1 em cópia única. A fim de introduzir sítios alvo de meganuclease no mesmo contexto cromossômico, a matriz de reparo é composta de i) um gene de resistência à higromicina sem promotor, ii) um cassete de expressão lacZ completo e iii) dois braços de sequências homólogas (1.1 kb e 2.3 kb). Muitas matrizes de reparo têm sido construídas diferindo apenas pelo sítio de reconhecimento que interrompe o gene lacZ (2). Assim, muitas linhagens celulares similares têm sido produzidas como linhagem celular A1, linhagem celular I-SceI e linhagem celular I-Crel. Um gene lacZ funcional é restaurado

quando a matriz de reparo lacZ (2kb em comprimento) é co-transfectadas com vetores expressando meganuclease clivando o sítio de reconhecimento (3). O nível de recombinação induzida por meganuclease pode ser inferida a partir do número de colônias azuis ou foco após transfecção.

5 - figura 21 representa o mapa de pCLS1088, um plasmídeo para a expressão de I-Crel N75 em células de mamífero.

- figura 22 ilustra a eficiência de meganucleases clivando a sequência de alvo de DNA HprCH3. A frequência de reparo do gene LacZ gene é detectada após transfecção de células CHO contendo um sistema de relatório cromossomal HprCH3, com uma matriz de reparo e várias quantidades de vetores de expressão de meganuclease, codificando para os heterodímeros construídos iniciais (HprCH3.3/HprCH3.4) ou seus derivados de G19S (HprCH3.3/HprCh3.4 G19S ou HprCH3.3 G19S/HprCh3.4).

Exemplo 1: Endonucleases funcionais com nova especificidade no que se refere a nucleotídeos ± 8 a ± 10 (10NNN).

O método para produzir variantes de meganuclease e os ensaios com base em recombinação induzida por clivagem em células de mamífero ou levedura, que são usadas para variantes de seleção com especificidade alterada são descritos no Pedido PCT Internacional WO 2004/067736; Epinat et al, Nucleic acids Res., 2003, 31, 2952-2962; Chames et al, Nucleic acids Res., 2005, 33, el 78, e Arnould et al., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458. Esses ensaios resultam em um gene de relatório LacZ funcional que pode ser monitorado por métodos padrão.

A) Materiais e métodos

25 a) Construção de bibliotecas mutantes

Quadros de leitura abertos I-Crel wt (I-Crel D75), I-Crel D75N (I-Crel N75) e I-Crel S70 N75 foram sintetizados, como descrito anteriormente (Epinat et al, N.A.R., 2003, 31, 2952-2962). Bibliotecas de combinação foram derivadas das suspensões I-Crel N75, I-Crel D75 e I-Crel S70 N75, recolocando combinações diferentes de resíduos, potencialmente envolvidos nas interações com as bases nas posições ± 8 a 10 de uma metade de sítio alvo de DNA (Q26, K28, N30, S32, Y33, Q38 e S40). A diversidade das bibliote-

cas de meganuclease foi gerada por PCR usando iniciadores degenerados abrigando um códon degenerado exclusivo em cada uma das posições selecionadas.

Mutação D75N foi introduzida recolocando o códon 75 com aac.

- 5 Em seguida, os três códons nas posições N30, Y33 e Q38 (Ulib4 library) ou K28, N30 e Q38 (biblioteca Ulib5) foram recolocados por um códon degenerado VVK (18 códons) codificando para 12 aminoácidos diferentes: A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T). Em consequência, a diversidade máxima (teórica) dessas bibliotecas de proteína 12^3 ou 1728. Entretanto, em termos de ácidos
10 nucleicos, a diversidade foi de 18^3 ou 5832.

- Em Lib4, ordenada de BIOMETHODES, uma arginina na posição 70 da suspensão I-Crel N75 foi primeiro recolocada com uma serina (R70S). Em seguida, as posições 28, 33, 38 e 40 foram aleatorizadas. Os aminoácidos regulares (K28, Y33, Q38 e S40) foram reclocados com um fora
15 dos 10 aminoácidos (A, D, E, K, N, Q, R, S, T, Y). A biblioteca resultante foi uma complexidade teórica de 10000 em termos de proteína.

- Em adição, bibliotecas pequenas de complexidade $225 (15^2)$ resultantes da aleatorização apenas de duas posições foram construídas em uma suspensão I-Crel N75 ou I-Crel D75, usando códon degenerado NVK
20 (24 códons, aminoácidos ACDEGHKNPQRSTWY).

- Fragmentos portando combinações das mutações desejadas foram obtidos por PCR, usando um par de iniciadores degenerados que codificam para 10, 12 ou 15 aminoácidos diferentes, e como modelo de DNA, o I-Crel N75 (Figura 4A), I-Crel D75 ou I-Crel S70 N75 abrem quadros de leitura (ORF). Por exemplo, a figura 4B ilustra os dois pares de iniciadores (Ulib456for e Ulib4rev; Ulib456for e Ulib5rev) usados para gerar as bibliotecas Ulib4 e Ulib5, respectivamente. Os produtos PCR correspondentes foram clonados de volta no I-Crel N75, I-Crel D75 ou I-Crel S70 N75 ORF, no vetor de expressão replicativo de levedura pCLS0542 (Epinat et al, pré-citado; figura 17), portando um gene marcador LEU2 auxotrófico. Neste vetor replicativo baseado em 2 microns, as variantes I-Crel estão sob o controle de um
30 promotor induzível por galactose.

b) Construção de clones alvos

Os 64 alvos palindrômicos derivados de C1221 foram construídos como descrito a seguir: 64 pares de oligonucleotídeos ggcatacaag ttcnnnacgtcgtagcagctnnngacaatcgctc tgtca (SEQ ID NO: 109) e sequências complementares reversas foram ordenadas de Sigma, enrijecidas e fechadas em pGEM- T Easy (PROMEGA) nas mesma orientação. Depois, um fragmento 400 bp PvuII foi excisado e clonado no vetor de levedura pFL39-ADH-LACURAZ, também chamado pCLS0042, descrito anteriormente (Epinat et al, pré-citado), resultando em 64 vetores de levedura de relatórios (plasmídeos alvos).

c) Cepas de Levedura

As três bibliotecas de variantes de expressão de foram transformadas na cepa de levedura haploide mutante leu2 mutant FYC2-6A: MAT α , trp1 Δ 63, leu2 Δ 1, his3 Δ 200. Uma química clássica/protocolo de choque de aquecimento que rotineiramente dá 10⁶ transformantes independentes por μ g de DNA derivados de (Gietz and Woods, Methods Enzymol., 2002, 350, 87-96), foi usada para transformação. Clones transformantes de indivíduo (Leu⁺) foram individualmente colocados em microplacas de 96 cavidades. Os 64 plasmídeos alvo foram transformados usando o mesmo protocolo padrão, na cepa de levedura haploide FYBL2-7B: MAT α , ura3 Δ 851, trp1 Δ 63, leu2 Δ 1, lys2 Δ 202, resultando em 64 cepas de teste.

d) Cruzamento de clones de expressão de meganuclease e seleção em leveduras.

Clones de expressão de meganuclease foram cruzados com cada uma das 64 cepas alvo, e diploides foram testados para atividade beta-galactosidase, usando o ensaio de seleção anteriormente descrito no Pedido PCT Internacional WO 2004/067736; Epinat et al, Nucleic Acids Res., 2003, 31, 2952-2962; Chames et al., Nucleic Acids Res., 2005, 33, el 78, e Arnould et al., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443- 458. Os clones de variante I-Crel bem como cepas de relatório de evedura foram estocadas em glicerol (20%) e replicadas em novas microplacas. O cruzamento foi realizado usando uma grelha de colônia (QpixII, GENETIX). Os mutantes foram grelhados em filtros

de náilon cobrindo as placas YPD, usando uma alta densidade (cerca de 20 pontos/cm²). Um segundo processo de grelha foi realizado usando os mesmos filtros para pontear uma segunda camada consistindo em 64 cepas de levedura de abrigo de relatório para cada variante. As membranas foram colocadas em meio rico em YEPD de agarose sólida, e incubadas a 30°C por uma noite, para permitir cruzamento. A seguir, os filtros foram transferidos para um meio sintético, faltando leucina e triptofano, com galactose (1%) como uma fonte de carbono (e com G418 para experimentos de co-expressão), e incubados por cinco dias a 37°C, para selecionar diploides portando os vetores de expressão e alvo. Depois de 5 dias, os filtros foram colocados em um meio de agarose sólido com 0,02% X-Gal em tampão de fosfato de sódio a 0,5 M, pH 7,0, 0,1% SDS, 6% de dimetil formamida (DMF), 7 mM β-mercaptoetanol, 1% agarose, e incubados a 37°C, para monitorar atividade β-galactosidase. Após dois dias de incubação, clones positivos foram identificados por varreduras e a atividade β-galactosidase dos clones foi quantificada usando um software apropriado.

Os clones mostrando uma atividade contra pelo menos um alvo foram isolados (primeira peneiração) e cada clone positivo foi testado contra as 64 cepas de relatório em quadruplicatas, desse modo, criando perfis completos (peneiração secundária).

c) Sequência

O quadro de leitura aberto (ORF) de clones positivos identificados durante a primeira e/ou segunda seleção na levedura foi amplificado por PCR sobre colônias de levedura usando iniciadores: PCR-Gal10-F (gcaacttagtgctgacacatacagg, SEQ ID NO: 48) e PCR-Gal10-R (acaaccttgattgcagacttgacc, SEQ ID NO: 49) de PROLIGO. Brevemente, colônia de levedura foi separada e ressuspensa em 100 µl de meio líquido LGlu e cultivadas durante a noite. Após centrifugação, pélete de levedura é ressuspensa em 10 µl de água estéril e usado para realizar reação PCR em um volume final de 50 µl contendo 1,5 µl de cada um dos iniciadores específicos (100 pmol/µl). As condições PCR foram um ciclo de desnaturação por 10 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturação por 30s a 94°C, enrijecimento ou 1 min a 55°C,

extensão por 1,5 min a 72°C, e uma extensão final por 5 min. O sequenciamento foi realizado diretamente sobre o produto PCR por MILLEGEN.

d) Análise de estrutura

5 Todas as análises de estrutura de proteína foram realizadas usando Pymol. As estruturas do I-Crel correspondem a entrada pdb Ig9y. Os números de resíduos no teste sempre se referem a essas estruturas, exceto para resíduos no segundo domínio de proteína I-Crel do homodímero onde números de resíduo foram estabelecidos como para o primeiro domínio.

B) Resultados

10 I-Crel é uma endonuclease residente dimérica que cliva alvo pseudo-palindrômio a 22 bp. A análise da estrutura I-Crel ligada a seu alvo natural tem mostrado que em cada monômero, oito resíduos estabelecem interações diretas com sete bases (Jurica et al., 1998, pré-citado). De acordo com esses dados estruturais, as bases dos nucleotídeos nas posições ± 8 a
15 10 estabelecem contato direto com aminoácido I-Crel N30, Y33, Q38 e contatos indiretos com aminoácido I-Crel K28 e S40. Assim, novas proteínas com mutações nas posições 30, 33 e 38 poderiam exibir novos perfis de clivagem com os 64 alvos resultantes das substituições nas posições ± 8 , ± 9 e ± 10 de um alvo palindrômico clivado por I-Crel (10NNN alvo). Em adição,
20 mutações podem alterar o número e posições dos resíduos envolvidos em contato direto com as bases de DNA. Mais especificamente, outras posições que não 30, 33, 38, mas localizadas na vizinhança próxima nas proteínas dobradas, poderiam envolver a interação com os mesmos pares de base.

25 Uma abordagem de biblioteca de proteína exaustiva vs. biblioteca alvo foi submetida a engenharia local desta parte da interface de ligação de DNA. Aleatorização de posições de 5 levaria a uma diversidade teórica de $20^5 = 3,2 \times 10^6$. Entretanto, bibliotecas com baixa diversidade foram geradas por aleatorização de 2, 3 ou 4 resíduos de uma vez, resultando em uma diversidade de 225 (15^2), 1728 (12^3) ou 10,000 (10^4). Esta estratégia permitiu uma seleção exaustiva de cada uma dessas bibliotecas contra 64 alvos
30 de DNA 10NNN palindrômicos usando um ensaio baseado em levedura descrito anteriormente (Epinat et al, 2003, pré-citado e Pedido PCT Interna-

cional WO 2004/067736).

Primeiro, a suspensão I-Crel foi mutada a partir de D75 a N. A mutação D75N não afetou a estrutura da proteína, mas diminuiu a toxicidade de I-Crel em experimentos de sobre-expressão.

5 A seguir, a biblioteca Ulib4 foi construída: resíduos 30, 33 e 38, foram aleatorizados, e os aminoácidos regulares (N30, Y33, e Q38) recolocados com um foram dos 12 aminoácidos (A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T). A biblioteca resultante teve uma complexidade de 1728 em termos de proteína (5832 em termos de ácidos nucleicos).

10 Em seguida, duas outras bibliotecas foram construídas: Ulib5 e Lib4. Em Ulib5, os resíduos 28, 30 e 38, foram aleatorizados, e os aminoácidos regulares (K28, N30, e Q38) recolocados com um foram dos 12 aminoácidos (ADEGHKNPQRST). A biblioteca resultante teve uma complexidade de 1728 em termos de proteína (5832 em termos de ácidos nucleicos). Em
15 Lib4, uma arginina na posição 70 foi primeiro recolocada com uma serina. Em seguida, as posições 28, 33, 38 e 40 foram aleatorizadas, e os aminoácidos regulares (K28, Y33, Q38 e S40) recolocados com um dos 10 aminoácidos (A, D, E, K, N, Q, R, S, T, Y). A biblioteca resultante teve uma complexidade de 10000 em termos de proteína.

20 Em um experimento de seleção primário, 20000 clones de Ulib4, 10000 clones de Ulib5 e 20000 clones de Lib4 foram cruzados com cada uma das 64 cepas de teste, e diploides foram testados para atividade beta-galactosidase. Todos os clones exibindo a atividade de clivagem com pelo menos um fora dos 64 alvos foram testados em uma segunda etapa de seleção
25 com os 64 alvos, em quadruplicatas, e cada perfil de clivagem foi estabelecido, como mostrado na figura 5. Em seguida, ORFs de meganuclease foram ampliados a partir de cada cepa por PCR, e sequenciados.

30 Após seleção e sequenciamento secundários de positivos sobre a região de codificação inteira, um total de 1484 mutantes exclusivos foram isolados mostrando uma atividade de clivagem contra pelo menos um alvo. Diferentes padrões poderiam ser observados. A figura 6 ilustra 37 novos alvos clivados por uma coleta de 141 variantes, incluindo 34 alvos que não

são clivados por I-Crel e 3 alvos que são clivados por I-Crel (aag, aat e aac). Doze exemplos de perfis, incluindo I-Crel N75 e I-Crel D75 são mostrados na Figura 5A. Alguns desses novos perfis compartilharam alguma similaridade com a suspensão tipo selvagem ao passo que muitos outros foram total-
 5 mente diferentes. Endonucleases residentes podem comumente acomodar alguma degeneração em suas sequências alvo, e proteínas I-Crel e I-Crel N75 por si só clivam uma série de dezesseis e três alvos, respectivamente. A degeneração de clivagem foi encontrada por muitas das novas endonucle-
 ases, com uma média de 9.9 alvos clivados por mutante (desvio padrão: 11).
 10 Entretanto, entre os 1484 mutantes identificados, 219 (15%) foram encontra- dos para clivar apenas um alvo de DNA, 179 (12%) clivam dois, e 169 (11%) e 120 (8%) foram capazes de clivar 3 e 4 alvos, respectivamente. Assim, independente de seu alvo preferido, um número significativo de derivados de I-Crel exibe um nível de especificidade que é similar se não maior do que
 15 aquele do mutante I-Crel N75 (três sequências alvo 10NNN clivadas), ou I-Crel (dezesseis sequências alvo 10NNN clivadas). Também, a maioria dos mutantes isolados para especificidade alterada para sequências 10NNN não mais cliva a sequência alvo C1221 original (61% e 59%, respectivamente).

No geral, esta ampla coleta de mutantes permitiu o alvo de todas
 20 as 64 sequências de DNA possíveis nas posições ± 10 , ± 9 , e ± 8 (Figura 5B). Entretanto, existiu uma grande variação nos números de mutantes que cli- vavam cada alvo (Figura 5B), esses números variam de 3 a 936, com uma mé- dia de 228,5 (desvio padrão: 201,5). A clivagem foi frequentemente observa- da por alvos com uma guanina em ± 8 ou uma adenina em ± 9 , ao passo que
 25 uma citosina e ± 10 ou ± 8 foi correlacionada, com baixos números de clivado- res. Em adição, todos os alvos não foram clivados com a mesma eficiência. Uma vez que variações significantes poderiam ser observadas por um mes- mo alvo, dependendo do mutante (comparar eficiências de clivagem para um alvo 10AAA tipo selvagem na figura 5B, porexemplo), uma eficiência de cli-
 30 vagem média foi medida por cada alvo como anteriormente relatado (Ar- nould et al, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458). Essas eficiências médias são representadas por níveis de escala cinza na figura 5B. A análise dos resulta-

dos mostra uma clara correlação entre esta eficiência média e os números de clivadores, com mais alvo mais frequentemente cortado sendo também mais eficientemente cortado (comparar, por exemplo, alvos 10TCN, 10CTN e 10CCN com 10GAN, 10AAN e 10TAN na Figura 5B).

- 5 Assim, milhares de novas variantes foram obtidas, incluindo mutantes com nova especificidade de substrato; essas variantes podem manter altos níveis de atividade e a especificidade das novas proteínas pode ser ainda mais limitada do que a proteína tipo selvagem para seu alvo.

10 **Exemplo 2: Dois subdomínios funcionais I-Crel podem se comportar de forma independente em termos de ligação de DNA.**

- Este exemplo mostra que um alvo I-Crel pode ser separado em duas partes, ligadas por diferentes subdomínios, se comportando de forma independente. No alvo de DNA I-Crel, as posições ± 5 , ± 4 e ± 3 são ligadas por resíduos 44, 68 e 70. Muitas variantes I-Crel, mutadas nas posições 44, 15 68, 70 e 75, obtidas como descrito no exemplo 1, foram mostradas para exibir uma atividade detectável em C1221, um alvo palindrômico clivado por I-Crel tipo selvagem (Chevalier, et al, 2003), mas foram clivando outros alvos com várias eficácias. Na parte externa do sítio de ligação, as posições ± 9 e ± 8 são contactadas pelos resíduos 30, 33 e 38. Como mostrado na figura 7, 20 os dois conjuntos de resíduos estão em partes distintas das proteínas ± 8 . Se as posições ± 5 a ± 3 e ± 10 a ± 8 forem ligadas por dois subdomínios funcionais, independentes, diferentes, a engenharia de um subdomínio não deveria impactar nas propriedades de ligação do outro domínio.

- A fim de determinar se as posições ± 5 a ± 3 e ± 9 a ± 8 são ligadas por dois subdomínios funcionais, independentes, diferentes, mutantes 25 com especificidade alterada na região ± 5 a ± 3 , mas ainda ligando C1221, foram ensaiados por suas propriedades de clivagem na região ± 10 a ± 8 .

A) Material e Métodos

a) Análise de estrutura

- 30 O procedimento experimental como no exemplo 1.

b) Variante I-Crel expressando cepa de levedura

mutantes foram gerados como descrito no exemplo 1, mutando

as posições 44, 68, 70 e 75, e selecionando clones capazes de clivar C1221 alvos derivados. Mutantes expressando plasmídeos são transformados em cepa *S. cerevisiae* FYC2-6A (MAT α , trp1 Δ 63, leu2 Δ 1, his3 Δ 200).

c) Construção do clone alvo

5 Os 64 plasmídeos alvo palindrômicos derivados de C1221 por mutação em ± 5 a ± 3 foram construídos como descrito no exemplo 1, usando 64 pares de oligonucleotídeos (ggcatacaagtttcaaaacn nngtacnnngtttgacatcgtctgtca (SEQ ID NO : 110) e sequências complementares reversas). Os 64 plasmídeos alvo foram transformados usando o protocolo descrito no exemplo 1, na cepa de levedura haploide FYBL2-7B: MAT α , ura3 Δ 851, trp1 Δ 63, leu2 Δ 1, lys2 Δ 202, resultando em 64 cepas de teste.

d) Cruzamento de meganuclease expressando clones e seleção em leveduras

15 O cruzamento foi realizado como descrito no exemplo 1, usando uma baixa densidade de grelha (cerca de 4 pontos/cm²).

B) Resultados

64 alvos correspondendo a todos os alvos palindrômicos derivados de C1221 foram construídos por mutagenese de bases ± 10 a ± 8 , como mostrado na figura 8B. O perfil de clivagem I-CreI N75 foi estabelecido, mostrando um forte sinal com alvos aaa e aat, e um mais fraco com um alvo aag.

20 Como mostrado na figura 8C, as proteínas com perfil de clivagem claramente diferente em ± 5 a ± 3 , tal como QAR, QNR, TRR, NRR, ERR e DRR têm um perfil similar em ± 10 a ± 8 . A sequência aaa em ± 10 a ± 8 corresponde ao alvo C1221, e é necessariamente clivada por todas as variantes que clivam C1221. aat é clivada bem como em muitos mutantes (90 %), ao passo que aag é frequentemente não observada, provavelmente porque o sinal cai abaixo do nível de detecção em clivadores fracos. Nenhum outro alvo é clivado. Esses resultados mostram que as regiões ± 5 a ± 3 e ± 10 a ± 8 são ligadas por suas unidades de ligação amplamente independentes, diferentes.

30 **Exemplo 3: Estratégia para construir novas meganucleases clivando um alvo a partir do gene HPRT.**

A) Princípio da abordagem de combinação paraprojetar novas meganucleases com especificidade personalizadas.

O objetivo aqui é determinar se é possível combinar subdomínios funcionais separáveis na interface de ligação de DNA I-CreI, a fim de
5 clivar novos alvos DNA.

A identificação de grupos distintos de mutações na sequência de codificação I-CreI que altera a especificidade de clivagem no que se refere a duas regiões diferentes da sequência alvo C1221 (10NNN (posições - 10 a - 8 e + 8 a +10: ± 8 a 10 ou ± 10 a 8; exemplo 1) e 5NNN (posições- 5 a -3 e + 3 a +5: ± 3 a 5 a ± 5 a 3; Arnould et al., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458, Pedidos Internacionais WO 2006/097784 e WO 2006/097853) surge a possibilidade de combinar esses dois grupos de mutantes intramolecularmente para gerar um mutante combinatório capaz de clivar uma sequência alvo simultaneamente alterada nas posições 10NNN e 5NNN (Figura 1C).
10

As posições 28, 30, 33, 38 e 40 por um lado, e 44, 68 e 70, por outro lado estão na mesma dobradura de ligação de DNA, e não existe nenhuma evidência estrutural que elas deveriam se comportar de forma independente. Entretanto, os dois conjuntos de mutações estão claramente em duas regiões espacialmente distintas desta dobradura (figuras 7 e 9) localizadas ao redor de diferentes regiões do alvo de DNA. Em adição, o impacto cumulativo de uma série de mutações poderia eventualmente interromper a dobradura. Para verificar se elas são parte de duas subunidades funcionais independentes, as mutações a partir dessas duas séries de mutantes foram combinadas, e a capacidade das variantes resultantes para clivar a sequência alvo de combinação foi ensaiada (Figura 1D).
15
20
25

Portanto, uma sequência alvo não-palindrômica que seria um trabalho de quatro alvos 5NNN e 10NNN clivados, é identificada. Em adição, duas sequências alvo derivadas representando as metades esquerda e direita em forma palindrômica, são projetadas. Para gerar mutantes combinatórios I-CreI capazes de alvejar alvos palindrômicos, mutantes clivando de forma eficiente a parte 10NNN e 5NNN de cada sequência palindrômica são selecionados e suas mutações características incorporadas.
30

Por todo o texto e figuras, as sequências de mutantes de combinação são nomeadas com um código carta de onze, após resíduos nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40, 44, 68 e 70, 75 e 77. Por exemplo, KNSTYS/KYSEV que representam I-Crel K28, N30, S32, T33, Y38, S40, K44, Y68, S70, E75, e V77 (I-Crel 28K, 30N, 32S, 33T, 38Y, 40S, 44K, 68Y, 70S, 75E e 77V). Controles de origem são nomeados com um código carta de seis, após resíduos nas posições 28, 30, 32, 33, 38 e 40 ou um código carta de cinco, após resíduos nas posições 44, 68, 70, 75 e 77. Por exemplo, KNSTYS que representam I-Crel 28K, 30N, 32S, 33T, 38Y e 40S, e KYSEV que representam I-Crel 44K, 68Y, 70S, 75E e 77V.

Todas as sequências alvo descritas nesses exemplos são sequências palindrômicas de 22 ou 24 bp. Portanto, elas serão descritas apenas pelos primeiros 11 ou 12 nucleotídeos, seguidas pelo sufixo P; por exemplo, alvo 5' tcaaaacgtcgtacgacgttttga 3' (SEQ ID NO: 16) clivadas pela proteína I-Crel, serão chamadas de tcaaaacgtcgt_P.

B) Projeto de novas meganucleases clivando um alvo a partir do gene HPRT Criteculus griseus.

Esta abordagem de combinação, foi usada para construir o domínio de ligação de DNA da meganuclease I-Crel, e clivar o gene HPRT Criteculus griseus.

HprCH3 é um alvo 22 bp (não-palindrômico) (Figura 2) localizado, em Éxon 3 (posições 17 a 38) do gene HPRT Criteculus griseus (Hams-ter Chinês); a sequência alvo corresponde as posições 241 a 262 do mRNA (número de acesso J00060; SEQ ID NO: 15; Figura 2).

A meganucleases clivando HprCH3 poderia ser usada, ou para inserir um gene de interesse homólogo no Locus de HPRT, para permitir níveis de expressão de gene reduzíveis em linhagens de célula recombinante de vertebrado ou animais transgênicos, ou para inativar o gene HPRT, para permitir a seleção de linhagens de célula recombinante de vertebrado ou animais transgênicos (Figura 3A e 3B).

A sequência HprCH3 é parcialmente um trabalho dos alvos 10GAG_P, 10CAT_P e 5CTT_P (Figura 10) que são clivados por meganu-

cleases identificadas anteriormente, obtidas como descrito nos Pedidos PCT Internacionais WO 2006/097784 e WO 2006/097853; Arnould et al, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458; exemplo 1. Assim, HprCH3 poderia ser clivada por mutantes combinatórios resultando dessas meganucleases anteriormente

5 identificadas.

As sequências alvo 10GAG_P, 10CAT_P e 5CTT_P são derivados de 24 bp de C1221, uma sequência palindrômica clivada por I-Crel (Arnould et al, pré-citado). Entretanto, a estrutura de I-Crel ligada a seu alvo de DNA sugere que os dois pares de base experimentais externos desses alvos

10 (posições -12 e 12) não tenham nenhum impacto sobre a ligação e a clivagem (Chevalier et al, Nat. Struct. Biol., 2001, 8, 312-316; Chevalier and Stoddard, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3774; Chevalier et al, J. Mol. Biol., 2003, 329, 253-269), e neste estudo, apenas as posições -11 a 11 foram consideradas. Consequentemente, a série de alvos HprCH3 foi definida

15 como sequências de 22 bp em vez de 24 bp. HprCH3 difere de C1221 na região central de 4 bp. De acordo com a estrutura da proteína I-Crel ligada a seuq alvo, não existe nenhum contato entre os pares de base centrais (posições -2 a 2) e a proteína I-Crel (Chevalier et al, Nat. Struct. Biol., 2001, 8, 312-316; Chevalier and Stoddard, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3774;

20 Chevalier et al, J. Mol. Biol., 2003, 329, 253-269). Assim, as bases nessas posições não deveriam impactar na eficiência de ligação. Entretanto, elas poderiam afetar a clivagem, que resulta de dois cortes na borda desta região. Assim, a sequência atga em -2 a 2 foi primeiro substituída com a sequência gtac a partir de C1221, resultando no alvo HprCH3.2 (Figura 10).

25 Em seguida, dois alvos palindrômicos, HprCH3.3 e HprCH3.4, foram derivados de HprCH3.2 (Figura 10). Uma vez que HprCH3.3 e HprCH3.4 são palindrômicos, eles poderiam ser clivados por proteínas homodiméricas. Assim, proteínas são capazes de clivas as sequências HprCH3.3 e HprCH3.4 como homodímeros foram primeiro designados (exemplos 4 e 5) e em seguida co-

30 expressos para obter heterodímeros clivando HprCH3 (exemplo 6). Heterodímeros que clivam os alvos HprCH3.2 e HprCH3 poderiam ser identificados. A fim de melhorar a atividade de clivagem para o alvo HprCH3, uma

série de mutantes que clivam HprCH3.3 e HprCH3.4 foi escolhida, e em seguida refinada. Os mutantes escolhidos foram aleatoriamente mutagenizados, e usados para formar novos heterodímeros que foram peneirados contra o alvo HprCH3 (exemplos 7 e 8). Heterodímeros poderiam ser identifi-

5 dos com uma atividade de clivagem melhorada para o alvo HprCH3.

Exemplo 4: Identificação de meganucleases clivando HprCH3.3

Neste exemplo, mostra que mutantes I-Crel podem cortar a sequência alvo de DNA HprCH3.3 derivada da parte esquerda do alvo HprCH3.2 em uma forma palindrômica (Figura 10). Sequências alvo descritas

10 neste exemplo são sequências palindrômicas de 22 bp. Portanto, portanto, elas serão descritas apenas pelos primeiros 11 nucleotídeos, seguidas pelo sufixo P (Por exemplo, alvo HprCH3.3 irá ser anotado cgagatgtcgt_P (SEQ ID NO: 21).

HprCH3.3 é similar à 10GAG_P em todas as posições exceto

15 ± 6 . Foi hipotetizado que posições ± 6 teriam um efeito menor sobre a ligação e a atividade de clivagem. Mutantes capazes de clivar o alvo 10GAG_P foram obtidos por mutagênese de I-Crel ou I-Crel S70 N75, nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40, como descrito no exemplo 1. Seleção desses mutantes permitiria a identificação de meganucleases que clivam o alvo HprCFB.3.

20 A) Material e Métodos

a) Construção de vetor alvo

O alvo foi clonado como segue: oligonucleosídeo correspondente à sequência alvo flanqueada por uma sequência de clonagem do tipo gateway foi ordenadaa partir de PROLIGO: 5'tggcatacaagtttcgagatgtcgtacgacatctcgacaatcgtctgtca3' (SEQ ID NO: 23). DNA alvo de duplo folamento, gerado por amplificação de PCR oligonucleosídeo de único filamento, foi clonado usando o protocolo do tipo gateway (INVITROGEN) no vetor de relatório de levedura (pCLS1055, Figura 16). Vetor de relatório de levedura foi transformado em cepa *Saccharomyces cerevisiae* FYBL2-7B (MAT α , ura

25 3 Δ 851, trp1 Δ 63, leu2 Δ 1, lys2 Δ 202), resultando em uma cepa de relatório.

30

b) Cruzamento de meganuclease expressando clones e seleção em levedura

Mutantes I-Crel clivando 10GAG_P foram anteriormente identificados, como descrito no exemplo 1. Esses mutantes estavam presentes em um plasmídeo de expressão de levedura (pCLS0542, Figura 17) na cepa *S. cerevisiae* FYC2-6A (MAT α , trp1 Δ 63, leu2 Δ 1, his3 Δ 200).

- 5 Meganuclease expressando clones foram cruzadas com a cepa de relatório e diploides foram testados para atividade beta-galactosidade, usando o ensaio de seleção como descrito no exemplo 1, usando uma baixa densidade de gralha (cerca de 4 pontos/cm²).

c) Sequenciamento de mutantes

- 10 O procedimento experimental é como descrito no exemplo 1.

B) Resultados

- Mutantes I-Crel capazes de clivar 10GAG_P foram selecionados para clivagem contra alvo de DNA HprCH3.3 (cgagatgtcgt_P; (SEQ ID NO: 21). 38 clones positivos foram encontrados, e após sequenciamento e validação por seleção secundária 24 mutantes listados na tabela III foram identifi-
- 15 cados. Exemplos de positivos são mostrados na tabela 11.

Tabela III: Mutantes I-Crel capazes de clivar o alvo de DNA HprCH3.3.

Aminoácidos nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40 /44, 68, 70, 75 e 77 dos mutantes I-Crel (ex: KNDTQS/QRRDI representam K28, N30, D32, T33, Q38, S40/Q44, R68, R70, D75 e I77)	SEQ ID NO:
KNDTQS/QRRDI	24
KNETQS/QRRDI	25
KNPAQS/QRRDI	26
KNRDQS/QRRDI	27
KNSCKS/QRRDI	28
KNSCSS/QRRDI	29
KNSCTS/QRRDI	30
KNSGAS/QRRDI	31
KNSHQS/QRRDI	32
KNSPHS/QRRDI	33
KNSPQS/QRRDI	34
KNSQQS/QRRDI	35
KNSQYS/QRRDI	36
KNSRQY/QRSNI	37
KNSSDS/QRRDI	38
KNSTGS/QRRDI	39
KNSTNS/QRRDI	40
KNSTSS/QRRDI	41

Tabela III: Continuação

KNSTTS/QRRDI	42
KNSVHS/QRRDI	43
KNTPQS/QRRDI	44
KNTTQS/QRRDI	45
KTSTNS/QRRDI	46
TNSRQR/QRSNI	47

Exemplo 5: Preparação de meganucleases clivando HprCH3.4

Este exemplo mostra que mutantes I-Crel podem clivar a sequência alvo de DNA HprCH3.4 derivada da parte direita do alvo HprCH3.2 em uma forma palindrômica (Figura 10). Todas as sequências alvo descritas neste exemplo são sequências palindrômicas de 22 bp. Portanto, elas serão descritas apenas pelos primeiros 11 nucleotídeos, seguidas pelo sufixo _P (por exemplo, HprCH3.4 será chamado de ccatctctgt P; SEQ ID NO: 22).

HprCH3.4 é similar a 5CTT_P nas posições ± 1 , ± 2 , ± 3 , ± 4 , ± 5 e ± 11 e a 10CAT_P nas posições ± 1 , ± 2 , ± 8 , ± 9 , ± 10 e ± 11 . Foi hipotetizado que nas posições ± 6 e ± 7 teriam pouco efeito sobre a ligação e a atividade de clivagem. Mutantes capazes de clivar 5CTT_P (caaaacctgt P; SEQ ID NO: 19) foram obtidos por mutagênese de I-Crel N75 nas posições 44, 68 e 70 ou I-Crel S70 nas posições 44, 68, 75 e 77, como descrito anteriormente (Pedidos PCT Internacionais WO 2006/097784 e WO 2006/097853; Arnould et al, J. Mol. Biol., 2006, 355, 443- 458). Mutantes capazes de clivar o alvo 10CAT_P (ccatcgctgt P; SEQ ID NO: 18) foram obtidos por mutagênese de I-Crel (D75), nas posições 30, 32, 33 e 38, como descrito no exemplo 1. Assim, combinar tais pares de mutantes permitiria a clivagem do alvo HprCH3.4. Portanto, para verificar se mutantes clivados poderiam clivar o alvo HprCH3.4, aminoácidos nas posições 44, 68, 70, 75 e 77 a partir de proteínas que clivam 5CTT_P foram combinados com os aminoácidos nas posições 30, 32, 33 e 38 a partir de proteínas que clivam 10CAT_P.

A) Material e Métodos**25 a) Construção do vetor alvo**

O procedimento experimental é como descrito no exemplo 4.

b) Construção de mutantes combinatórios

Mutantes I-Crel que clivam 10CAT_P ou 5CTT_P foram anteri-

ormente identificados, como descrito nos Pedidos PCT Internacionais WO 2006/097784 e WO 2006/097853; Arnould et al., J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458, e no exemplo 1. A fim de gerar sequência de codificação derivada de I-Crel contendo mutações de ambas as séries, reações de PCR de sobreposição separadas foram realizadas e amplificam a extremidade 5' (posições aa 1-43) ou a extremidade 3' (posições 39-167) da sequência de codificação de I-Crel. Para ambas as extremidades 5' e 3', amplificação de PCR é realizada usando iniciadores (Gal10F 5'-gcaactttagtgctgacacatacagg-3' (SEQ ID NO: 48) ou Gal10R 5'-acaaccttgattggagacttgacc-3' (SEQ ID NO: 49) específicos para o vetor (pCLS0542, Figura 11) e iniciadores (assF 5'-ctannnttgaccttt-3' (SEQ ID NO: 50) ou assR 5'-aaaggtcaannntag-3' (SEQ ID NO: 51), onde nnn codifica o resíduo 40. Os fragmentos de PCR resultando da reação de amplificação realizada com os mesmos iniciadores e com a mesma sequência de codificação para o resíduo 40 foram agrupados. Em seguida, cada grupo de fragmentos de PCR resultando da reação com iniciadores Gal10F e assR ou assF e Gal10R foram misturados em uma razão equimolar. Finalmente, aproximadamente 25 ng de cada grupo final dos dois fragmentos de PCR de sobreposição e 75 ng de DNA do vetor (pCLS1107, Figura 18) linearizado pela digestão com DraIII e NgoMIV foram usando para transformar a cepa *Saccharomyces cerevisiae* de levedura FYC2-6A (MAT α , trp1 Δ 63, leu2 Δ 1, his3 Δ 200) usando um protocolo de transformação LiAc de alta eficiência (Gietz and Woods, Methods Enzymol., 2002, 350, 87-96). Uma sequência de codificação intacta contendo ambos os grupos de mutações é gerada por recombinação homóloga *in vivo* em leveduras.

25 c) Cruzamento de meganuclease expressando clones e seleção em leveduras

O procedimento experimental é como descrito no exemplo 4.

d) Sequenciamento de mutantes

O procedimento experimental é como descrito no exemplo 4.

30 **B) Resultados**

Mutantes I-Crel usados neste exemplo, e cortando o alvo 10CAT_P ou o alvo 5CTT_P são listados na tabela IV. Mutantes combinados

de *I-Crel* foram construídos por associação na suspensão *I-Crel*, aminoácidos nas posições 44, 68, 70, 75 e 77 a partir de mutantes clivando o alvo 5CTT_P, com os aminoácidos nas posições 30, 32, 33 e 38 a partir dos mutantes clivando o alvo 10CAT_P (tabela IV), resultando em uma biblioteca de complexidade 480. esta biblioteca foi transformada em levedura e 1728 clones (3.6 vezes a diversidade) foram selecionados por clivagem contra o alvo de DNA HprCH3.4 (ccatctcttgt P; SEQ ID NO: 22). 10 clones positivos foram encontrados, e após sequenciamento e validação por seleção secundária 9

5

mutantes combinatórios foram encontrados (tabela IV). Os mutantes são

10

identificados por um código carta 11, correspondendo aos resíduos de aminoácido nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40, 44, 68, 70, 75 e 77. Por exemplo, KNSTYS/KYSEV representam *I-Crel* K28, N30, S32, T33, Y38, S40, K44, Y68, S70, E75, e V77 (SEQ ID NO: 56).

Entre esses nove mutantes, quatro correspondem a montagem original de 2 moléculas parentais (tabela IV; SEQ ID NO: 52 a 55), ao passo que as cinco outras exibiram combinação de não-parentais nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40 ou 44, 68, 70, 75, 77. Eses cinco mutantes são:

15

- KNSTYS/KYSEV (SEQ ID NO: 56)
- KNRDQS/KYSDR (SEQ ID NO: 57)
- 20 - KNSSDS/KYSDR (SEQ ID NO: 58)
- KNTHQS/KYSNR (SEQ ID NO: 59)
- KNSYQS/RYSNI (SEQ ID NO: 60)

Tais mutantes provavelmente resultam da recombinação entre fragmentos de PCR similares durante o processo de transformação. Exemplos de positivos são mostrados na Figura 12.

25

Tabela IV: Clivagem do alvo HprCH3.4 por mutantes teoricamente presentes na biblioteca de combinação

		Aminoácidos nas posições 28, 30, 32, 33, 38, e 40 (ex: KNRDQS representam K28, N30, R32, D33, Q38, e S40)							
		KNRDQS	KNTGQS	KNSQYS	KNSSDS	KSSQQS	KCSTQS	KNTHQS	KTSYQS
Aminoácidos nas posições 44, 68, 70, 75 e 77 (ex: GQTNI representam G44, Q68, T70, N75 e I77)	GQTNI								
	KASDK								
	KASDV								
	KASNI								
	KESDK								
	KESDR								
	KGSNI								
	KNQNI								
	KNSNI								
	KQSNR								
	KRDNI								
	KRENI								
	KRSDA								
	KRSNV								
	KRTNI								
	KSSNI								
	KSSNV								
	KTQNI								
	KTSDR								
	KTSDV								
	KTSNI								
	KYSDI								
	KYSDT								
	KYSEV								
	KYSNI								
	KYSYN								
	NHNNI								
	NQRNI								
	QASQR								
	QASYR								
	QESNR								
	QNSQR					+			
	QRSHY							+	
	QRSNI								
	QRSNK								
	QRSQR								
	QRSYR								
	RASER								
	RASNI								
	RASNN							+++	
	RESDR								

RNSDR								
RNSNN								
RQSNN								
RRSDQ								
RRSNN								
RSSER								
RTSER								
RTSNN								
RYGYI								
RYSDQ								
RYSDN					+++		+++	
RYSDR							+++	
RYSEI								
RYSER								
RYSHI								
RYSNI								
RYSNN								
RYSNQ								
RYSQY								

+ indica uma combinação funcional.

Exemplo 6: Preparação de meganucleases clivando HprCH3.2 e HprCH3

Mutantes I-Crel capazes de clivar cada um dos alvos derivados de HprCH3 palindrômicos (HprCH3.3 e HprCH3.4) foram identificados no exemplo 4 e no exemplo 5. Pares de tais mutantes (um cortando HprCH3.3 e um cortando HprCH3.4) foram co-expressos em leveduras. Na co-expressão, deveria ter três espécies moleculares ativas, dois homodímeros e um heterodímero. Foi ensaiado se os heterodímeros que deveriam ser formados, cortam o alvos HprCH3 e HprCH3.2.

10 A) Materiais e Métodos

a) Co-expressão de mutante

Os procedimentos experimentais são como descritos no Pedido PCT Internacional WO 2006/097854 e Arnould et al. J. Mol. Biol., 2006, 355, 443-458. Brevemente, DNA de levedura foi extraído a partir de mutantes que clivam o alvo HprCH3.4 usando protocolos padrão e foi usado para transformar E. coli. O DNA de plasmídeo resultante foi então usado para transformar cepas de levedura que expressam um mutante cortando o alvo HprCH3.3. Transformantes foram selecionados sobre meio -L Glu + G418.

b) Cruzamento de meganuclease co-expressando clones e seleção em leve-

dura

O procedimento experimental é como descrito no exemplo 4, exceto que uma baixa grelha (cerca de 4 pontos/cm²) foi usada.

B) Resultados:

- 5 Co-expressão de mutantes clivando as sequências HprCH3.3 e HprCH3.4 resultou em uma clivagem eficiente do alvo HprCH3.2 em muitos casos (Figura 13A). Em adição, algumas dessas combinações foram capazes de cortar o alvo natural HprCH3 que difere da sequência HprCH3.2 por 4 bp nas posições -1, -2, 1 e 2. (Figura 13B). Combinações funcionais são re-
- 10 sumidas na tabela V e na tabela VI.

Tabela V: Clivagem do alvo HprCH3.2 pelos mutantes heterodiméricos

Aminoácidos nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40 /44, 68, 70, 75 e 77 dos mutantes I-Crel clivando o alvo HprCH3.3 (ex: KN-THQS/RYSTN representam K28, N30, T32, H33, Q38, S40/R44, Y68, S70, T75 e N77)	Aminoácidos nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40 /44, 68, 70, 75 e 77 dos mutantes I-Crel clivando o alvo HprCH3.3 (ex: KNSCK/QRRDI representam K28, N30, S32, C33, K38, S40/Q44, R68, R70, D75 e I77))									
		KNSCKS/ QRRDI	KNDTQS/ QRRDI	KNSTSS/ QRRDI	KNSTTS/ QRRDI	KNTQPS/ QRRDI	KNSCSS/ QRRDI	KNTTQS/ QRRDI	KNSHQS/ QRRDI	KNSQQS/ QRRDI
	KNTHQS/ RYSN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KNSYQS/ RYSNI		+	+	+	+	+	+	+	+
	KNSTYS/ KYSEV	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KNTHQS/ KYSNR		+		+	+		+	+	+
	KNRDQS/ KYSDR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KNSSDS/ KYSDR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KNTHQS/ RASNN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KNTHQS/ RYSDR		+	+	+	+	+	+	+	+
	KSSQQS/ RYSN		+	+	+	+	+	+	+	+

+ indica uma combinação funcional. Mutantes em negrito são mutantes com mutações alternativas no exemplo 5.

Tabela VI: Clivagem do alvo HprCH3.3 pelos mutantes heterodiméricos

Aminoácidos nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40 /44, 68, 70, 75 e 77 dos mutantes I-Crel clivando o alvo HprCH3.3 (ex: KNSCKS/QRRDI representam K28, N30, S32, C33, K38, S40/Q44, R68, R70, D75 e I77)										
	KNSCKS/ QRRDI	KNDTQS/ QRRDI	KNSTSS/ QRRDI	KNSTTS/ QRRDI	KNTPOS/ QRRDI	KNSCSS/ QRRDI	KNTTQS/ QRRDI	KNSHQS/ QRRDI	KNSQQS/ QRRDI	
KNTHQS/ RYSDN								+		
KNSYQS/ RYSNI								+		
KNSTYS/ KYSEV								+		
KNTHQS/ KYSNR										
KNRDQS/ KYSDR								+		
KNSSDS/ KYSDR								+		
KNTHQS/ RASVN								+		
KNTHQS/ RYSDR								+		
KSSQQS/ RYSDN								+		

Aminoácidos nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40 /44, 68, 70, 75 e 77 dos mutantes I-Crel clivando o alvo Hpr-CH3.3 (ex: KNTHQS/RYSDN representam K28, N30, T32, H33, Q38, S40/R44, Y68, S70, D75 e N77)

+ indica uma combinação funcional

Mutantes em negrito são mutantes com mutações alternativas no exemplo 5.

Tabela VI: Clivagem do alvo HprCH3 pelos mutantes heterodiméricos

		Aminoácidos nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40 /44, 68, 70, 75 e 77 dos mutantes I-Crel clivando o alvo HprCH3.3 (ex: KNSCKS/QRRDI representam K28, N30, S32, C33, K38, S40/Q44, R68, R70, D75 e I77)									
		KNSCKS/ QRRDI	KNDTQS/ QRRDI	KNSTSS/ QRRDI	KNSTTS/ QRRDI	KNTPQS/ QRRDI	KNSCSS/ QRRDI	KNITQS/ QRRDI	KNSHQS/ QRRDI	KNSQQS/ QRRDI	
Aminoácidos nas posições 28, 30, 32, 33, 38, 40 /44, 68, 70, 75 e 77 dos mutantes I-Crel clivando o alvo HprCH3.3 (ex: KNTHQS/RYSDN representam K28, N30, T32, H33, Q38, S40/R44, Y68, S70, D75 e N77/7)	KNTHQS/ RYSDN								+		
	KNSYQS/ RYSDN								+		
	KNSTYS/ KYSEV								+		
	KNTHQS/ KYSNR										
	KNRDQS/ KYSNR								+		
	KNSSDS/ KYSNR								+		
	KNTHQS/ RASNN								+		
	KNTHQS/ RYSNR								+		
	KSSQQS/ RYSNR								+		

+ indica uma combinação funcional

* Mutantes em negrito são mutantes com mutações alternativas no exemplo 5.

Exemplo 7: Aperfeiçoamento de meganucleases clivando HprCH3 por mutagênese aleatória clivando HprCH3.4 e montagem com proteínas clivando HprCH3.3

5 Mutantes I-Crel capazes de clivar o alvo HprCH3.2 e o HprCH3 por montagem de mutantes clivando o alvo HprCH3.3 e HprCH3.4 foram anteriormente identificados no exemplo 4. Entretanto, esses mutantes exibem atividade mais forte com o alvo HprCH3.2 comparado ao alvo HprCH3.

Portanto, os mutantes combinatórios que clivam HprCH3 foram mutagenizados, e variantes exibindo clivagem mais forte deste alvo foram selecionadas. De acordo com a estrutura da proteína I-Crel ligada a seu alvo, não existe nenhum contato entre os 4 pares de base centrais (posições - 2 a 2) e a proteína I-Crel (Chevalier et al, Nat. Struct. Biol., 2001, 8, 312-316; Chevalier and Stoddard, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3774; Chevalier et al, J. Mol. Biol., 2003, 329, 253-269). Assim, é difícil racionalizar a escolha de um conjunto de posições para mutagenizar, e a mutagênese foi realizada na proteína toda. Mutagênese aleatória resulta em bibliotecas de alta complexidade. Portanto, para limitar a complexidade das bibliotecas de variante a serem testadas, apenas um dos dois componentes dos heterodímeros que clivam HprCH3 foi mutagenizado. Assim, em uma primeira etapa, proteínas 15 que clivam HprCH3.4 foram mutagenizadas, e em uma segunda etapa, foi avaliado se elas poderiam clivar HprCH3 quando co-expressas com uma proteína que cliva HprCH3.3.

A) Material e Métodos

a) Construção de bibliotecas por mutagênese aleatória

25 Mutagênese aleatória foi realizada em uma grupo de mutantes escolhidos, por PCR usando Mn^{2+} ou por um processo de PCR de duas etapas usando derivados de dNTP 8-oxo dGTP e dPTP como descrito no protocolo de Jena Bioscience GmbH para Kit de mutagênese JBS dNTP. Os iniciadores usados foram preATGCreFor (5'-gcataaattactatacttctatagacacgcaaaca
30 acaaatacacagcgcccttgccac c-3': SEQ ID NO: 61) e ICrelpostRev (S'-ggctc gaggagctc gtctagaggatcgctcgagttatcagtcggccgc-S': SEQ ID NO: 62). Aproximadamente 25 ng do produto PCR e 75 ng do DNA de vetor (pCLS 1107,

Figura 18) linearizado pela digestão com DraIII e NgoMIV foram usados para transformar a cepa *Saccharomyces cerevisiae* de levedura FYC2-6A (MAT α , trp1 Δ 63, leu2 Δ 1, his3 Δ 200) usando um protocolo de transformação LiAc de alta eficiência (Gietz and Woods, Methods Enzymol., 2002, 350, 87-96).

- 5 Plasmídeos de expressão contendo uma sequência de codificação intacta para o mutante I-CreI foram gerados por recombinação homóloga *in vivo* em levedura.

b) Mutante-cepas de levedura alvo, seleção e sequenciamento

- 10 A cepa de levedura FYBL2-7B (MAT α , ura3 Δ 851, trp1 Δ 63, leu2 Δ 1, lys2 Δ 202) contendo o alvo HprCH3 no vetor de relatório de levedura (pCLS1055, Figura 16) foi transformada com mutantes, no vetor de leucina (pCLS0542), cortando o alvo HprCH3.3, usando um protocolo de transformação LiAc de alta eficiência. Leveduras alvo de mutante foram usadas como cepas alvo para ensaios de cruzamento como descrito no exemplo 4.
- 15 Positivos resultando em clones foram verificados por sequenciamento (MIL-LEGEN) como descrito no exemplo 4.

B) Resultados:

- 20 Quatro mutantes clivando HprCH3.4 (I-CreI 32T, 33H, 44K, 68Y, 70S, 75N, 77R, I-CreI 30S, 33Q, 44R, 68Y, 70S, 77N, I-CreI 32T, 33H, 70S, 75H, 77Y e I-CreI 32T, 33H, 68N, 70S, 75Q, 77R, também chamados KN-THQS/KYSNR, KSSQQS/RYS DN, KNTHQS/QRSHY e KNTHQS/QNSQR de acordo com a nomenclatura da tabela IV; SEQ ID NO: 59, 53, 63 e 64) foram agrupados, aleatoriamente mutagenizados e transformados em levedura.
- 25 1140 clones transformados foram em seguida cruzados com uma cepa de levedura que contém (i) o alvo HprCH3 em um plasmídeo de relatório (ii) um plasmídeo de expressão contendo um mutante que cliva um alvo HprCH3.3 (I-CreI 33H ou KNSHQ S/QRRDI; SEQ ID NO: 32). Após cruzamento com esta cepa de levedura, 23 clones foram encontrados para clivar o alvo HprCH3 mais eficientemente do que o mutante original. Assim, 23 proteínas que
- 30 continham positivos capazes de formar heterodímeros com KNSHQ S/QRRDI com forte atividade de clivagem para o alvo HprCH3. Um exemplo de positivo é mostrado na figura 14. Sequenciamento desses 23 clones positivos in-

dica que 10 mutantes distintos listados na tabela VTI foram identificados.

Tabela VII: Combinações de mutante funcionais exibindo forte atividade de clivagem para HprCH3.

		Mutantes Otimizados HprCH3.4 (SEQ ID NO: 65 a 74)
Mutante HprCH3.3	I-Crel 28K30N32S33H38Q40S44Q68R70R75D77I (KNSHQSIQRRDI)	I-Crel 28R,30N,32S,33S,38Y,40Q,44R,68A,70S,75N,77N I-Crel 28R,30N,32S,33S,38Y,40Q,44R,68A,70S,75H,77Y I-Crel 28R,30N,32T,33S,38Y,40Q,44R,68Y,70S,75N,77N,140M I-Crel 28K,30N,32T,33H,38H,40S,44Q,68Y,70S,75D,77R I-Crel 28K,30N,32T,33H,38Q,40S,44K,68Y,70S,75D,77R I-Crel 28K,30N,32T,33H,38Q,40S,44Q,68N,70S,75H,77R I-Crel 28K,30N,32T,33H,38Q,40S,44Q,68R,70S,75H,77R I-Crel 28K,30N,32T,33H,38Q,40S,44Q,68H,70S,75H,77H I-Crel 28K,30N,32T,33H,38Q,40S,44Q,68H,70S,75H,77H,92R I-Crel 28K,30N,32T,33H,38Q,40S,44K,68Y,70S,75D,77R,92R,96R,107R,132V,140A,143A

Exemplo 8: Aperfeiçoamento de meganucleases clivando HprCH3 por mutagênese aleatória de proteínas que clivam HprCH3.3 e montagem com proteínas que clivam HprCH3.4

Como um complemento ao exemplo 6, foi também decidido realizar mutagênese aleatória com os mutantes que clivam HprCH3.3. Apenas um mutante HprCh3.3 foi capaz de clivar HprCH3 de modo que este mutante e três outros mutantes que clivaram fortemente HprCH3.3 mas não HprCH3 foram usados para mutagênese aleatória.

As proteínas mutagenizadas que clivam HprCH3.3 foram em seguida testadas para determinar se elas poderiam clivar de modo eficiente HprCH3 quando co-expressas com uma proteína que cliva HprCH3.4.

A) Material e Métodos

a) Construção de bibliotecas por mutagênese aleatória

Mutagênese aleatória foi realizada em um grupo de mutantes escolhidos, por PCR usando Mn^{2+} ou por um processo de PCR de duas etapas usando derivados de dNTP 8-oxo-dGTP e dPTP como descrito no protocolo de Jena Bioscience GmbH para o Kit de Mutagênese JBS dNTP. Os iniciadores usados foram preATGCreFor (5'-cataaattactatacttctatagacacgc aaacacaaatacacagcgcccttgccac c-3': SEQ ID NO: 61) e ICrelpostRev (S'-

ggctcgaggagctcgt ctagaggatcgctcgagttatcagtcggccgo-S': SEQ ID NO: 62). Aproximadamente 25 ng do produto PCR e 75 ng do DNA de vetor (p-CLS0542, Figura 17) linearizados por digestão com NcoI e EagI foram usados para transformar a cepa *Saccharomyces cerevisiae* de levedura FYC2-6A {MAT α , trp1 Δ 63, leu2 Δ 1, his3 Δ 200} usando um protocolo de transformação LiAc de alta eficiência (Gietz and Woods, *Methods Enzymol.*, 2002, 350, 87-96). Plasmídeos de expressão contendo uma sequência de codificação intacta para o mutante 1-Crel mutant foram gerados por recombinação homólogo *in vivo* em levedura.

10 b) Mutante-cepas de levedura alvo, seleção e sequenciamento

A cepa de levedura FYBL2-7B (MAT α , ura3 Δ 851, trp1 Δ 63, leu2 Δ 1, lys2 Δ 202) contendo o alvo HprCH3 no vetor de relatório de levedura (pCLS1055, Figura 16) foi transformada com mutantes, no vetor resistente a canamicina (pCLS1107), cortando o alvo HprCH3.4, usando um protocolo de transformação LiAc de alta eficiência. Leveduras alvo de mutantes foram usadas como cepas alvo para ensaios de cruzamento como descrito no exemplo 6. Clones de resultado positivo foram verificados por sequenciamento (MILLEGEN) como descrito no exemplo 4.

B) Resultados

20 Quatro mutantes clivando HprCH3.3 (I-Crel 32D,33T, I-Crel 32T,33T, I-Crel 33H e I-Crel 33Q, também chamados KNDTQS/QRRDI, KNTTQS/QRRDI, KNSHQS/QRRDI e KNSQQS/QRRDI de acordo com a nomenclatura da tabela IV; SEQ ID NO: 24, 45, 32 e 35) foram agrupados, aleatoriamente mutagenizados e transformados em levedura. 1140 clones transformados foram em seguida cruzados com uma cepa de levedura que contém (i) o alvo HprCH3 em um plasmídeo de relatório (ii) um plasmídeo de expressão contendo um mutante que o alvo HprCH3.4 (I-Crd 33T, 38Y, 44K, 68Y, 70S, 75E, 77V ou KNSTYS/KYSEV; SEQ ID NO: 56). Após cruzamento com esta cepa de levedura, 18 clones foram encontrados para clivar de modo eficiente o alvo HprCH3. Assim, 18 proteína que continham positivos capazes de formar heterodímeros com KNSTYS/KYSEV com atividade de clivagem para o alvo HprCH3. Um exemplo de positivos é mostrado na

figura 15. Exemplos de tais mutantes heterodiméricos são listados na tabela VIII.

Tabela VIII: Combinações de mutantes funcionais que apresentam atividade de clivagem para HprCH3

5 HprCH3

		Mutantes Otimizados HprCH3.3 (SEQ ID NO: 75 a 82)
Mutante HprCH3	I-Crel 28K30N32S33T38Y40S44M68Y70S75E77V (KNSTYSIKYSEV)	I-Crel 33H 66C 137V 155R 162P I-Crel 9L 33H 100I 108V 154G 155P 161P I-Crel 2Y 33H 109V 125A I-Crel 33H 113S 136S I-Crel 2I 33H 81V 86I 110G 131R 135Q 151A 157V I-Crel 33H 71R 103I 129A 130G I-Crel 33H 69V 82R 90R 120V 139R 158M I-Crel 33H 54L 86D 100R 104M 105A 136S 159R

Exemplo 9: Refinamento de meganucleases clivando o sítio alvo HprCH3 por mutagênese direcionada a sítio resultando em substituição de GLicina-19 com serina (G19S)

10 Para validar a capacidade da substituição G19S para aumentar a atividade de clivagem de meganucleases derivadas de I-Crel, esta mutação foi incorporada em cada uma das duas proteínas do heterodímero HprCH3.3 (KNSHQS/QRRDI/42A43L, SEQ ID NO: 147)/HprCH3.4 (KNTHQS/RYSNN/72T, SEQ ID NO: 148). Este heterodímero que cliva o alvo HprCH3 foi obtido por mutagênese aleatória, como descrito nos exemplos 7 e 8.

15 Para avaliar a atividade de clivagem dos mutantes derivados de G19S e originais um sistema de relatório de cromossoma em células CHO foi usado (Figura 20). Neste sistema um gene LacZ de cópia única acionado pelo promotor CMV é interrompido pelo sítio HprCH3 e é desse modo não-funcional. A transformação da linhagem de célula com os plasmídeos de expressão CHO para HprCH3.3/HprCH3.4 e um plasmídio de reparo LacZ
20 permite a restauração de um gene LacZ funcional por recombinação homólogo. Foi anteriormente mostrado que quebras de duplo filamento podem induzir recombinação homólogo; a frequência com a qual o gene LacZ é re-

parado é indicativa da eficiência de clivagem do sítio alvo HprCH3 genômico.

I) Material e Métodos

a) Mutagênese direcionada ao sítio

Para introduzir a substituição G19S nas sequências de codificação HprCH3.3 e HprCH3.4, das reações de PCR de sobreposição separadas foram realizadas para amplificar a extremidade 5' (resíduos 1-24) ou a extremidade 3' (resíduos 14-167) da sequência de codificação I-Crel. Para ambas as extremidades 5' e 3', amplificação de PCR é realizada usando um iniciador com homologia para o vetor:

CCM2Direto 5'-aagcagagctctctggctaactagagaacccactgcttactggctt atcgaccatggccaalacca aatataacaaagagttcc-3' (SEQ ID NO: 149) ou CCMReverso 5'-tctgatcgattcaagtcagtgctctcttagatagcgagtcggccgccggggaggattcttcttcgcgc-3': SEQ ID NO: 150) e um iniciador específico para a sequência de codificação I-Crel para aminoácidos 14-24 que contém a mutação de substituição G19S: G19SF 5'-gccggcttctgtggactctgacggtagcatcatc-3' (SEQ ID NO:151) ou G19SR 5'-gatgatgctaccgtcagagtcacaaagccggc-3' (SEQ ID NO: 152).

Os produtos de PCR resultantes contêm 33 bp de homologia um com o outro. Subsequentemente, os fragmentos são montados por PCR usando uma alíquota de cada um dos dois fragmentos e dos iniciadores CCM2Direto e CCMReverso.

b) Clonagem de mutantes em um vetor de expressão CHO

Produtos de PCR digeridos com SacI-XbaI foram clonados nos sítios SacI-XbaI correspondentes do plasmídeo pCLS1088 (Figura 21), um vetor de expressão de gateway CHO pCDNA6.2 (INVITROGEN) contendo a sequência de codificação I-Crel N75. A substituição da sequência de codificação HprCH3.3-G19S ou HprCH3.4-G19S para a sequência de codificação I-Crel N75 foi verificada por sequenciamento (MILLEGEN).

c) Ensaio de cromossoma em células de mamíferos

Linhagens de células CHO suportando o sistema de relatório foram semeadas a uma densidade de 2×10^5 células por 10cm disco em meio completo (meio de Kaighn modificado F-12 (F12-K), suplementado com 2 mM de L-glutamina, penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml), anfotericina-

na B (Fongizona) (0,25 $\mu\text{g/ml}$) (INVITROGEN-LIFE SCIENCE) e 10% de FBS (SIGMA- ALDRICH CHIMIE). O dia posterior, células foram transfectadas com reagente de transfecção Poly feet (QIAGEN). Brevemente, 2 μg de vetor de matriz de reparo lacZ foi transfectado com várias quantidades de vetores de expressão de meganucleases. Após 72 horas de incubação a 37°C, as células foram fixadas em 0,5% de glutaraldeído a 4°C por 10 min, lavadas duas vezes em 100 mM de tampão de fosfato com 0,02% NP40 e tinjidas com o seguinte tampão de tinjimento (10 mM de tampão de fosfato, 1 mM de MgCl_2 , 33 mM de K haexacianoferrato (III), 33 mM de K hexacianoferrato (II), 0,1% (v/v) X-Gal). Depois, uma incubação durante a noite a 37°C, placas foram examinadas sob um microscópio leve e o número de clones de célula positiva LacZ contado. A frequência do reparo LacZ é expressa no número de LacZ+ foci dividido pelo número de células transfectadas (5×10^5) e corrigido pela eficiência de transfecção.

2) Resultados

As atividades de heterodímeros contendo ou os dois mutantes iniciais (HprCH3.3 / HprCH3.4) ou um dos dois mutantes derivados de G19S combinados com o mutante inicial coreespondente (HprCH3.3 / HprCh3.4 G19S ou HprCH3.3 G19S / HprCh3.4) foram testadas usando um ensaio de cromossoma em linhagens de célula CHO contendo o alvo HprCH3. Este ensaio de cromossoma foi extensivamente descrito em uma publicação recente (Amould et al, J. Mol. Biol. Epub May 10, 2007). Brevemente, uma linhagem celular de CHO portando um transgene de única cópia foi primeiro criada. O transgene contém um promotor EF1 α a montante um sítio de clivagem I-SceI (Figura 20, etapa 1). Segundo, a meganuclease I-SceI foi usada para acionar recombinação homólogo induzida por DSB neste locus, inserir um cassete de 5,5 kb com um novo sítio que cliva meganuclease (Figura 20, etapa 2). Este cassete contém um quadro de leitura aberto LacZ acionado por um promotor CMV, e um promotor menos o gene marcador de higromicina. O gene LacZ por si só é inativado por uma inserção de 50 bp contendo o sítio que cliva meganuclease a ser testada (aqui, o sítio de clivagem HprCH3). Estas linhagens celulares podem por sua vez ser usadas para

avaliar gene induzido por DSB objetivando eficiências (reparo LacZ) com derivados I-Crel clivando o alvo HprCH3 (Figura 20, etapa 3).

5 Esta linhagem celular foi transfectada com a matriz de reparo e várias quantidades dos vetores expressando as meganucleases. A frequência de reparo do gene LacZ aumentou de um máximo de $2,0 \times 10^{-3}$ com heterodímeros construídos iniciais (HprCH3.3 / HprCH3.4), para um máximo de $1,15 \times 10^{-2}$ com o mutante derivado de G19S HprCH3.3 e um máximo de $1,2 \times 10^{-2}$ com o mutante derivado de G19S HprCH3.4 (Figura 22).

10 Estas descobertas demonstram que mutação G19S é capaz, por si só, de melhorar a atividade de um heterodímero, quando encontrada em apenas um de seus monômeros. Uma única substituição G19S foi mostrada para melhorar a atividade de heterodímeros competamente diferentes, clivando outros alvos. Assim, a mutação G19S se comporta como um motivo "portátil", capaz de melhorar a atividade de diferentes derivados de I-Crel por si só, ou em combinações com outras mutações.

15 Entretanto, quando o heterodímero HprCH3.3 G19S / HprCH3.4 G19S foi transformado com a matriz de reparo, nenhum LacZ+ foci foi detectado, indicando uma frequência de recombinação de menos do que $6,0 \times 10^{-6}$. Essas descobertas indicam que uma única substituição G19S melhora a atividade, uma substituição G19S em cada um dos monômeros do heterodímero resulta em uma diminuição muito forte da atividade.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> CELLECTIS
 SMITH, Julianne
 GRIZOT, Sylvestre
 GOUBLE, Agnès

<120> VARIANTES MEGANUCLEASE QUE CLIVAM UMA OU SEQUÊNCIA ALVO DE DNA A PARTIR DO GENE HPRT E USOS DAS MESMAS

<130> BLOcpHLP1546-13PCT

<160> 152

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Alvo de HprCH

<400> 1
 ccagccgacc gattccgtca tg 22

<210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Alvo de HprCH

<400> 2
 tattcctaatt cactatgtcg ag 22

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Alvo de HprCH

<400> 3
 tattcctcat ggagtgatta tg 22

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Alvo de HprCH3

<400> 4
 cgagatgtca tgaaagagat gg 22

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Alvo de HprCH
 <400> 5
 ccctctgtgt gctgaagggg gg 22

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Alvo de HprCH
 <400> 6
 ttgtctgacc tgctggatta ca 22

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Alvo de HprCH
 <400> 7
 tgacctgctg gattacatta aa 22

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Alvo de HprCH
 <400> 8
 catgactgta gattttatca ga 22

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Alvo de HprCH
 <400> 9
 tgacactggt aaaacaatgc aa 22

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Alvo de HprCH
 <400> 10
 ctttccctgg tcaagcggta ca 22

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Alvo de HprCH

<400> 11
 tttccctggt caagcgtac aa 22

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Alvo de HprCH

<400> 12
 ttggatttga aattccagac aa 22

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Alvo de HprCH

<400> 13
 tgtcattagt gaaactggga aa 22

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Alvo de HprCH

<400> 14
 taagatgaga gttcaagttg aa 22

<210> 15
 <211> 1301
 <212> DNA
 <213> Criteculus sp.

<400> 15
 ttacctcacc gctttctcgt gcctcggcgc ctctctgcg ggcttctctc tcacacogct 60
 ctctgctccc gccagccgac cgattccgtc atggcgaccc gcagccccag cgctcgtgatt 120
 agtgaatgatg aaccaggcta tgacctagat ttattttgta ttctaatca ctatgtcgag 180
 gatttggaag aggtgtttat tctcatgga gtgattatgg acaggactga aagacttgcc 240
 cgagatgtca tgaaagagat gggaggccat cacattgtgg ccctctgtgt gctgaagggg 300
 ggctataaat tctttgctga cctgctggat tacattaaag cactgaatag aaatagtgat 360

```

agatccattc ccatgactgt agattttatc agactgaaga gctactgtaa tgatcagtca 420
acaggggaca taaaagttat tgggtggggat gatctctcaa ctttaactgg aaagaatgtc 480
ttgattgttg aggacataat tgacactggg aaaacaatgc aaactctgct ttccctggtc 540
aagcgggtaca acctcaaaat ggtaaggtt gcaagcttgc tggtgaaaag gacctctcga 600
agtgttggtat ataggccaga ctttggttga tttgaaattc cagacaagtt tgttggttga 660
tatgcccttg actataatga gtacttcagg gatttgaatc atatttgtgt cattagtga 720
actgggaaag ccaaatacaa agcctaagat gagagttcaa gttgaatctg caaacacgag 780
gagtccatt catgttccca gtaaaattac caagcattct agttctgcag ccattctgctt 840
agtacagctt tttgcatgaa ctttctaaga attttatggt tttttatttt tagaaatgtc 900
agtgtctgca ttcttaaact ttttatttgc actatgagcc ttcgatagat tgcgcttac 960
cttgtgagca aagtaaactt cttaaattac cactattaaa aatgctgaga ttgtatctgt 1020
aagaaacatt taaagaggag atatattagt tttttaattg gtattttaat ttttatatat 1080
tcgggaaaga aagctgtgat tgaatattgt taattatacc accatgtgtt tagaacagtg 1140
tgaagcactc agtttcatgt cagtaaccat ctaagaagtt ttgctcagtg gaataaacat 1200
atgttttatc agtgttgctt atattttccc acttggattc tttcagtgag tcattgtcaa 1260
cagttccttt aaatgcaaat aaattctaaa aatttaccac t 1301

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> alvo de C1221 I-CreI

<400> 16
tcaaaacgtc gtacgacgtt ttga 24

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> alvo de 10GAG_P

<400> 17
tcgagacgtc gtacgacgtc tcga 24

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> alvo de 10CAT_P

<400> 18
tccatacgtc gtacgacgta tgga 24

```

<210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> alvo de 5CTT_P

 <400> 19
 tcaaaacctt gtacaagggtt ttga 24

 <210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> alvo de HprCH3.2

 <400> 20
 cgagatgtcg tacaagagat gg 22

 <210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> alvo de HprCH3.3

 <400> 21
 cgagatgtcg tacgacatct cg 22

 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> alvo de HprCH3.4

 <400> 22
 ccattctcttg tacaagagat gg 22

 <210> 23
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotídeo alvo de HprCH3.3

 <400> 23
 tggcatacaa gtttcgagat gtcgtacgac atctcgacaa tcgtctgtca 50

 <210> 24
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 24

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Asp
 20 25 30
 Thr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 25

<211> 163

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 25

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

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 26
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 26

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Pro
 20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 27
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 27

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Arg
 20 25 30

Asp Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 28
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 28

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Cys Lys Phe Lys His Lys Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 29
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 29

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Cys Lys Phe Lys His Ser Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 30
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 30

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Cys Lys Phe Lys His Thr Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 31
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3
 <400> 31

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Gly Lys Phe Lys His Ala Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 32
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 32

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1           5           10           15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
          20           25           30

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
          35           40           45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50           55           60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
65           70           75           80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85           90           95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
          100          105          110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
          115          120          125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
          130          135          140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145          150          155          160

Ser Ser Pro

```

<210> 33
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 33

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1           5           10           15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
          20           25           30

Pro Lys Phe Lys His His Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
          35           40           45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50           55           60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
65           70           75           80

```

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 34
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 34

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Pro Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 35
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 35

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1          5          10          15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
          20          25          30

Gln Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
          35          40          45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50          55          60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
65          70          75          80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85          90          95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
          100          105          110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
          115          120          125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
          130          135          140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145          150          155          160

Ser Ser Pro

```

<210> 36
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 36

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1          5          10          15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
          20          25          30

Gln Lys Phe Lys His Tyr Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
          35          40          45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50          55          60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
65          70          75          80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85          90          95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
          100          105          110

```

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 37
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 37

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Arg Lys Phe Lys His Gln Leu Tyr Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 38
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 38

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Ser Lys Phe Lys His Asp Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 39
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3
 <400> 39

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Thr Lys Phe Lys His Gly Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 40
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 40

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Thr Lys Phe Lys His Asn Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 41
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 41

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Thr Lys Phe Lys His Ser Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 42

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 42

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
20 25 30

Thr Lys Phe Lys His Thr Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 43
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 43

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1           5           10           15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
          20           25           30

Val Lys Phe Lys His His Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
          35           40           45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50           55           60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
65           70           75           80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85           90           95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
          100          105          110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
          115          120          125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
          130          135          140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145          150          155          160

Ser Ser Pro

```

<210> 44
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 44

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1           5           10           15

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

Pro Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
          35           40           45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50           55           60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
65           70           75           80

```

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 45
<211> 163
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 45

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

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

Thr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 46
<211> 163
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 46

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1          5          10          15
Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Thr Gln Ser
          20          25          30
Thr Lys Phe Lys His Asn Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
          35          40          45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50          55          60
Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
65          70          75          80
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85          90          95
Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
          100          105          110
Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
          115          120          125
Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
          130          135          140
Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145          150          155          160

Ser Ser Pro

```

<210> 47

<211> 163

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.3

<400> 47

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1          5          10          15
Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Thr Pro Asn Gln Ser
          20          25          30
Arg Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
          35          40          45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50          55          60
Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser Glu
65          70          75          80
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85          90          95

```

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 48
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de Gall10F

<400> 48
 gcaacttttag tgctgacaca tacagg

26

<210> 49
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de Gall10R

<400> 49
 acaaccttga ttggagactt gacc

24

<210> 50
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> iniciador de assF

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(6)
 <223> n e a, c, g, ou t

<400> 50
 ctannnttga ccttt

15

<210> 51
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> iniciador de assR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(12)
 <223> n e a, c, g, ou t

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Asn Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 54

<211> 163

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 54

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

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

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Asn Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 55
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3
 <400> 55

Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe
1				5					10					15	
Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Ile	Ala	Gln	Ile	Lys	Pro	Asn	Gln	Thr
		20						25					30		
His	Lys	Phe	Lys	His	Gln	Leu	Ser	Leu	Thr	Phe	Arg	Val	Thr	Gln	Lys
		35					40					45			
Thr	Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val
		50				55					60				
Gly	Tyr	Val	Tyr	Asp	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Asp	Tyr	Arg	Leu	Ser	Glu
65					70					75				80	
Ile	Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys
				85					90					95	
Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu
			100					105					110		
Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp
		115					120					125			
Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr
		130				135					140				
Ser	Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Lys
145					150					155				160	

Ser Ser Pro

<210> 56
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3
 <400> 56

Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe
1						5				10				15	
Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Ile	Ala	Gln	Ile	Lys	Pro	Asn	Gln	Ser
			20					25					30		

Thr Lys Phe Lys His Tyr Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 57

<211> 163

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 57

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Arg
20 25 30

Asp Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 58
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 58

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Asp Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 59
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.4

<400> 59

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Thr
 20 25 30
 His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Arg Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 60
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 60

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 61
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de preATGCreFor

<400> 61
 gcataaatta ctatacttct atagacacgc aaacacaaat acacagcggc cttgccacc 59

<210> 62
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de ICreIpostRev

<400> 62
 ggctcgagga gctcgtctag aggatcgctc gagttatcag tcggccgc 48

<210> 63
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.4

<400> 63

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

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

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser His Tyr Tyr Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 64
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3.4

<400> 64

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Thr
 20 25 30
 His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Asn Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Arg Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 65
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 65

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Arg Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Ser Lys Phe Lys His Tyr Leu Gln Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Ala Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Asn Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 66
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 66

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Arg Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Tyr Leu Gln Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Ala Asp Ser Gly Ser Val Ser His Tyr Tyr Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 67
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 67

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Arg Pro Asn Gln Thr
 20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Tyr Leu Gln Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Asn Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Met Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 68
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 68

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

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

His Lys Phe Lys His His Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 69
<211> 163
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 69

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

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

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 70
<211> 163
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 70

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1           5           10           15

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

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
          35           40           45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50           55           60

Gly Tyr Val Asn Asp Ser Gly Ser Val Ser His Tyr Arg Leu Ser Glu
65           70           75           80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85           90           95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
          100          105          110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
          115          120          125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
          130          135          140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145          150          155          160

Ser Ser Pro

```

<210> 71

<211> 163

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 71

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1           5           10           15

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

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
          35           40           45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50           55           60

Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser His Tyr Arg Leu Ser Glu
65           70           75           80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85           90           95

```

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 72

<211> 163

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 72

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

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

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val His Asp Ser Gly Ser Val Ser His Tyr His Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 73

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 73

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Thr
 20 25 30
 His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val His Asp Ser Gly Ser Val Ser His Tyr His Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Arg Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 74

<211> 163

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 74

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

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Val Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Ala Arg Lys Ala Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 75
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 75

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Cys Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Val Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Arg Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Pro Pro

<210> 76
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 76

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Leu Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Ile Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Val Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Gly Pro Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Pro Ser Pro

<210> 77
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 77

Met Tyr Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Val Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Ala Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 78
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 78

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Ser Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Ser Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 79
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 79

Met Ile Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Val Lys Pro Leu His Ile Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Gly Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Arg Ile Ala Ala Gln Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Asp Ser Leu Ser Val Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 80
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3
 <400> 80

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Arg Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Ile Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Ala Gly Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 81
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 81

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Val Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Arg Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Arg Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Val Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Met Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 82
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 82

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Leu Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asp Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Arg Gln Ala Asn Met Ala Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Ser Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Arg Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 83
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr
 <400> 83

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Gln Gln Asp
 20 25 30
 Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Lys Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Thr Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 84
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 84

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asp Gln Ser
 20 25 30

Arg Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Gln Asp Ser Gly Ser Val Ser Ser Tyr Val Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 85
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 85

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Thr Gln Ser
 20 25 30

Gly Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Tyr Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 86
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr
 <400> 86

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Thr
 20 25 30
 Tyr Lys Phe Lys His Trp Leu Ser Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 87
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 87

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Thr Lys Phe Lys His Gln Leu Ala Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Lys Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Thr Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 88
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 88

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

His Lys Phe Lys His Ser Leu Ser Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Asp Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 89
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr
 <400> 89

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Gly Lys Phe Lys His Thr Leu Ser Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Lys Asp Ser Gly Ser Val Ser His Tyr Phe Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 90
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 90

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1          5          10          15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Lys Gln Ser
          20          25          30

Arg Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Asp Val Thr Gln Lys
          35          40          45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50          55          60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Ser Tyr Arg Leu Ser Glu
65          70          75          80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85          90          95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
          100          105          110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
          115          120          125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
          130          135          140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145          150          155          160

```

Ser Ser Pro

<210> 91
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 91

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1          5          10          15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
          20          25          30

Thr Lys Phe Lys His Gln Leu Thr Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
          35          40          45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50          55          60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Tyr Leu Ser Glu
65          70          75          80

```

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 92
<211> 163
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 92

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

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

Thr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Tyr Val Thr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Val Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 93
<211> 163
<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 93

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1          5          10          15
Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Tyr Gln Thr
          20          25          30
Cys Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
          35          40          45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50          55          60
Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Lys Leu Ser Glu
65          70          75          80
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85          90          95
Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
          100          105          110
Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
          115          120          125
Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
          130          135          140
Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145          150          155          160
Ser Ser Pro

```

<210> 94

<211> 163

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 94

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1          5          10          15
Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
          20          25          30
His Lys Phe Lys His Gly Leu Ser Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln Lys
          35          40          45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50          55          60
Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Asn Leu Ser Glu
65          70          75          80

```

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 95
<211> 163
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Variante de I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 95

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
20 25 30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Ala Val Thr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Glu Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 96
<211> 163
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 96

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Arg Gln Ser
 20 25 30

Tyr Lys Phe Lys His Glu Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val His Asp His Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 97

<211> 163

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI

<400> 97

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Gly Lys Phe Lys His Cys Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 98
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 98

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Thr Lys Phe Lys His Gly Leu Ser Leu Thr Phe Thr Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 99
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 99

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Thr Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Glu Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Lys Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 100

<211> 163

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 100

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

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 101
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 101

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Gly Lys Phe Lys His Gln Leu Gln Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Ala Asp Lys Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 102
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 102

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Cys Gln Ser
 20 25 30
 Thr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Gln Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 103
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de alvo de Hpr
 <400> 103

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

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 104
<211> 163
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Variante de I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 104

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
20 25 30

Arg Lys Phe Lys His Thr Leu Ser Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

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

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 105
<211> 163
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Variante de I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 105

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Gly
 20 25 30
 Thr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Asn Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Tyr Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 106
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de alvo de Hpr
 <400> 106

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Trp
 20 25 30
 Thr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 107
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 107

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Thr Lys Phe Lys His Ala Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Leu Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 108
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante I-CreI de clivagem de alvo de Hpr

<400> 108

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Cys Lys Phe Lys His Tyr Leu Ser Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 109
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> oligonucleotídeo alvo 10NNN

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(17)
 <223> n e a, c, g, ou t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(34)
 <223> n e a, c, g, ou t

<400> 109
 ggcatacaag tttcnnnagc tcgtacgacg tnnngacaat cgtctgtca

49

<210> 110
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> oligonucleotídeo alvo 5NNN

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(22)
 <223> n e a, c, g, ou t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(29)

<223> n e a, c, g, ou t

<400> 110
ggcatacaag tttcaaaacn nngtacnng ttttgacaat cgtctgtca 49

<210> 111
<211> 501
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> cDNA N75 de I-CreI

<400> 111
atggccaata ccaaataata caaagagttc ctgctgtacc tggcgggctt tgtggacggt 60
gacggtagca tcatcgctca gattaaacca aaccagtctt ataagtttaa acatcagcta 120
agcttgacct ttcaggtgac tcaaaagacc cagcgccgtt ggtttctgga caaactagtg 180
gatgaaattg gcgttggtta cgtacgtgat cgcggatccg tttccaacta catcttaagc 240
gaaatcaagc cgctgcacaa cttcctgact caactgcagc cgtttctgaa actgaaacag 300
aaacaggcaa acctggttct gaaaattatc gaacagctgc cgtctgcaaa agaatccccg 360
gacaaattcc tggaagtttg tacctgggtg gatcagattg cagctctgaa cgattctaag 420
acgcgtaaaa ccacttctga aaccgttcgt gctgtgctgg acagcctgag cgagaagaag 480
aaatcctccc cggcggccga c 501

<210> 112
<211> 68
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador de Ulib4Rev

<400> 112
ctgaaaggtc aagcttagmb batgtttaaa cttmbbagac tgmbbtggtt taatctgagc 60
gatgatgc 68

<210> 113
<211> 68
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador de Ulib5Rev

<400> 113
ctgaaaggtc aagcttagmb batgtttaaa cttataagac tgmbbtggmb baatctgagc 60
gatgatgc 68

<210> 114
<211> 18
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de Ulib456For

<400> 114
 ctaagcttga cctttcag 18

<210> 115
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 5GGG_P

<400> 115
 tcaaaacggg gtaccccggt ttga 24

<210> 116
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 5GGA_P

<400> 116
 tcaaaacgga gtactccggt ttga 24

<210> 117
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 5GGT_P

<400> 117
 tcaaaacggt gtacaccggt ttga 24

<210> 118
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 5GGC_P DNA

<400> 118
 tcaaaacggc gtacgccggt ttga 24

<210> 119
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 5GAG_P DNA

<400> 119
 tcaaaacgag gtacctcggt ttga 24

<210> 120
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 5GAA_P DNA

<400> 120
 tcaaaacgaa gtacttcggt ttga

24

<210> 121
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 5GAT_P DNA

<400> 121
 tcaaaacgat gtacatcggt ttga

24

<210> 122
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 10GGG_P

<400> 122
 tcgggacgctc gtacgacgctc ccga

24

<210> 123
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 10GGA_P DNA

<400> 123
 tcggaacgctc gtacgacggt ccga

24

<210> 124
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 10GGT_P DNA

<400> 124
 tcggtacgctc gtacgacgta ccga

24

<210> 125
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 10GGC_P DNA

<400> 125
 tcggcacgtc gtacgacgtg ccga 24

<210> 126
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 10GGA_P DNA

<400> 126
 tcgagacgtc gtacgacgtc tcga 24

<210> 127
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 10GAA_P DNA

<400> 127
 tcgaaacgtc gtacgacgtt tcga 24

<210> 128
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> alvo de 10GAT_P DNA

<400> 128
 tcgatacgtc gtacgacgta tcga 24

<210> 129
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 129

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Ser Gln Ser
 20 25 30

Gln Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 130
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 130

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

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

His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 131
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 131

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Thr Lys Phe Lys His Tyr Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 132

<211> 163

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI

<400> 132

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

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 133
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 133

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Asp Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 134
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 134

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1           5           10           15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
          20           25           30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
          35           40           45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50           55           60

Gly Tyr Val Ala Asp Ser Gly Ser Val Ser Ser Tyr Asn Leu Ser Glu
65           70           75           80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85           90           95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
          100          105          110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
          115          120          125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
          130          135          140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145          150          155          160

```

Ser Ser Pro

```

<210> 135
<211> 163
<212> PRT
<213> sequência artificial

```

```

<220>
<223> Variante de I-CreI

```

```

<400> 135

```

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1           5           10           15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
          20           25           30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
          35           40           45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
          50           55           60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Asn Leu Ser Glu
65           70           75           80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
          85           90           95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
          100          105          110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
          115          120          125

```

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 136
<211> 163
<212> PRT
<213> sequência artificial

<220>
<223> Variante de I-CreI

<400> 136

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
20 25 30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 137
<211> 163
<212> PRT
<213> sequência artificial

<220>
<223> Variante de I-CreI

<400> 137

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Asn Asp Ser Gly Ser Val Ser Gln Tyr Arg Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 138
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 138

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser His Tyr Tyr Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 139
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 139

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 140
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 140

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 141
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 141

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Lys Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Arg Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 142
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI

<400> 142

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 143
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 143

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Ala Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Trp Arg Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 144
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 144

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 145
 <211> 1289
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 145
 ttacctcact gctttccgga gcggtagcac ctctccgcc ggttctctcc tcagaccgct 60
 ttttgccgcg agccgaccgg tcccgtcatg ccgacccgca gtcccagcgt cgtgattagc 120
 gatgatgaac caggttatga cctagatttg ttttgtatac ctaatcatta tgccgaggat 180
 ttggaaaaag tgtttattcc tcatggactg attatggaca ggactgaaag acttgctcga 240
 gatgtcatga aggagatggg aggccatcac attgtggccc tctgtgtgct caaggggggc 300
 tataagttct ttgtgacct gctggattac attaaagcac tgaatagaaa tagtgataga 360
 tccattccta tgactgtaga tttatcaga ctgaagagct actgtaatga tcagtcaacg 420
 ggggacataa aagttattgg tggagatgat ctctcaactt taactggaaa gaatgtcttg 480
 attgttgaag atataattga cactggtaaa acaatgcaaa ctttgctttc cctggttaag 540
 cagtacagcc ccaaaatggg taaggttgca agcttgctgg tgaaaaggac ctctogaagt 600
 gttggataca ggccagactt tgttggtatt gaaattccag acaagtttgt tgttggtat 660
 gcccttgact ataatgagta cttcaggaat ttgaatcacg tttgtgtcat tagtgaaact 720
 ggaaaagcca aatacaaagc ctaagatgag cgcaagttga atctgcaa acgaggagtc 780
 ctgttgatgt tgccagtaaa attagcaggt gttctagtcc tgtggccatc tgccagtaa 840
 agctttttgc atgaacctt tatgaatggt actgttttat ttttagaaat gtcagttgct 900
 gcgtccccag acttttgatt tgcactatga gcctataggc cagcctaccc tctggtagat 960
 tgtcgcttat cttgtaagaa aaacaaatct cttaaattac cactttttaa taataatact 1020
 gagattgtat ctgtaagaag gatttaaaga gaagctatat tagtttttta attgggtatt 1080
 taatttttat atattcagga gagaaagatg tgattgatat tgttaattta gacgagtctg 1140
 aagctctoga tttcctatca gtaacagcat ctaagagggt ttgctcagtg gaataaacat 1200
 gtttcagcag tgttggtgtg attttccac tttcagtaaa tcgttgtcaa cagttccttt 1260
 taaatgcaaa taaataaatt ctaaaaatt 1289

<210> 146
 <211> 1331
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 146
 tcttgctgcg cctccgctc ctctctgct ccgccaccgg ctctctctc ctgagcagtc 60
 agcccgcgcg ccggccggt ccgttatggc gaccgcgagc cctggcgctg tgattagtga 120
 tgatgaacca gggtatgacc ttgatttatt ttgcatacct aatcattatg ctgaggattt 180
 ggaaaggggtg tttattcctc atggactaat tatggacagg actgaacgctc ttgctcgaga 240
 tgtgatgaag gagatgggag gccatcacat tgtagccctc tgtgtgctca aggggggcta 300

```

taaattcttt gctgacctgc tggattacat caaagcactg aatagaaata gtgatagatc 360
cattcctatg actgtagatt ttatcagact gaagagctat tgtaatgacc agtcaacagg 420
ggacataaaa gtaattggtg gagatgatct ctcaacttta actggaaaga atgtcttgat 480
tgtggaagat ataattgaca ctggcaaaac aatgcagact ttgctttcct tggtcaggca 540
gtataatcca aagatggtca aggtcgcaag cttgctggtg aaaaggaccc cacgaagtgt 600
tggatataag ccagactttg ttggatttga aattccagac aagtttggtg taggatatgc 660
ccttgactat aatgaatact tcagggattt gaatcatggt tgtgtcatta gtgaaactgg 720
aaaagcaaaa tacaaagcct aagatgagag ttcaagtuga gtttggaac atctggagtc 780
ctattgacat cgccagtaaa attatcaatg ttctagttct gtggccatct gcttagtaga 840
gctttttgca tgtatcttct aagaatttta tctgttttgt actttagaaa tgtcagttgc 900
tgcattccta aactgtttat ttgcactatg agcctataga ctatcagttc cctttgggcg 960
gattgttggt taacttghaa atgaaaaaat tctcttaaac cacagcacta ttgagtghaa 1020
cattgaactc atatctghaa gaaataaaga gaagatatat tagtttttta attggtattt 1080
taatttttat atatgcagga aagaatagaa gtgattgaat attgttaatt ataccaccgt 1140
gtgttagaaa agtaagaagc agtcaatttt cacatcaaag acagcatcta agaagttttg 1200
ttctgtcctg gaattatttt agtagtggtt cagtaatggt gactgtattt tccaacttgt 1260
tcaaattatt accagtgaat ctttgtcagc agttcccttt taaatgcaaa tcaataaatt 1320
cccaaaaatt t 1331

```

<210> 147

<211> 163

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 147

```

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

```

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 148
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> Variante de I-CreI de clivagem de HprCH3

<400> 148

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Thr
 20 25 30
 His Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Arg Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Thr Val Ser Asn Tyr Asn Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro

<210> 149
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> iniciador de CCM2Direto

<400> 149

aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg accatggcca 60
 ataccaaata taacaaagag ttcc 84

<210> 150
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> iniciador de CCMReverso

<400> 150
 tctgatcgat tcaagtcagt gtctctctag atagcgagtc ggccgccggg gaggatttct 60
 tcttctcgc 69

<210> 151
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> iniciador de G19SF

<400> 151
 gccggccttg tggactctga cggtagcatc atc 33

<210> 152
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> iniciador de G19SR

<400> 152
 gatgatgcta ccgtcagagt ccacaaagcc ggc 33

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma variante I-Crel ou um derivado de cadeia simples para induzir uma modificação sítio-específica no gene HPRT, para finalidade não-terapêutica, em que a variante I-Crel ou derivado de cadeia simples tem
5 pelo menos uma substituição em um dos dois subdomínios funcionais do domínio núcleo LAGLIDADG situado a partir das posições 26 a 40 e 44 a 77 de I-Crel, e é capaz de clivar uma sequência alvo de DNA selecionada a partir dos grupos consistindo nas sequências SEQ ID NO: 1 a 14.
2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, em que o gene HPRT é
10 um gene HPRT de mamífero não-humano.
3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, em que o gene HPRT é o gene HPRT *Citellus sp.*
4. Uso, de acordo com a reivindicação 2, em que o gene HPRT é o gene HPRT *Mus musculus*.
5. Uso, de acordo com a reivindicação 4, em que a variante I-Crel cliva um alvo DNA da sequência SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou
15 14.
6. Uso, de acordo com a reivindicação 1, em que o gene HPRT é o gene HPRT *Homo sapiens*.
7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, em que a variante I-Crel cliva um alvo DNA da sequência SEQ ID NO: 6, 8, 9, 12 ou 14
20
8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a variante I-Crel ou derivado de cadeia simples são combinados com um constructo de DNA alvo compreendendo uma sequência para ser
25 introduzido flanqueados por sequências que compartilham homologias com as regiões do gene HPRT que circundam o sítio de clivagem de DNA genômico da variante I-Crel ou derivado de cadeia simples.
9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, em que a sequência a ser introduzida compreende um gene de interesse.
10. Uso, de acordo com a reivindicação 8, em que a sequência a ser introduzida compreende um cassete de inativação para o gene HPRT.
30
11. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10,

em que o constructo de DNA alvo é inserido em um vetor.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a variante I-Crel ou derivado de cadeia simples é codificada por um fragmento de polinucleotídeo.

5 13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, em que o fragmento é inserido em um vetor de expressão.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, em que o vetor compreende dois fragmentos de polinucleotídeo diferentes, cada um codificando um dos monômeros de uma variante I-Crel heterodimérico.

10 15. Uso, de acordo com a reivindicação 13 ou reivindicação 14, em que o vetor inclui um constructo de DNA alvo como definido em qualquer uma das reivindicações 8 a 10.

15 16. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, em que a modificação de local específico do gene HPRT consiste na inserção de um gene de interesse por clivagem do gene HPRT pela variante I-Crel e recombinação homólogo com um constructo de DNA alvo como definido na reivindicação 9.

20 17. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, em que a modificação de local específico do gene HPRT consiste na inserção de um cassete de inativação por clivagem do gene HPRT pela variante I-Crel e recombinação homólogo com um constructo de DNA alvo como definido na reivindicação 10.

25 18. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a modificação de local específico do gene HPRT consiste na inativação do gene HPRT por clivagem do gene HPRT pela variante I-Crel e reparo da quebra de filamentos duplos por junção final não-homólogo.

29 19. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, para preparar animais transgênicos não-humanos ou linhagens de célula recombinante.

30 20. Uso, de acordo com a reivindicação 19, para preparar linhagens de células humanas recombinantes.

21. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20,

em que a variante I-Crel é obtenível por um método compreendendo pelo menos as etapas de:

- 5 (a) construir uma primeira série de variantes I-Crel tendo pelo menos uma substituição no primeiro subdomínio funcional do domínio núcleo LAGLIDADG situado a partir das posições 26 a 40 de I-Crel,
- 10 (b) construir uma segunda série de variantes I-Crel tendo pelo menos uma substituição em um segundo subdomínio funcional do domínio núcleo LAGLIDADG situado a partir das posições 44 a 77 de I-Crel,
- 15 (c) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir da primeira série de etapa (a) que são capazes de clivar um sítio de I-Crel mutante em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições -10 a -8 do sítio I-Crel foi recolocado com uma trinca de nucleotídeo selecionado a partir do grupo consistindo em cag, att, cct, ttg, gac, atg, ttt, ttc, tgg, gtc, aag, gag e (ii) a trinca de nucleotídeo nas posições +8 a +10 foi recolocado com a sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que é substituído na posição -10 a -8 do sítio I-Crel (isto é: ctg, aat, agg, caa, gtc, cat, aaa, gaa, cca, gac, ctt, e ctc, respectivamente),
- 20 (d) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir da segunda série de etapa (b) que são capazes de clivar um sítio de I-Crel mutante em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições -5 a -3 do sítio I-Crel foi recolocada com uma trinca de nucleotídeo selecionado a partir do grupo consistindo em: gac, taa, tca, gtg, gct, tgt, tgg, ctg, ttg, tag, e gag e (ii) a trinca de nucleotídeo nas posições +3 a +5 foi recolocada com a sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que é substituída na posição -5 a -3 do sítio I-Crel (isto é: gtc, tta, tga, cac, agc, aca, cca, cag, caa, cta e ctc, respectivamente),
- 25
- 30

- 5 (e) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir da primeira série de etapa (a) que são capazes de clivar um sítio de I-Crel mutante em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições +8 a +10 do sítio I-Crel foi recolocada uma trinca de nucleotídeo selecionado a partir do grupo consistindo em: cat, cga, tat, ggg, tac, taa, cag, gca, aca, gaa, tga, atg, e (ii) a trinca de nucleotídeo nas posições -10 a -8 foi recolocada com a sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que é substituída na posição +8 a +10 do sítio I-Crel (isto é: atg, tcg, ata, ccc, gta, tta, ctg, tgc, tgt, ttc, tca e cat, respectivamente),
- 10 (f) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir da segunda série de etapa (b) que são capazes de clivar um sítio de I-Crel mutante em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições +3 a +5 do sítio I-Crel foi trocada pela a trinca de nucleotídeos selecionada a partir do grupo consistindo em: tcc, tat, gtg, gaa, tgg, tac, ttt, aca, agc, gcg, tcc, act, caa e aag e (ii) a trinca de nucleotídeo nas posições -5 a -3 foi recolocada com a sequência complementar reversa da qual é substituída na posição +3 a +5 do sítio I-Crel (isto é: gga, ata, cac, ttc, cca, gta, aaa, tgt, gct, cgc, gga, agt, ttg e ctt, respectivamente),
- 15 (g₁) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir das etapas (c) a (f) que são capazes de clivar um alvo DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14.
- 20 22. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, em que a variante I-Crel é obtenível por um método compreendendo pelo menos as etapas (a) a (f) como definidas na reivindicação 21, e as etapas adicionais de:
- 25 (g₂) combinar variantes diferentes obtidas em qualquer uma das etapas (c) a (f) uma com a outra ou com I-Crel, para formar heterodímeros, e
- 30

- (h₂) selecionar e/ou peneirar os heterodímeros a partir da etapa (g₂) que são capazes de clivar o alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14.

23. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, em que a variante I-CreI é obtível por um método compreendendo pelo menos as etapas (a) a (f) como definidas na reivindicação 21, e as etapas adicionais de:

(g₃) combinar em uma variante única, as mutações nas posições 26 a 40 e 44 a 77 de duas variantes a partir da etapa (c) e etapa (d), para obter uma nova variante I-CreI homodimérica que cliva uma sequência em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições -10 a -8 é idêntica à trinca de nucleotídeo que está presente nas posições -10 a -8 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, (ii) a trinca de nucleotídeo nas posições +8 a +10 é idêntica à sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que está presente nas posições -10 a -8 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, (iii) a trinca de nucleotídeo nas posições -5 a -3 é idêntica à trinca de nucleotídeo que está presente nas posições -5 a -3 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14 (iv) a trinca de nucleotídeo nas posições +3 a +5 é idêntica à sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que está presente nas posições -5 a -3 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, e/ou,

(h₃) combinar em uma variante única, as mutações nas posições 26 a 40 e 44 a 77 de duas variantes a partir da etapa (e) e etapa (f), para obter uma nova variante I-CreI homodimérica que cliva uma sequência em que (i) a trinca de nucleotídeo nas posições +3 a +5 é idêntica à trinca de nucleotídeo que está presente nas posições +3 a +5 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, (ii) a trinca de

- nucleotídeo nas posições -5 a -3 é idêntica à sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo que está presente nas posições +3 a +5 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, (iii) a trinca de nucleotídeo nas posições +8 a +10 do sítio I-CreI foi recolocada com a trinca de nucleotídeo que está presente nas posições +8 a +10 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14 e (iv) a trinca de nucleotídeo nas posições -10 a -8 é idêntica à sequência complementar reversa da trinca de nucleotídeo nas posições +8 a +10 do alvo de DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14, e
- (i₃) selecionar e/ou peneirar as variantes a partir das etapas (g₃) ou (h₃) que são capazes de clivar um alvo DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14.
24. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, em que a variante I-CreI é obtível por um método compreendendo pelo menos as etapas (a) a (f) como definidas na reivindicação 20, a etapa (g₃) e/ou a etapa (h₃) como definida na reivindicação 23, e as etapas adicionais de:
- (i₄) combinar as variantes obtidas na etapa (g₃) com as variantes obtidas na etapa (h₃), I-CreI ou as variantes obtidas na etapa (e) ou etapa (f), para formar heterodímeros, ou
- (i'₄) combinar as variantes obtidas na etapa (h₃) com I-CreI ou as variantes obtidas na etapa (c) ou etapa (d), para formar heterodímeros, e
- (j₄) selecionar e/ou peneirar os heterodímeros a partir da etapa (i₄) ou (i'₄) que são capazes de clivar um alvo DNA da sequência SEQ ID NO: 1 a 14.
25. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 21 a 24, em que as substituições no subdomínio situado a partir das posições 44 a 77 de I-CreI estão nas posições 44, 68, 70, 75 e/ou 77.
26. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 21

to 24, em que as substituições no subdomínio situado a partir das posições 26 a 40 de I-Crel estão nas posições 26, 28, 30, 32, 33, 38 e/ou 40.

27. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 21 a 26, em que a variante I-Crel compreende uma ou mais substituições adicionais em I-Crel.

28. Uso, de acordo com a reivindicação 27, em que as substituições estão nas posições: 2, 9, 19, 42, 43, 54, 66, 69, 72, 81, 82, 86, 90, 92, 96, 100, 103, 104, 105, 107, 108, 109, 110, 113, 120, 125, 129, 130, 131, 132, 135, 136, 137, 140, 143, 151, 154, 155, 157, 158, 159, 161 ou 162 de I-Crel.

29. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 21 a 28, em que as substituições são recolocações dos aminoácidos iniciais nos aminoácidos selecionados no grupo consistindo em A, C, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T, Y, W, L, V, M e I.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 28 ou reivindicação 29, em que a substituição é a mutação G 19S ou G 19 A.

31. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, em que a variante I-Crel é um heterodímero, resultando da associação de um primeiro e um segundo monômero tendo diferentes mutações nas posições 26 a 40 e/ou 44 a 77 de I-Crel.

32. Uso, de acordo com a reivindicação 31, em que pelo menos um monômero tem pelo menos duas substituições, um em cada um dos dois subdomínios funcionais situado a partir das posições 26 a 40 e 44 a 77 de I-Crel.

33. Uso, de acordo com a reivindicação 32, em que o heterodímero consiste em um primeiro e um segundo monômero selecionado a partir dos seguintes pares de sequência: SEQ ID NO: 83 e 97, SEQ ID NO: 84 e 98, SEQ ID NO: 85 e 99, SEQ ID NO: 32 e 52, SEQ ID NO: 32 e 53, SEQ ID NO: 32 e 54, SEQ ID NO: 32 e 55, SEQ ID NO: 32 e 56, SEQ ID NO: 32 e 57, SEQ ID NO: 32 e 58, SEQ ID NO: 32 e 60, SEQ ID NO: 32 e 65, SEQ ID NO: 32 e 66, SEQ ID NO: 32 e 67, SEQ ID NO: 32 e 68, SEQ ID NO: 32 e 69, SEQ ID NO: 32 e 70, SEQ ID NO: 32 e 71, SEQ ID NO: 32 e 72, SEQ ID

NO: 32 e 73, SEQ ID NO: 32 e 74, SEQ ID NO: 75 e 56, SEQ ID NO: 76 e 56, SEQ ID NO: 77 e 56, SEQ ID NO: 78 e 56, SEQ ID NO: 79 e 56, SEQ ID NO: 80 e 56, SEQ ID NO: 81 e 56, SEQ ID NO: 82 e 56, SEQ ID NO: 86 e 96, SEQ ID NO: 87 e 100, SEQ ID NO: 88 e 101, SEQ ID NO: 89 e 102, 5 SEQ ID NO: 90 e 103, SEQ ID NO: 91 e 104, SEQ ID NO: 92 e 105, SEQ ID NO: 93 e 106, SEQ ID NO: 94 e 107, SEQ ID NO: 95 e 108, SEQ ID NO: 147 e 148.

34. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 33, em que um monômero do heterodímero compreende a mutação G19S.

10 35. Uso de uma variante I-Crel ou um derivado de cadeia simples de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 21 a 34, para a preparação de um medicamento para prevenir, melhorar ou curar uma doença genética associada com uma mutação no gene HPRT.

15 36. Uso, de acordo com a reivindicação 35, em que a variante I-Crel ou derivado de cadeia simples é associada com um constructo de DNA alvo que compreende uma sequência que repara uma mutação no gene HPRT flanqueado por sequências que compartilham homologies com as regiões do gene HPRT que circunda o alvo de DNA genômico da variante I-Crel ou derivado de cadeia simples, como definido na reivindicação 8 ou 11.

20 37. Uso, de acordo com a reivindicação 36, em que a sequência que repara a mutação é a sequência correta do gene HPRT.

25 38. Uso, de acordo com a reivindicação 36, em que a sequência que repara a mutação compreende os éxons do HPRT a jusante do sítio de clivagem genômico fundido no quadro, e um sítio de poliadenilação para parar a transcrição em 3'.

39. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 38, em que o I-Crel ou derivado de cadeia simples é codificado por um vetor compreendendo o constructo de DNA alvo.

30 40. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 39, em que a doença genética é a Síndrome de Lesch Nyhan.

41. Variante I-Crel como definida em qualquer uma das reivindicações 1 e 21 a 34.

42. Endonuclease quimérica de cadeia simples derivada de uma variante I-Crel como definida na reivindicação 41.

43. Fragmento de polinucleotídeo que codifica uma variante como definida na reivindicação 41 ou uma endonuclease quimérica de cadeia simples como definida na reivindicação 42.

44. Vetor de expressão que compreende pelo menos um fragmento de polinucleotídeo como definida na reivindicação 43.

45. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 44, que compreende, dois fragmentos de polinucleotídeo diferentes, cada um codificando um dos monômeros de uma variante de heterodímero como definida em qualquer uma das reivindicações 14 e 30 a 34.

46. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 44 ou reivindicação 45, que compreende um constructo de DNA alvo como definido em qualquer uma das reivindicações 8 a 10 e 36 a 38.

47. Vetor que compreende um constructo de DNA alvo como definido em qualquer uma das reivindicações 8 a 10 e 36 a 38.

48. Célula hospedeiro que é modificada por um polinucleotídeo como definida na reivindicação 41, ou um vetor, como definida em qualquer uma das reivindicações 44 a 47.

49. Animal transgênico não-humano compreendendo um ou dois fragmentos de polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 41 a 43.

50. Planta transgênica compreendendo um ou dois fragmentos de polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 41 a 43.

51. Composição que compreende pelo menos uma variante I-Crel como definida em qualquer uma das reivindicações 1 e 21 a 32 ou uma endonuclease quimérica de cadeia simples como definida na reivindicação 39, e/ou pelo menos um vetor de expressão, como definida em qualquer uma das reivindicações 42 a 44.

52. Produtos contendo pelo menos uma variante I-Crel como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 21 a 32, uma endonuclea-

se quimérica de cadeia simples, de acordo com a reivindicação 39, ou um vetor de expressão de acordo com qualquer uma das reivindicações 42 a 44, e um vetor como definido em qualquer uma das reivindicações 34 a 36, como uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou sequencial na prevenção ou tratamento ou de uma doença genética associada com uma mutação no gene HPRT.

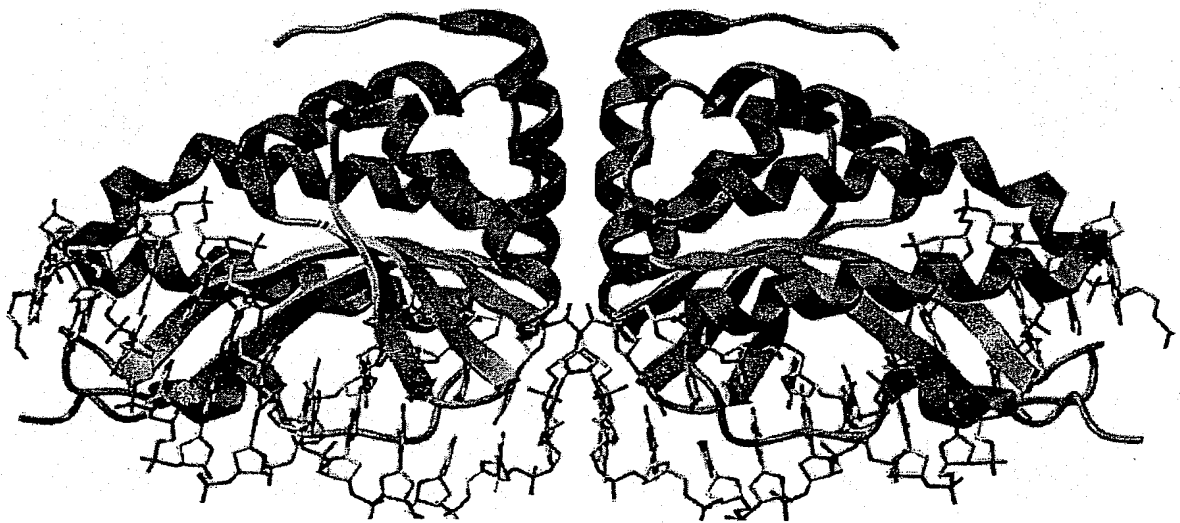


FIG. 1A

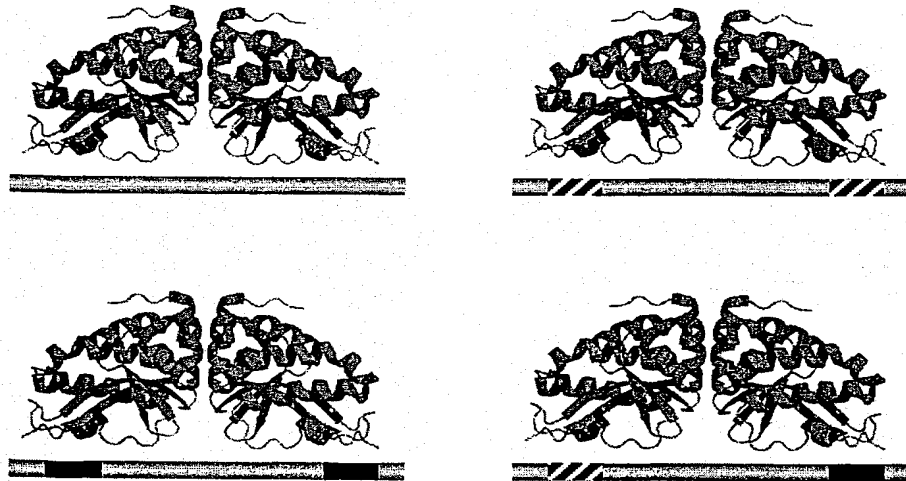


FIG. 1B

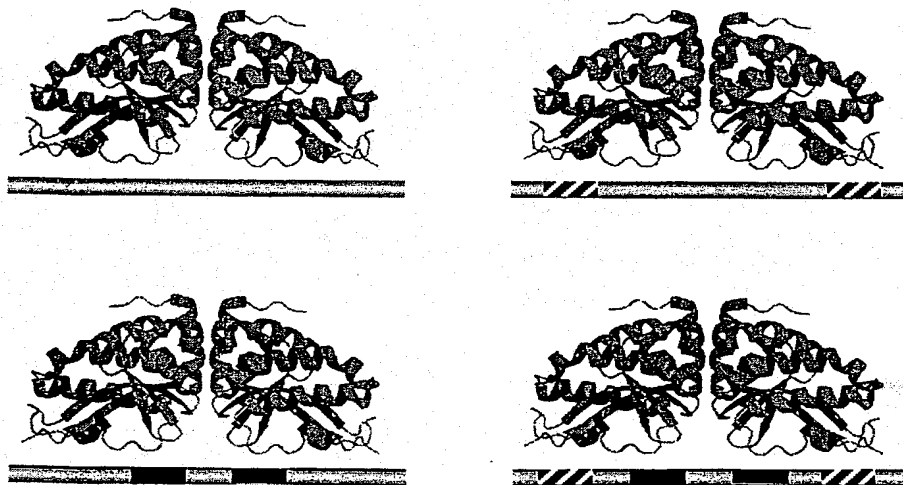


FIG. 1C

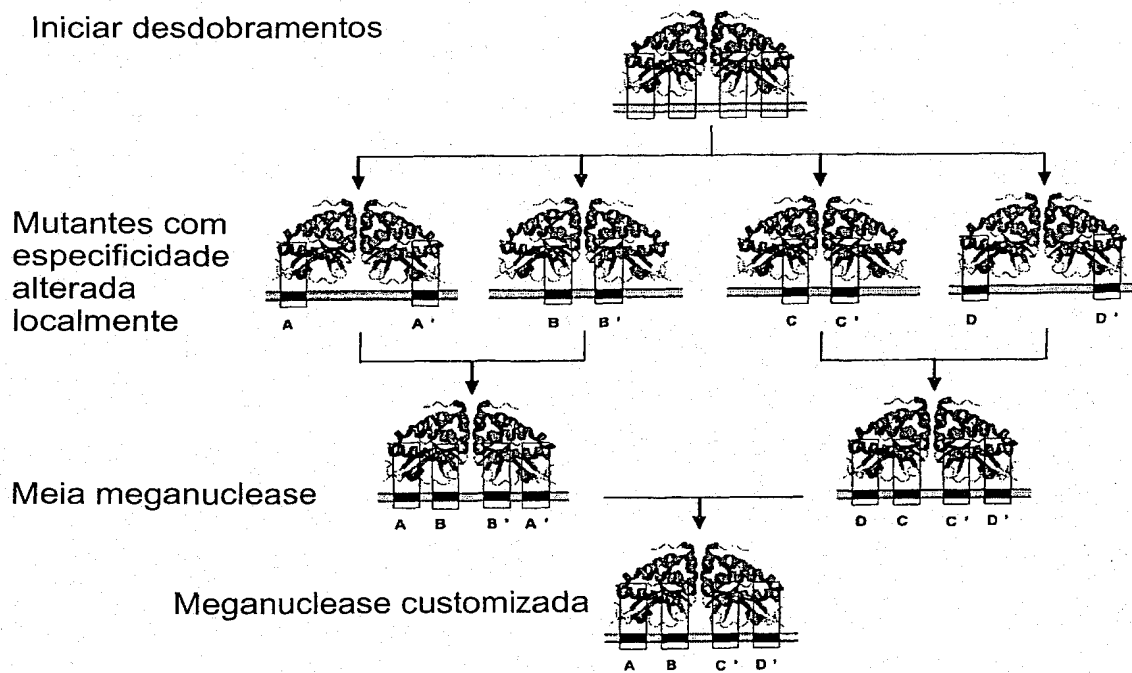


FIG. 1D

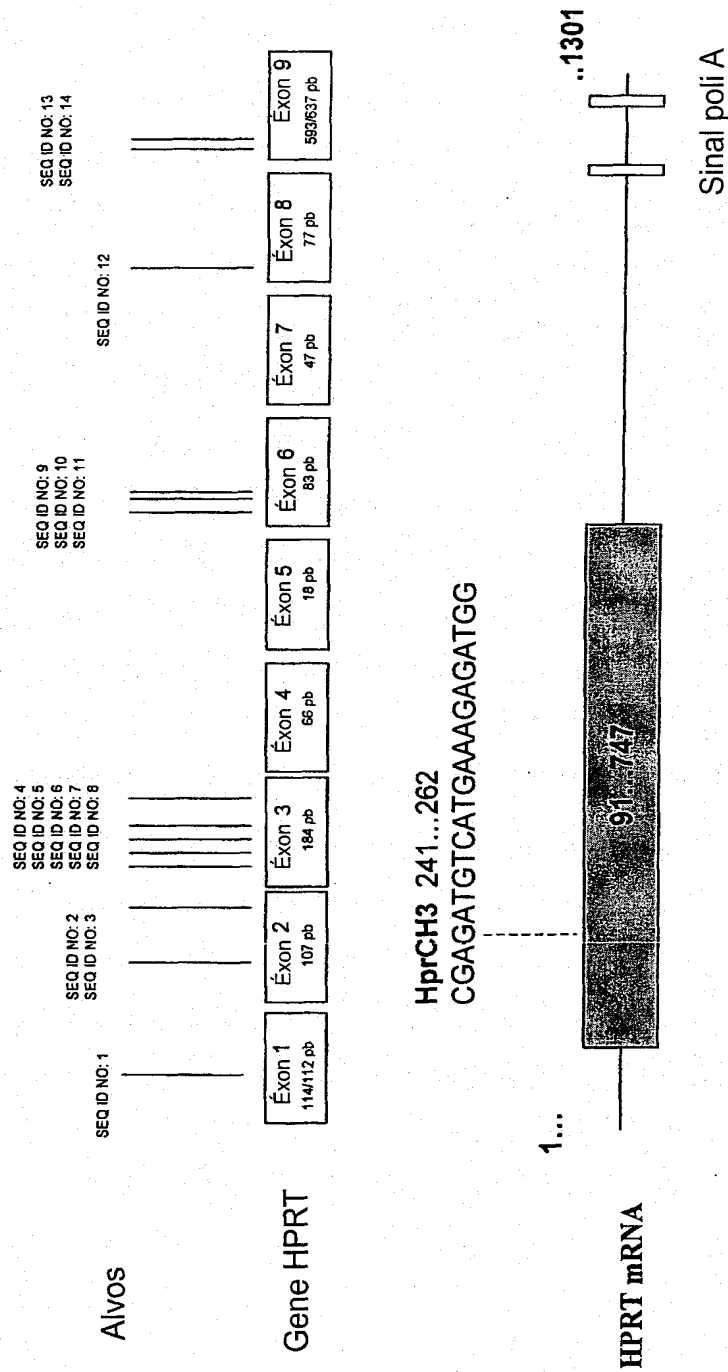


FIG. 2

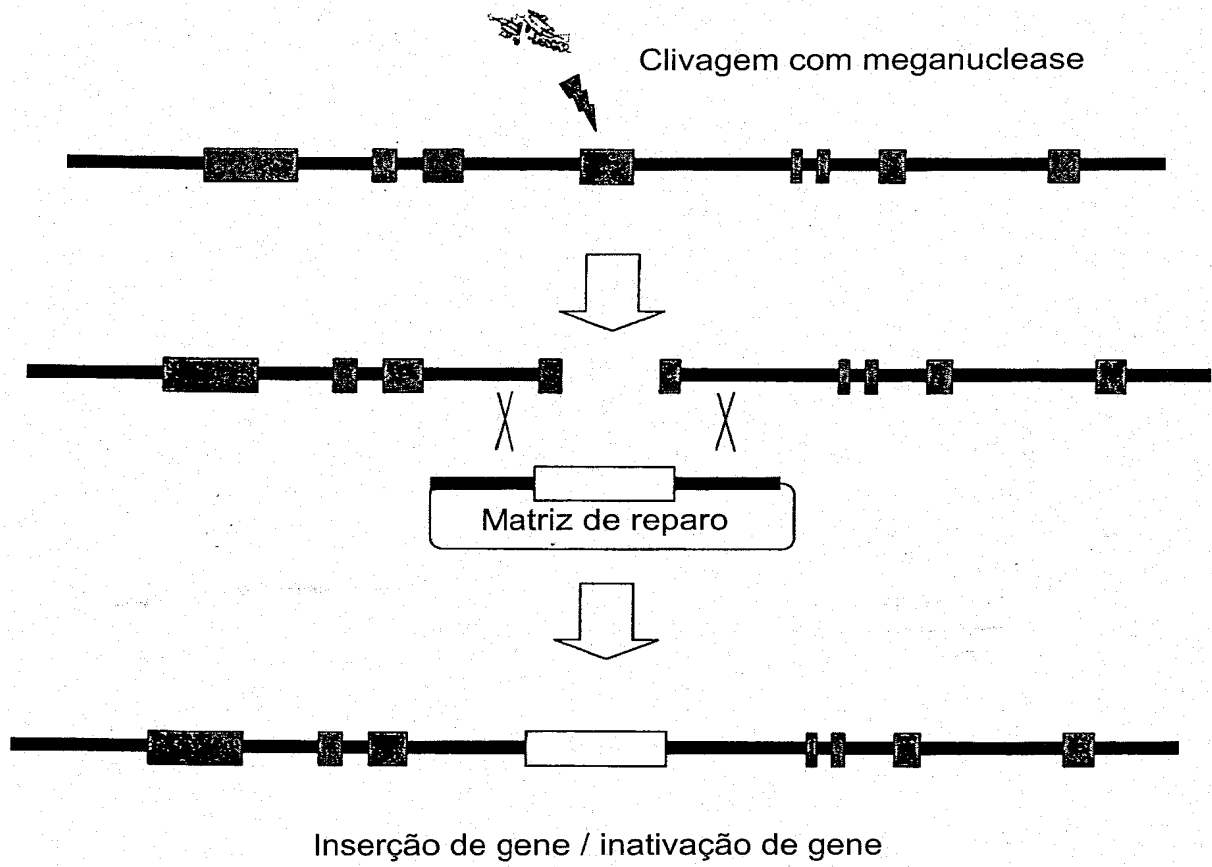


FIG. 3A

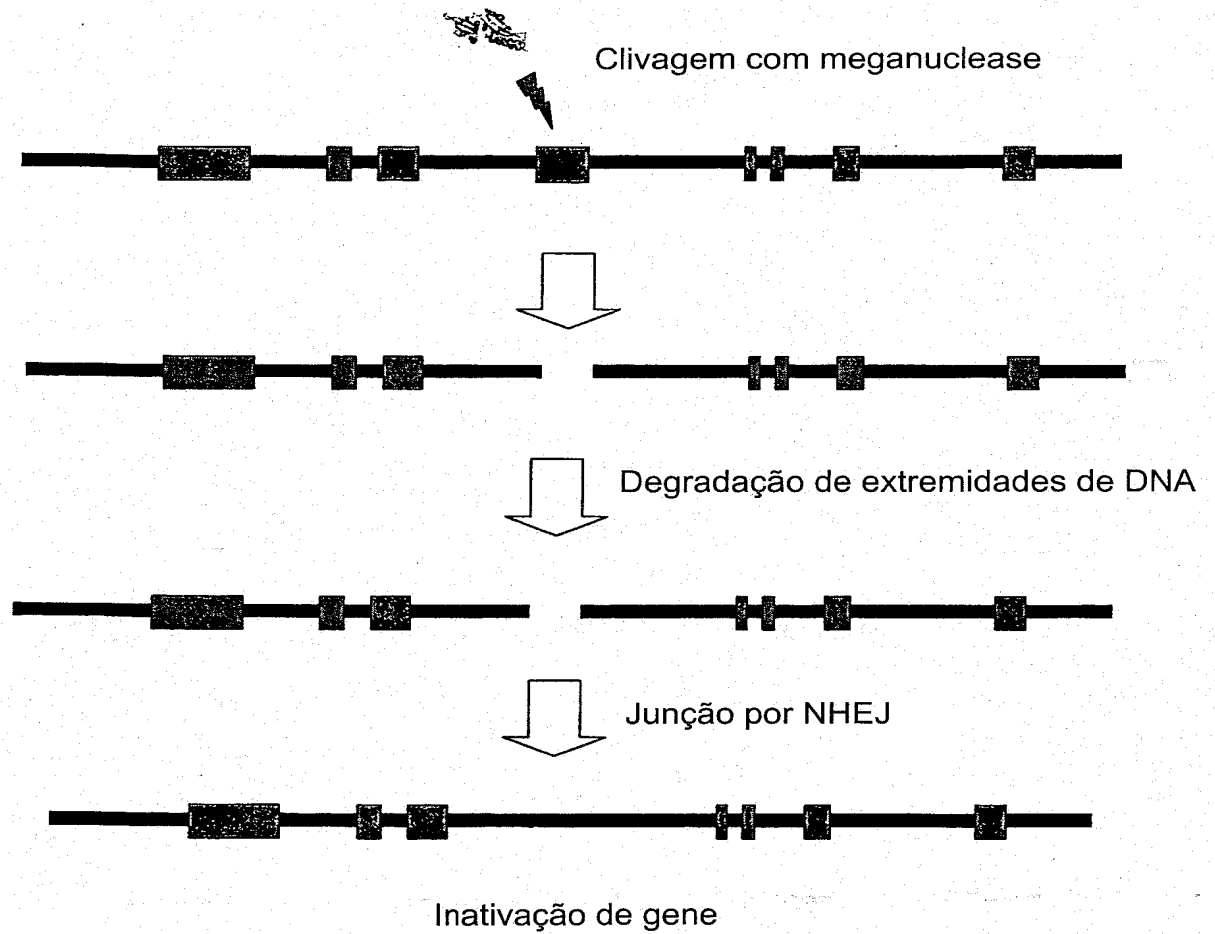


FIG. 3B

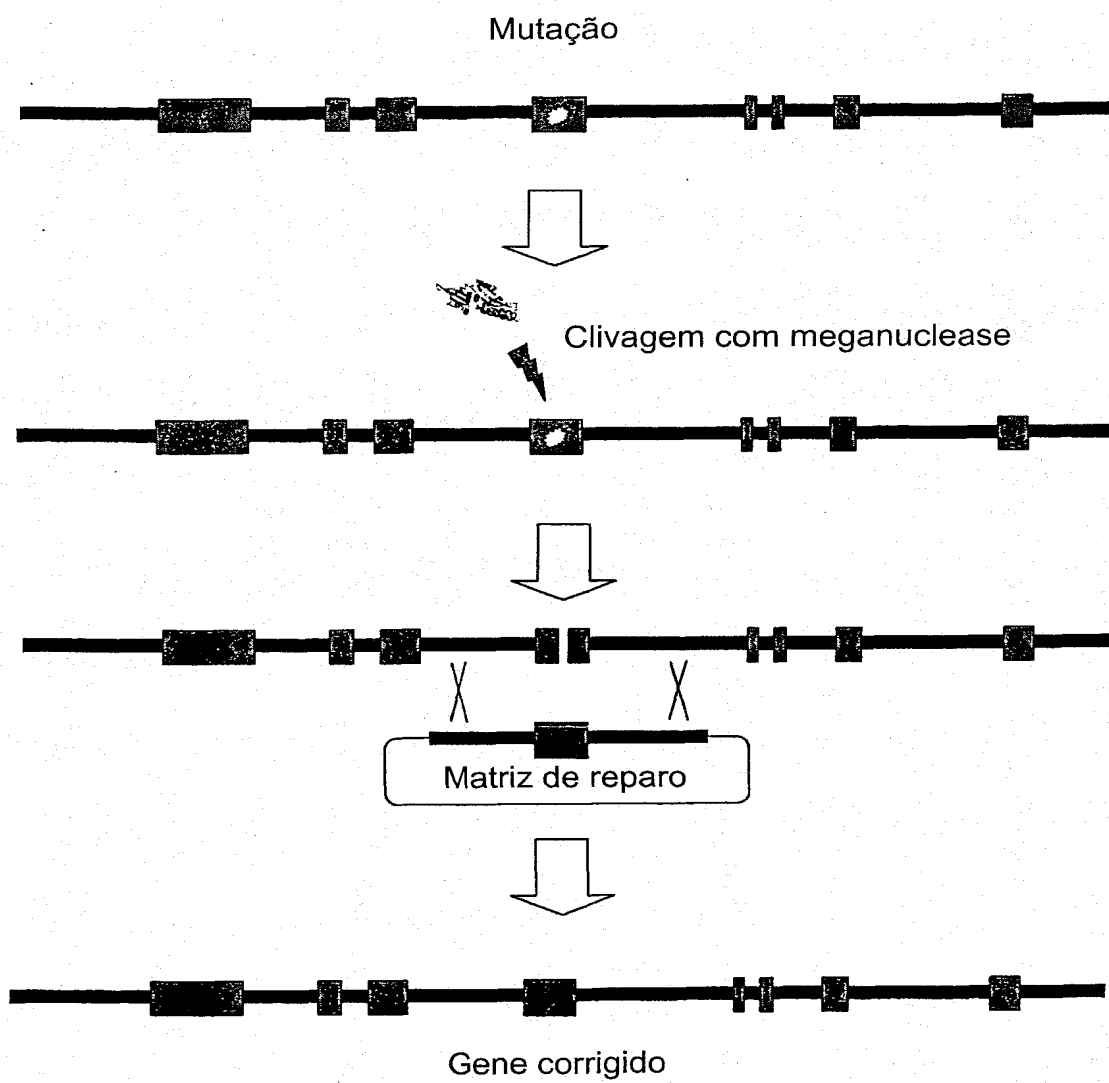


FIG. 3C

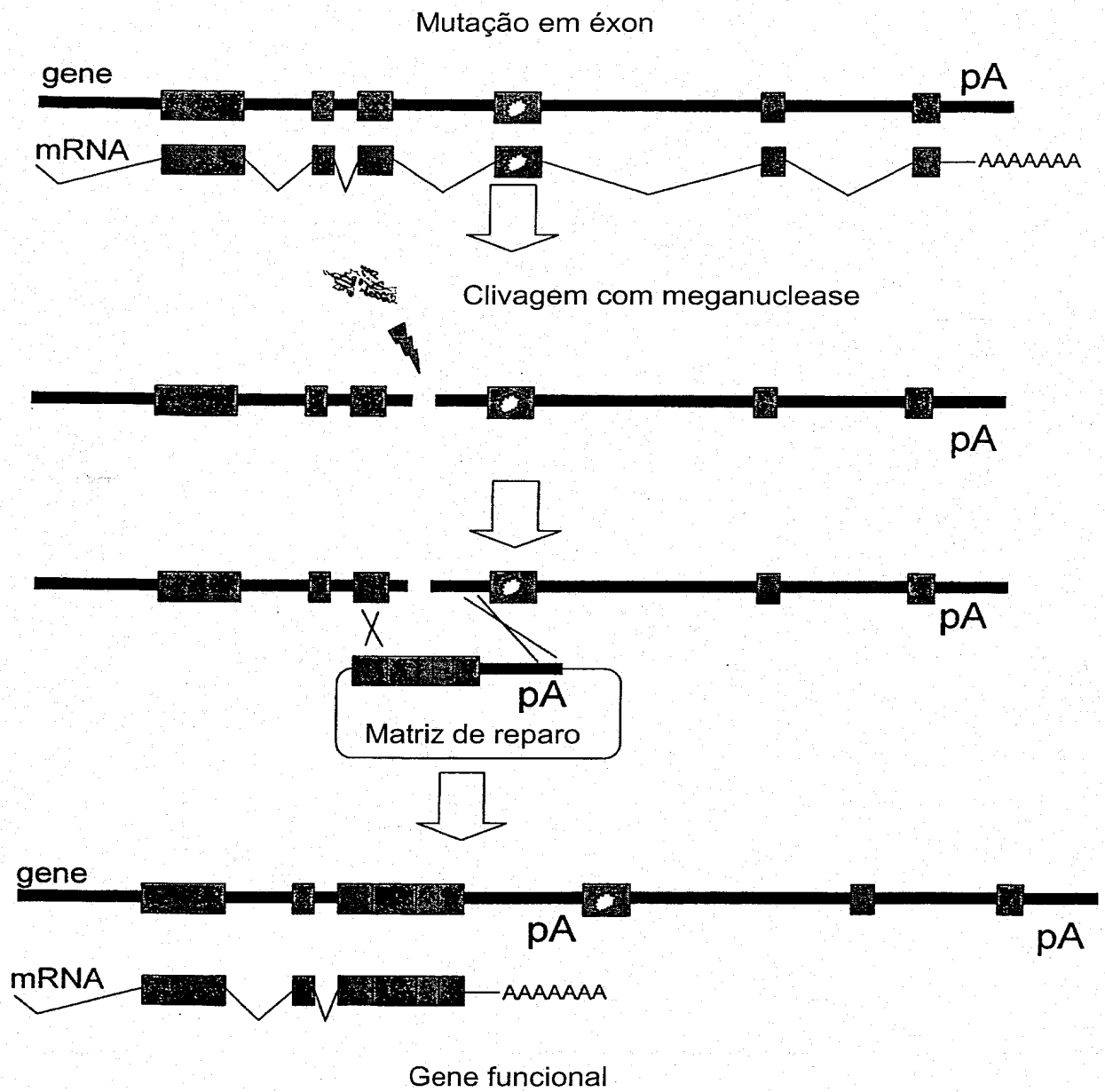


FIG. 3D

A SEQ ID NO: 111

```

1   ATGGCCAATA CCAAATATAA CAAAGAGTTC CTGCTGTACC TGGCCGGCTT
51  TGTGGACGGT GACGGTAGCA TCATCGCTCA GATTAAACCA AACCAGTCTT
101 ATAAGTTTAA ACATCAGCTA AGCTTGACCT TTCAGGTGAC TCAAAAGACC
151 CAGCGCCGTT GGTTTCTGGA CAAACTAGTG GATGAAATTG GCGTTGGTTA
201 CGTACGTGAT CGCGGATCCG TTTCCAACTA CATCTTAAGC GAAATCAAGC
251 CGCTGCACAA CTTCCTGACT CAACTGCAGC CGTTTCTGAA ACTGAAACAG
301 AAACAGGCAA ACCTGGTTCT GAAAATTATC GAACAGCTGC CGTCTGCAAA
351 AGAATCCCCG GACAAATTCC TGGAAGTTTG TACCTGGGTG GATCAGATTG
401 CAGCTCTGAA CGATTCTAAG ACGCGTAAAA CCACTTCTGA AACCGTTCGT
451 GCTGTGCTGG ACAGCCTGAG CGAGAAGAAG AAATCCTCCC CGGCGGCCGA
501 C

```

B

Ulib4rev (SEQ ID NO:112)

CTGAAAGGTC AAGCTTAGMB BATGTTTAAA CTTMBBAGAC TGMBBTGGTT
TAATCTGAGC GATGATGC

Ulib5rev (SEQ ID NO:113)

CTGAAAGGTC AAGCTTAGMB BATGTTTAAA CTTATAAGAC TGMBBTGGMB
BAATCTGAGC GATGATGC

Ulib456for (SEQ ID NO:114)

CTAAGCTTGA CCTTTCAG

V = A or G or C

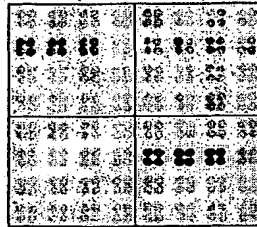
M = A or C

B = G or C or T

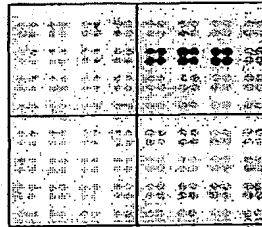
K = G or T

FIG. 4

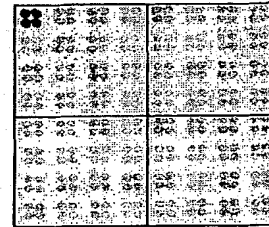
**I-Crel K28 N30 Y33
Q38 S40 S70 D75
(I-Crel D75)**



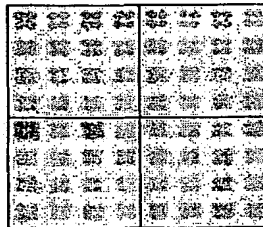
**I-Crel K28 N30 Y33
Q38 S40 S70 N75
(I-Crel N75)**



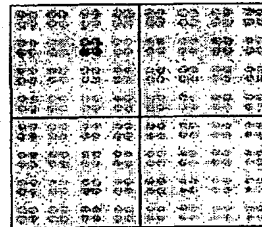
**I-Crel K28 R30 G33
T38 S40 R70 N75**



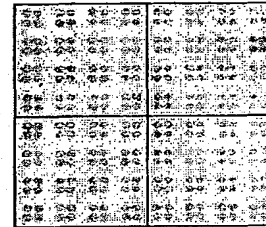
**I-Crel N28 N30 S33
R38 K40 S70 N75**



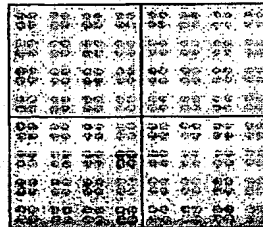
**I-Crel Q28 N30 K33
R38 T40 S70 N75**



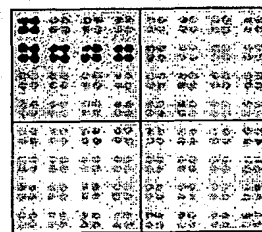
**I-Crel K28 N30 R33
Q38 E40 S70 N75**



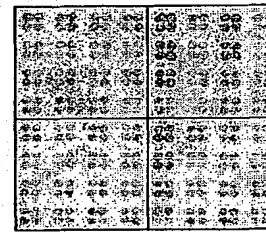
**I-Crel R28 N30 A33
Y38 Q40 S70 N75**



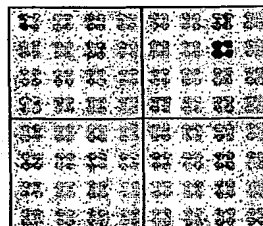
**I-Crel K28 N30 H33
Q38 S40 R70 N75**



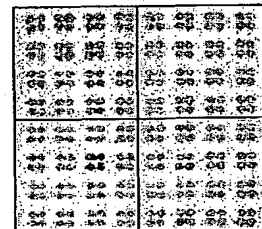
**I-Crel K28 D30 R33
G38 S40 R70 N75**



**I-Crel Q28 N30 Y33
Q38 R40 S70 N75**



**I-Crel N28 N30 Y33
R40 S70 N75**



**I-Crel R28 N30 Y33
A40 S70 N75**

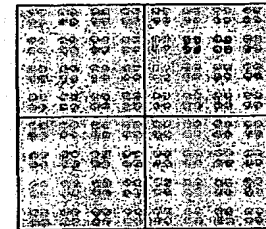


FIG. 5A

GGG 618	GGA 246	GGT 290	GGC 31	AGG 502	AGA 194	AGT 295	AGC 135
GAG 686	GAA 422	GAT 524	GAC 313	AAG 936	AAA 616	AAT 821	AAC 478
GTG 249	GTA 119	GTT 134	GTC 78	ATG 348	ATA 116	ATT 190	ATC 54
CGG 142	GCA 124	GCT 130	GCC 103	ACG 163	ACA 178	ACT 201	ACC 202
TGG 322	TGA 141	TGT 203	TGC 165	CGG 288	CGA 64	CGT 107	CGC 76
TAG 589	TAA 282	TAT 372	TAC 318	CAG 396	CAA 230	CAT 224	CAC 121
TTG 201	TTA 124	TTT 133	TTC 125	CTG 145	CTA 47	CTT 41	CTC 3
TCG 68	TCA 23	TCT 59	TCC 38	CCG 28	CCA 15	CCT 33	CCC 5

FIG. 5B

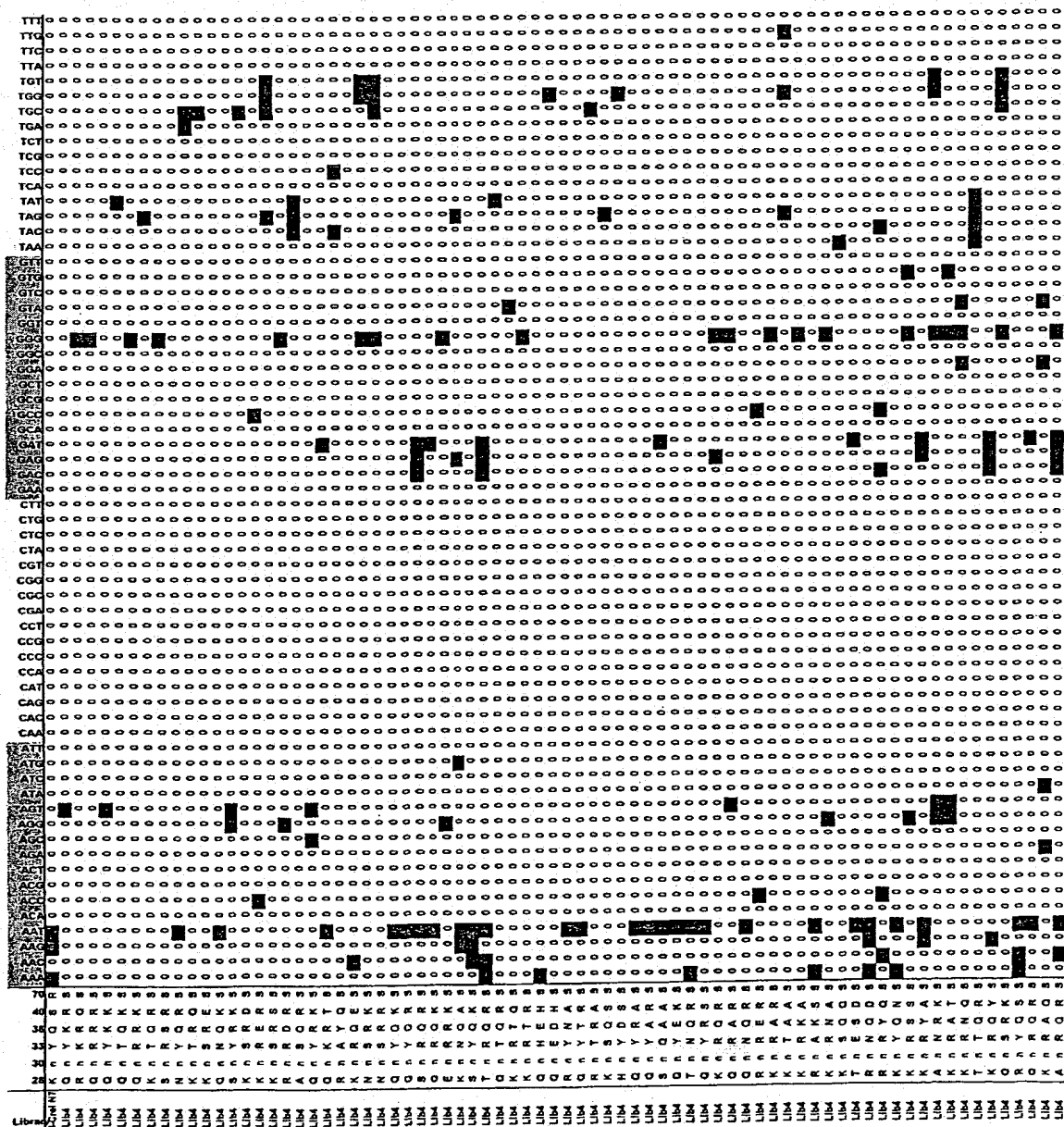


FIG. 6

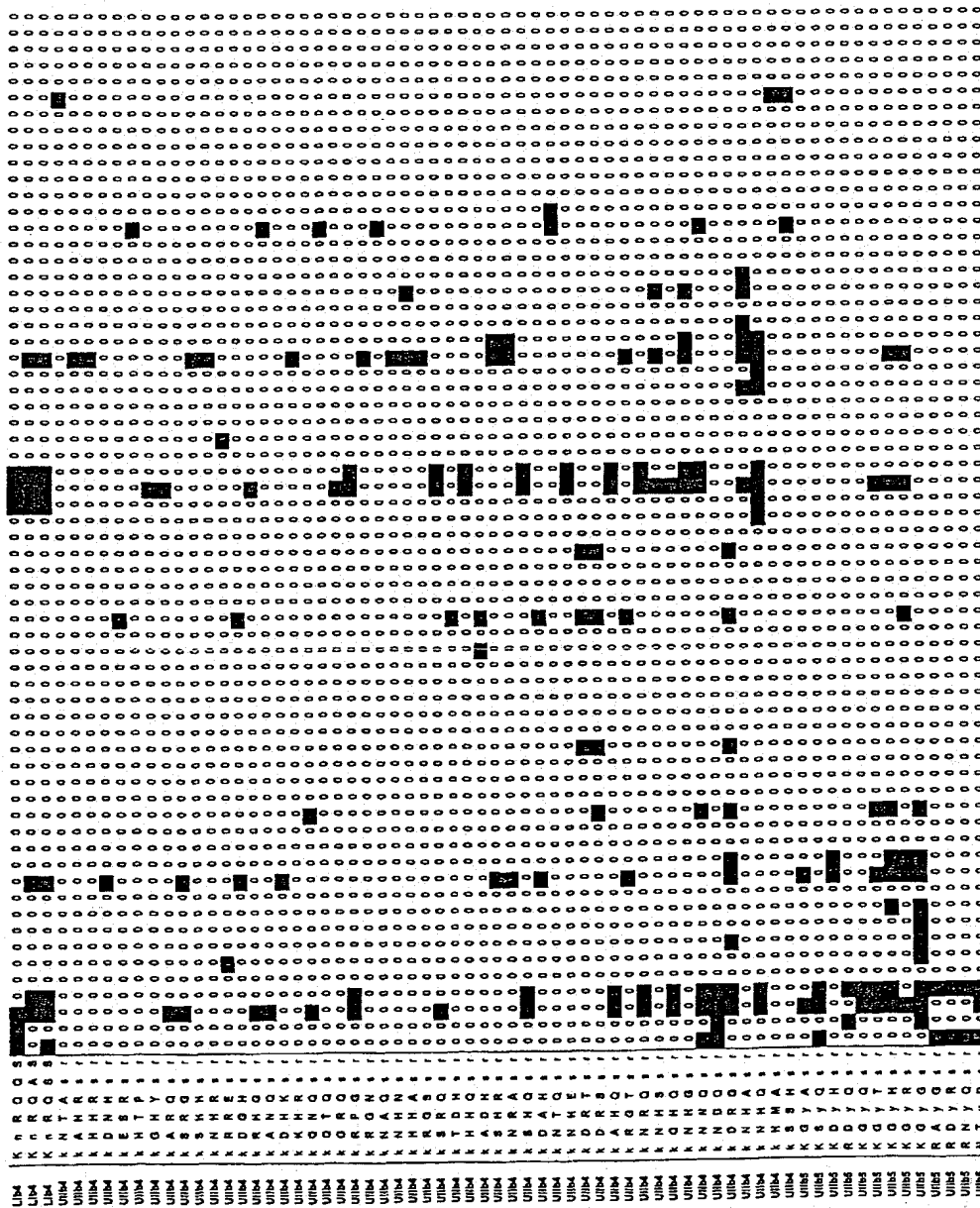


FIG. 6 (CONTINUAÇÃO)

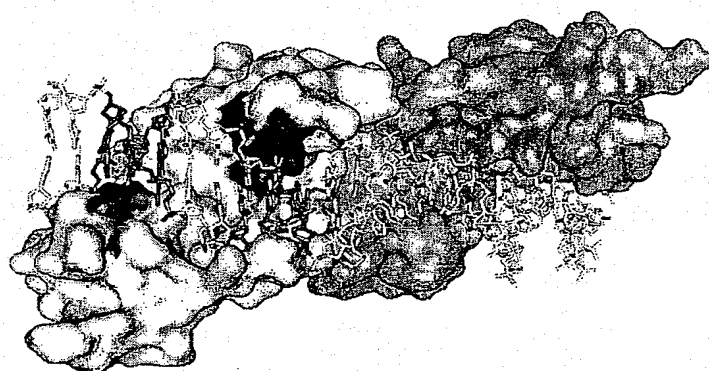


FIG. 7

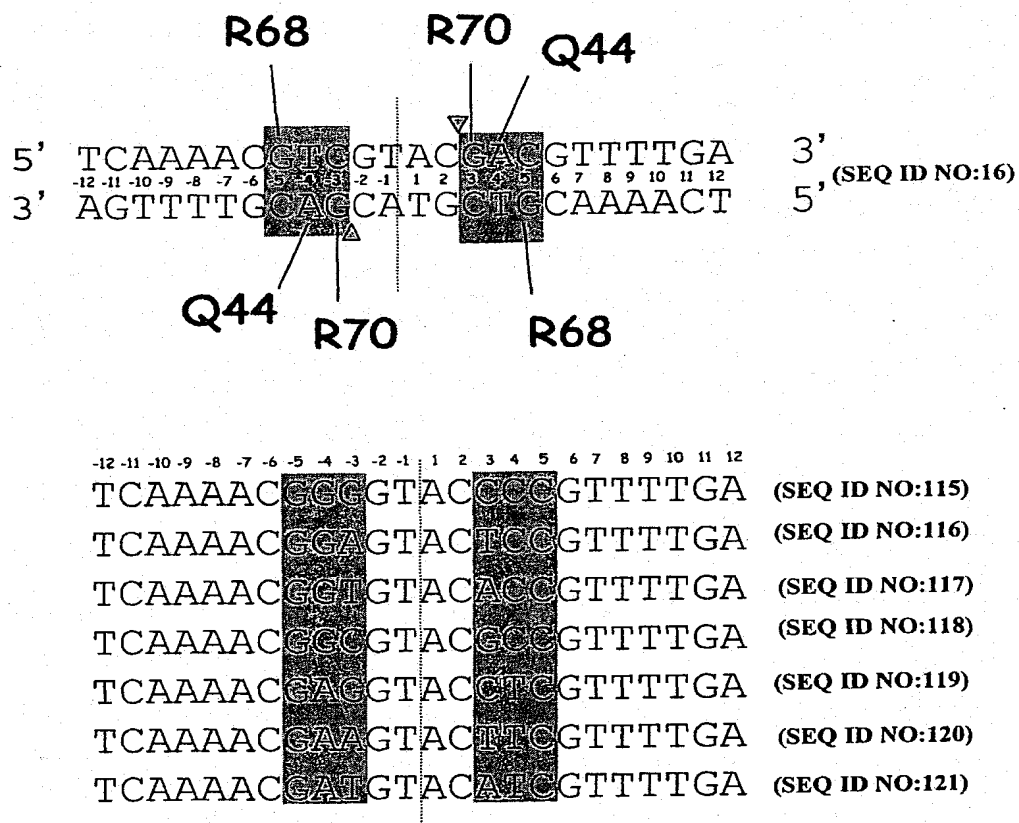
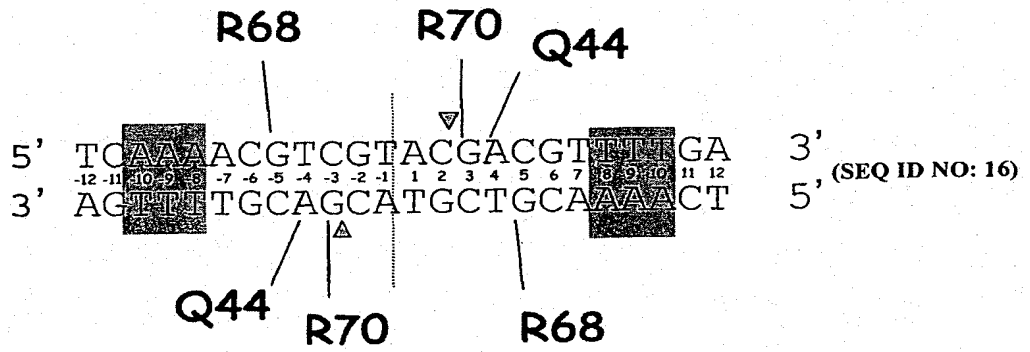


FIG. 8A



-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
T	C	G	G	G	A	C	G	T	C	G	T	A	C	G	A	C	G	T	C	C	C	G	A	(SEQ ID NO: 122)
T	C	G	G	A	C	G	T	C	G	T	A	C	G	A	C	G	T	T	C	C	G	A	(SEQ ID NO: 123)	
T	C	G	G	T	A	C	G	T	C	G	T	A	C	G	A	C	G	T	A	C	C	G	A	(SEQ ID NO: 124)
T	C	G	C	C	A	C	G	T	C	G	T	A	C	G	A	C	G	T	G	C	C	G	A	(SEQ ID NO: 125)
T	C	G	A	G	A	C	G	T	C	G	T	A	C	G	A	C	G	T	C	T	C	G	A	(SEQ ID NO: 126)
T	C	G	A	A	A	C	G	T	C	G	T	A	C	G	A	C	G	T	T	T	C	G	A	(SEQ ID NO: 127)
T	C	G	A	T	A	C	G	T	C	G	T	A	C	G	A	C	G	T	A	T	C	G	A	(SEQ ID NO: 128)

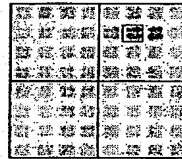
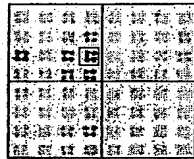
FIG. 8B

C

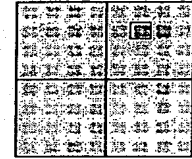
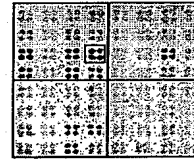
GGG GGA GGT GGC	AGG AGA AGT AGC
GAG GAA GAT GAC	AAG AAA AAT AAC
GTG GTA GTT GTC	ATG ATA ATT ATC
GCG GCA GCT GCC	ACG ACA ACT ACC
TGG TGA TGT TGC	CGG CGA CGT CGC
TAG TAA TAT TAC	CAG CAA CAT CAC
TTG TTA TTT TTC	CTG CTA CTT CTC
TCG TCA TCT TCC	CCG CCA CCT CCC

D

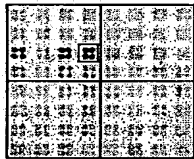
QRR



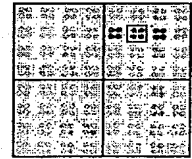
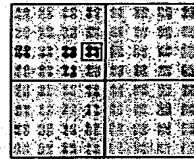
QRA



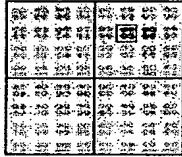
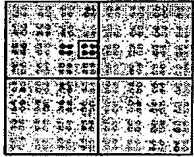
QSK



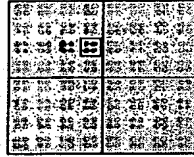
QTK



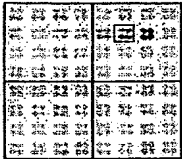
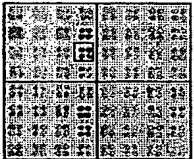
QAR



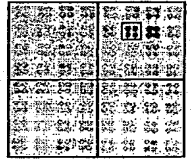
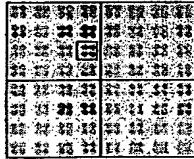
QNR



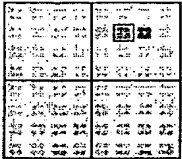
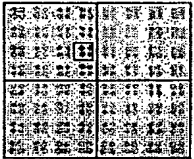
TRR



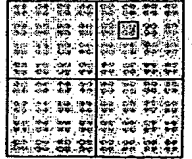
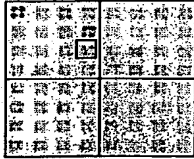
NRR



ERR



DRR



Alvos mutados em ± 5 para ± 3 Alvos mutados em ± 10 para ± 8

Alvos mutados em ± 5 para ± 3 Alvos mutados em ± 10 para ± 8

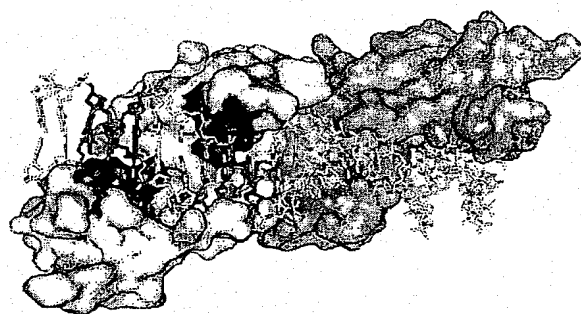


FIG. 9

C1221	(T) CAAAACGTCGTACGACGTTTGG (A) (SEQ ID NO: 16)
10GAG_P	(T) CGAGACGTCGTACGACGTCGCG (A) (SEQ ID NO: 17)
10CAT_P	(T) CCATACGTCGTACGACGTATCG (A) (SEQ ID NO: 18)
5CTT_P	(T) CAAAACCTTGTACAAGGTTTGG (A) (SEQ ID NO: 19)
HprCH3	CGAGATGTCATGAAGAGATCG (SEQ ID NO: 4)
HprCH3.2	CGAGATGTCGTACAAGAGATCG (SEQ ID NO: 20)
HprCH3.3	CGAGATGTCGTACGACATCTCG (SEQ ID NO: 21)
HprCH3.4	CCATCTCTTGTACAAGAGATCG (SEQ ID NO: 22)

FIG. 10

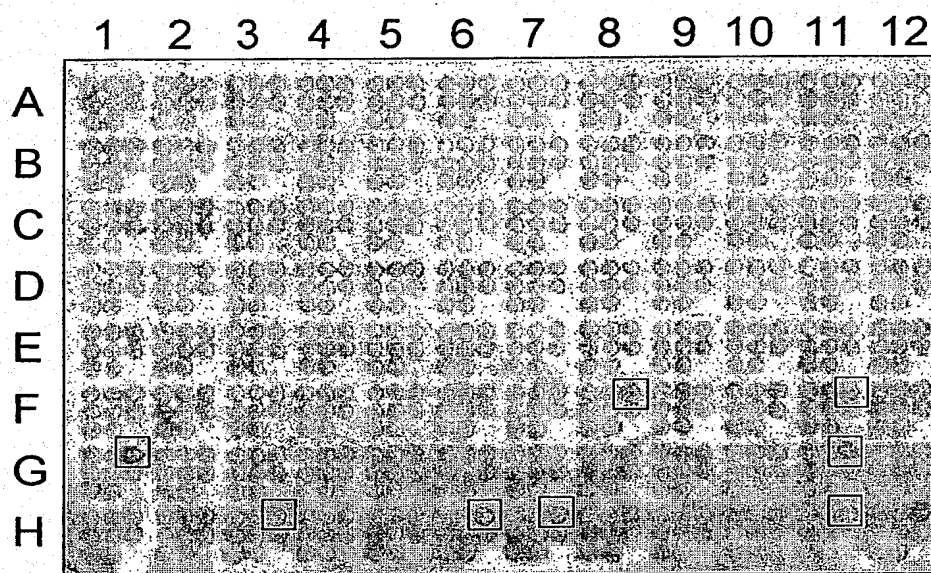


FIG. 11

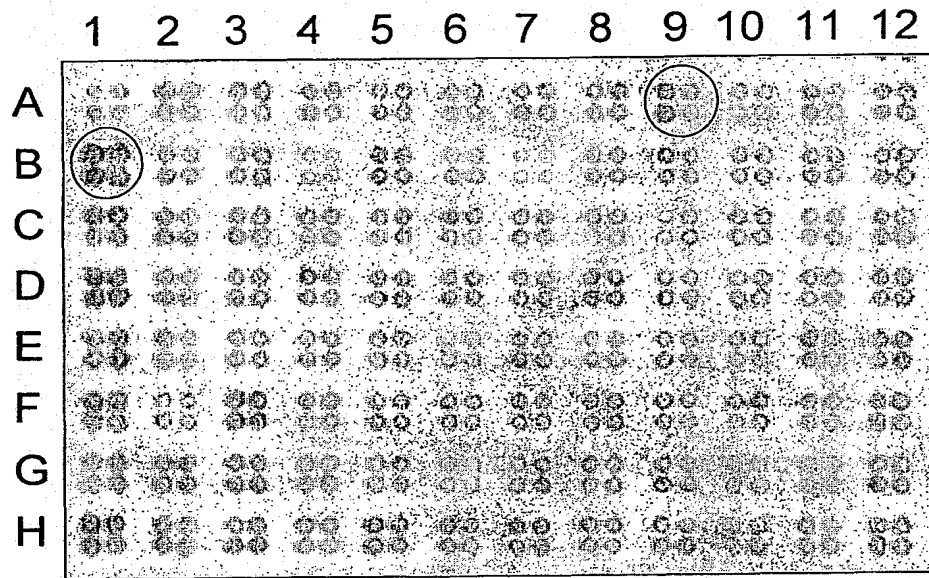


FIG. 12

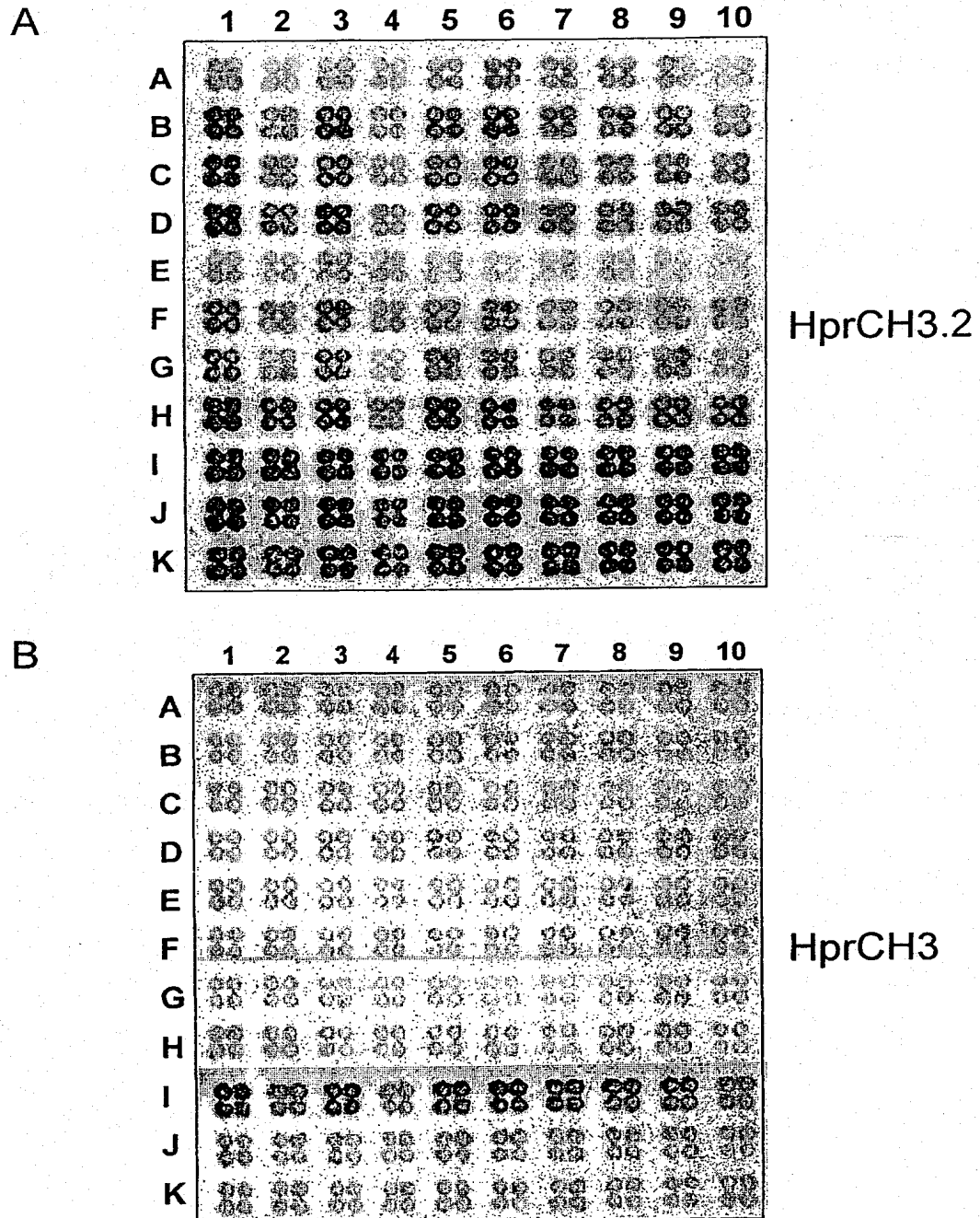


FIG. 13

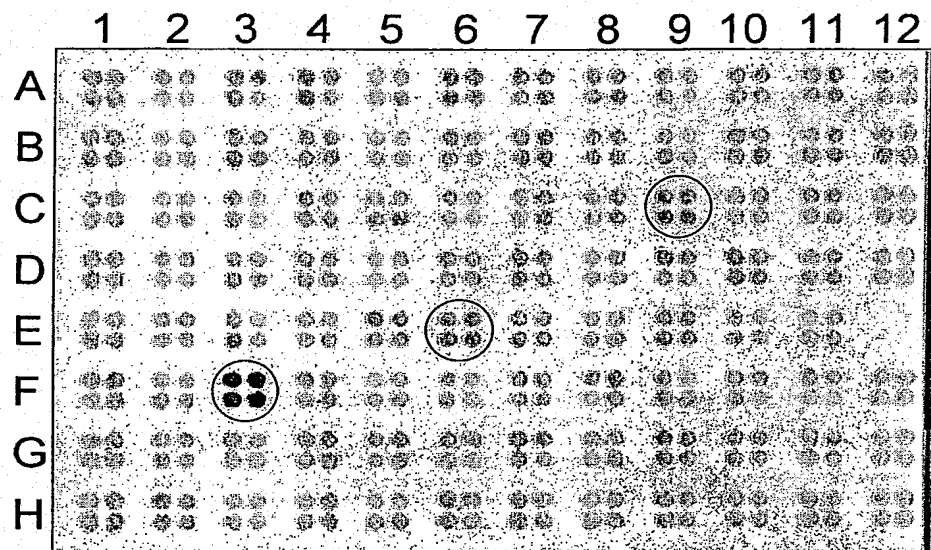


FIG. 14

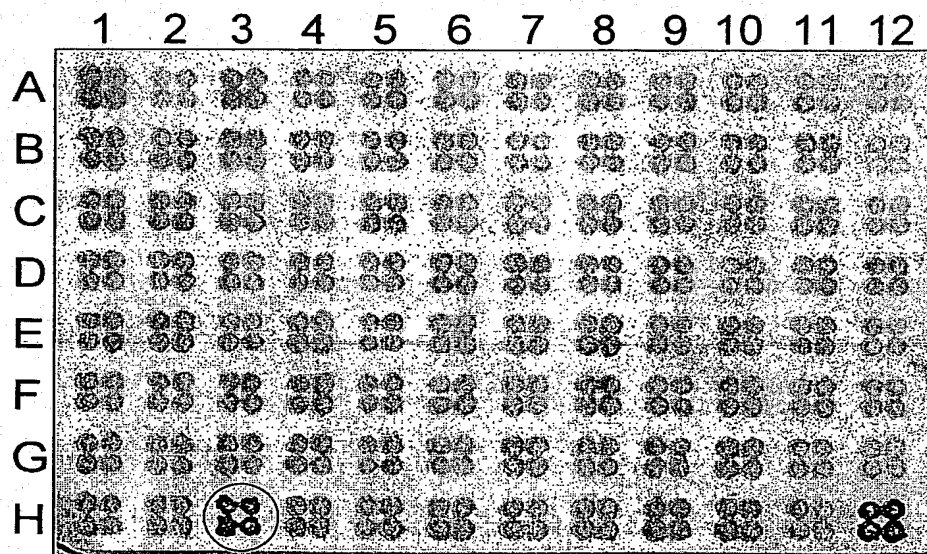
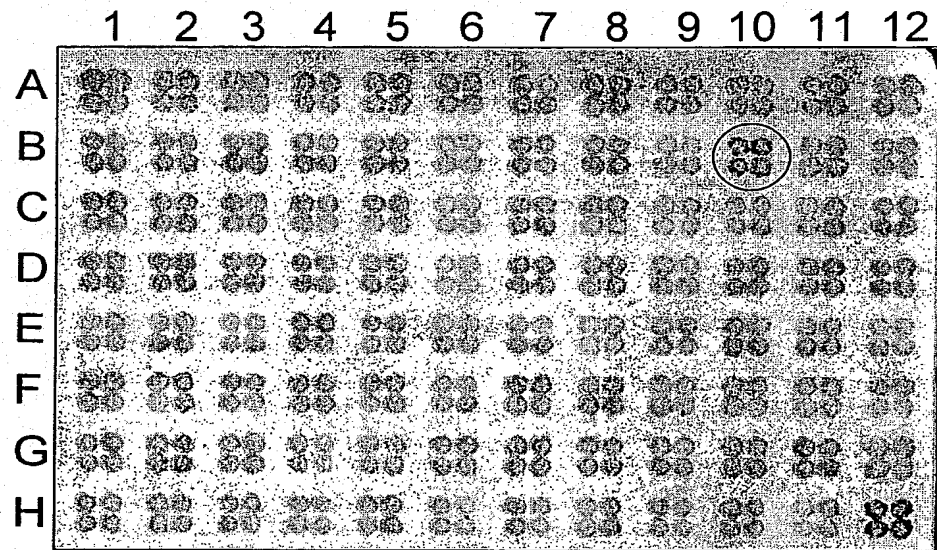


FIG. 15

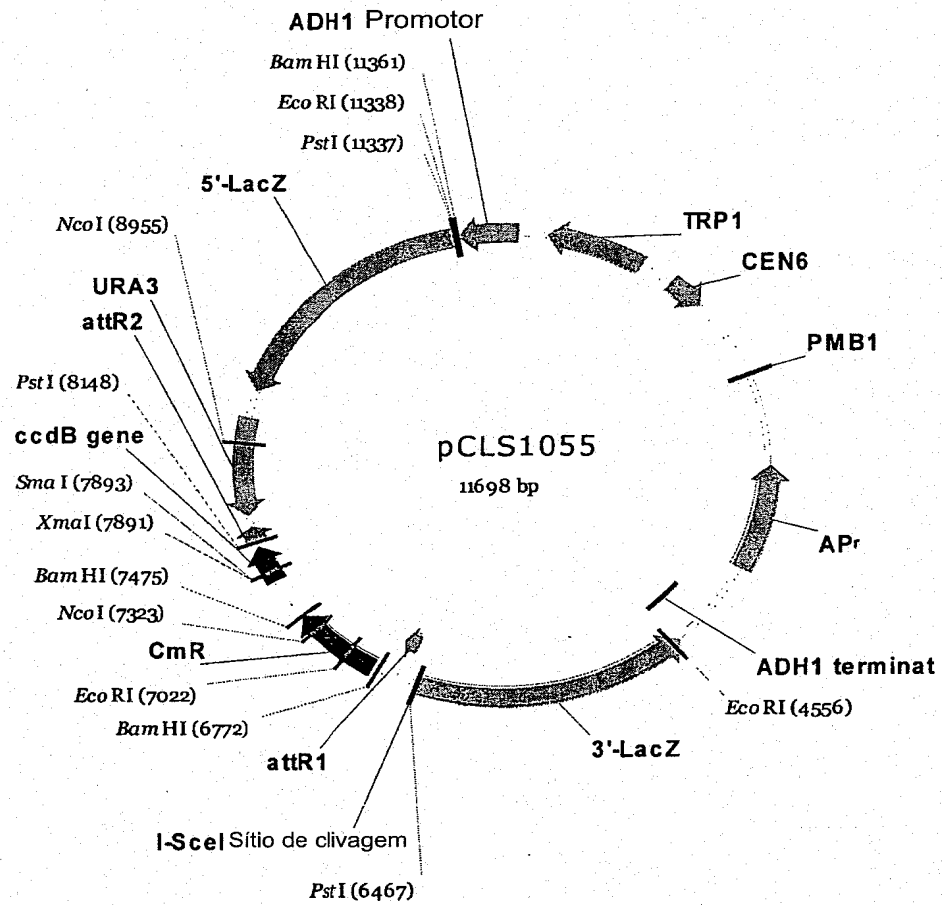


FIG. 16

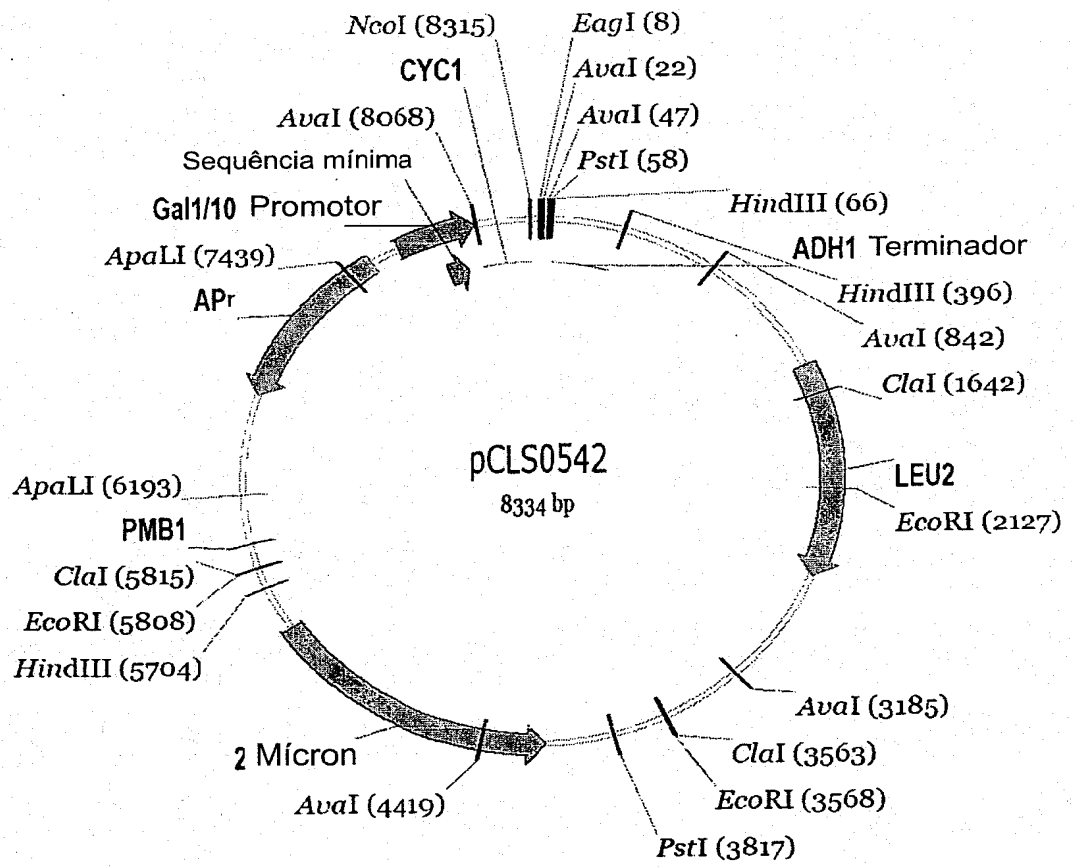


FIG. 17

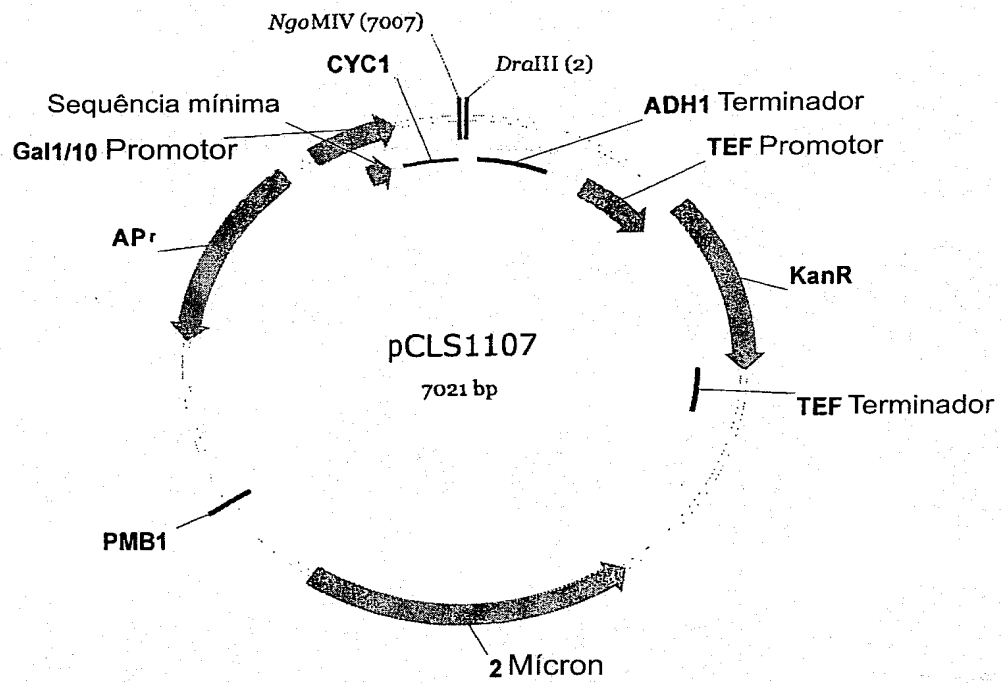


FIG. 18

Sequência alvo			Primeiro / segundo Monômero		Segundo / segundo Monômero	
Início	Fim	Sequência de nucleotídeo	SEQ ID NO :	Aminoácidos nas posições indicadas	SEQ ID NO :	
72	93	ccagccgaccgattccgtcatg	1	28K30Q32D33Y38Q40S44N68K70S75R77T	83	
			2	28K30D32S33R38Q40S44N68Q70S75S77V	84	
			3	28K30T32S33G38Q40S44Q68R70S75R77Y	85	
159	180	tattctaatcactatgicgag				
198	219	tattctcatggagtgattatg				
241	262	cgagatgcatgaagagatgg	32		28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
					28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R	
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S44Q68R70S75D77R					
	28K30N32S33Y38Q40S					

Sequência alvo			Primeiro / segundo Monômero		Segundo / segundo Monômero	
Início	Fim	Sequência de nucleotídeo	SEQ ID NO.:	Aminoácidos nas posições indicadas	SEQ ID NO.:	Aminoácidos nas posições indicadas
241	262	cgagatgcatgaagacagtg	4			
				28K3ON32S33H38Q40S44Q66C68R70R75D77I137V155R162P	75	
				9L28K3ON32S33H38Q40S44Q68R70R75D77I100I09V154G155P161P	76	
				2Y28K3ON32S33H38Q40S44Q68R70R75D77I109V125A	77	
				28K3ON32S33H38Q40S44Q68R70R75D77I113S136S	78	
				2I28K3ON32S33H38Q40S44Q68R70R75D77I81R1V86I110G131R135Q151A157V	79	28K3ON32S33T38V40S44K66Y70S75E77V
				28K3ON32S33H38Q40S44Q68R70R75D77I103I129A130G	80	
				28K3ON32S33H38Q40S44Q68R69V70R75D77I82R90R120V139R158M	81	
				28K3ON32S33H38Q40S44Q64L68R70R75D77I86D100R104M105A136S159R	82	
				28K3ON32S33H38Q40A4A3L544Q68R70R75D77I	147	28K3ON32T33H38Q40S44R68Y70S72T75N77N
				28K3ON32T33Y38W40S44N68R70S75Y77I	86	28K3OR32S33T33B40S44Q68H70H75N77I
				28K3ON32S33T38Q40A44N68K70S75R77T	87	28K3ON32S33H38T40S44N68R70N75N77I
				28K3ON32S33H38S40S44R68R70S75N77D	88	28K3ON32S33G38Q40Q44Q68A70K75N77I
				28K3ON32S33G38T40S44N68K70S75H77F	89	28K3OC32S33T38Q40S44Q68Y70S75R77Q
281	302	ccctctgtgtcgaagcg-gggg	5	28K3ON32T33H38Q40A4A3L544Q68R70R75D77I	148	
313	334	tgttgagacctgtgattaca	6		96	
318	339	tgtacctgtgattaccattaaa	7		100	
372	393	catgtcgtgtagattttacaga	8		101	
501	522	tgtacctgtgttaaaacaaatgcga	9		102	
529	550	ctttcccggttcaacgcgtlaca	10		103	
530	551	tttcccggttcaacgcgtlaca	11		104	
626	647	tgtgtttgaaatftccagatcaa	12		105	
708	729	tgtcatgtgaactgttggaata	13		106	
745	766	taaatgtgagatftcattgttaa	14		107	
					108	

FIG. 19 (CONTINUAÇÃO)

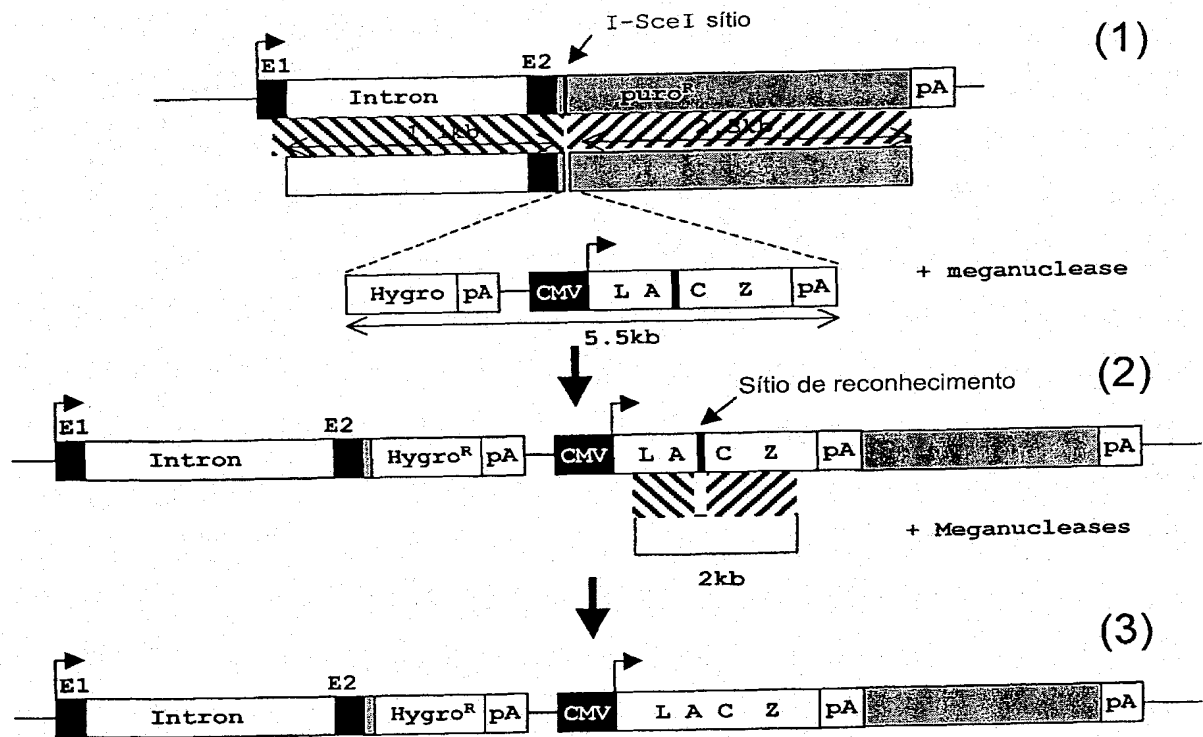


FIG. 20

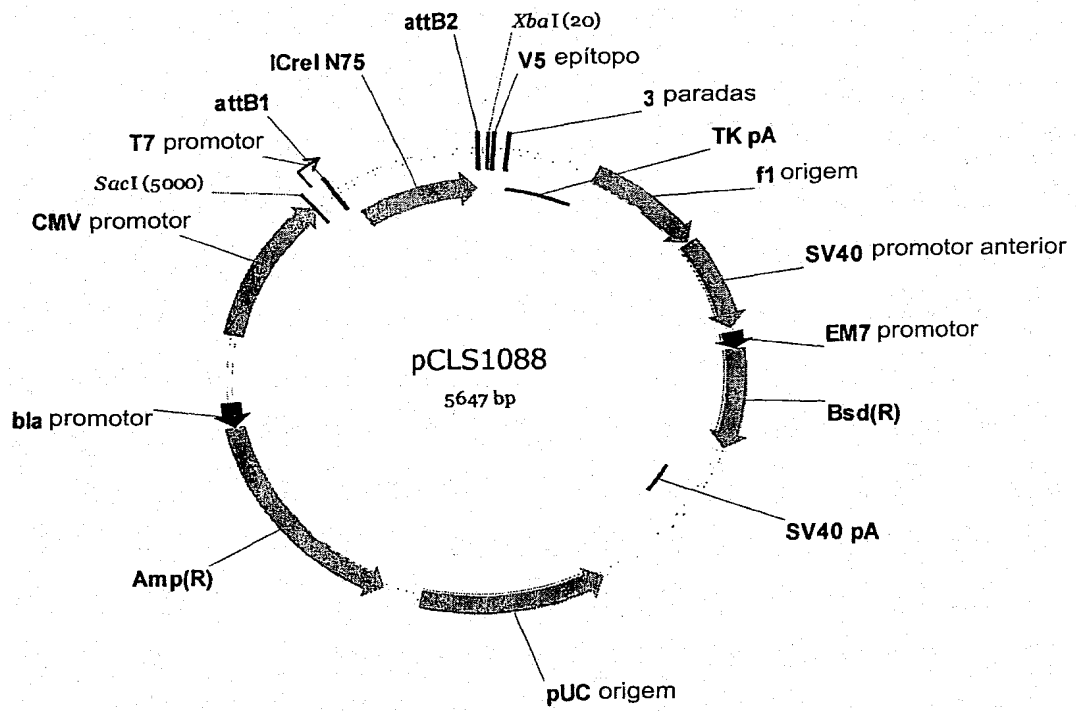


FIG. 21

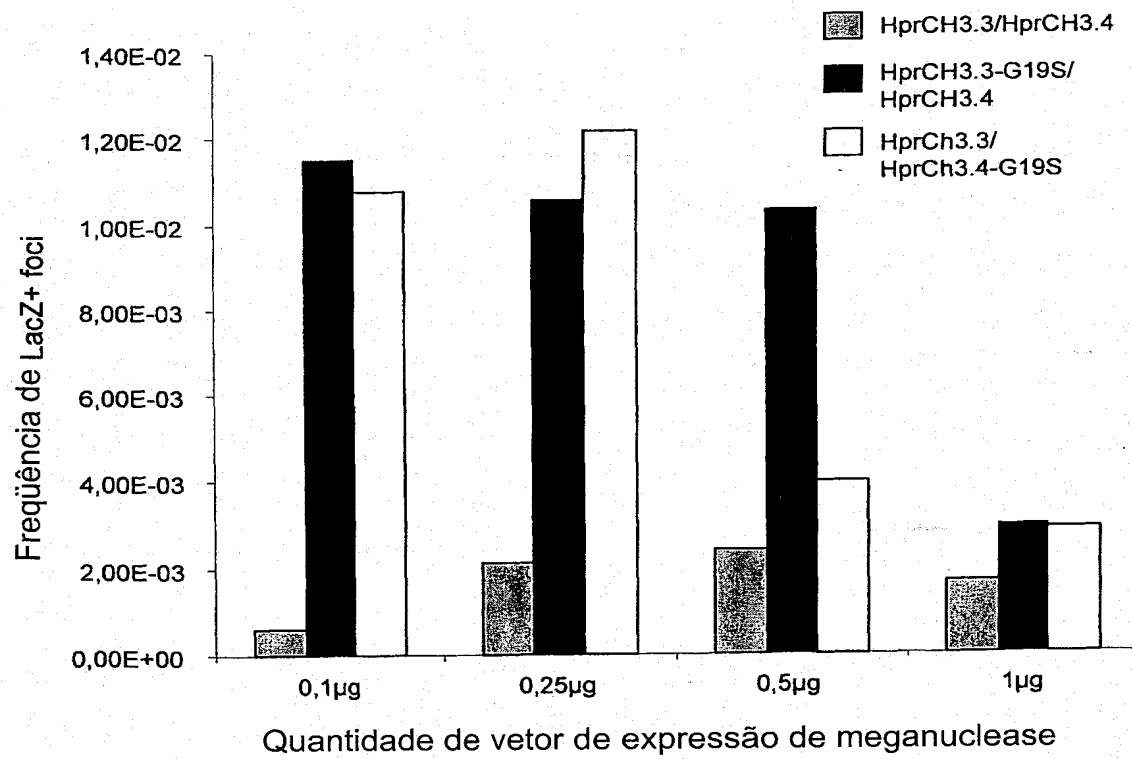


FIG. 22

RESUMO

Patente de Invenção: **"VARIANTES MEGANUCLEASE QUE CLIVAM UMA OU SEQUÊNCIA ALVO DE DNA A PARTIR DO GENE HPRT E USOS DAS MESMAS"**.

- 5 A presente invenção refere-se a uma variante I-Crel ou um derivado de cadeia simples que tem pelo menos uma substituição em um dos dois subdomínios do domínio núcleo LAGLIDADG situado a partir das posições 26 a 40 e 44 a 77 de I-Crel, e sendo capaz de clivar uma ou sequência alvo de DNA a partir do gene HPRT tendo uma sequência de nucleotídeo de
- 10 SEQ ID NO: 1 a 14. Uso da variante para induzir uma modificação de local específico no gene HPRT, para finalidade terapêutica (terapia de gene de Síndrome de Lesch-Nyhan) ou não-terapêutica (engenharia de animais transgênicos e linhagens de células recombinantes).