

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 824 024**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2013 PCT/US2013/064384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14059173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2013 E 13845951 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 2906684**

54 Título: **Compuestos modificadores de células T y usos de los mismos**

30 Prioridad:

10.10.2012 US 201261712028 P

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

11.05.2021

73 Titular/es:

**SANGAMO THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
7000 Marina Blvd
Brisbane, CA 94005, US**

72 Inventor/es:

**GREGORY, PHILIP D. y
HOLMES, MICHAEL C.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 824 024 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos modificadores de células T y usos de los mismos

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente descripción se encuentra en el campo de la edición de genoma y la terapéutica.

10 ANTECEDENTES

10 **[0002]** Las nucleasas manipuladas, incluidas las nucleasas con dedos de zinc, las TALEN y las endonucleasas
autodirigidas diseñadas para unirse específicamente a sitios de ADN diana, son útiles en la ingeniería del genoma.
Por ejemplo, las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) son proteínas que comprenden dedos de zinc específicos de un
sitio modificados genéticamente fusionados a un dominio de nucleasa. Tales ZFN y TALEN se han utilizado con éxito
15 para la modificación del genoma en una variedad de especies diferentes. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de
Patente de EE.UU. 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231;
20110301073; 20130177983; 20130177960; Solicitud Provisional de EE.UU. N° 61/823,689 (correspondiente a la
Publicación de EE.UU. N° 20150056705) y Publicación Internacional WO 07/014275. Estas nucleasas manipuladas
pueden crear una ruptura de doble hebra (DSB) en una secuencia de nucleótidos específica, lo que aumenta la
frecuencia de recombinación homóloga en el locus objetivo en más de 1000 veces. Por tanto, las nucleasas
modificadas genéticamente se pueden utilizar para explotar el sistema de reparación dirigida por homología (HDR) y
facilitar la integración dirigida de transgenes en el genoma de las células. Además, la reparación inexacta de un DSB
específico de un sitio mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) también puede resultar en la alteración
del gen.

25 **[0003]** El receptor de muerte programada (PD1 o PD1, también conocido como PDCD1) se ha demostrado estar
involucrado en la regulación del equilibrio entre la activación de las células T y la tolerancia de las células T en
respuesta a los antígenos crónicos, y está codificado por uno de un grupo de genes conocidos como genes de puntos
de control inmunológicos. Las proteínas codificadas por estos genes participan en la regulación de la amplitud de las
respuestas inmunes. Tras la activación de las células T, se induce la expresión de PD1 en las células T. Los ligandos
para el receptor PD1 son el ligando PD1 (PDL1 también conocido como B7-H1 y CD272) y PDL2 (también conocido
como B7-DC y CD273), y normalmente se expresan en células presentadoras de antígeno. El acoplamiento PD1-PDL
(ligando PD1) provoca la desactivación de la célula T y participa en la inducción de la tolerancia de la célula T (ver,
Pardoll (2012) Nat Rev 12: 252). Durante la infección por VIH1, se ha encontrado que la expresión de PD1 aumenta
35 en las células T CD4+ y la expresión de PDL1 aumenta en las APC, inclinando el equilibrio entre la inhibición de las
células T y la estimulación de las células T hacia la inhibición de las células T (ver Freeman et al. (2006) J Exp Med
203 (10): 2223-2227). Se cree que la regulación positiva de PD1 está ligada de alguna manera al agotamiento de las
células T (definida como una pérdida progresiva de funciones efectoras clave) cuando se observa una disfunción de
las células T en presencia de exposición crónica a antígenos, como es el caso de la infección por VIH. La regulación
positiva de PD1 también puede estar asociada con un aumento de la apoptosis en estos mismos conjuntos de células
40 durante la infección viral crónica (véase Petrovas et al, (2009) J Immunol. 183 (2): 1120-32). El PD1 también puede
desempeñar un papel en el escape específico del tumor de la vigilancia inmunitaria. Se ha demostrado que la PD1 se
expresa en gran medida en linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos de tumores tanto en la leucemia mielógena
crónica (LMC) como en la leucemia mielógena aguda (LMA). La PD1 también se regula al alza en linfocitos T infiltrantes
de melanoma (LIT) (véase Dotti (2009) Blood 114 (8): 1457-58). Se ha encontrado que los tumores expresan el ligando
PD1 PD-L1 o, más raramente, el ligando PD1 PDL2 que, cuando se combina con la regulación positiva de PD1 en
LTC, puede ser un factor contribuyente en la pérdida de la funcionalidad de las células T y la incapacidad de los LTC
para mediar en una respuesta antitumoral eficaz. Los investigadores han demostrado que en ratones infectados
crónicamente con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), la administración de anticuerpos anti-PD1 bloqueó
50 la interacción PD1-PDL y fue capaz de restaurar parte de la funcionalidad de las células T (proliferación y secreción
de citocinas), lo que llevó a una disminución de la concentración de carga viral (Barber et al (2006) Nature 439 (9):
682-687). Además, se ha probado un anticuerpo monoclonal IgG4 específico de PD-1 completamente humano en la
clínica en un entorno oncológico en pacientes con una variedad de antecedentes de enfermedad (melanoma
avanzado, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal o cáncer de
próstata). Se observó actividad clínica en pacientes con melanoma, cáncer de pulmón de células renales y de células
55 no pequeñas, y los datos preliminares sugirieron que la detección de la expresión del ligando PD1 por el tumor antes
del tratamiento se correlacionó con el resultado clínico (consulte Wolfe (2012) Oncology Business Review, julio; y
Pardoll, ibid).

60 **[0004]** Otro modulador de la actividad de las células T es el receptor CTLA-4, y que también se considera un gen fr
punto de control inmunológico. Similarmente al coestimulador del receptor de células T CD28, CTLA-4 interactúa con
los ligandos CD80 y CD86 en las células presentadoras de antígenos. Pero mientras que la interacción de estos
antígenos con CD28 provoca la activación de las células T, la interacción de CD80 o CD86 con CTLA-4 antagoniza la
activación de las células T al interferir con la secreción de IL-2 y la expresión del receptor de IL-2, e inhibir la expresión
de componentes del ciclo celular críticos. CTLA-4 no se encuentra en la superficie de la mayoría de las células T en
65 reposo, pero se regula al alza de forma transitoria después de la activación de las células T. Por tanto, CTLA-4 también

participa en el equilibrio de la actividad de activación e inhibición de las células T (véase Attia et al. (2005) J Clin Oncol, 23 (25): 6043-6053). Los estudios clínicos iniciales que involucraron el uso de anticuerpos CTLA 4 en sujetos con melanoma metastásico encontraron regresión de la enfermedad (Attia, *ibid*), pero estudios posteriores encontraron que los sujetos tratados con los anticuerpos exhibieron efectos secundarios de la terapia (eventos adversos relacionados con el sistema inmunológico: erupciones, colitis, hepatitis, etc.) que parecían estar relacionados con una ruptura de la auto-tolerancia. El análisis de estos datos sugirió que una mayor regresión tumoral como resultado del anticuerpo anti-CTLA4 se correlacionó directamente con una mayor gravedad de los eventos adversos inmunorrelacionados (Weber (2007) Oncologist 12 (7): 864-872).

[0005] Receptores de antígeno quiméricos (CAR) son moléculas diseñadas para dirigirse a las células inmunes a dianas moleculares específicas expresadas en las superficies celulares. En su forma más básica, son receptores introducidos en una célula que acoplan un dominio de especificidad expresado en el exterior de la célula a vías de señalización en el interior de la célula, de modo que cuando el dominio de especificidad interactúa con su diana, la célula se activa. A menudo, los CAR se fabrican a partir de variantes de receptores de células T (RCT) en las que un dominio de especificidad, como un scFv o algún tipo de receptor, se fusiona con el dominio de señalización de un RCT. Estas construcciones se introducen luego en una célula T permitiendo que la célula T se active en presencia de una célula que exprese el antígeno diana, lo que da como resultado el ataque de la célula T activada a la célula diana de una manera no dependiente del MHC. (véase Chicaybam et al. (2011) Int Rev Immunol 30: 294-311). Actualmente, se están probando en la clínica CAR específicos a tumores dirigidos a una variedad de antígenos tumorales para el tratamiento de una variedad de cánceres diferentes. Ejemplos de estos cánceres y sus antígenos que están siendo atacados incluyen linfoma folicular (CD20 o GD2), neuroblastoma (CD171), linfoma no Hodgkin (CD20), linfoma (CD19), glioblastoma (IL13R α 2), leucemia linfocítica crónica o LLC y leucemia linfocítica o ALL (ambos CD19). También se han desarrollado CAR específicos de virus para atacar células que albergan virus como el VIH. Por ejemplo, se inició un ensayo clínico utilizando un CAR específico para Gp100 para el tratamiento del VIH (Chicaybam, *ibid*).

[0006] La terapia celular adoptiva (TCA) es una forma en desarrollo de terapia contra el cáncer basada en la administración de células inmunitarias específicas del tumor a un paciente para que las células administradas ataquen y eliminen el cáncer del paciente. TCA a menudo implica el uso de linfocitos infiltrantes de tumores (LIT) que son células T que se aíslan de las masas tumorales del propio paciente y se expanden *ex vivo* para reinfundirlas nuevamente en el paciente. Este enfoque ha sido prometedor en el tratamiento del melanoma metastásico, donde en un estudio, se observó una tasa de respuesta a largo plazo de >50% (ver, por ejemplo, Rosenberg et al (2011) Clin Canc Res 17 (13): 4550). Los LIT son una fuente prometedora de células porque son un conjunto mixto de las propias células del paciente que tienen receptores de células T (RCT) específicos para los antígenos asociados al tumor (TAA) presentes en el tumor (Wu et al (2012) Cancer J 18 (2): 160). Sin embargo, como se indicó anteriormente, los LIT a menudo se regulan positivamente para la expresión de PD1, presumiblemente debido a la expresión de PDL en los tumores, lo que da como resultado una población de células que pueden dirigirse a una célula cancerosa específica e infiltrar un tumor, pero luego no pueden matar la células cancerosas. Los estudios *in vitro* han demostrado un aumento significativo en la proliferación de LIT en respuesta a su antígeno tumoral afín en presencia de anticuerpos anti-PD1 en comparación con la estimulación en ausencia del anticuerpo anti-PD1 (Wu et al, *ibid*).

[0007] Por muy útil que sea el desarrollo de una tecnología que hará que una célula T re-dirija su atención a células específicas, tales como células de cáncer, sigue existiendo el problema de que estas células diana a menudo expresan ligando de PD-1. Como tal, la interacción PD1-PD-L1/PDL2 permite que el tumor escape de la acción de las células T dirigidas a CAR desactivando las células T y aumentando la apoptosis y el agotamiento celular. Además, las interacciones PD1-PDL también están implicadas en la represión de la respuesta de las células T al VIH, donde el aumento de la expresión de PD1 y PDL conduce al agotamiento de las células T. La inducción de la expresión de CTLA-4 en las células T activadas es también uno de los primeros pasos para amortiguar la respuesta inmune y, por lo tanto, una célula T armada con un CAR podría volverse inactiva debido a la participación de este sistema diseñado para equilibrar la activación de células T con inhibición de células T.

[0008] Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de moduladores orientados a PD1 y/o CTLA-4, por ejemplo nucleasas orientadas a PD1 y/o CTLA-4 o represores de transcripción que pueden ser utilizadas en investigación y aplicaciones terapéuticas. El documento US 2011/0158957 describe la alteración dirigida de genes del receptor de células T usando nucleasas de dedos de zinc modificadas genéticamente. Berger et al. (Current Opinion in Immunology (2009) 21 (2): 224-232) proporciona una revisión de la transferencia adoptiva de células T específicas de virus y de tumores aisladas o modificadas como terapias potenciales.

SUMARIO

[0009] La invención proporciona una célula T modificada genéticamente que expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde una secuencia exógena que codifica una CAR se integra en el genoma de la célula T usando una o más nucleasas, y además en donde la expresión de un gen del receptor de muerte programada endógeno PDCD1 (PD1) o un gen CTLA-4 endógeno se reprime en la célula T mediante modificación genética usando una nucleasa dirigida para PD1 o CTLA-4.

5 [0010] La invención también proporciona un método de fabricación de la célula T de la invención, comprendiendo el método: (i) la integración de la secuencia exógena que codifica la CAR en el genoma de la célula T usando una o más nucleasas; y (ii) reprimir la expresión de un gen del receptor de muerte programada endógeno PDCD1 (PD1) o un gen CTLA-4 endógeno en la célula T mediante modificación genética usando una nucleasa dirigida para PD1 o CTLA-4, en donde la secuencia exógena que codifica la CAR se inserta en un gen de puerto seguro mediante integración dirigida.

10 [0011] La invención proporciona además una célula T genéticamente modificada de la invención para uso en el tratamiento de cáncer.

15 [0012] La presente descripción se refiere al desarrollo de nucleasas dirigidas al punto de control inmunológico, por ejemplo, por meganucleasas modificadas, sistemas de nucleasa CRISPR/Cas, nucleasas de dedos de zinc (ZFNs) y nucleasas TALE (TALENs) para la inactivación de PD1 y/o CTLA-4, opcionalmente en combinación con receptores de antígenos quiméricos modificados genéticamente (CAR) y/o receptores de células T modificados genéticamente (RCT), para prevenir o reducir la inhibición de las células T. Esta divulgación también se refiere al desarrollo de represores de la transcripción, por ejemplo CRISPR/Cas-, proteínas de fusión basadas en dedos de zinc y TALE para la inactivación de PD1 y/o CTLA-4, opcionalmente en combinación con receptores de antígenos quiméricos modificados genéticamente (CAR) y/o receptores de células T modificadas (RCT), para prevenir o reducir la inhibición de las células T.

20 [0013] La presente descripción proporciona proteínas de dedos de cinc específico para humanos y roedores PD1 y proteínas de fusión, incluyendo factores de transcripción de proteína de dedos de zinc (ZFP-TFS) o nucleasas de dedos de zinc (ZFNs), que comprende estas proteínas con dedos de zinc específicas a PD1. La divulgación también proporciona proteínas con dedos de zinc específicas para CTLA-4 humano y proteínas de fusión, incluidas las nucleasas con dedos de zinc (ZFN), que comprenden estas proteínas con dedos de zinc específicas de CTLA-4. La divulgación también proporciona proteínas TALE activas específicas para PD1 humana y proteínas de fusión, incluidas las nucleasas TALE (TALEN) que comprenden estos dominios de unión al ADN de TALE específicos de PD1. En determinadas realizaciones, la proteína de dedo de zinc comprende cinco regiones de reconocimiento de dedo de zinc ordenadas de F1 a F5 desde el extremo N al terminal C, y en las que las regiones de reconocimiento comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos que se muestran en una única fila de la Tabla 2a o la Tabla 2c. En otras realizaciones, el dominio efector de TAL (TALE) comprende una pluralidad de unidades de repetición de TALE, cada unidad de repetición comprende una región Diresidue variable de repetición (RVD) que se une a un ácido nucleico en una secuencia diana, en donde TALE se une a una diana. secuencia como se muestra SEQ ID NO: 29-34 (como se muestra en la Tabla 5).

35 [0014] Las proteínas que comprenden proteínas PD1 y/o dedo de cinc específico a CTLA-4, CRISPR/Cas o TALE se pueden utilizar para fines de investigación y terapéuticos, incluyendo para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno en donde se expresa PD1 (por ejemplo, sobreexpresado), dando como resultado la inactivación o el agotamiento de las células T activadas debido a la sobreexpresión de una PDL por una célula diana y/o una enfermedad o trastorno en donde será beneficiosa la prevención de la participación de CTLA-4. Por ejemplo, un dedo de zinc, TALE y/o nucleasa CRISPR/Cas dirigidos al locus PD1 en células T pueden usarse para bloquear la supresión inmunológica dependiente de PD1 tanto en enfermedades infecciosas crónicas como en neoplasias malignas. De manera similar, el dedo de zinc, la nucleasa CRISPR/Cas TALE y/o el direccionamiento de CTLA-4 en células T pueden usarse para prevenir la inhibición de células T mediada por CTLA-4, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer. Las proteínas de fusión derivadas de un enlace de un dominio de unión al ADN de TALE y una meganucleasa también pueden dirigirse a PD1 y/o CTLA-4 para una knock down de un gen similar o knock out. Las proteínas represoras transcripcionales, derivadas de proteínas con dedos de zinc modificadas genéticamente, TALE y CRISPR/Cas fusionadas con dominios represores de la transcripción también se pueden usar para prevenir la inhibición de células T mediada por PD1 o CTLA-4.

50 [0015] En otro aspecto, las proteínas de fusión comprenden el dedo de zinc (ZFN), CRISPR/Cas o nucleasas TALE (TALEN) que son específicas para los genes humanos PD1 o CTLA-4. En ciertas realizaciones, los dominios de dedos de zinc de las proteínas de fusión de nucleasa específicas para PD-1 comprenden las hélices de reconocimiento que no ocurren naturalmente y/o se unen a los sitios diana descritos en la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20110136895 (ver Tablas 2a y 2b) y las proteínas TALE se unen a sitios diana en PD1 como se muestra en las Tablas 5a y 5b. En otras realizaciones, los dominios de dedos de zinc de las proteínas de fusión específicas de CTLA-4 comprenden las hélices de reconocimiento de origen no natural que se muestran en la Tabla 2c y/o se unen a los sitios diana que se muestran en la Tabla 3.

60 [0016] En otro aspecto, se describe en este documento un sistema CRISPR/Cas que se une al sitio diana en una región de interés en un gen PD1 o CTLA-4 en un genoma, donde el sistema CRISPR/Cas comprende una nucleasa CRISPR/Cas y un crARN/tracrARN diseñado (o guía de ARN). Véase también la Solicitud Provisional de EE.UU. 61/823,689 (correspondiente a la publicación de EE.UU. N° 20150056705).

65 [0017] En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido que codifica una nucleasa como se describe en el presente documento, por ejemplo, polinucleótidos que codifican una o más nucleasas de dedos de zinc (ZFNs), uno o más

TALeNs, una o más meganucleasas y/o una o más nucleasas CRISPR/Cas. El polinucleótido puede comprender ADN, ARN o combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, el polinucleótido comprende un plásmido. En otras realizaciones, el polinucleótido que codifica la nucleasa comprende ARNm.

5 **[0018]** En un aspecto, los métodos y composiciones de la invención comprenden células T modificadas (genéticamente modificadas). Las células T incluyen, pero no se limitan a, células T auxiliares (por ejemplo, células CD4+), células T citotóxicas (por ejemplo, CD8+), células T de memoria, células T reguladoras, linfocitos infiltrantes de tumores (LIT, CD3+) y similares. En determinadas realizaciones, las células T comprenden una nucleasa específica de PD-1 (por ejemplo, para la inactivación de PD1 en la célula), mientras que en otras realizaciones, las células T comprenden una nucleasa específica de PD-1 y al menos un donante de transgénico. En determinadas realizaciones, las células T comprenden una nucleasa específica de CTLA-4 (*p. ej.*, para la inactivación de CTLA-4 en la célula), mientras que en otras realizaciones, las células T comprenden una nucleasa específica de CTLA-4 y al menos un donante de transgén. En otras realizaciones, las células T modificadas genéticamente se modifican mediante una nucleasa tanto en un gen PD1 endógeno como en un gen CTLA-4 endógeno. En otras realizaciones más, las células T modificadas genéticamente se modifican por al menos una nucleasa en el RCT endógeno y los genes PD1 y CTLA-4 endógenos. En algunas realizaciones, el al menos un donante de transgénico codifica un receptor de anticuerpo quimérico (CAR). En determinadas realizaciones, el donante de CAR se integra en un gen PD1 y/o CTLA-4 endógeno. En algunas realizaciones, el donante de CAR se integra mediante integración dirigida en una ubicación de puerto seguro. En otras realizaciones, la secuencia exógena que codifica CAR se introduce mediante integración aleatoria usando un sistema de administración lentiviral. En otras realizaciones, el donante de CAR se introduce mediante integración aleatoria utilizando un sistema de administración basado en transposones.

25 **[0019]** En otras realizaciones, las células T comprenden al menos dos donantes de transgén. En algunas realizaciones, los al menos dos donantes de transgenes codifican subunidades de un receptor de células T (RCT), por ejemplo, TRAC y TRBC (véase la Publicación de Patente de los Estados Unidos nº 20110158957). En algunos casos, las subunidades de RCT, cuando se expresan a partir de los donantes, comprenden un RCT con especificidad para un TAA. Algunas realizaciones incluyen cadenas de RCT modificadas genéticamente diseñadas para minimizar la asociación con un RCT endógeno. En otras realizaciones, el RCT endógeno se vuelve no funcional a través de la alteración genética mediada por nucleasa modificada.

30 **[0020]** En algunas realizaciones, el donante de transgén se inserta en el locus PD1 y/o CTLA-4, de tal manera que el transgén se expresa y se interrumpe la expresión de PD1 o CTLA 4. En otras realizaciones, las células T diseñadas comprenden la nucleasa específica de PD1 o CTLA-4, una segunda nucleasa específica para un puerto seguro y un transgén tal que el transgén se inserta en un locus de puerto seguro (por ejemplo, AAVS1, CCR5 o HPRT) por integración dirigida. Véanse, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nº 7,951,925 y las Publicaciones de EE.UU. Nº 20080159996; 201000218264; 20130177983; 20130177960; 20130137104; y 20130122591. En otras realizaciones, las células T comprenden una nucleasa específica de PD1 y/o CTLA-4, un transgén que codifica un CAR y un segundo transgén que codifica otro marco de lectura abierto. En algunas realizaciones, el segundo transgén codifica un gen suicida. En algunas realizaciones, las células T comprenden una nucleasa específica de PD1 y/o CTLA-4, un transgén que codifica un CAR y un conjunto de transgenes que codifican un RCT específico de TAA. En otros aspectos, los transgenes del donante se integran en las células T antes de que se integren las nucleasas, mientras que en algunos aspectos, tanto los transgenes del donante como las nucleasas se introducen juntos en la célula T.

45 **[0021]** En el presente documento se describen métodos para modificar una célula T. La expresión de PD1 y/o CTLA-4 en la célula T puede reducirse o inactivarse, por ejemplo, usando un dedo de zinc o factor de transcripción TALE, una nucleasa de dedo de zinc y/o un sistema TALEN y/o CRISPR/Cas. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además la introducción de una o más secuencias exógenas (por ejemplo, transgenes) en cualquiera de las células modificadas con PD1 y/o CTLA-4 como se describe en el presente documento, por ejemplo, un transgén que codifica un CAR y/o un conjunto de transgenes que codifican un RCT específico de TAA. En determinadas realizaciones, la célula T se activa, por ejemplo, la activación de cuentas como se describe en la Publicación de EE.UU. Nº 20080311095. En otras realizaciones, las células T están en reposo. En algunos aspectos, la célula T es una LIT. En otros aspectos, la célula T comprende una línea de células T derivada de un LIT. En algunas realizaciones, el LIT se caracteriza por sus subtipos de HLA, y en otras realizaciones, los LIT llevan eliminaciones y/o eliminaciones de HLA específicamente diseñadas (véase la Publicación de Patente de EE.UU. Nº 20120060230).

55 **[0022]** En otro aspecto de la descripción, los métodos comprenden una composición para el tratamiento terapéutico de un sujeto en necesidad del mismo. La composición puede comprender células T o LIT modificadas genéticamente que comprenden una nucleasa específica de PD1 o CTLA-4, una nucleasa específica de puerto seguro, al menos un donante de transgénico que codifica un CAR, un segundo donante de transgénico y cualquier combinación de nucleasas y donantes de las mismas. En algunos aspectos, los donantes de transgenes codifican un RCT específico de TAA. La composición puede comprender células T o LIT modificadas genéticamente que comprenden una nucleasa específica de PD1 o CTLA-4 y un donante de transgénico que codifica un CAR.

65 **[0023]** En otro aspecto, se dan a conocer en el presente documento métodos y composiciones para la regulación de la PD1 o CTLA-4 de genes. Los métodos pueden comprender la introducción de una nucleasa (por ejemplo, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas, meganucleasa, fusiones TALE-meganucleasa, etc.) que se une y modifica un gen PD1 o CTLA-

4. En ciertas realizaciones, la nucleasa es una proteína de fusión que comprende un dedo de zinc o una proteína de fusión TALE que está diseñada para unirse a un sitio diana en el locus PD1 o CTLA-4 (o polinucleótido que codifica la proteína de fusión) en células de un sujeto con una enfermedad o trastorno para prevenir o tratar la enfermedad o trastorno. Los métodos pueden comprender introducir un regulador de la transcripción (por ejemplo, ZFP-TF, TALE-TF, CRISPR/Cas-TF, *etc.*) en una célula que se une y reprime la expresión de un gen de PD1 o CTLA-4. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es un cáncer o una malignidad, y el dedo de zinc o la proteína de fusión TALE es una nucleasa o una proteína de fusión que comprende un dominio de represión de la transcripción. La nucleasa puede comprender un sistema de nucleasa CRISPR/Cas. Los ejemplos no limitantes de cánceres que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen carcinomas de pulmón, cánceres de páncreas, cánceres de hígado, melanomas, cánceres de huesos, cánceres de mama, cánceres colorrectales, leucemias, cánceres de ovario, linfomas, cánceres de cerebro y similares.

[0024] En el presente documento se describe un kit que comprende los sistemas ZFN, TALEN y/o CRISPR/Cas de la divulgación. El kit puede comprender ácidos nucleicos que codifican los sistemas ZFN, TALEN o CRISPR/Cas (por ejemplo, moléculas de ARN o genes que codifican ZFP, TALEN o Cas9 contenidos en un vector de expresión adecuado) y ARN sg modificado si es necesario, o alícuotas de las proteínas de nucleasa, moléculas donantes, líneas de células huésped adecuadas, instrucciones para realizar los métodos de la invención y similares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0025]

La Figura 1 representa un gel que muestra la actividad (medida por % de detección indel) de TALEN específicos de PD1 en células K562 usando el ensayo Cel-I (descrito en el texto). Las designaciones de los carriles son como en el texto y el % de indels detectado se indica en la parte inferior de cada carril.

La Figura 2 es un gráfico que representa el porcentaje de eventos de unión de extremos no homólogos (NHEJ) según se determina mediante el ensayo Cel-1) usando las nucleasas y condiciones indicadas. "R5" se refiere a células electroporadas con ARNm de ZFN específico de CCR5 (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 7,951,925). "PD1" se refiere a células electroporadas con ARNm de ZFN específico de PD1 (véase, por ejemplo, la publicación de EE.UU. N° 20110136895). "C1" y "C3" se refieren a condiciones de electroporación. La barra izquierda de cada par muestra el % NHEJ en las condiciones indicadas 3 días después de la electroporación del ARNm (EPD3) y la barra derecha muestra el % NHEJ en las condiciones indicadas 5 días después de la electroporación del ARNm (EPD5).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0026] En el presente documento se describen composiciones y métodos para la modulación de PD1 y/o CTLA-4. Estas composiciones y métodos son útiles para la investigación y aplicaciones terapéuticas e implican el uso de la edición del genoma mediante nucleasas modificadas genéticamente para alterar el gen PD1 y/o CTLA-4. Los métodos descritos también incluyen el dedo de zinc específico de PD1 o CTLA-4 o el dominio de unión al ADN de TALE fusionado con represores de la transcripción para prevenir la expresión de los genes PD1 o CTLA-4. Los métodos y composiciones incluidos también describen el uso de receptores de antígenos quiméricos para la activación de células T contra dianas celulares específicas en células T con una alteración de PD1 y/o CTLA-4.

[0027] La interacción de PD1, expresada en una célula T, con el ligando de PD1 puede provocar la desactivación de la célula T. Algunas células cancerosas expresan ligandos PD1 y, de esta manera, pueden evitar la vigilancia inmunitaria y proliferar a pesar de la presencia de células T que son capaces, en ausencia del ligando PD-1, de destruir esa célula cancerosa. Además, incluso si la célula T se ha modificado de manera que expresa un CAR que activa y dirige esa célula T a una célula que lleva un marcador particular, la expresión de ligandos PD1 por esa célula diana puede causar la desensibilización de la célula T activada, y la célula T insensibilizada ya no actuará sobre la célula diana.

[0028] La expresión de CTLA-4 se induce tras la activación de las células T en las células T activadas, y compite por la unión con los antígenos CD80 y CD86 que activan las células presentadoras de antígeno. La interacción de CTLA-4 con CD80 o CD86 produce inhibición de las células T y sirve para mantener el equilibrio de la respuesta inmunitaria. Sin embargo, la inhibición de la interacción CTLA-4 con CD80 o CD86 puede prolongar la activación de las células T y, por tanto, aumentar el nivel de respuesta inmune a un antígeno canceroso. La presente invención describe la inhibición de la interacción CTLA-4 mediante un bloqueo de su expresión con un dedo de zinc o una fusión de factor de transcripción TALE, o mediante el tratamiento de la célula T con una nucleasa específica de CTLA-4 para anular el gen.

[0029] La tecnología CAR ofrece el potencial para diseñar células T que atacarán células específicas, donde el investigador elige la diana de esas células T. Los investigadores médicos han sugerido durante mucho tiempo que las células T eliminan regularmente las células malignas o aberrantes y, sin embargo, hay algunos cánceres que pueden escapar, tal vez mediante el uso de amortiguación de la respuesta inmune impulsada por el ligando PD-1. Por lo tanto, por muy prometedor que parezca el uso de CAR, la combinación de células T diseñadas para expresar CAR (que las

dirige a células tumorales particulares) en combinación con factores de transcripción y/o nucleasas (*p. ej.*, dedo de zinc, TALE y/o basado en CRISPR/Cas) para reprimir o anular la expresión de PD1 o CTLA-4 en esas mismas células proporciona nuevos modelos celulares y animales, y métodos de investigación para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos.

5

General

[0030] La práctica de los métodos, así como la preparación y el uso de las composiciones descritas en este documento emplean, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, estructura y análisis de cromatina, química computacional, cultivo celular, ADN recombinante y campos relacionados que están dentro del conocimiento de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 y tercera edición, 2001; Ausubel et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; la serie *METHODS IN ENZYMOLOGY*, Academic Press, San Diego; Wolffe, *CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION*, Tercera edición, Academic Press, San Diego, 1998; *METHODS IN ENZYMOLOGY*, Vol. 304, "Chromatin" (PM Wassarman y AP Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; y *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (PB Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

Definiciones

[0031] Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, en conformación lineal o circular, y en forma monocatenaria o bicatenaria. Para los propósitos de la presente descripción, estos términos no deben interpretarse como limitantes con respecto a la longitud de un polímero. Los términos pueden abarcar análogos conocidos de nucleótidos naturales, así como nucleótidos que están modificados en los restos de base, azúcar y/o fosfato (por ejemplo, cadenas principales de fosforotioato). En general, un análogo de un nucleótido particular tiene la misma especificidad de apareamiento de bases; es decir, un análogo de A se pareará con T.

[0032] Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos ácidos. El término también se aplica a polímeros de aminoácidos en los que uno o más aminoácidos son análogos químicos o derivados modificados de los correspondientes aminoácidos naturales.

[0033] "Unión" se refiere a una secuencia específica, la interacción no covalente entre macromoléculas (por ejemplo, entre una proteína y un ácido nucleico). No todos los componentes de una interacción de unión necesitan ser específicos de secuencia (por ejemplo, contactos con residuos de fosfato en una cadena principal de ADN), siempre que la interacción en su conjunto sea específica de secuencia. Estas interacciones se caracterizan generalmente por una constante de disociación (K_d) de $10^{-6} M^{-1}$ o menor. "Afinidad" se refiere a la fuerza de unión: una mayor afinidad de unión se correlaciona con una menor K_d .

[0034] Una "proteína de unión" es una proteína que es capaz de unirse no covalentemente a otra molécula. Una proteína de unión puede unirse, por ejemplo, a una molécula de ADN (una proteína de unión a ADN), una molécula de ARN (una proteína de unión a ARN) y/o una molécula de proteína (una proteína de unión a proteínas). En el caso de una proteína de unión a proteínas, puede unirse a sí misma (para formar homodímeros, homotrímeros, etc.) y/o puede unirse a una o más moléculas de una proteína o proteínas diferentes. Una proteína de unión puede tener más de un tipo de actividad de unión. Por ejemplo, las proteínas con dedos de zinc tienen actividad de unión a ADN, de ARN y de unión a proteínas.

[0035] Una "ADN de dedo de zinc proteína de unión" (o dominio de unión) es una proteína, o un dominio dentro de una proteína más grande, que se une al ADN de una manera específica de la secuencia a través de uno o más dedos de zinc, que son regiones de secuencia de aminoácidos dentro del dominio de unión cuya estructura se estabiliza mediante la coordinación de un ion zinc. El término proteína de unión al ADN con dedos de zinc a menudo se abrevia como proteína con dedos de zinc o ZFP.

[0036] Un "dominio de unión de ADN TALE" o "TALE" es un polipéptido que comprende uno o más dominios/unidades de repetición TALE. Los dominios repetidos están implicados en la unión del TALE a su secuencia de ADN diana afín. Una única "unidad de repetición" (también denominada "repetición") tiene típicamente 33-35 aminoácidos de longitud y exhibe al menos alguna homología de secuencia con otras secuencias de repetición de TALE dentro de una proteína TALE de origen natural. Cada unidad de repetición TALE incluye 1 o 2 residuos de unión al ADN que forman el Diresiduo variable de repetición (RVD), típicamente en las posiciones 12 y/o 13 de la repetición. El código natural (canónico) para el reconocimiento de ADN de estos TALE se ha determinado de manera que una secuencia de HD en las posiciones 12 y 13 conduce a una unión a la citosina (C), NG se une a T, NI a A, NN se une a G o A, y NG se une a T y también se conocen RVD no canónicos (atípicos). Ver, la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20110301073.

[0037] Una "nucleasa de CRISPR/Cas" o "sistema de nucleasa CRISPR/Cas" incluye una molécula de ARN no

codificante (guía) de ARN que se une a ADN y proteínas Cas (Cas9) con funcionalidad de nucleasa (por ejemplo, dos dominios de nucleasa). Véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de EE.UU. N° 61/823,689 (correspondiente a la Publicación de EE.UU. N° 20150056705).

5 [0038] En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se pueden usar pares adicionales de proteínas con dedos de zinc y/o TALEN para la escisión adicional de doble hebra de sitios diana adicionales dentro de la célula. Además, un sistema CRISPR/Cas puede ser utilizado solo o en combinación con ZFN y/o TALEN para inducir roturas adicionales de doble hebra.

10 [0039] Los dominios de unión de dedos de zinc y TALE se pueden "diseñar" para unirse a una secuencia de nucleótidos predeterminada, por ejemplo mediante ingeniería (alterando uno o más aminoácidos) de la región de la hélice de reconocimiento de un dedo de zinc o proteína TALE de origen natural. Por lo tanto, las proteínas de unión al ADN diseñadas (dedos de zinc o TALE) son proteínas que no ocurren naturalmente. Los ejemplos no limitantes de métodos para manipular proteínas de unión a ADN son el diseño y la selección. Una proteína de unión al ADN diseñada es una proteína que no se encuentra en la naturaleza y cuyo diseño/composición resulta principalmente de criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computarizados para procesar información en una base de datos que almacena información de diseños existentes de ZFP y/o TALE y datos vinculantes. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 6,140,081; 6,453,242; y 6,534,261; ver también WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496 y publicación de EE.UU. N° 20110301073.

25 [0040] Una proteína con dedos de zinc "seleccionada" o historia es una proteína que no se encuentra en la naturaleza cuyos resultados principalmente de la producción de un proceso empírico tal como presentación de fagos, la trampa de interacción o selección híbrida. Véase, por ejemplo, US 5.789.538; US 5.925.523; US 6.007.988; US 6.013.453; US 6.200.759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197; WO 02/099084 y publicación de EE.UU. N° 20110301073.

30 [0041] "Escisión" se refiere a la rotura de la columna vertebral covalente de una molécula de ADN. La escisión puede iniciarse mediante una variedad de métodos que incluyen, pero no se limitan a, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Tanto la escisión monocatenaria como la escisión bicatenaria son posibles, y la escisión bicatenaria puede ocurrir como resultado de dos eventos de escisión monocatenaria distintos. La escisión del ADN puede resultar en la producción de extremos romos o extremos escalonados. En determinadas realizaciones, los polipéptidos de fusión se utilizan para la escisión de ADN de doble hebra dirigida.

35 [0042] Un "medio-dominio de escisión" es una secuencia de polipéptido que, en conjunción con un segundo polipéptido (ya sea idénticos o diferentes) forma una actividad de escisión que tiene complejo (preferiblemente actividad de la doble cadena de escisión). Los términos "medio-dominios de escisión primero y segundo"; los "medio-dominios de escisión + y -" y los "medio-dominios de escisión derecho e izquierdo" se utilizan indistintamente para referirse a pares de medio-dominios de escisión que dimerizan. Un "medio-dominio de escisión por ingeniería genética" es un semi-dominio de escisión que se ha modificado para formar heterodímeros obligados con otro medio-dominio de escisión (por ejemplo, otro medio-dominio de escisión por ingeniería genética). Véase, también, la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20050064474, 20070218528, 20080131962 y 20110201055.

45 [0043] El término "secuencia" se refiere a una secuencia de nucleótidos de cualquier longitud, que puede ser ADN o ARN; puede ser lineal, circular o ramificado y puede ser monocatenario o bicatenario. El término "secuencia donante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se inserta en un genoma. Una secuencia donante puede tener cualquier longitud, por ejemplo entre 2 y 10.000 nucleótidos de longitud (o cualquier valor entero entre ellos o arriba), preferiblemente entre aproximadamente 100 y 1.000 nucleótidos de longitud (o cualquier número entero entre ellos), más preferiblemente entre aproximadamente 200 y 500 nucleótidos de longitud. "Cromatina" es la estructura de nucleoproteína que comprende el genoma celular. La cromatina celular comprende ácido nucleico, principalmente ADN, y proteínas, incluidas las histonas y las proteínas cromosómicas que no son histonas. La mayoría de la cromatina celular eucariota existe en forma de nucleosomas, en los que un núcleo de nucleosoma comprende aproximadamente 150 pares de bases de ADN asociado con un octámero que comprende dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4; y el ADN enlazador (de longitud variable dependiendo del organismo) se extiende entre los núcleos de nucleosomas. Una molécula de histona H1 generalmente se asocia con el ADN enlazador. Para los propósitos de la presente divulgación, el término "cromatina" pretende abarcar todos los tipos de nucleoproteínas celulares, tanto procariontas como eucariotas. La cromatina celular incluye cromatina tanto cromosómica como episomal.

60 [0044] Un "cromosoma", es un complejo de cromatina que comprende la totalidad o una porción del genoma de una célula. El genoma de una célula a menudo se caracteriza por su cariotipo, que es la colección de todos los cromosomas que componen el genoma de la célula. El genoma de una célula puede comprender uno o más cromosomas.

65 [0045] Un "episoma" es un ácido nucleico replicante, complejo de nucleoproteína u otra estructura que comprende un ácido nucleico que no es parte del cariotipo cromosómico de una célula. Los ejemplos de episomas incluyen plásmidos y ciertos genomas virales.

[0046] Un "sitio diana" o "secuencia diana" es una secuencia de ácido nucleico que define una porción de un ácido nucleico al cual se unirá una molécula de unión, siempre que las condiciones suficientes para existir unión. Por ejemplo, la secuencia 5'-GAATTC-3' es un sitio diana para la endonucleasa de restricción Eco RI.

5 **[0047]** Una "enfermedad infecciosa crónica" es una enfermedad causada por un agente infeccioso en donde la infección ha persistido. Dicha enfermedad puede incluir hepatitis (A, B o C), virus del herpes (por ejemplo, VZV, HSV-1, HSV-6, HSV-II, CMV y EBV) y VIH/SIDA. Los ejemplos no virales pueden incluir enfermedades fúngicas crónicas tales como aspergilosis, candidiasis, coccidioidomycosis y enfermedades asociadas con *Cryptococcus* e histoplasmosis. Ningún ejemplo limitante de agentes infecciosos bacterianos crónicos puede ser *Chlamydia pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis*.

10 **[0048]** El término "enfermedad autoinmune" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno en donde el sujeto se monta una respuesta inmune destructiva contra sus propios tejidos. Los trastornos autoinmunitarios pueden afectar a casi todos los sistemas de órganos del sujeto (p. ej., humanos), incluidas, entre otras, enfermedades de los sistemas nervioso, gastrointestinal y endocrino, así como la piel y otros tejidos conectivos, ojos, sangre y vasos sanguíneos. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, tiroiditis de Hashimoto, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, enfermedad de Graves, esclerodermia, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia gravis y diabetes.

15 **[0049]** El término "cáncer" como se usa en el presente documento se define como una hiperproliferación de las células cuyo rasgo único - pérdida de controles normales - los resultados en crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión de tejido local, y metástasis. Con respecto a los métodos descritos, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluido cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rhabdomyosarcoma alveolar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal o anorrecto, cáncer de ojo, cáncer de vías biliares intrahepáticas, cáncer de articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de cavidad oral, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, fibrosarcoma, tumor carcinoide gastrointestinal, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, tumores líquidos, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, maligno mesotelioma, mastocitoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, tumores sólidos, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de uréter y cáncer de vejiga urinaria. Como se usa en el presente documento, el término "tumor" se refiere a un crecimiento anormal de células o tejidos de tipo maligno, a menos que se indique específicamente lo contrario y no incluye un tejido de tipo benigno. El término "inhibe o inhibiendo" como se usa en este documento significa reducir el crecimiento/replicación.

20 **[0050]** El término "gen de punto de control inmunológico" se refiere a cualquier gen que está implicado en un proceso inhibitorio (por ejemplo, bucle de realimentación) que actúa para regular la amplitud de una respuesta inmune, por ejemplo, un bucle de retroalimentación inhibitoria inmune que mitiga la propagación incontrolada de respuestas inmunes dañinas. Estas respuestas incluyen contribuir a un escudo molecular que protege contra el daño tisular colateral que podría ocurrir durante las respuestas inmunes a las infecciones y/o el mantenimiento de la auto-tolerancia periférica. Los ejemplos no limitantes de genes de puntos de control inmunológicos incluyen miembros de la familia extendida de receptores CD28 y sus ligandos, así como genes implicados en rutas co-inhibidoras (por ejemplo, CTLA-4 y PD-1).

25 **[0051]** Una molécula "exógena" es una molécula que normalmente no está presente en una célula, pero puede ser introducida en una célula por uno o más métodos genéticos, bioquímicos u otros métodos. La "presencia normal en la célula" se determina con respecto a la etapa de desarrollo particular y las condiciones ambientales de la célula. Así, por ejemplo, una molécula que está presente solo durante el desarrollo embrionario del músculo es una molécula exógena con respecto a una célula muscular adulta. De manera similar, una molécula inducida por choque térmico es una molécula exógena con respecto a una célula sin choque térmico. Una molécula exógena puede comprender, por ejemplo, una versión funcional de una molécula endógena que funciona mal o una versión que funciona mal de una molécula endógena que funciona normalmente.

30 **[0052]** Una molécula exógena puede ser, entre otras cosas, una molécula pequeña, como se genera por un proceso de química combinatoria, o una macromolécula tal como una proteína, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, glicoproteína, lipoproteína, polisacárido, cualquier derivado modificado de las moléculas anteriores, o cualquier complejo que comprenda una o más de las moléculas anteriores. Los ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN, pueden ser monocatenarios o bicatenarios; puede ser lineal, ramificado o circular; y puede tener cualquier longitud. Los ácidos nucleicos incluyen los que pueden formar dúplex, así como los ácidos nucleicos que forman triplex. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N^{os} 5.176.996 y 5.422.251. Las proteínas incluyen, pero no se limitan a, proteínas de unión a ADN, factores de transcripción, factores de remodelación de cromatina, proteínas de unión a ADN metilado, polimerasas, metilasas, demetilasas, acetilasas, desacetilasas, quinasas, fosfatasa, integrasas, recombinasas, ligasas, topoisomerasas, girasas y helicinasas.

- 5 [0053] Una molécula exógena puede ser el mismo tipo de molécula como una molécula endógena, por ejemplo, una proteína exógena o ácido nucleico. Por ejemplo, un ácido nucleico exógeno puede comprender un genoma viral infectante, un plásmido o episoma introducido en una célula, o un cromosoma que normalmente no está presente en la célula. Los expertos en la técnica conocen métodos para la introducción de moléculas exógenas en las células e incluyen, pero no se limitan a, transferencia mediada por lípidos (es decir, liposomas, incluidos lípidos neutros y catiónicos), electroporación, inyección directa, fusión celular., bombardeo de partículas, coprecipitación de fosfato cálcico, transferencia mediada por DEAE-dextrano y transferencia mediada por vectores virales.
- 10 [0054] Por el contrario, una molécula "endógena" es una que está normalmente presente en una célula particular en una etapa de desarrollo particular bajo condiciones ambientales particulares. Por ejemplo, un ácido nucleico endógeno puede comprender un cromosoma, el genoma de una mitocondria, cloroplasto u otro orgánulo, o un ácido nucleico episómico de origen natural. Las moléculas endógenas adicionales pueden incluir proteínas, por ejemplo, factores de transcripción y enzimas.
- 15 [0055] Una molécula de "fusión" es una molécula en donde dos o más moléculas de subunidades están vinculadas, preferentemente de forma covalente. Las moléculas subunitarias pueden ser del mismo tipo químico de molécula o pueden ser diferentes tipos químicos de moléculas. Los ejemplos del primer tipo de molécula de fusión incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (por ejemplo, una fusión entre un dominio de unión al ADN de ZFP y un dominio de escisión); ácidos nucleicos de fusión (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión descrita *supra*) y fusiones entre ácidos nucleicos y proteínas (p. ej., sistema de nucleasa CRISPR/Cas). Los ejemplos del segundo tipo de molécula de fusión incluyen, pero no se limitan a, una fusión entre un ácido nucleico formador de triplex y un polipéptido, y una fusión entre un aglutinante de surco menor y un ácido nucleico.
- 20 [0056] La expresión de una molécula de fusión en una célula puede resultar del suministro de la molécula de fusión a la célula, por ejemplo, para proteínas de fusión mediante el suministro de la proteína de fusión a la célula o mediante el suministro de un polinucleótido que codifica la proteína de fusión a una célula, en donde se transcribe el polinucleótido y se traduce la transcripción para generar la proteína de fusión. El empalme trans, la escisión de polipéptidos y la ligación de polipéptidos también pueden estar implicados en la expresión de una proteína en una célula. Los métodos para el suministro de polinucleótidos y/o polipéptidos a las células se presentan en otra parte de esta descripción.
- 25 [0057] Un "gen", para los propósitos de la presente descripción, incluye una región de ADN que codifica un producto génico (véase *infra*), así como todas las regiones de ADN que regulan la producción del producto del gen, si o no tales secuencias reguladoras son adyacentes a secuencias codificantes y/o transcritas. En consecuencia, un gen incluye, pero no se limita necesariamente a secuencias promotoras, terminadores, secuencias reguladoras de traducción como sitios de unión a ribosomas y sitios de entrada de ribosomas internos, potenciadores, silenciadores, aislantes, elementos de frontera, orígenes de replicación, sitios de unión a matriz y regiones de control de locus.
- 30 [0058] La "expresión génica" se refiere a la conversión de la información, contenida en un gen, en un producto génico. Un producto génico puede ser el producto transcripcional directo de un gen (por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNr, ARN antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína producida por traducción de un ARNm. Los productos génicos también incluyen ARN que se modifican mediante procesos tales como taponamiento, poliadenilación, metilación y edición, y proteínas modificadas, por ejemplo, mediante metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, miristilación y glicosilación.
- 35 [0059] La "modulación" de la expresión génica se refiere a un cambio en el nivel de expresión de un gen. La modulación de la expresión puede incluir, pero no se limita a, activación génica y represión génica. La modulación también puede ser completa, es decir, en donde la expresión génica está totalmente inactivada o se activa a niveles de tipo salvaje o más allá; o puede ser parcial, en donde la expresión génica se reduce parcialmente o se activa parcialmente a alguna fracción de los niveles de tipo salvaje. Las células "eucariotas" incluyen, pero no se limitan a, células fúngicas (como levadura), células vegetales, células animales, células de mamíferos y células humanas (por ejemplo, células T).
- 40 [0060] Los términos "unión operativa" y "unido operativamente" (o "enlazado operativamente") se usan indistintamente con referencia a una yuxtaposición de dos o más componentes (tales como elementos de secuencia), en donde los componentes están dispuestos de tal manera que ambos componentes funcionan normalmente y permiten la posibilidad de que al menos uno de los componentes pueda mediar en una función que se ejerce sobre al menos uno de los otros componentes. A modo de ilustración, una secuencia reguladora transcripcional, como un promotor, está operativamente ligada a una secuencia codificante si la secuencia reguladora transcripcional controla el nivel de transcripción de la secuencia codificante en respuesta a la presencia o ausencia de uno o más factores reguladores transcripcionales. Una secuencia reguladora de la transcripción está generalmente unida operativamente en *cis* con una secuencia codificante, pero no necesita estar directamente adyacente a ella. Por ejemplo, un potenciador es una secuencia reguladora de la transcripción que está operativamente ligada a una secuencia codificante, aunque no sean contiguas.
- 45 [0061] Con respecto a los polipéptidos de fusión, el término "unido operativamente" puede referirse al hecho de que cada uno de los componentes realiza la misma función en vinculación con el otro componente como lo haría si no
- 50
- 55
- 60
- 65

fuera así vinculado. Por ejemplo, con respecto a un polipéptido de fusión en donde un dominio de unión a ZFP, TALE o CasADN se fusiona con un dominio de escisión, el dominio de unión al ADN y el dominio de escisión están en enlace operativo si, en el polipéptido de fusión, la porción del dominio de unión a ADN es capaz de unirse a su sitio diana y/o su sitio de unión, mientras que el dominio de escisión es capaz de escindir el ADN en las proximidades del sitio diana.

De manera similar, con respecto a un polipéptido de fusión en donde un dominio de unión a ZFP, TALE o CasADN se fusiona con un dominio de activación o represión, el dominio de unión al ADN y el dominio de activación o represión están en enlace operativo si, en el polipéptido de fusión, la porción del dominio de unión al ADN es capaz de unirse a su sitio diana y/o su sitio de unión, mientras que el dominio de activación es capaz de regular al alza la expresión génica o el dominio de represión es capaz de regular negativamente la expresión génica. Las ZFP fusionadas con dominios capaces de regular la expresión génica se denominan colectivamente "ZFP-TF" o "factores de transcripción con dedos de zinc", mientras que las TALE fusionadas con dominios capaces de regular la expresión génica se denominan colectivamente "TALE-TF" o "factores de transcripción TALE" y las proteínas CRISPR/Cas unidas a dominios capaces de regular la expresión génica se denominan colectivamente "CRISPR/Cas TF".

[0062] Un "fragmento funcional" de una proteína, polipéptido o ácido nucleico es una proteína, polipéptido o ácido nucleico cuya secuencia no es idéntica a la proteína de longitud completa, polipéptido o ácido nucleico, sin embargo, conserva la misma función que la proteína de longitud completa, polipéptido o ácido nucleico. Un fragmento funcional puede poseer más, menos o el mismo número de residuos que la molécula nativa correspondiente y/o puede contener una o más sustituciones de aminoácidos o nucleótidos. Los métodos para determinar la función de un ácido nucleico (por ejemplo, función de codificación, capacidad para hibridar con otro ácido nucleico) son bien conocidos en la técnica. De manera similar, los métodos para determinar la función de las proteínas son bien conocidos. Por ejemplo, la función de unión al ADN de un polipéptido se puede determinar, por ejemplo, mediante ensayos de unión a filtro, desplazamiento de movilidad electroforética o inmunoprecipitación. La escisión del ADN puede ensayarse mediante electroforesis en gel. Ver Ausubelet *al.*, *Supra*. La capacidad de una proteína para interactuar con otra proteína se puede determinar, por ejemplo, mediante coimmunoprecipitación, ensayos de dos híbridos o complementación, tanto genética como bioquímica. Véase, por ejemplo, Fields et al. (1989) *Nature* 340: 245-246; Patente de EE.UU. N° 5,585,245 y PCT WO 98/44350.

[0063] Un "vector" es capaz de transferir secuencias génicas a células diana. Normalmente, "construcción de vector", "vector de expresión" y "vector de transferencia de genes" significan cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir secuencias de genes a células diana. Por tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores de integración.

[0064] Un "gen informador" o "secuencia indicadora" se refiere a cualquier secuencia que produce un producto de proteína que es fácilmente medido, preferiblemente aunque no necesariamente en un ensayo de rutina. Los genes informadores adecuados incluyen, entre otros, secuencias que codifican proteínas que median la resistencia a los antibióticos (p. ej., resistencia a ampicilina, resistencia a neomicina, resistencia a G418, resistencia a puromicina), secuencias que codifican proteínas coloreadas o fluorescentes o luminiscentes (p. ej., proteína verde fluorescente, proteína fluorescente verde mejorada, proteína fluorescente roja, luciferasa) y proteínas que median el crecimiento celular mejorado y/o la amplificación génica (por ejemplo, reductasa de dihidrofolato). Las etiquetas de epítipo incluyen, por ejemplo, una o más copias de FLAG, His, myc, Tap, HA o cualquier secuencia de aminoácidos detectable. Las "etiquetas de expresión" incluyen secuencias que codifican indicadores que se pueden unir operativamente a una secuencia genética deseada para controlar la expresión del gen de interés.

[0065] Un "receptor antígeno quimérico" (CAR) es una proteína híbrida construida artificialmente o polipéptido que comprende una especificidad o el reconocimiento (es decir, unión) de dominio vinculado a un receptor inmune responsable de la transducción de señales en los linfocitos. Más comúnmente, el dominio de unión se deriva de un fragmento de anticuerpo Fab que se ha modelado en un scFv de cadena única mediante la introducción de un enlazador flexible entre las cadenas de anticuerpos dentro del dominio de especificidad. Otros posibles dominios de especificidad pueden incluir las porciones de señalización de moléculas de hormonas o citocinas, los dominios extracelulares de receptores y ligandos o péptidos de péptidos aislados por cribado de bibliotecas (p. ej., fagos) (ver Ramos y Dotti, (2011) *Expert Opin Bio Ther* 11(7): 855). La flexibilidad entre las partes de señalización y de unión del CAR puede ser una característica deseable para permitir una interacción más óptima entre la diana y el dominio de unión, por lo que a menudo se incluye una región de bisagra. Un ejemplo de una estructura que se puede usar es la región CH2-CH3 de una inmunoglobulina como una molécula de IgG. El dominio de señalización del CAR típico comprende dominios intracelulares del complejo RCT-CD3 como la cadena zeta. Alternativamente, puede usarse la cadena y de un receptor Fc. La porción transmembrana del CAR típico puede comprender porciones transmembrana de proteínas tales como CD4, CD8 o CD28 (Ramos y Dotti, *ibid*). Las características de algunos CAR incluyen su capacidad para redirigir la especificidad y reactividad de las células T hacia una diana seleccionada de una manera no restringida por MHC. El reconocimiento de la diana no restringida por MHC da a las células T que expresan CAR la capacidad de reconocer una diana independientemente del procesamiento del antígeno, evitando así un mecanismo principal de escape del tumor.

[0066] CARs llamados de "primera generación" a menudo comprenden un único dominio de señalización interno tal como la cadena zeta CD3, y se cree que son un tanto ineficaz en la clínica, tal vez debido a la activación incompleta. Para aumentar el rendimiento de las células T que llevan estos CAR, se han generado CAR de segunda generación

con la capacidad de probar las señales de activación adicionales de las células T al incluir otro dominio estimulante, a menudo derivado de los dominios intercelulares de otros receptores como CD28, CD134/OX40, CD137/4-1BB, Lck, ICOS y DAP10. Además, también se han desarrollado CAR de tercera generación en los que el CAR contiene tres o más dominios estimulantes (Ramos y Dotti, *ibid*).

[0067] En algunos casos, CAR puede comprender un dominio de bisagra extracelular, dominio transmembrana, y opcionalmente, un dominio de bisagra intracelular que comprende CD8 y un dominio de señalización del receptor de células T intracelular que comprende CD28, 41BB, y CD3.zeta. CD28 es un marcador de células T importante en la coestimulación de células T. CD8 también es un marcador de células T. 4-1BB transmite una potente señal coestimuladora a las células T, promoviendo la diferenciación y mejorando la supervivencia a largo plazo de los linfocitos T. CD3.zeta. se asocia con los RCT para producir una señal y contiene motivos de activación inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM). En otros casos, los CAR pueden comprender un dominio bisagra extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización de células T intracelular que comprende CD28 y CD3.zeta. En otros casos, los CAR pueden comprender un dominio bisagra extracelular y un dominio transmembrana que comprende CD8 y un receptor de células T intracelular que señala el dominio que comprende CD28 y CD3.zeta.

Descripción general

[0068] En el presente documento se describen moléculas de unión a ADN (por ejemplo, dedo de zinc, nucleasas TALE y/o CRISPR/Cas y/o factores de transcripción dirigidos al gen PD1 y/o gen CTLA-4, así como composiciones que comprenden y métodos del uso de estas nucleasas y factores de transcripción artificiales para el tratamiento de enfermedades o trastornos, en particular trastornos en los que PD1 o los ligandos de PD1 se expresan de forma indeseable en células del sistema inmunológico, cánceres y/o enfermedades autoinmunes y/o enfermedades o trastornos en los que la represión de CTLA- 4. Para el tratamiento de un sujeto con una enfermedad o trastorno que mejora mediante la modulación de la interacción del PD1/ligando PD1, o la inhibición de células T mediada por CTLA-4, las nucleasas descritas en el presente documento pueden introducirse *in vivo* o *ex vivo* en células (p. ej., células primarias tales como células T aisladas de un sujeto afectado por dicha enfermedad) para prevenir la expresión de PD1 o CTLA-4 en las células tratadas. Después del tratamiento con nucleasa, los linfocitos T deficientes en PD1 o CTLA-4 pueden reintroducirse en el sujeto para su uso como medicamento en el tratamiento de una enfermedad infecciosa crónica o cáncer, o pueden expandirse antes de la reintroducción. Alternativamente, la modulación de los loci de PD1 o CTLA-4 puede ocurrir *in vivo* mediante la introducción de las nucleasas necesarias o factores de transcripción diseñados en un sujeto. De manera similar, se pueden usar células madre que se hayan tratado con nucleasas específicas de PD1 y/o CTLA-4 (por ejemplo, ZFN, sistemas de nucleasas CRISPR/Cas y/o TALEN). Estas células se pueden infundir en un sujeto afectado para el tratamiento de dicha afección médica.

[0069] En algunos casos, las nucleasas específicas a PD1 o CTLA-4 o factores de transcripción pueden ser utilizados en concierto con receptores de antígenos quiméricos. Por ejemplo, se describen métodos en los que un CAR que se dirige específicamente a un antígeno tumoral proteico o no proteico se introduce en una célula T de modo que la célula T que lleva dicho CAR se active en presencia del antígeno. El uso de un CAR en una célula que también ha sido o será tratada con nucleasas o factores de transcripción específicos de PD1 y/o CTLA-4, en los que el gen o los genes de PD1 o CTLA-4 están noqueados o modulados de otra manera similar, da como resultado una célula T que expresa un CAR de interés que es resistente al ligando PD1 producido por la célula cancerosa y, por lo tanto, no está sujeta al agotamiento de las células T mediado por PD-1 y/o resistente a la inhibición de las células T mediada por CTLA-4.

[0070] Numerosos antígenos del cáncer son conocidos en la técnica y pueden ser la diana de los CAR específicos. A modo de ejemplos no limitativos, consulte la Tabla 1 para conocer los antígenos asociados a tumores que pueden ser dirigidos por los CAR (consulte Ramos y Dotti, *ibid*, y Orentas et al (2012), *Front in Oncol* 2:1).

Tabla 1: Antígenos asociados a tumores adecuados para dirigirse a CAR

Tipo de tumor	Antígeno	Descripción
Gastrointestinal	EGP2/EpCam	Glucoproteína epitelial 2/Molécula de adhesión de células epiteliales
Gastrointestinal	EGP40	Glicoproteína epitelial 40
Gastrointestinal	TAG72/CA72-4	Glicoproteína 72 asociada al tumor/antígeno del cáncer 72-4
Glioblastoma	IL13R α 2	Subunidad alfa-2 del receptor de interleucina 13
Riñón	G250/MN/CA IX	Anhidrasa carbónica IX
Neoplasias linfoides	CD19	
Neoplasias linfoides	CD52	
Neoplasias linfoides	CD33	
Neoplasias linfoides	CD20	Miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios que atraviesan la membrana
Neoplasias linfoides	TSLPR (CRLF2)	

(Continuación)

	Tipo de tumor	Antígeno	Descripción
5	Neoplasias linfoides	CD22	Lectina 2 similar a Ig que se une al ácido siálico
	Neoplasias linfoides	CD30	Miembro 8 de la superfamilia del receptor de TNF
	Neoplasias linfoides	κ	Cadena ligera Kappa
	Melanoma	GD3	GD3-Gangliósido
10	Melanoma	HLA-A1 + MAGE-1	Antígeno leucocitario humano A1 + Antígeno 1 del melanoma
	Neuroblastoma/Tumores neurales	CD171	Molécula de adhesión celular L1
	Neuroblastoma/Tumores neurales	ALK	Cinasa del linfoma anaplásico
15	Neuroblastoma/Tumores neurales	GD2	GD2-Gangliósido
	Neuroblastoma/Tumores neurales	CD47	
20	Neuroblastoma/Tumores neurales	EGFRvIII	
	Neuroblastoma/Tumores neurales	NCAM	Molécula de adhesión de células neurales
	Ovario	FBP/α FR	Proteína de unión a folato/receptor alfa de folato
25	Ovario	Le (Y)	Antígeno de Lewis-Y
	Ovario	MUCI	Mucina 1
	Próstata	PSCA	Antígeno de células madre de próstata
	Próstata	PSMA	Antígeno de membrana específico de la próstata
	Rabomiosarcoma	FGFR4	Receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos
30	Rabomiosarcoma	LEJOS	Receptor de acetilcolina fetal
	Varios tumores sólidos	CEA	Antígeno carcinoembrionario
	Varios tumores sólidos	ERBB2/HER2	Homólogo 2 del oncogén viral de la leucemia eritroblástica aviar/Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
35	Varios tumores sólidos	ERBB3 + ERBB4	Homología de oncogén viral de leucemia eritroblástica aviar 3 + 4
	Varios tumores sólidos	Mesotelina	
	Varios tumores	CD44v6	Variante 6 del receptor de hialuronato
	Varios tumores	B7-H3	Receptor de adherencia
40	Varios tumores	Glipicano-3,5	Peptidoglicano de superficie celular
	Varios tumores	ROR1	
	Varios tumores	Survivin	Molécula anti-apoptótica
	Varios tumores	FOLR1	receptor de folato α
45	Varios tumores	WT1	Antígeno tumoral de Wilm
	Varios tumores	CD70	
	Varios tumores	VEGFR2/FLK/KDR	Inserto de factor de crecimiento endotelial vascular 2/cinasa 1 del hígado fetal/dominio de cinasa

50 **[0071]** Además, los vectores de expresión recombinantes, por ejemplo vectores que incluyen un gen suicida, o tal gen puede ser introducido por separado. Como se usa en este documento, el término "gen suicida" se refiere a un gen que hace que muera la célula que expresa el gen suicida. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, por ejemplo, un fármaco que actúa sobre la célula en donde se expresa el gen y hace que la célula muera cuando la célula entra en contacto o se expone al agente. Los genes suicidas son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Center for Cancer Therapeutics en el Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, el gen de la timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (HSV), la citosina desaminasa, la fosforilasa de nucleósido de purina y la nitroreductasa.

60 **Dominios de unión al ADN**

65 **[0072]** Se describen aquí composiciones que comprenden un dominio de unión a ADN que se une específicamente a un sitio diana en un locus PD1 o CTLA-4. Se puede usar cualquier dominio de unión a ADN en las composiciones y métodos descritos en este documento, incluidos, entre otros, un dominio de unión a ADN con dedo de zinc, un dominio de unión a ADN de TALE, un sistema nucleasa de unión a ADN CRISPR/Cas o un dominio de unión a ADN de una meganucleasa.

5 **[0073]** En ciertas realizaciones, el dominio de unión de ADN comprende una proteína de dedos de cinc o proteína TALE de unión a ADN. Preferiblemente, la proteína de dedo de zinc no se produce de forma natural porque está diseñada para unirse a un sitio diana de elección. Ver, por ejemplo, Beerli et al. (2002) *Nature Biotechnol.* 20: 135-141; Pabo et al. (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70: 313-340; Isalan y otros (2001) *Nature Biotechnol.* 19: 656-660; Segal et al. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 632-637; Choo et al. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 411-416; Patentes de EE.UU. N° 6,453,242; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,030,215; 6,794,136; 7,067,317; 7,262,054; 7,070,934; 7,361,635; 7,253,273; y Publicaciones de Patentes de EE.UU. N°s 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061. En otras realizaciones, el dominio de unión a ADN comprende un dominio de unión a ADN de TALE (véase, *Publicación de Patente de EE.UU. de copropiedad* N° 20110301073).

15 **[0074]** Un dedo de zinc modificado o dominio de unión a ADN TALE puede tener una especificidad de unión noveda, en comparación con un dedo de cinc de origen natural o proteína TALE. Los métodos de ingeniería incluyen, pero no se limitan al diseño racional y varios tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, el uso de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos de tripletes (o cuatrupletes) y secuencias de aminoácidos de dedos de zinc individuales, en las que cada secuencia de nucleótidos de tripletes o cuatrupletes está asociada con una o más secuencias de aminoácidos de dedos de zinc que se unen a la secuencia particular de triplete o cuatruplete. Véanse, por ejemplo, las patentes EE.UU. de propiedad conjunta 6,453,242 y 6,534,261.

20 **[0075]** Los métodos de selección ejemplares, que incluyen la presentación en fagos y los sistemas de dos híbridos, se describen en las Patentes de EE.UU. 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759; y 6,242,568; así como WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 y GB 2,338,237. Además, se ha descrito la mejora de la especificidad de unión para los dominios de unión de dedos de zinc, por ejemplo, en el documento WO 02/077227 de propiedad conjunta.

25 **[0076]** Además, como se describe en estas y otras referencias, dominios de dedos de zinc y/o proteínas de dedos de zinc de múltiples dedos o TALEs pueden unirse entre sí utilizando cualquier secuencia de enlazador adecuado, incluyendo por ejemplo, enlazadores de 5 o más aminoácidos en longitud. Véanse también las Patentes de EE.UU. N° 6,479,626; 6,903,185; y 7,153,949 para secuencias de engarce ejemplares de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier combinación de conectores adecuados entre los dedos de zinc individuales de la proteína. Además, se ha descrito la mejora de la especificidad de unión para los dominios de unión de dedos de zinc, por ejemplo, en el documento WO 02/077227 de propiedad conjunta.

30 **[0077]** Selección de sitios diana; las ZFP o TALE y los métodos para el diseño y la construcción de proteínas de fusión (y polinucleótidos que las codifican) son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en detalle en las Patentes de EE.UU. N°s 6,140,0815; 789,538; 6,453,242; 6,534,261; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496.

35 **[0078]** Además, como se describe en estas y otras referencias, los dominios de unión al ADN pueden unirse entre sí utilizando cualquier secuencia de enlazador adecuado, incluyendo por ejemplo, enlazadores de 5 o más aminoácidos de longitud. Véanse también las Patentes de EE.UU. N° 6,479,626; 6,903,185; y 7,153,949 para secuencias de engarce ejemplares de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier combinación de conectores adecuados entre los dominios individuales de unión al ADN de la proteína.

40 **[0079]** Alternativamente, el dominio de unión a ADN puede ser derivado de una nucleasa. Por ejemplo, las secuencias de reconocimiento de endonucleasas y meganucleasas homing como I-Sce I, I-CeuI, PI-Psp I, PI-Sce, I-Sce IV, I-Csm I, I-PanI, I-Scell, I-PpoI, I-ScellIII, I-Crel, I-TevI, I-TevII y I-TevIII son conocidos. Véase también la Patente de EE.UU. N° 5,420,032; Patente de EE.UU. N° 6,833,252; Belfort y otros (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3379-3388; Dujon et al. (1989) *Gene* 82: 115-118; Perler et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet* 12: 224-228; Gimble et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 263: 163-180; Argast et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 280: 345-353 y el catálogo de New England Biolabs. Además, la especificidad de unión al ADN de endonucleasas y meganucleasas autodirigidas puede modificarse por ingeniería genética para unirse a sitios diana no naturales. Véase, por ejemplo, Chevalier et al. (2002) *Molec. Cell* 10: 895-905; Epinat et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31: 2952-2962; Ashworth et al. (2006) *Nature* 441: 656-659; Paques y otros (2007) *Current Gene Therapy* 7: 49-66; la *Publicación de Patente de EE.UU.* N° 20070117128.

45 **[0080]** En otras realizaciones, el dominio de unión a ADN está en un sistema de nucleasa CRISPR/Cas, guiado, por ejemplo, por una molécula de ARN.

50 **[0081]** En ciertas realizaciones, el dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de zinc modificada que se une (de una manera específica a secuencia) a un sitio diana en un locus PD1 o CTLA-4 y modula la expresión de PD1 o CTLA-4. Los sitios diana PD1 y CTLA-4 incluyen típicamente al menos un dedo de zinc pero pueden incluir una pluralidad de dedos de zinc (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más dedos). Por lo general, las ZFP incluyen al menos tres dedos. Algunas de las ZFP incluyen cuatro, cinco o seis dedos. Las ZFP que incluyen tres dedos normalmente reconocen un sitio diana que incluye 9 o 10 nucleótidos; las ZFP que incluyen cuatro dedos normalmente reconocen un sitio diana que incluye de 12 a 14 nucleótidos; mientras que las ZFP que tienen seis dedos pueden reconocer sitios

diana que incluyen de 18 a 21 nucleótidos. Las ZFP también pueden ser proteínas de fusión que incluyen uno o más dominios reguladores, en los que estos dominios reguladores pueden ser dominios de activación o represión transcripcional.

5 [0082] En otras realizaciones, el dominio de unión a ADN comprende un dominio de unión de ADN de efector TAL de origen natural o modificado (de origen no natural). Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20110301073. Se sabe que las bacterias patógenas de plantas del género *Xanthomonas* provocan muchas enfermedades en importantes plantas de cultivo. La patogenicidad de *Xanthomonas* depende de un sistema de secreción conservada de tipo III (T3S) que inyecta más de 25 proteínas efectoras diferentes en la célula vegetal. Entre estas proteínas inyectadas se encuentran los efectores de tipo activador de la transcripción (TALE) que imitan los activadores de la transcripción de las plantas y manipulan el transcriptoma de las plantas (véase Kay et al (2007) Science 318: 648-651). Estas proteínas contienen un dominio de unión al ADN y un dominio de activación transcripcional. Uno de los TALE mejor caracterizados es AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* sp. *Vesicatoria* (véase Bonaset al (1989) Mol Gen Genet 218: 127-136 y WO2010079430). Los TALE contienen un dominio centralizado de repeticiones en tándem, conteniendo cada repetición aproximadamente 34 aminoácidos, que son clave para la especificidad de unión al ADN de estas proteínas. Además, contienen una secuencia de localización nuclear y un dominio de activación transcripcional ácido (para una revisión, véase Schornack S, et al (2006) J Plant Physiol 163 (3): 256-272). Además, en las bacterias fitopatógenas *Ralstoniasolanacearum* se han encontrado dos genes, denominados brg11 y hpx17, que son homólogos a la familia AvrBs3 de *Xanthomonas* en la cepa biovar 1 de *R. solanacearum* GMI1000 y en la cepa biovar 4 RS1000 (ver Heuer et al (2007).) Appl y Envir Micro 73 (13): 4379-4384). Estos genes son 98,9% idénticos entre sí en la secuencia de nucleótidos, pero se diferencian por una delección de 1575 pb en el dominio de repetición de hpx17. Sin embargo, ambos productos génicos tienen una identidad de secuencia inferior al 40% con las proteínas de la familia AvrBs3 de *Xanthomonas*.

25 Sistema CRISPR/Cas

[0083] Han surgido recientemente pruebas convincentes de la existencia de una vía de defensa de genoma de ARN mediada en arqueas y muchas bacterias que se ha hipotetizado que son paralelas a la vía de ARNi eucariota (para revisiones, ver Gödde y Bickerton, 2006. J. Mol. Evol. 62: 718-729; Lillestolet al., 2006. Archaea 2: 59-72; Makarova et al., 2006. Biol. Direct 1: 7.; Sorek et al., 2008. Nat. Rev. Microbiol. 6: 181-186). Conocida como el sistema CRISPR-Cas o ARNi procarriótico (pRNAi), se propone que la vía surja de dos loci de genes vinculados evolutivamente y a menudo físicamente: el locus CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas), que codifica los componentes de ARN del sistema, y el locus cas (asociado a CRISPR), que codifica proteínas (Jansen et al., 2002. Mol. Microbiol. 43: 1565-1575; Makarova et al., 2002. Nucleic Acids Res. 30: 482-496; Makarova et al., 2006. Biol. Direct 1: 7; Haft et al., 2005. PLoS Comput. Biol. 1: e60). Los loci CRISPR en huéspedes microbianos contienen una combinación de genes asociados a CRISPR (Cas), así como elementos de ARN no codificantes capaces de programar la especificidad de la escisión del ácido nucleico mediada por CRISPR. Las proteínas Cas individuales no comparten una similitud de secuencia significativa con los componentes proteicos de la maquinaria del ARNi eucariota, pero tienen funciones predichas análogas (p. ej., unión de ARN, nucleasa, helicasa, etc.) (Makarova et al., 2006. Biol. Direct 1: 7) Los genes asociados a CRISPR (*cas*) a menudo se asocian con matrices de espaciadores repetidos de CRISPR. Se han descrito más de cuarenta familias de proteínas Cas diferentes. De estas familias de proteínas, Cas1 parece ser ubicua entre los diferentes sistemas CRISPR/Cas. Se han utilizado combinaciones particulares de genes *cas* y estructuras de repetición para definir 8 subtipos de CRISPR (Ecoli, Ypest, Nmeni, Dvulg, Tneap, Hmari, Aperm y Mtube), algunos de los cuales están asociados con un módulo genético adicional que codifica proteínas misteriosas asociadas a repetición (RAMP). Puede ocurrir más de un subtipo de CRISPR en un solo genoma. La distribución esporádica de los subtipos CRISPR/Cas sugiere que el sistema está sujeto a la transferencia horizontal de genes durante la evolución microbiana.

[0084] Hay tres tipos de sistemas de CRISPR/Cas que todos incorporan ARN y proteínas Cas. Los tipos I y III tienen endonucleasas Cas que procesan los pre-crARN, que, cuando se procesan por completo en crARN, ensamblan un complejo proteico multiCas que es capaz de escindir ácidos nucleicos que son complementarios al crARN.

[0085] El Tipo II CRISPR (ejemplificado por Cas9) es uno de los sistemas más bien caracterizados y lleva a cabo rotura de doble hebra de ADN dirigido en cuatro pasos secuenciales. Primero, dos ARN no codificantes, la matriz pre-crARN y tracrARN, se transcriben desde el locus CRISPR. En segundo lugar, tracrARN se hibrida con las regiones repetidas del pre-crARN y media el procesamiento de pre-crARN en crARN maduros que contienen secuencias espaciadoras individuales. En tercer lugar, el complejo crARN: tracrARN maduro dirige Cas9 al ADN objetivo a través del emparejamiento de bases de Watson-Crick entre el espaciador en el crARN y el protoespaciador en el ADN diana junto al motivo adyacente del protoespaciador (PAM), un requisito adicional para el reconocimiento de la diana. Finalmente, Cas9 media la escisión del ADN diana para crear una ruptura de doble hebra dentro del protoespaciador. La actividad del sistema CRISPR/Cas consta de tres pasos: (i) inserción de secuencias de ADN ajenas en la matriz CRISPR para prevenir ataques futuros, en un proceso llamado "adaptación", (ii) expresión de las proteínas relevantes, así como expresión y procesamiento de la matriz, seguido de (iii) interferencia mediada por ARN con el ácido nucleico ajeno. Por tanto, en la célula bacteriana, varias de las denominadas proteínas "Cas" están implicadas en la función natural del sistema CRISPR/Cas.

[0086] Los productos primarios de los loci CRISPR parecen ser ARNs cortos que contienen las secuencias de direccionamiento invasor, y que son llamados ARN de guía o ARN de silenciamiento procariontas (psiARNs) basado en su papel hipotético en la vía (Makarova et al. (2006) Biol. Direct 1: 7; Hale et al. (2008) RNA14: 2572-2579). El análisis de ARN indica que las transcripciones del locus CRISPR se escinden dentro de las secuencias repetidas para liberar intermedios de ARN de ~ 60 a 70 nt que contienen secuencias de direccionamiento de invasores individuales y fragmentos repetidos flanqueantes (Tang et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 7536-7541; Tang et al. (2005) Mol. Microbiol. 55: 469-481; Lillestolet al. (2006) Archaea 2: 59-72; Brouns et al. (2008) Science 321: 960-964; Hale et al. (2008) RNA 14: 2572-2579). En el archaeon *pyrococcus furiosus*, estos ARN intermedios se procesan adicionalmente a psiRNAs abundantes, estables ~35 a 45-nt maduros (Hale et al (2008) RNA14: 2572-2579).

[0087] En los sistemas de Tipo II CRISPR/Cas, crARNs se producen utilizando un mecanismo diferente en donde un ARN de activación de a-trans (tracrARN) complementarias a las secuencias de repetición en el pre-crARN, disparadores de procesamiento por un RNasa III específico de doble cadena en presencia de la proteína Cas9. Entonces, Cas9 es capaz de escindir un ADN diana que es complementario al crARN maduro, sin embargo, la escisión por Cas 9 depende tanto del emparejamiento de bases entre el crARN y el ADN diana, y en la presencia de un motivo corto en el crARN denominado secuencia PAM (motivo protoespacial adyacente) (ver Qi et al. (2013) Cell 152: 1173). Además, el tracrARN también debe estar presente como pares de bases con el crARN en su extremo 3', y esta asociación desencadena la actividad de Cas9.

[0088] El requisito del complejo crARN-tracrARN se puede evitar mediante el uso de una "ARN único de guía" (sgARN) que comprende la horquilla normalmente formada por la hibridación de la crARN y la tracrARN (véase, Jinek et al. (2012) Science 337: 816 y Cong et al. (2013) Scienceexpress/10.1126/science.1231143). En *S. pyrogenes*, la fusión tracrARN:crARN modificada, o sgARN, guía a Cas9 para escindir el ADN diana cuando se forma un heterodímero de ARN:ADN bicatenario entre los ARN asociados a Cas y el ADN diana. Este sistema que comprende la proteína Cas9 y un sgARN modificado que contiene una secuencia PAM se ha utilizado para la edición del genoma guiada por ARN (ver Ramalingam, ibid) y ha sido útil para la edición genómica de embriones de pez cebra *in vivo* (ver Hwang et al. (2013) Nature Biotechnology 31(3):227) con eficiencias de edición similares a las de ZFN y TALEN.

Proteínas Cas

[0089] La proteína de Cas9 tiene al menos dos dominios de nucleasa: un dominio nucleasa es similar a una endonucleasa de HNH, mientras que los otros se asemejan a un dominio de endonucleasa Ruv. El dominio de tipo HNH parece ser responsable de escindir la hebra de ADN que es complementaria al crARN, mientras que el dominio Ruv escinde la hebra no complementaria.

[0090] En ciertas realizaciones, la proteína Cas puede ser un "derivado funcional" de una proteína Cas de origen natural. Un "derivado funcional" de un polipéptido de secuencia nativa es un compuesto que tiene una propiedad biológica cualitativa en común con un polipéptido de secuencia nativa. Los "derivados funcionales" incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de una secuencia nativa y derivados de un polipéptido de secuencia nativa y sus fragmentos, siempre que tengan una actividad biológica en común con un polipéptido de secuencia nativa correspondiente. Una actividad biológica contemplada en el presente documento es la capacidad del derivado funcional para hidrolizar un sustrato de ADN en fragmentos. El término "derivado" abarca tanto variantes de secuencias de aminoácidos del polipéptido, modificaciones covalentes y fusiones de las mismas.

[0091] El "polipéptido Cas" abarca un polipéptido Cas de longitud completa, un fragmento enzimáticamente activo de un polipéptido Cas y derivados enzimáticamente activos de un polipéptido Cas o fragmento del mismo. Los derivados adecuados de un polipéptido Cas o un fragmento del mismo incluyen, pero no se limitan a mutantes, fusiones, modificaciones covalentes de la proteína Cas o un fragmento de la misma.

[0092] Las proteínas Cas y los polipéptidos Cas pueden obtenerse de una célula o sintetizarse químicamente o mediante una combinación de estos dos procedimientos. La célula puede ser una célula que produce proteína Cas de forma natural, o una célula que produce proteína Cas de forma natural y está diseñada genéticamente para producir la proteína Cas endógena a un nivel de expresión más alto o para producir una proteína Cas a partir de un ácido nucleico introducido exógenamente, cuyo ácido nucleico codifica una Cas que es igual o diferente de la Cas endógena. En algunos casos, la célula no produce de forma natural la proteína Cas y está diseñada genéticamente para producir una proteína Cas.

[0093] El sistema CRISPR/Cas puede también ser utilizado para la expresión de genes de inhibición. Lei et al. (2013) Cell 152 (5): 1173-1183) han demostrado que un Cas9 catalíticamente muerto que carece de actividad endonucleasa, cuando se coexpresa con un ARN guía, genera un complejo de reconocimiento de ADN que puede interferir específicamente con el alargamiento transcripcional, la unión de polimerasa de ARN o la unión de factor de transcripción. Este sistema, llamado interferencia CRISPR (CRISPRi), puede reprimir eficazmente la expresión de genes diana.

[0094] Adicionalmente, proteínas Cas se han desarrollado que comprenden mutaciones en sus dominios de escisión para render incapaces de inducir una DSB, y en lugar de mellar el ADN diana ("enzima mellar de Cas9", véase Cong

et al., *Ibid*). En particular, la nucleasa Cas comprende dos dominios de nucleasa, el HNH y similar a RuvC, para escindir las hebras sentido y antisentido del ADN diana, respectivamente. Por tanto, la nucleasa Cas puede diseñarse de manera que sólo uno de los dominios nucleasa sea funcional, creando así una nickasa de Cas. Véase, por ejemplo, Jinek et al., *Ibid*, y Cong et al., *Ibid*.

[0095] Las proteínas Cas se pueden mutar para alterar la funcionalidad. Métodos de selección ejemplares, que incluyen presentación de fagos y sistemas de dos híbridos, se describen en las Patentes de EE.UU. 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759; y 6,242,568; así como WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 y GB 2,338,237.

Componentes de ARN de CRISPR/Cas

[0096] El sistema de CRISPR/Cas relacionado con Cas9 comprende dos componentes no codificantes de ARN: tracrARN y una matriz precrARN que contiene secuencias guía de nucleasa (espaciadores) intercaladas por repeticiones directas idénticas (DRS). Para utilizar un sistema CRISPR/Cas para lograr la ingeniería del genoma, ambas funciones de estos ARN deben estar presentes (consulte Cong et al, (2013) Scienceexpress 1/10.1126/science 1231143). En algunas realizaciones, el tracrARN y pre-crARN se suministran mediante construcciones de expresión independientes o como RNA independientes. En otras realizaciones, se construye un ARN quimérico donde un ARNcr maduro diseñado (que confiere especificidad diana) se fusiona con un tracrARN (que proporciona interacción con el Cas9) para crear un híbrido quimérico cr-ARN-tracrARN (también denominado ARN guía único). (ver, Jinek, *ibid* y Cong, *ibid*).

[0097] Pueden diseñarse ARNs quiméricos o sgARN para que comprendan una secuencia complementaria a cualquier diana deseada. Los ARN comprenden 22 bases de complementariedad con una diana y de la forma G [n19], seguidas de un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) de la forma NGG. Por tanto, en un método, los sgARN se pueden diseñar mediante la utilización de una diana de ZFN conocida en un gen de interés (i) alineando la secuencia de reconocimiento del heterodímero de ZFN con la secuencia de referencia del genoma relevante (humano, ratón o de una especie particular de planta); (ii) identificar la región espaciadora entre los medios sitios de ZFN; (iii) identificar la ubicación del motivo G[N20]GG que está más cerca de la región del espaciador (cuando más de uno de tales motivos se superpone al espaciador, se elige el motivo que está centrado con respecto al espaciador); (iv) usar ese motivo como el núcleo del sgARN. Este método se basa ventajosamente en dianas de nucleasa probadas. Alternativamente, los sgARN pueden diseñarse para dirigirse a cualquier región de interés simplemente identificando una secuencia diana adecuada que se ajuste a la fórmula G[n20]GG.

Sitios diana

[0098] Como se describe en detalle anteriormente, los dominios de ADN (ZFPs, TALEs, CRISPR ARNs, meganucleasas) pueden ser diseñados para unirse a cualquier secuencia de elección en un locus. Un dominio de unión a ADN diseñado puede tener una nueva especificidad de unión, en comparación con un dominio de unión a ADN de origen natural. Los métodos de ingeniería incluyen, pero no se limitan a, diseño racional y varios tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, el uso de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos de tripletes (o cuatrupletes) y secuencias de aminoácidos individuales (por ejemplo, dedos de zinc), en las que cada secuencia de nucleótidos de tripletes o cuatrupletes está asociada con una o más secuencias de aminoácidos del dominio de unión al ADN. que unen la secuencia particular de triplete o cuatruplete. Véanse, por ejemplo, las patentes EE.UU. de copropiedad 6,453,242 y 6,534,261. También se puede realizar el diseño racional de dominios efectores de TAL. Véase, por ejemplo, la Publicación de EE.UU. N° 20110301073.

[0099] Métodos de selección a modo de ejemplo aplicables a los dominios de unión al ADN, incluyendo presentación en fagos y de dos híbridos de sistemas, se dan a conocer en las patentes US 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759; y 6,242,568; así como WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 y GB 2,338,237.

[0100] Selección de sitios diana; nucleasas y métodos para el diseño y construcción de proteínas de fusión (y polinucleótidos que codifican los mismos) son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en detalle en la Solicitud de Patente EE.UU. N°s 20050064474 y 20060188987.

[0101] Además, como se describe en estas y otras referencias, los dominios de unión al ADN (por ejemplo, proteínas con dedos de zinc de múltiples dedos) se pueden unir entre sí usando cualquier secuencia de engarce adecuada, incluyendo por ejemplo, engarces de 5 o más aminoácidos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 6,479,626; 6,903,185; y 7,153,949 para secuencias de engarce ejemplares de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier combinación de conectores adecuados entre los dominios individuales de unión al ADN de la proteína. Véase, también, la Publicación de EE.UU. N° 20110301073.

Donantes

[0102] Como se señaló anteriormente, la inserción de una secuencia exógena (también llamada una "secuencia

donante" o "donante" o "transgén"), por ejemplo, para la expresión de un polipéptido, corrección de un gen mutante o para una mayor expresión de un gen de tipo salvaje. Resultará fácilmente evidente que la secuencia donante no es típicamente idéntica a la secuencia genómica donde se coloca. Una secuencia donante puede contener una secuencia no homóloga flanqueada por dos regiones de homología para permitir una HDR eficiente en la ubicación de interés. Además, las secuencias donantes pueden comprender una molécula de vector que contiene secuencias que no son homólogas a la región de interés en la cromatina celular. Una molécula donante puede contener varias regiones discontinuas de homología con la cromatina celular. Por ejemplo, para la inserción dirigida de secuencias que normalmente no están presentes en una región de interés, dichas secuencias pueden estar presentes en una molécula de ácido nucleico donante y flanqueadas por regiones de homología con la secuencia en la región de interés.

[0103] El polinucleótido donante puede ser ADN o ARN, monocatenario o bicatenario y puede introducirse en una célula en forma lineal o circular. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de Patente de EE.UU. N^{os} 20100047805; 20110281361; 20110207221 y la solicitud de EE.UU. N^o 13/889,162 (publicada como US 20130326645). La secuencia o secuencias donantes pueden estar contenidas dentro de un ADN MC, que puede introducirse en la célula en forma circular o lineal. Si se introduce en forma lineal, los extremos de la secuencia donante pueden protegerse (por ejemplo, de la degradación exonucleolítica) mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se añaden uno o más residuos de didesoxinucleótidos al extremo 3' de una molécula lineal y/o se ligan oligonucleótidos autocomplementarios a uno o ambos extremos. Véase, por ejemplo, Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science272: 886-889. Los métodos adicionales para proteger polinucleótidos exógenos de la degradación incluyen, pero no se limitan a, la adición de grupo(s) de amino terminal y el uso de enlaces internucleotídicos modificados tales como, por ejemplo, fosforotioatos, fosforamidatos y residuos de O-metilto ribosa o desoxirribosa.

[0104] Un polinucleótido puede ser introducido en una célula como parte de una molécula de vector que tiene secuencias adicionales, tales como, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores y genes que codifican resistencia a los antibióticos. Además, los polinucleótidos donantes pueden introducirse como ácido nucleico desnudo, como ácido nucleico complejado con un agente como un liposoma o poloxámero, o pueden ser administrados por virus (por ejemplo, adenovirus, AAV, herpesvirus, retrovirus, lentivirus y lentivirus defectuosos en integrasa (IDLV)).

[0105] El donante se inserta generalmente de modo que su expresión está dirigida por el promotor endógeno al sitio de integración, es decir, el promotor que conduce la expresión del gen endógeno en donde se inserta el donante (por ejemplo, AAVS1, CCR5, HPRT etc. (véanse las patentes de los EE.UU. de copropiedad N^{os} 8,110,379 y 7,9519,25, y las publicaciones de EE.UU. N^o 20130137104 y 20130122591). Sin embargo, será evidente que el donante puede comprender un promotor y/o potenciador, por ejemplo promotor constitutivo o un promotor específico inducible o tejido.

[0106] también pueden lograrse inserción dirigida de secuencia de ácido nucleico no codificante. Las secuencias que codifican ARN, ARNi, shARNs y micro ARN (miARNs) antisentido también se pueden utilizar para las inserciones dirigidas.

[0107] La molécula donante puede insertarse en un gen endógeno de modo que se exprese todo, parte o ninguno del gen endógeno. Por ejemplo, un transgén como se describe en este documento puede insertarse en un locus endógeno de manera que algunos (N-terminal y/o C-terminal al transgén) o ninguna de las secuencias endógenas se expresa, por ejemplo, como una fusión con el transgén. En otras realizaciones, el transgén (por ejemplo, con o sin secuencias codificantes adicionales tales como el gen endógeno) se integra en cualquier locus endógeno, por ejemplo, un locus de puerto seguro. Ver, por ejemplo, Publicaciones de Patente de EE.UU. 20080299580; 20080159996 y 201000218264.

[0108] Cuando las secuencias endógenas (endógenos o parte del transgén) se expresan con el transgén, las secuencias endógenas pueden ser secuencias de longitud completa (de tipo salvaje o mutante) o secuencias parciales. Preferiblemente, las secuencias endógenas son funcionales. Los ejemplos no limitantes de la función de estas secuencias de longitud completa o parcial incluyen aumentar la vida media en suero del polipéptido expresado por el transgén (por ejemplo, gen terapéutico) y/o actuar como portador.

[0109] Además, aunque no se requiere para la expresión, las secuencias exógenas pueden incluir también la transcripción o secuencias reguladoras traduccionales, por ejemplo, promotores, potenciadores, aisladores, sitios de entrada de ribosoma interno, secuencias que codifican péptidos 2A y/o señales de poliadenilación.

[0110] En ciertas realizaciones, la secuencia exógena (donante) comprende una fusión de una proteína de interés y, como su compañero de fusión, un dominio extracelular de una proteína de membrana, haciendo que la proteína de fusión se encuentre en la superficie de la célula. En algunos casos, el donante codifica un CAR en donde las secuencias que codifican CAR se insertan en un puerto seguro de manera que se exprese CAR. En algunos casos, las secuencias que codifican CAR se insertan en un locus PD1 y/o CTLA-4. En otros casos, el CAR se suministra a la célula en un lentivirus para su inserción aleatoria, mientras que las nucleasas específicas de PD1 o CTLA-4 se suministran como ARNm. En algunos casos, el CAR se administra a través de un sistema de vector viral como AAV o adenovirus junto con nucleasas que codifican ARNm específicas para un puerto seguro (por ejemplo, AAVS1, CCR5, albúmina o HPRT). Véanse las publicaciones de Patente de EE.UU. N^{os} 20080299580; 20080159996; 201000218264;

20110301073; 20130177983 y 20130177960 y la Solicitud Provisional de EE.UU. N° 61/823,689 (correspondiente a la publicación de EE.UU. N° 20150056705). Las células también pueden tratarse con ARNm que codifican nucleasas específicas de PD1 y/o CTLA-4. En determinadas realizaciones, el polinucleótido que codifica CAR se suministra a través de un sistema de administración viral junto con ARNm que codifica nucleasas específicas de HPRT y nucleasas específicas de PD1 o CTLA-4. Las células que comprenden un nucleótido que codifica CAR integrado en el locus HPRT pueden seleccionarse para usar 6-tioguanina, un análogo de guanina que puede dar como resultado la detención celular y/o iniciar la apoptosis en células con un gen HPRT intacto. Los CAR que pueden usarse con los métodos y composiciones de la invención incluyen todos los tipos de estas proteínas quiméricas, incluidos los diseños de primera, segunda y tercera generación. Los CARS que comprenden dominios de especificidad derivados de anticuerpos son particularmente útiles, aunque la invención también contempla dominios de especificidad derivados de receptores, ligandos y polipéptidos manipulados. Los dominios de señalización intercelulares pueden derivarse de cadenas de RCT como zeta y otros miembros del complejo CD3 como las cadenas γ y ϵ . En algunos casos, los CAR pueden comprender dominios coestimuladores adicionales tales como los dominios intercelulares de CD28, CD137 (también conocidos como 4-1BB) o CD134. En otros casos más, pueden usarse simultáneamente dos tipos de dominios coestimuladores (es decir, CD3 zeta usado con CD28 + CD137).

Proteínas de fusión

[0111] Las proteínas de fusión que comprenden proteínas de unión al ADN (por ejemplo, ZFPs o TALEs) como se describe en el presente documento y un dominio (funcional) regulador heterólogo (o un fragmento funcional del mismo) también se proporcionan. Los dominios comunes incluyen, por ejemplo, dominios de factores de transcripción (activadores, represores, coactivadores, correpresores), silenciadores, oncogenes (por ejemplo, myc, jun, fos, myb, max, mad, rel, ets, bcl, myb, la mayoría de los miembros de la familia, etc.); enzimas reparadoras de ADN y sus factores y modificadores asociados; enzimas de transposición del ADN y sus factores y modificadores asociados; proteínas asociadas a cromatina y sus modificadores (por ejemplo, quinasas, acetilasas y desacetilasas); y enzimas modificadoras de ADN (por ejemplo, metiltransferasas, topoisomerasas, helicasas, ligasas, quinasas, fosfatasas, polimerasas, endonucleasas) y sus factores y modificadores asociados. Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N°s 20050064474; 20060188987 y 2007/0218528 para obtener detalles sobre fusiones de dominios de unión a ADN y dominios de escisión de nucleasa.

[0112] Dominios adecuados para lograr la activación incluyen el dominio HSV VP16 de activación (véase, por ejemplo, Hagmann et al., J. Virol. 71, 5,952-5,962 (1997)) receptores de hormonas nucleares (véase, por ejemplo, Torchia et al., Curr. Opin. Cell. Biol. 10: 373-383 (1998)); la subunidad p65 del factor nuclear kappa B (Bitko y Barik, J. Virol. 72: 5610-5618 (1998) y Doyle y Hunt, Neuroreport 8: 2937-2942 (1997)); Liu et al., Cancer Gene Ther. 5: 3-28 (1998)), o dominios funcionales quiméricos artificiales tales como VP64 (Beerli et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95: 14623-33) y degron (Molinari et al., (1999) EMBO J. 18, 6439-6447). Los dominios de activación ejemplares adicionales incluyen Oct 1, Oct-2A, Sp1, AP-2 y CTF1 (Seipel et al., EMBO J. 11, 4961-4968 (1992) así como p300, CBP, PCAF, SRC1 PVALF, AtHD2A y ERF-2. Véase, por ejemplo, Robyr et al. (2000) Mol. Endocrinol. 14: 329-347; Collingwood et al. (1999) J. Mol. Endocrinol. 23: 255-275; Leo et al. (2000) Gene 245: 1-11; Manteuffel-Cymborowska (1999) Acta Biochim. Pol. 46: 77-89; McKenna et al. (1999) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69: 3-12; Malik et al. (2000) Trends Biochem. Sci. 25: 277-283; y Lemon et al. (1999) Curr. Opin. Genet. Dev. 9: 499-504. Los dominios de activación ejemplares adicionales incluyen, pero no se limitan a, OsGAI, HALF-1, C1, AP1, ARF-5, -6, -7 y -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP y TRAB1. Véase, por ejemplo, Ogawa et al. (2000) Gene 245: 21-29; Okanami et al. (1996) Genes Cells 1: 87-99; Goff et al. (1991) Genes Dev. 5: 298-309; Cho et al. (1999) Plant Mol. Biol. 40: 419-429; Ulmason et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96: 5844-5849; Sprenger-Haussels et al. (2000) Plant J. 22: 1-8; Gong et al. (1999) Plant Mol. Biol. 41: 33-44; y Hobo et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96: 15,348-15.353.

[0113] Será evidente para los expertos en la técnica que, en la formación de una proteína de fusión (o un ácido nucleico que codifica la misma) entre un dominio de unión a ADN y un dominio funcional, ya sea un dominio de activación o una molécula que interactúa con un dominio de activación es adecuado como dominio funcional. Esencialmente, cualquier molécula capaz de reclutar un complejo activador y/o actividad activadora (tal como, por ejemplo, acetilación de histonas) en el gen diana es útil como dominio activador de una proteína de fusión. Los dominios aislantes, los dominios de localización y las proteínas de remodelación de la cromatina, como los dominios que contienen ISWI y/o las proteínas del dominio de unión a metilo, adecuadas para su uso como dominios funcionales en moléculas de fusión, se describen, por ejemplo, en las solicitudes de Patente de EE.UU. de propiedad conjunta 2002/0115215 y 2003/0082552. y en WO 02/44376 de propiedad conjunta.

[0114] Los dominios de represión ejemplares incluyen, pero no se limitan a, KRAB A/B, KOX, gen temprano inducible por TGF-beta (TIEG), v-erbA, SID, MBD2, MBD3, miembros de la familia DNMT (por ejemplo, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), Rb y MeCP2. Véase, por ejemplo, Bird et al. (1999) Cell 99: 451-454; Tyler et al. (1999) Cell 99: 443-446; Knoepfler et al. (1999) Cell 99: 447-450; y Robertson et al. (2000) Nature Genet. 25: 338-342. Los dominios de represión ejemplares adicionales incluyen, pero no se limitan a, ROM2 y AtHD2A. Véase, por ejemplo, Chem et al. (1996) Plant Cell 8: 305-321; y Wu et al. (2000) Plant J. 22: 19-27.

[0115] El componente/dominio funcional de una molécula de fusión se puede seleccionar de cualquiera de una variedad de diferentes componentes capaces de influir en la transcripción de un gen una vez que la molécula de fusión

se une con una secuencia diana a través de su dominio de unión a ADN. Por tanto, el componente funcional puede incluir, pero no se limita a, varios dominios de factores de transcripción, tales como activadores, represores, coactivadores, correpresores y silenciadores.

5 [0116] Dominios funcionales ejemplares adicionales se describen, por ejemplo, en Patente de EE.UU. de propiedad conjunta Nº 6,534,261 y Solicitud de Patente EE.UU. Nº 2002/0160940.

10 [0117] Los dominios funcionales que están regulados por moléculas pequeñas exógenas o ligandos también pueden seleccionarse. Por ejemplo, puede emplearse la tecnología RheoSwitch® en donde un dominio funcional solo asume su conformación activa en presencia del ligando RheoChem™ externo (véase, por ejemplo, el documento US 20090136465). Por tanto, ZFP, TALE o Cas pueden unirse operativamente al dominio funcional regulable en donde la actividad resultante de ZFP-TF, TALE-TF o CRISPR/Cas TF está controlada por el ligando externo.

15 Nucleasas

[0118] En determinadas realizaciones, la proteína de fusión comprende un dominio de unión a ADN y un dominio de escisión (nucleasa). Como tal, la modificación de genes se puede lograr usando una nucleasa, por ejemplo una nucleasa modificada. La tecnología de nucleasa modificada se basa en la ingeniería de proteínas de unión al ADN de origen natural. Los métodos y composiciones descritas en este documento son ampliamente aplicables y pueden implicar cualquier nucleasa de interés. Los ejemplos no limitantes de nucleasas incluyen meganucleasas, TALEN, nucleasas con dedos de zinc y sistemas de nucleasas CRISPR/Cas. La nucleasa puede comprender dominios de unión y escisión de ADN heterólogos (p. ej., nucleasas de dedos de zinc; TALEN, dominios de unión a ADN de meganucleasa con dominios de escisión heterólogos) o, alternativamente, el dominio de unión a ADN de una nucleasa natural puede alterarse para unirse a un sitio diana seleccionado (por ejemplo, una meganucleasa que ha sido diseñada para unirse a un sitio diferente al sitio de unión análogo). Por ejemplo, se ha descrito la ingeniería de endonucleasas autodirigidas con especificidades de unión a ADN adaptadas, véase Chames et al. (2005) Nucleic Acids Res 33 (20): e178; Arnould et al. (2006) J. Mol. Biol. 355: 443-458 y Grizot et al (2009) Nucleic Acids Res 7 de julio y publicación. Además, también se ha descrito la ingeniería de ZFP. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nº 6,534,261; 6,607,882; 6,824,978; 6,979,539; 6,933,113; 7,163,824; y 7,013,219. La nucleasa puede comprender combinaciones de ácido nucleico y proteína (por ejemplo, CRISPR/Cas).

[0119] En cierta realización, la nucleasa es una meganucleasa (endonucleasa autodirigida). Las meganucleasas de origen natural reconocen sitios de escisión de 15-40 pares de bases y comúnmente se agrupan en cuatro familias: la familia LAGLIDADG, la familia GIY-YIG, la familia box de His-Cyst y la familia HNH. Ejemplos de endonucleasas autodirigidas incluyen I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-Scell, I-PpoI, I-ScellIII, I-Crel, I-TeV1, I-TeVII y I-TeVIII. Se conocen sus secuencias de reconocimiento. Véase también la Patente de EE.UU. Nº 5,420,032; Patente de EE.UU. Nº 6,833,252; Belfort y otros (1997) Nucleic Acids Res.25: 3379-3388; Dujon et al. (1989) Gene82: 115-118; Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12: 224-228; Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263: 163-180; Argast et al. (1998) J. Mol. Biol.280: 345-353 y el catálogo de New England Biolabs.

[0120] Dominios de unión a ADN de meganucleasas de origen natural, principalmente de la familia LAGLIDADG, han sido utilizados para fomentar modificación genoma específica de sitio en plantas, levaduras, Drosophila, células de mamíferos y ratones, pero este enfoque se ha limitado a la modificación de genes homólogos que conservan la secuencia de reconocimiento de meganucleasa (Monet et al. (1999), Biochem. Biophysics. Res. Common. 255: 88-93) o de genomas prediseñados en los que se ha introducido una secuencia de reconocimiento (Route et al. (1994), Mol. Cell. Biol. 14: 8096-106; Chilton et al. (2003), Plant Physiology. 133: 956-65; Puchta et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU. 93: 5055-60; Rong et al. (2002), Genes Dev. 16: 1568-81; Gouble et al. (2006), J. Gene Med. 8 (5): 616-622). En consecuencia, se han hecho intentos de diseñar meganucleasas para exhibir una nueva especificidad de unión en sitios médicamente o biotecnológicamente relevantes (Porteus et al. (2005), Nat. Biotechnol. 23: 967-73; Sussman et al. (2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41; Epinat et al. (2003), Nucleic Acids Res. 31: 2952-62; Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10: 895-905; Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res,31: 2952-2962; Ashworth et al. (2006) Nature441: 656-659; Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7: 49-66; Publicaciones de Patentes de EE.UU. Nºs 20070117128; 20060206949; 20060153826; 20060078552; y 20040002092). Además, los dominios de unión a ADN de origen natural o manipulados de meganucleasas también se han unido operativamente con un dominio de escisión de una nucleasa heteróloga (por ejemplo, FokI).

[0121] En otras realizaciones, la nucleasa es una nucleasa de dedos de cinc (ZFN). Las ZFN comprenden una proteína con dedos de zinc que se ha diseñado para unirse a un sitio diana en un gen de elección y dominio de escisión o un medio-dominio de escisión.

[0122] Como se señaló anteriormente, los dominios de unión de dedo de zinc se pueden diseñar para unirse a una secuencia de elección. Véase, por ejemplo, Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20: 135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem,70: 313-340; Isalan y otros (2001) Nature Biotechnol. 19: 656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol,12: 632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10: 411-416. Un dominio de unión de dedos de zinc diseñado puede tener una nueva especificidad de unión, en comparación con una proteína de dedos de zinc de origen natural. Los métodos de ingeniería incluyen, pero no se limitan a, diseño racional y varios tipos de selección. El diseño

racional incluye, por ejemplo, el uso de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos de tripletes (o cuatrupletes) y secuencias de aminoácidos de dedos de zinc individuales, en las que cada secuencia de nucleótidos de tripletes o cuatrupletes está asociada con una o más secuencias de aminoácidos de dedos de zinc que se unen a la secuencia particular de triplete o cuatrupletes. Véanse, por ejemplo, las patentes EE.UU. de copropiedad 6,453,242 y 6,534,261.

[0123] Los métodos de selección ejemplares, que incluyen la presentación de fagos y los sistemas de dos híbridos, se describen en las Patentes de EE.UU. 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759; y 6,242,568; así como WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 y GB 2,338,237. Además, se ha descrito la mejora de la especificidad de unión para los dominios de unión de dedos de zinc, por ejemplo, en el documento WO 02/077227 de propiedad conjunta.

[0124] Selección de sitios diana; ZFNs y métodos para el diseño y construcción de proteínas de fusión (y los polinucleótidos que codifican los mismos) son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en detalle en la Solicitud de Patente EE.UU. N^{os} 20050064474 y 20060188987.

[0125] Además, como se describe en estas y otras referencias, los dominios con dedos de zinc y/o proteínas con dedos de zinc de múltiples dedos pueden unirse entre sí usando cualquier secuencia de engarce adecuada, incluyendo, por ejemplo, engarces de 5 o más aminoácidos de longitud. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N^o 6,479,626; 6,903,185; y 7,153,949 para secuencias de engarce ejemplares de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier combinación de conectores adecuados entre los dedos de zinc individuales de la proteína.

[0126] En algunas realizaciones, la nucleasa es un TALEN diseñado. Se han publicado métodos y composiciones para manipular estas proteínas para lograr una interacción sólida y específica del sitio con la secuencia diana elegida por el usuario (véase la solicitud de Patente de EE.UU. de copropiedad N^o 20110301073).

[0127] En otras realizaciones, la nucleasa es un sistema de nucleasa de CRISPR/Cas como se describe en el presente documento.

[0128] Las nucleasas tales como ZFN, TALEN, CRISPR/Cas y/o meganucleasas también comprenden una nucleasa (dominio de escisión, medio-dominio de escisión). Como se indicó anteriormente, el dominio de escisión puede ser homólogo o heterólogo al dominio de unión al ADN. Por ejemplo, los dominios de escisión pueden incluir nucleasas Cas (en un sistema CRISPR/Cas) o dominios de escisión de meganucleasa con un dominio de unión a ADN de meganucleasa. Alternativamente, los dominios de escisión heterólogos incluyen proteínas de fusión que comprenden un dominio de unión a ADN de dedo de zinc o TALE y un dominio de escisión de una nucleasa o un dominio de unión a ADN de meganucleasa y un dominio de escisión de una nucleasa diferente. Los dominios de escisión heterólogos se pueden obtener a partir de cualquier endonucleasa o exonucleasa. Las endonucleasas ejemplares a partir de las que se puede derivar un dominio de escisión incluyen, pero no se limitan a, endonucleasas de restricción y endonucleasas autodirigidas. Véase, por ejemplo, el catálogo 2002-2003, New England Biolabs, Beverly, MA; y Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3379-3388. Se conocen enzimas adicionales que escinden el ADN (p. ej., nucleasa S1; nucleasa de frijol mungo; ADNasa I pancreática; nucleasa microcócica; endonucleasa HO de levadura; véase también Linn et al. (Eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Una o más de estas enzimas (o fragmentos funcionales de las mismas) se pueden usar como fuente de dominios de escisión y medio-dominios de escisión.

[0129] Del mismo modo, un medio-dominio de escisión se puede derivar de cualquier nucleasa o porción del mismo, como se ha expuesto anteriormente, que requiere dimerización para la actividad de escisión. En general, se requieren dos proteínas de fusión para la escisión si las proteínas de fusión comprenden medio-dominios de escisión. Alternativamente, se puede usar una única proteína que comprende dos medio-dominios de escisión. Los dos medio-dominios de escisión pueden derivarse de la misma endonucleasa (o fragmentos funcionales de la misma), o cada medio-dominio de escisión puede derivarse de una endonucleasa diferente (o fragmentos funcionales de la misma). Además, los sitios diana para las dos proteínas de fusión están preferiblemente dispuestos, entre sí, de modo que la unión de las dos proteínas de fusión a sus respectivos sitios diana coloque los medio-dominios de escisión en una orientación espacial entre sí que permita que los medio-dominios de escisión formen un dominio de escisión funcional, por ejemplo, dimerizando. Por tanto, en determinadas realizaciones, los bordes cercanos de los sitios diana están separados por 5-8 nucleótidos o por 15-18 nucleótidos. Sin embargo, cualquier número entero de nucleótidos o pares de nucleótidos puede intervenir entre dos sitios diana (por ejemplo, de 2 a 50 pares de nucleótidos o más). En general, el sitio de escisión se encuentra entre los sitios diana.

[0130] Las endonucleasas de restricción (enzimas de restricción) están presentes en muchas especies y son capaces de unirse al ADN (a un sitio de reconocimiento), y la escisión de ADN en o cerca del sitio de unión específico a secuencia. Ciertas enzimas de restricción (p. ej., tipo IIS) escinden el ADN en sitios retirados del sitio de reconocimiento y tienen dominios de unión y escisión separables. Por ejemplo, la enzima de tipo IIS *FokI* cataliza la escisión bicatenaria del ADN, en 9 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en una hebra y 13 nucleótidos en su sitio de reconocimiento en la otra. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 5,356,802; 5,436,150 y 5,487,994; así como Li et al. (1992)

Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 4275-4279; Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 2764-2768; Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 883-887; Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269: 31,978-982. Por tanto, en una realización, las proteínas de fusión comprenden el dominio de escisión (o medio dominio de escisión) de al menos una enzima de restricción de Tipo IIS y uno o más dominios de unión a dedos de zinc, que pueden o no pueden ser manipulados por ingeniería genética.

[0131] Un tipo IIS ejemplar de enzima de restricción, cuyo dominio de escisión es separable del dominio de unión, es *FokI*. Esta enzima particular es activa como un dímero. Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95: 10,570-10,575. Por consiguiente, para los propósitos de la presente divulgación, la porción de la enzima *FokI* usada en las proteínas de fusión descritas se considera un medio-dominio de escisión. Por lo tanto, para la escisión de doble hebra dirigida y/o la sustitución dirigida de secuencias celulares utilizando fusiones de dedos de zinc-*FokI* o TALE-*FokI*, se pueden usar dos proteínas de fusión, cada una de las cuales comprende un medio-dominio de escisión de *FokI*, para reconstituir un catalizador. dominio de escisión activo. Alternativamente, también se puede usar una única molécula de polipéptido que contenga un dedo de zinc o un dominio de unión a ADN TALE y dos medio-dominios de escisión *FokI*. Los parámetros para la escisión dirigida y la alteración de la secuencia dirigida usando fusiones de dedos de zinc o TALE-*FokI* se proporcionan en otra parte de esta descripción.

[0132] Un dominio de escisión o medio-dominio de escisión puede ser cualquier porción de una proteína que conserva la actividad de escisión, o que conserva la capacidad de multimerizar (por ejemplo, dimerizan) para formar un dominio de escisión funcional.

[0133] Enzimas de restricción de tipo IIS ejemplares se describen en la Publicación Internacional WO 07/014275. Las enzimas de restricción adicionales también contienen dominios de unión y escisión separables, y estos se contemplan en la presente divulgación. Véase, por ejemplo, Roberts et al. (2003) Nucleic Acids Res 31: 418-420.

[0134] En determinadas formas de realización, el dominio de escisión comprende uno o más medio-dominios de escisión modificados (también denominados mutantes del dominio de dimerización) que minimizan o previenen la homodimerización, como se describe, por ejemplo, en las publicaciones de Patente de EE.UU. N° 20050064474; 20060188987 y 20080131962. Los residuos de aminoácidos en las posiciones 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537 y 538 de *FokI* son dianas para influir en la dimerización de los medio-dominios de escisión de *FokI*.

[0135] Los medio-dominios de escisión modificados por ingeniería de ejemplo de *FokI* que forman heterodímeros obligados incluyen un par en donde un primer medio-dominio de escisión incluye mutaciones en los residuos de aminoácidos en las posiciones 490 y 538 de *FokI* y un segundo medio-dominio de escisión incluye mutaciones en residuos de aminoácidos 486 y 499.

[0136] Por lo tanto, en una realización, una mutación en 490 sustituye Glu (E) con Lys (K); la mutación en 538 reemplaza Iso (I) con Lys (K); la mutación en 486 reemplazó a Gln (Q) con Glu (E); y la mutación en la posición 499 reemplaza Iso (I) con Lys (K). Específicamente, los medio-dominios de escisión diseñados aquí descritos se prepararon mutando las posiciones 490 (E → K) y 538 (I → K) en un medio-dominio de escisión para producir un medio-dominio de escisión diseñado denominado "E490K:I538K" y por mutar las posiciones 486 (Q → E) y 499 (I → L) en otro medio-dominio de escisión para producir un medio-dominio de escisión diseñado como "Q486E:I499L". Los medio-dominios de escisión modificados genéticamente descritos en el presente documento son mutantes heterodímeros obligados en los que la escisión aberrante se minimiza o anula. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 de la Publicación de Patente de EE.UU. de propiedad conjunta N° 20080131962, y la Patente de EE.UU. emitida N° 7,914,796.

[0137] En ciertas realizaciones, el medio-dominio de escisión modificado genéticamente comprende mutaciones en las posiciones 486, 499 y 496 (numeradas en relación con el de tipo salvaje *FokI*), para las mutaciones de instancia que reemplazan el residuo Gln (Q) de tipo salvaje en la posición 486 con un residuo Glu (E), el residuo Iso (I) de tipo salvaje en la posición 499 con un residuo Leu (L) y el residuo Asn (N) de tipo salvaje en la posición 496 con un residuo Asp (D) o Glu (E) (también denominado dominios "ELD" y "ELE", respectivamente). En otras realizaciones, el medio-dominio de escisión por ingeniería genética comprende mutaciones en las posiciones 490, 538 y 537 (numeradas en relación con *FokI* de tipo salvaje), por ejemplo mutaciones que reemplazan el residuo de Glu (E) de tipo salvaje en la posición 490 con un residuo de Lys (K), el residuo de Iso (I) de tipo salvaje en la posición 538 con un residuo de Lys (K) y el residuo de His (H) de tipo salvaje en la posición 537 con un residuo Lys (K) o un residuo Arg (R) (también denominados dominios "KKK" y "KKR", respectivamente). En otras realizaciones, el medio-dominio de escisión diseñado por ingeniería comprende mutaciones en las posiciones 490 y 537 (numeradas con respecto al *FokI* de tipo salvaje), por ejemplo, mutaciones que reemplazan el residuo de Glu (E) de tipo salvaje en la posición 490 con un residuo Lys (K) y el residuo His (H) de tipo salvaje en la posición 537 con un residuo Lys (K) o un residuo Arg (R) (también denominados dominios "KIK" y "KIR", respectivamente). (Véase la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20110201055). Los medio-dominios de escisión diseñados aquí descritos pueden prepararse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio de los medio-dominios de escisión de tipo salvaje (*FokI*) como se describe en las publicaciones de Patente de EE.UU. 20080131962; y 20110201055.

[0138] Alternativamente, las nucleasas pueden ensamblarse *in vivo* en el sitio diana de ácido nucleico utilizando la llamada tecnología "de enzima escindida" (véase, por ejemplo la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20090068164). Los componentes de tales enzimas divididas pueden expresarse en construcciones de expresión separadas o pueden unirse en un marco de lectura abierto donde los componentes individuales están separados, por ejemplo, por un péptido 2A autoescindible o una secuencia IRES. Los componentes pueden ser dominios de unión de dedos de zinc individuales o dominios de un dominio de unión de ácido nucleico de meganucleasa.

[0139] Los medio-dominios de escisión modificados por ingeniería descritos en el presente documento se pueden preparar usando cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio de medio-dominios de escisión de tipo salvaje (*FokI*) en las publicaciones de Patente de EE.UU. N°s 20050064474; 2007/0305346; 2008/0131962; y 20110201055.

[0140] Las construcciones de expresión de nucleasa se pueden diseñar fácilmente utilizando métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de Patente de EE.UU. 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; y Publicación Internacional WO 07/014275. En determinadas realizaciones, la expresión de la nucleasa está bajo el control de un promotor inducible, por ejemplo, el promotor de galactoquinasa que se activa (desreprime) en presencia de rafinosa y/o galactosa y se reprime en presencia de glucosa. En particular, el promotor de galactoquinasa se induce y la(s) nucleasa(s) se expresan tras cambios sucesivos en la fuente de carbono (por ejemplo, de glucosa a rafinosa a galactosa). Otros ejemplos no limitantes de promotores inducibles incluyen *CUP1*, *MET15*, *PHO5* y promotores que responden a tet.

[0141] Las nucleasas que generan roturas de cadena sencilla también se pueden usar. En determinadas realizaciones, se usa una nucleasa catalíticamente inactiva en combinación con una nucleasa catalíticamente activa para generar una rotura monocatenaria (también denominada "nickasas"). Dichas nickasas se describen, por ejemplo, en la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20100047805; Jinek et al, *ibid*; Cong et al., *Ibid*. Las nickasas se pueden generar por mutación específica de aminoácidos en el dominio catalítico de la enzima, o por truncamiento de parte o de todo el dominio de manera que ya no sea funcional. Por tanto, en nucleasas que comprenden dos dominios de nucleasa (escisión) (p. ej., sistemas de nucleasas ZFN, TALEN y CRISPR/Cas), esta estrategia puede adoptarse en cualquier dominio. Además, se puede lograr una ruptura de doble hebra en el ADN diana mediante el uso de dos de tales nickasas monocatenarias. Cada nickasa escinde una hebra del ADN y el uso de dos o más nickasas puede crear una rotura de doble hebra (por ejemplo, una rotura de doble hebra escalonada) en una secuencia de doble hebra diana.

Administración

[0142] Las nucleasas y factores de transcripción, polinucleótidos que codifican los mismos, y/o cualesquiera polinucleótidos donantes y composiciones que comprenden las proteínas y/o polinucleótidos descritos en el presente documento pueden ser entregados a una célula diana por cualquier medio adecuado.

[0143] Las células adecuadas incluyen, pero no se limitan a células eucariotas y procariontes y/o líneas celulares. Los ejemplos no limitantes de dichas células o líneas celulares generadas a partir de dichas células incluyen COS, CHO (por ejemplo, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (p. ej., HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T) y células perC6, así como células de insectos como *Spodoptera frugiperda* (Sf), o células fúngicas como *Saccharomyces*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*. En determinadas realizaciones, la línea celular es una línea celular CHO-K1, MDCK o HEK293. Las células primarias adecuadas incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y otros subconjuntos de células sanguíneas como, entre otros, cualquier célula T, como células T CD4+, células T CD8+, células infiltrantes de tumores (LIT) o cualquier otro tipo de célula T. Las células adecuadas también incluyen células madre tales como, a modo de ejemplo, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre hematopoyéticas, células madre neuronales y células madre mesenquimales.

[0144] Los métodos para administrar factores de transcripción y nucleasas como se describen en el presente documento se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N° 6,453,242; 6,503,717; 6,534,261; 6,599,692; 6,607,882; 6,689,558; 6,824,978; 6,933,113; 6,979,539; 7,013,219; y 7,163,824.

[0145] Los factores de transcripción y nucleasas tal como se describe en el presente documento también se pueden administrar usando vectores, por ejemplo, que contiene secuencias que codifican una o más de las proteínas. Los polinucleótidos que codifican donantes pueden administrarse de manera similar. Se puede usar cualquier sistema de vectores, incluidos, entre otros, vectores plásmidos, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales, vectores poxvirus; vectores de herpesvirus y vectores de virus adenoasociados, etc. Véanse también las Patentes de EE.UU. N° 6,534,261; 6,607,882; 6,824,978; 6,933,113; 6,979,539; 7,013,219; y 7,163,824. Además, resultará evidente que cualquiera de estos vectores puede comprender uno o más factores de transcripción y/o nucleasa. Por lo tanto, cuando uno o más ZFP, TALE, moléculas CRISPR/Cas y/o donantes se introducen en la célula, las ZFP, TALE, moléculas CRISPR/Cas y/o los donantes pueden llevarse sobre el mismo vector o sobre diferentes vectores. Cuando se usan múltiples vectores, cada vector puede comprender una secuencia que codifica uno o más ZFP, TALE, moléculas CRISPR/Cas y/o donantes.

[0146] Métodos convencionales de transferencia génica basados en virus y no virales se pueden utilizar para introducir ácidos nucleicos que codifican ZFPs modificados, moléculas CRISPR/Cas, TALEs y/o donantes de células (por ejemplo, células de mamífero) y tejidos diana. Dichos métodos también se pueden usar para administrar ácidos nucleicos que codifican moléculas ZFPs, TALEs, CRISPR/Cas y/o donantes a células *in vitro*. En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican ZFP, TALEs, moléculas CRISPR/Cas y/o donantes se administran para usos de terapia génica *in vivo* o *ex vivo*. Los sistemas de administración de vectores no virales incluyen plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo y ácido nucleico complejo con un vehículo de administración tal como un liposoma o poloxámero. Los sistemas de administración de vectores virales incluyen virus de ADN y ARN, que tienen genomas episomales o integrados después de la administración a la célula. Para una revisión de los procedimientos de terapia génica, véase Anderson, *Science* 256: 808-813 (1992); Nabel y Felgner, *TIBTECH* 11: 211-217 (1993); Mitani y Caskey, *TIBTECH* 11: 162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11: 167 - 175 (1993); Miller, *Nature* 357: 455 - 460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6 (10): 1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8: 35 - 36 (1995); Kremer y Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51 (1): 31-44 (1995); Haddada et al., en *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Doerfler y Böhm (eds.) (1995); y Yu et al., *Gene Therapy* 1: 13-26 (1994).

[0147] Los métodos de administración no viral de ácidos nucleicos incluyen electroporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, polimerización o lípido: conjugados de ácido nucleico, ADN desnudo, ARNm, viriones artificiales y absorción de ADN mejorada por agentes. La sonoporación usando, por ejemplo, el sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) también se puede usar para el suministro de ácidos nucleicos.

[0148] Los sistemas de entrega adicionales a modo de ejemplo de ácido nucleico incluyen los proporcionados por Amaxa® Biosystems (Colonia, Alemania), MaxCyte, Inc. (Rockville, Maryland), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) y Copernicus Therapeutics Inc. (ver por ejemplo US6008336). La lipofección se describe, por ejemplo, en los documentos US 5,049,386, US 4,946,787; y US 4,897,355) y los reactivos de lipofección se venden comercialmente (por ejemplo, Transfectam™ y Lipofectin™). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para la lipofección de polinucleótidos de reconocimiento de receptor eficaz incluyen los de Felgner, WO 91/17424, WO 91/16024. La administración puede ser a células (administración *ex vivo*) o tejidos diana (administración *in vivo*).

[0149] La preparación de complejos de lípido:ácido nucleico, incluyendo liposomas dirigidos tales como complejos de inmunolípido, es bien conocido para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Crystal, *Science* 270: 404-410 (1995); Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* 2: 291-297 (1995); Behr et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 382-389 (1994); Remy et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 647-654 (1994); Gao et al., *Gene Therapy* 2: 710-722 (1995); Ahmad et al., *Cancer Res.* 52: 4817-4820 (1992); Patentes de EE.UU. N^{os} 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085 4,837,028 y 4,946,787).

[0150] Los métodos adicionales de administración incluyen el uso de envasado de los ácidos nucleicos a ser entregado en vehículos de entrega EnGeneIC (VED). Estas VED se administran específicamente a tejidos diana utilizando anticuerpos biespecíficos donde un brazo del anticuerpo tiene especificidad por el tejido diana y el otro tiene especificidad por la VED. El anticuerpo lleva las VDE a la superficie de la célula diana y luego la VDE entra en la célula por endocitosis. Una vez en la célula, el contenido se libera (ver MacDiarmid et al (2009) *Nature Biotechnology* 27(7) p. 643).

[0151] El uso de sistemas basados en virus de ARN o ADN para la entrega de ácidos nucleicos que codifican ZFPs de ingeniería, TALEs, moléculas de CRISPR/Cas, y/o donantes se aprovechan de los procesos altamente evolucionados para dirigir un virus a células específicas en el cuerpo y el tráfico de la carga viral al núcleo. Los vectores virales se pueden administrar directamente a pacientes (*in vivo*) o se pueden usar para tratar células *in vitro* y las células modificadas se administran a pacientes (*ex vivo*). Los sistemas basados en virus convencionales para el suministro incluyen, pero no se limitan a, vectores de virus retrovirales, lentivirus, adenovirales, adenoasociados, vaccinia y herpes simplex para la transferencia de genes. La integración en el genoma del huésped es posible con los métodos de transferencia de genes de retrovirus, lentivirus y virus adenoasociados, lo que a menudo da como resultado la expresión a largo plazo del transgén insertado. Además, se han observado altas eficiencias de transducción en muchos tipos de células y tejidos diana diferentes.

[0152] El tropismo de un retrovirus puede alterarse por incorporación de proteínas de la envoltura exterior, la ampliación de la potencial población diana de células diana. Los vectores lentivirales son vectores retrovirales que pueden transducir o infectar células que no se dividen y típicamente producen altos títulos virales. La selección de un sistema de transferencia de genes retrovirales depende del tejido diana. Los vectores retrovirales se componen de repeticiones terminales largas que actúan en cis con capacidad de empaquetamiento de hasta 6-10 kb de secuencia extraña. Las LTR mínimas que actúan en cis son suficientes para la replicación y el empaquetamiento de los vectores, que luego se utilizan para integrar el gen terapéutico en la célula diana para proporcionar una expresión transgénica permanente. Los vectores retrovirales ampliamente utilizados incluyen los basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), el virus de la leucemia del mono gibbon (GaLV), el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Buchscher et al., *J. Virol.* 66: 2731-2739 (1992); Johann et al., *J. Virol.* 66: 1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., *Virol.* 176: 58-59 (1990); Wilson et al., *J. Virol.* 63: 2374-2378 (1989); Miller et al., *J. Virol.* 65: 2220-2224 (1991); PCT/US94/05700).

[0153] En aplicaciones en las que se prefiere la expresión transitoria, los sistemas basados adenovirales pueden ser utilizados. Los vectores basados en adenovirus son capaces de una eficacia de transducción muy alta en muchos tipos de células y no requieren división celular. Con tales vectores se han obtenido títulos elevados y niveles de expresión elevados. Este vector se puede producir en grandes cantidades en un sistema relativamente simple. Los vectores de virus adenoasociados ("AAV") también se utilizan para transducir células con ácidos nucleicos diana, por ejemplo, en la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos, y para procedimientos de terapia génica *in vivo* y *ex vivo* (ver, por ejemplo, West et al., Virology 160: 38-47 (1987); Patente de EE.UU. N° 4,797,368; WO 93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5: 793-801 (1994); Muzyczka, J. Clin. Invest. 94: 1351 (1994). La construcción de vectores AAV recombinantes se describe en varias publicaciones, incluida la Patente de EE.UU. N° 5,173,414; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3251-3260 (1985); Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4: 2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81: 6466-6470 (1984); y Samulski et al., J. Virol, 63: 03822-3828. (1989).

[0154] Al menos seis enfoques de vectores víricos están disponibles actualmente para transferencia génica en ensayos clínicos, que utilizan enfoques que implican complementación de vectores defectuosos por genes insertados en líneas de células cooperadoras para generar el agente transductor.

[0155] pLASN y MFG-S son ejemplos de vectores retrovirales que se han usado en ensayos clínicos (Dunbar et al, Blood. 85: 3048-305 (1995); Kohn et al, Nat Med 1: 1017-102 (1995); Malech et al., PNAS 94:22 12133-12138 (1997)). PA317/pLASN fue el primer vector terapéutico utilizado en un ensayo de terapia génica. (Blaese et al., Science 270: 475 - 480 (1995)). Se han observado eficiencias de transducción del 50% o más para los vectores empaquetados MFG-S. (Ellem et al., Immunol Immunother. 44 (1): 10-20 (1997); Dranoff et al., Hum. Gene Ther. 1: 111-2 (1997).

[0156] Vectores de virus adenoasociado recombinantes (rAAV) son sistemas alternativos prometedores de administración de genes basados en el virus de tipo adenoasociado de parvovirus defectuoso y no patógeno. Los vectores se derivan de un plásmido que retiene solo las repeticiones terminales invertidas de 145 pb del AAV que flanquean el casete de expresión del transgén. Transferencia génica eficiente y la entrega estable de transgén debido a la integración en los genomas de la célula transducida son características clave para este sistema de vector (Wagner et al., Lancet 351: 9117 1702-3 (1998), Kearns et al., Gene Ther. 9: 748-55 (1996)). También se pueden utilizar otros serotipos de AAV, incluidos AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 y AAV8, AAV 8,2, AAV9 y AAV rh10 y AAV pseudotipados como AAV2/8, AAV2/5 y AAV2/6. de acuerdo con la presente invención.

[0157] Vectores adenovirales recombinantes de replicación deficiente (Ad) pueden ser producidos a alto título y fácilmente infectan varios tipos de células diferentes. La mayoría de los vectores de adenovirus están diseñados de manera que un transgén sustituya a los genes Ad E1a, E1b y/o E3; posteriormente, el vector de replicación defectuosa se propaga en células 293 humanas que suministran la función del gen deleciónado en *trans*. Los vectores publicitarios pueden transducir múltiples tipos de tejidos *in vivo*, incluidas células diferenciadas que no se dividen, como las que se encuentran en el hígado, los riñones y los músculos. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad de carga. Un ejemplo del uso de un vector Ad en un ensayo clínico implicó la terapia con polinucleótidos para la inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7: 1083-9 (1998)). Ejemplos adicionales del uso de vectores de adenovirus para la transferencia de genes en ensayos clínicos incluyen Rosenecker et al., Infection 24: 1 5-10 (1996); Sterman et al., Hum. Gene Ther. 9: 7 1083 - 1089 (1998); Welsh et al., Hum. Gene Ther. 2: 205 - 18 (1995); Álvarez et al., Hum. Gene Ther. 5: 597 - 613 (1997); Topf et al., Gene Ther. 5: 507-513 (1998); Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7: 1083 - 1089 (1998).

[0158] Células de empaquetamiento se utilizan para formar partículas de virus que son capaces de infectar una célula huésped. Dichas células incluyen células 293, que empaquetan adenovirus, AAV y células ψ 2 o células PA317, que empaquetan retrovirus. Los vectores virales utilizados en la terapia génica generalmente se generan mediante una línea de células productoras que empaqueta un vector de ácido nucleico en una partícula viral. Los vectores contienen típicamente las secuencias virales mínimas necesarias para el empaquetamiento y la posterior integración en un huésped (si corresponde), siendo reemplazadas otras secuencias virales por un casete de expresión que codifica la proteína que se va a expresar. Las funciones virales faltantes son suministradas en *trans* por la línea celular empaquetadora. Por ejemplo, los vectores de AAV utilizados en terapia génica normalmente solo poseen secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del genoma de AAV que son necesarias para el empaquetamiento e integración en el genoma del huésped. El ADN viral se empaqueta en una línea celular, que contiene un plásmido auxiliar que codifica los otros genes de AAV, a saber, *rep* y *cap*, pero que carece de secuencias ITR. La línea celular también está infectada con adenovirus como ayudante. El virus auxiliar promueve la replicación del vector AAV y la expresión de genes AAV del plásmido auxiliar. El plásmido auxiliar no está empaquetado en cantidades significativas debido a la falta de secuencias ITR. La contaminación con adenovirus se puede reducir, por ejemplo, mediante tratamiento térmico al que el adenovirus es más sensible que el AAV. Además, AAV puede ser producido a escala clínica usando sistemas de baculovirus (véase la Patente de EE.UU. N° 7,479,554).

[0159] En muchas aplicaciones de terapia génica, es deseable que el vector de terapia génica puede entregar con un alto grado de especificidad para un tipo de tejido particular. En consecuencia, un vector viral puede modificarse para que tenga especificidad para un tipo de célula dado expresando un ligando como una proteína de fusión con una proteína de la cubierta viral en la superficie externa del virus. El ligando se elige para tener afinidad por un receptor conocido por estar presente en el tipo de célula de interés. Por ejemplo, Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92:

9747-9751 (1995), informaron que el virus de la leucemia murina Moloney se puede modificar para expresar herregulina humana fusionada a gp70, y el virus recombinante infecta ciertas células de cáncer de mama humano que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. Este principio puede extenderse a otros pares de virus-células diana, en las que la célula diana expresa un receptor y el virus expresa una proteína de fusión que comprende un ligando para el receptor de la superficie celular. Por ejemplo, los fagos filamentosos se pueden diseñar para que presenten fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, FAB o Fv) que tienen afinidad de unión específica por prácticamente cualquier receptor celular elegido. Aunque la descripción anterior se aplica principalmente a los vectores virales, los mismos principios se pueden aplicar a los vectores no virales. Dichos vectores se pueden diseñar para que contengan secuencias de captación específicas que favorezcan la captación por células diana específicas.

[0160] Los vectores de terapia génica se pueden administrar *in vivo* mediante administración a un paciente individual, típicamente mediante administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o aplicación tópica, como se describe a continuación. Alternativamente, los vectores se pueden administrar a células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido) o células madre hematopoyéticas universales del donante, seguido de reimplante de las células en un paciente, generalmente después de la selección de las células que han incorporado el vector.

[0161] La transfección celular *ex vivo* para diagnóstico, investigación o para terapia génica (por ejemplo, mediante reinfusión de las células transfectadas en el organismo huésped) es bien conocida por los expertos en la técnica. En una realización preferida, las células se aíslan del organismo sujeto, se transfectan con un ácido nucleico de ZFP (gen o ADNc) y se vuelven a infundir de nuevo en el organismo sujeto (por ejemplo, paciente). Los expertos en la técnica conocen bien varios tipos de células adecuados para la transfección *ex vivo* (véase, por ejemplo, Freshney et al., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (3ª ed. 1994)) y las referencias allí citadas para una discusión sobre cómo aislar y cultivar células de pacientes).

[0162] Las células adecuadas incluyen, pero no se limitan a células eucariotas y procariotas y/o líneas celulares. Los ejemplos no limitantes de dichas células o líneas celulares generadas a partir de dichas células incluyen COS, CHO (por ejemplo, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHODUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (p. ej., HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T) y células perC6, así como células de insectos como *Spodoptera frugiperda* (Sf), o células fúngicas como *Saccharomyces*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*. En determinadas realizaciones, la línea celular es una línea celular CHO-K1, MDCK o HEK293. Además, las células primarias pueden aislarse y usarse *ex vivo* para reintroducirlas en el sujeto a tratar después del tratamiento con los factores de transcripción y/o nucleasas descritos en este documento. Las células primarias adecuadas incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y otros subconjuntos de células sanguíneas tales como, pero sin limitarse a, células T tales como células infiltrantes de tumores (LIT), células T CD4+ o células T CD8+. Las células adecuadas también incluyen células madre tales como, a modo de ejemplo, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre hematopoyéticas, células madre neuronales y células madre mesenquimales.

[0163] En una realización, las células madre se utilizan en procedimientos *ex vivo* para la transfección celular y terapia génica. La ventaja de usar células madre es que pueden diferenciarse en otros tipos de células *in vitro*, o pueden introducirse en un mamífero (como el donante de las células) donde se injertarán en la médula ósea. Los métodos para la diferenciación de células CD34+ *in vitro* en tipos de células inmunes clínicamente importantes usando citocinas un GM-CSF tal, IFN- γ y TNF- α son conocidos (véase, Inaba et al, *J. Exp Med* 176: 1693-1702 (1992)).

[0164] Las células madre se aíslan para transducción y diferenciación utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, las células madre se aíslan de las células de la médula ósea mediante el cribado de las células de la médula ósea con anticuerpos que se unen a células no deseadas, como CD4+ y CD8+ (células T), CD45+ (células panB), GR-1 (granulocitos) y lad (células presentadoras de antígeno diferenciadas) (véase Inaba et al., *J. Exp. Med.* 176: 1693-1702 (1992)).

[0165] Las células madre que han sido modificadas también pueden utilizarse en algunas realizaciones. Por ejemplo, las células madre que se han hecho resistentes a la apoptosis se pueden usar como composiciones terapéuticas en las que las células madre también contienen las ZFP, TALE, moléculas CRISPR/Cas y/o donantes de la invención. La resistencia a la apoptosis puede producirse, por ejemplo, al anular BAX y/o BAK utilizando ZFN específicos de BAX o BAK (véase la solicitud de Patente de EE.UU. Nº 12/456,043 (posteriormente concedida como US 8,597,912)) en las células madre, o aquellos que se rompen en una caspasa, nuevamente usando ZFN específicos de caspasa-6, por ejemplo.

[0166] Los vectores (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, liposomas, etc.) que contienen moléculas terapéuticas de ZFP, TALE, CRISPR/Cas y/o ácidos nucleicos de donantes también pueden administrarse directamente a un organismo para la transducción de células *in vivo*. Alternativamente, se puede administrar ADN o ARNm desnudo. La administración se realiza mediante cualquiera de las rutas normalmente utilizadas para introducir una molécula en contacto final con células sanguíneas o tisulares, incluidas, entre otras, inyección, infusión, aplicación tópica y electroporación. Los métodos adecuados para administrar dichos ácidos nucleicos están disponibles y son bien

conocidos por los expertos en la técnica y, aunque se puede usar más de una ruta para administrar una composición particular, una ruta particular a menudo puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra ruta.

5 [0167] Los métodos para la introducción de ADN en células madre hematopoyéticas se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 5,928,638. Los vectores útiles para la introducción de transgenes en células madre hematopoyéticas, por ejemplo, células CD34+, incluyen adenovirus de tipo 35.

10 [0168] Los vectores adecuados para la introducción de transgenes en células inmunes (por ejemplo, células T) incluyen vectores lentivirus no integrantes. Véase, por ejemplo, Ory et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 11382-11388; Dull et al. (1998) J. Virol. 72: 8463-8471; Zuffery et al. (1998) J. Virol. 72: 9873-9880; Follenzi et al. (2000) Nature Genetics 25: 217-222.

15 [0169] Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas disponibles, como se describe a continuación (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., 1989).

Aplicaciones

20 [0170] Las composiciones y métodos descritos se pueden utilizar para cualquier aplicación en donde se desea modular la expresión de PD-1 y/o CTLA-4. En particular, estos métodos y composiciones pueden usarse cuando se desee la modulación de PD-1 o CTLA-4, incluidas, entre otras, aplicaciones terapéuticas y de investigación. La invención también contempla la inserción de secuencias de ADN que codifican un CAR y/o un RCT modificado en el genoma de PD-1 y/o células moduladas por CTLA-4 (p. ej., células en las que la expresión de PD1 y/o CTLA-4 se modifica mediante un factor de transcripción manipulado o se anula utilizando nucleasas modificadas genéticamente). En algunos casos, las células son LIT o células expandidas a partir de LIT. Los métodos y composiciones pueden usarse para tratar diversas enfermedades y trastornos que incluyen enfermedades infecciosas crónicas tales como VIH/SIDA y VHC y/o cánceres (por ejemplo, melanoma, cáncer de ovario, cáncer colorrectal/colon, carcinoma de células renales, plasmocitoma/mieloma, cáncer de mama cáncer y cáncer de pulmón).

30 [0171] Estas y otras enfermedades pueden también ser tratadas con nucleasas dirigidas a PD1- o CTLA-4 o factores de transcripción en combinación con los coches en los que los CAR se introducen en la célula a través de un sistema de administración viral. En algunos casos, también se introduce un RCT diseñado en la célula, o se puede introducir en la célula en lugar de un CAR. Para facilitar el funcionamiento del RCT modificado por ingeniería, el RCT endógeno también puede romperse.

40 [0172] Los métodos y composiciones que comprenden nucleasas o factores de transcripción específicos de PD1 o CTLA-4 también se pueden usar junto con otras terapias diseñadas para tratar una enfermedad infecciosa crónica o cáncer. Las nucleasas como se describen en este documento (por ejemplo, ZFN, TALEN, sistemas CRISPR/Cas o polinucleótidos que codifican estas moléculas) o factores de transcripción (o polinucleótidos que los codifican) pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo, en las mismas composiciones farmacéuticas) o pueden administrarse secuencialmente en cualquier orden. Se puede tratar cualquier tipo de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinomas de pulmón, cánceres de páncreas, cánceres de hígado, cánceres de huesos, cánceres de mama, cánceres colorrectales, cánceres de ovario, leucemias, melanomas, linfomas, cánceres de cerebro y similares.

45 [0173] Las nucleasas específicas a PD1 y/o CTLA-4 o factores de transcripción se pueden utilizar en conjunción con un sistema de focalización CAR de células T. Los CAR pueden tener especificidad por un antígeno tumoral donde el dominio de especificidad CAR es un ScFv. Alternativamente, los CAR pueden ser específicos para un antígeno tumoral en donde el dominio de especificidad CAR comprende un ligando o polipéptido. Los CAR ejemplares no limitantes incluyen aquellos dirigidos a CD33 (ver Dutour et al, (2012) Adv Hematol 2012; 2012: 683065), GD2 (Louis et al (2011) Blood 118 (23): 650-6), CD19 (Savoldo et al, (2011) J Clin Invest 121 (5): 1822 y Torikai et al (2012) Blood 119 (24): 5697), IL-11R α (Huang et al, (2012) Cancer Res 72 (1): 271-81), CD20 (Till et al (2012) Blood 119 (17): 3940-50), NY-ESO-1 (Schuberth et al, (2012) Gene Ther doi: 10.1038/gt2012.48), ErbB2 (Zhao et al, (2009) J. Immunol 183 (9): 5563-74), CD70 (Shaffer et al (2011) Blood 116 (16): 4304-4314), CD38 (Bhattacharaya et al (2012) Blood Canc J2 (±) p. E75), CD22 (Haso et al. (2012) Canc Res 72 (8) S1, doi: 1158/1158-7445 AM2012- 3504), CD74 (Stein et al (2004) Blood 104: 3705-3711), CAIX (Lamers et al, (2011) Blood 117 (1): 72-82) STEAP1 (ver Kiessling et al. (2012) Cancer 4: 193-217 para revisión de la diana) VEGF-R2 (Publicación de Patente de EE.UU. N° US20120213783A1), el receptor de folato (Publicación de Patente PCT WO2012099973) e IL-13R α (US7514537). En algunos casos, el CAR puede ser biespecífico (consulte la Publicación de Patente de EE.UU. N° US2001012967). En algunos casos, las células T son LIT. Además, las nucleasas o factores de transcripción específicos de PD1 y/o CTLA-4 pueden usarse junto con una célula T o LIT que comprenda un RCT modificado por ingeniería genética.

65 [0174] Los métodos y composiciones de la invención también son útiles para el diseño e implementación de modelos *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo, modelos animales de infección crónica, cáncer o autoinmunidad, lo que permite el estudio de estos trastornos y su descubrimiento de terapias útiles. En algunos casos, los métodos de la invención son útiles para producir células T modificadas genéticamente que pueden usarse en pacientes que las necesiten. Para algunos

tratamientos, los pacientes se tratan previamente con agentes para la mioablación parcial o total antes de la infusión de las células T.

[0175] Los siguientes ejemplos se refieren a formas de realización ejemplares de la presente descripción en donde la nucleasa comprende un ZFN o TALEN. Se apreciará que esto es solo con fines de ejemplificación y que se pueden usar otras nucleasas, por ejemplo, sistemas de nucleasas CRISPR/Cas, endonucleasas autodirigidas (meganucleasas) con dominios de unión a ADN modificados y/o fusiones de endonucleasas autodirigidas de origen natural (meganucleasas) dominios de unión al ADN y dominios de escisión heterólogos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación de ZFNs específicos a PD1- o CTLA-4 persistentemente biológicamente activos

[0176] ZFNs se reunieron contra los genes humanos PD1 o CTLA-4 y se ensayaron por ELISA y ensayos de CEL1 como se describe en Miller et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25: 778-785 y Publicación de Patente de EE.UU. N° 20050064474 y Publicación de Patente Internacional WO2005/014791.

[0177] Los ejemplos específicos de ZFPs dirigidos a PD1 se describen en la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20110136895 y se muestran en la Tabla 2a y 2b y diseños de ZFP dirigidos a CTLA-4 se muestran en la Tabla 2c. La primera columna de esta tabla es un nombre de referencia interno (número) para un ZFP. "F" se refiere al dedo y el número que sigue a "F" se refiere al dedo de zinc (por ejemplo, "F1" se refiere al dedo 1). Los sitios diana para estos ZFN específicos de CTLA-4 se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2a: Proteínas de dedos de zinc dirigidas a PD1 humana

SBS N°	Diseño					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
12942	QSGHLSR (SEQ ID NO: 34)	RSDLSLV (SEQ ID NO: 35)	HNDSRKN (SEQ ID NO: 36)	RSDDL TR (SEQ ID NO: 37)	RSDHLTQ (SEQ ID NO: 38)	N/A
12946	RSAALSR (SEQ ID NO: 39)	RSDDLTR (SEQ ID NO: 37)	RSDHLTT (SEQ ID NO: 40)	DRSALSR (SEQ ID NO: 6)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
12947	RSAALAR (SEQ ID NO: 42)	RSDDLK (SEQ ID NO: 3)	RNDHRKN (SEQ ID NO: 43)	DRSALSR (SEQ ID NO: 6)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
12934	RSDHLE (SEQ ID NO: 44)	TSSDRK (SEQ ID NO: 45)	RSDHLE (SEQ ID NO: 44)	QSASRKN (SEQ ID NO: 46)	N/A	N/A
12971	RSDVLE (SEQ ID NO: 47)	RSANLTR (SEQ ID NO: 48)	RSDHLSQ (SEQ ID NO: 49)	TSSNRKT (SEQ ID NO: 50)	DRSNLSR (SEQ ID NO: 9)	RSDALAR (SEQ ID NO: 7)
12972	DDWNLSQ (SEQ ID NO: 51)	RSANL TR (SEQ ID NO: 48)	RSDHLSQ (SEQ ID NO: 49)	TSSNRKT (SEQ ID NO: 50)	DRSNLSR (SEQ ID NO: 9)	RSDALAR (SEQ ID NO: 7)
18759	RSSALSR (SEQ ID NO: 52)	RPLALKH (SEQ ID NO: 53)	RNDHRKN (SEQ ID NO: 43)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
22237	QSGHLSR (SEQ ID NO: 34)	RSDLSLV (SEQ ID NO: 35)	HNDSRKN (SEQ ID NO: 36)	RANLLR (SEQ ID NO: 55)	RSDHLTQ (SEQ ID NO: 38)	N/A
25005	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSEDLTR (SEQ ID NO: 57)	RNNLRT (SEC ID N.º: 58)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
25006	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSEDLTR (SEQ ID NO: 57)	TNWLRT (SEQ ID NO: 59)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
25010	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSEDLTR (SEQ ID NO: 57)	RTPHLTL (SEQ ID NO: 60)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
25011	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSEDLTR (SEQ ID NO: 57)	RSAQLAT (SEC ID N.º: 61)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A

ES 2 824 024 T3

(Continuación)

SBS N°	Diseño						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
5	25012	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RCTHLYL (SEQ ID NO: 62)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
10	25013	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RPTQRYS (SEQ ID NO: 63)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
	25014	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RANHREC (SEQ ID NO: 64)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
15	25015	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RANHREC (SEQ ID NO: 64)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
20	25016	RKFARPS (SEQ ID NO: 65)	RNFERSD (SEQ ID NO: 66)	HPHHRMC (SEQ ID NO: 67)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
	25017	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RMGRLST (SEQ ID NO: 68)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
25	25022	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RHSRLTT (SEQ ID NO: 69)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 70)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
	25023	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RANHRVC (SEC ID N.º: 71)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
30	25025	RPSTLHR (SEQ ID NO: 56)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RSTHLLG (SEQ ID NO: 72)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
	25027	RNAALTR (SEQ ID NO: 73)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RSCGLWS (SEQ ID NO: 74)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
35	25028	CNAALTR (SEQ ID NO: 75)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	REEHRAT (SEQ ID NO: 76)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
40	25029	RNAALTR (SEQ ID NO: 73)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RHHHLAA (SEQ ID NO: 77)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
	25030	RNAALTR (SEQ ID NO: 73)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RPMHLTN (SEQ ID NO: 78)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
45	25031	RNAALTR (SEQ ID NO: 73)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RSPHLYH (SEQ ID NO: 79)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
50	25032	RNAALTR (SEQ ID NO: 73)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RCEALHH (SEQ ID NO: 80)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSAQAR (SEQ ID NO: 81)	N/A
	25034	RNAALTR (SEQ ID NO: 73)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RCEALHH (SEQ ID NO: 80)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
55	25036	RNAALTR (SEQ ID NO: 73)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RSPHLYH (SEQ ID NO: 79)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
	25040	RNAALTR (SEQ ID NO: 73)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RLPALLS (SEQ ID NO: 82)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A
60	25041	HNAALTR (SEQ ID NO: 83)	RSDELTR (SEQ ID NO: 57)	RTYNRTQ (SEQ ID NO: 84)	TRPVLKR (SEQ ID NO: 54)	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	N/A

65

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

SBS N°	Sitio de destino
12942	ccAGGGCGCCTGTGGGAtctgcatgcct (SEQ ID NO: 85)
12946	caGTCGTCTGGGCGGTGctacaactggg (SEQ ID NO: 86)
12947	caGTCGTCTGGGCGGTGctacaactggg (SEQ ID NO: 86)
12934	gaACACAGGCACGGctgaggggtcctcc (SEQ ID NO: 87)
12971	ctGTGGACTATGGGGAGCTGgattcca (SEQ ID NO: 88)
12972	ctGTGGACTATGGGGAGCTGgattcca (SEQ ID NO: 88)
18759	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
22237	ccAGGGCGCCTGTGGGAtctgcatgcct (SEQ ID NO: 85)
25005	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25006	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25010	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25011	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25012	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25013	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25014	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25015	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25016	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25017	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25022	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25023	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25025	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25027	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25028	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25029	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25030	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25031	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25032	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25034	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25036	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25040	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)
25041	caGTCGTCTGGGCGGTGct (SEQ ID NO: 89)

Tabla 2c: Proteínas de dedos de zinc dirigidas a CTLA-4 humana

SBS N°	Diseño				
	F1	F2	F3	F4	F5
20186	QSSDLR (SEQ ID NO:1)	RSDNLRE (SEQ ID NO:2)	RSDDLK (SEQ ID NO: 3)	QSSDLRR (SEQ ID NO: 4)	LKQHLNE (SEQ ID NO: 5)
20185	DRSALR (SEQ ID NO: 6)	RSDALAR (SEQ ID NO: 7)	QSGDRNK (SEQ ID NO: 8)	DRSNLSR (SEQ ID NO: 9)	RSDDRKT (SEQ ID NO: 10)
20190	QSGSLTR (SEQ ID NO: 11)	RSDNLTT (SEQ ID NO: 12)	QNATRIK (SEQ ID NO: 13)	RSDVLSA (SEQ ID NO: 14)	DRSNRIK (SEQ ID NO: 15)
20189	RSANLAR (SEQ ID NO: 16)	TNQRIT (SEQ ID NO: 17)	TSGHLR (SEQ ID NO: 18)	RSDLLR (SEQ ID NO: 19)	RNDDRKK (SEQ ID NO: 20)

Tabla 3: Sitios diana de ZFN en los genes CTLA-4 humanos

SBS N°	Sitio de destino
20186	acAGTGCTTCGgCAGGCTgacagccagg (SEQ ID NO: 21)
20185	acCCGGACcTCAGTGGCTttgcctggag (SEQ ID NO: 22)
20190	acTACCTGgGCATAGCAacggaacca (SEQ ID NO: 23)
20189	tgGCGGTGGGTaCATGAGctccacctg (SEQ ID NO: 24)

[0178] Los ensayos de actividad iniciales *in vitro* se realizaron en muestras de células nucleofectadas como se describe anteriormente. Brevemente, los plásmidos que codifican las fusiones *ZFP-FokI* se introdujeron en células K562

mediante transfección usando el kit Amaxa™ Nucleofection según lo especificado por el fabricante. Para la transfección, dos millones de células K562 se mezclaron con cantidades variables de cada plásmido de expresión de nucleasa de dedo de zinc y 100 µL de Amaxa™ Solution V. Las células fueron transfectadas en un Amaxa Nucleofector II™ usando el programa de T-16. Inmediatamente después de la transfección, las células se dividieron en dos matraces diferentes y se cultivaron en medio RPMI (Invitrogen) suplementado con FBS al 10% en CO₂ al 5% a 30°C o 37°C durante cuatro días.

[0179] Además, PMBCs fueron también activados con cuentas anti-CD23/CD8 (véase, por ejemplo, la Publicación de EE.UU. N° 20080311095). Ya sea 3 días (EPD3) o 5 días (EPD5) después de la activación, las células se sometieron a electroporación con ARNm de ZFN específicos de PD1 (PD1, particularmente ZFN 12942 y 25029) o CCR5 (R5, ver, Patente de EE.UU. N° 7,951,925) usando dos diferentes condiciones MAXCYTE™ (C1 y C3). A continuación, se analizaron las células para determinar la modificación génica del locus diana utilizando el ensayo CEL-1 descrito a continuación. Como se muestra en la Figura 2, se observaron altos niveles de modificación genética.

[0180] Para determinar la actividad de ZFN en el locus CTLA-4, se realizaron ensayos de nucleasa SURVEYOR™ basados en Cel-1 esencialmente según las instrucciones del fabricante (Transgenomic SURVEYOR™) y como se describe para PD1 en la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20110136895. Brevemente, se recolectaron las células y se preparó el ADN cromosómico usando un kit Quickextract™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Epicentre®). La región apropiada del locus PD1 se amplificó por PCR usando la polimerasa de ADN de alta fidelidad Accuprime™ (Invitrogen). Las reacciones de PCR se calentaron a 94°C y se enfriaron gradualmente a temperatura ambiente. Se mezclaron aproximadamente 200 ng del ADN hibridado con 0,33 ml de enzima Cel-I y se incubaron durante 20 minutos a 42°C. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en tampón Trisborato-EDTA 1X.

[0181] Las células se recogieron 3 ó 10 días después de la exposición a la eficiencia de modificación del virus y gen se determinó usando un ensayo de nucleasa SURVEYOR™ basado en Cel-I, realizado como se describe en la Publicación de Patente Internacional WO 07/014275. Véase también Oleykowski et al. (1998) Nucleic Acids Res. 26: 4597-4602; Qui et al. (2004) BioTechniques 36: 702-707; Yeung et al. (2005) BioTechniques 38: 749-758.

Tabla 4: Actividad de ZFN de CTLA-4

Par ZFN	% indels detectados
20186/20185	3,3%
20190/20189	1,8%

Ejemplo 2: TALENs específicos a PD1 y CTLA-4

[0182] TALENs específicos a PD1 fueron desarrollados y ensamblados como se describió previamente (véase la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20110301073). El reconocimiento de bases se logró utilizando las correspondencias canónicas de base de RVD (el "código TALE": NI para A, HD para C, NN para G (NK en media repetición), NG para T). Los TALEN se construyeron en la columna vertebral de TALEN "+63" como se describe en la publicación de EE.UU. N° 20110301073. Los objetivos e identificadores numéricos para los TALEN probados se muestran a continuación en las Tablas 5a y 5b.

Tabla 5a: TALEN específicos a PD1: Sitio de destino

SBS N°	sitio	# de RVD	SEQ ID NO:
101621	gtAGCACCGCCCAGACGACtg	17	25
101618	gtGCTCCAGGCATGCAGATcc	17	26
101620	atGCAGATCCCACAGGCgc	15	27
101622	gtTGTAGCACCGCCCAGACga	17	28
101623	gtTGTAGCACCGCCCAGAcg	16	29
101624	atGCAGATCCCACAGGCgc	15	27
101625	gtTGTAGCACCGCCCAGACga	17	28
101626	ctTCTCCCCAGCCCTGCTCgt	17	30
101627	gtGAAGGTGGCGTTGTCCCct	17	31
101632	ctACCTCTGTGGGGCCATCtc	17	32
101633	ctCTCTTTGATCTGCGCCTtg	17	33
101638	gtACCGCATGAGCCCCAGCaa	17	34
101639	ctCGGGGAAGGCGGCCAGCtt	17	35
101640	ctACCTCTGTGGGGCCATCtc	17	32
101641	ctCTCTTTGATCTGCGCCTtg	17	33

Tabla 5b: TALEN específicos a PD1 – RVD

SBS Nº	Nº de RVD	RVD (N->C)	SEQ ID NO:
101621	17	NI-NN-HD-NI-HD-HD-NN-HD-HD-HD-NI-NN-NI-HD-NN-NI-HD	90
101618	17	NN-HD-NG-HD-HD-NI-NN-NN-HD-NI-NG-NN-HD-NI-NN-NI-NG	91
101620	15	NN-HD-NI-NN-NI-NG-HD-HD-HD-NI-HD-NI-NN-NN-HD	92
101622	17	NG-NN-NG-NI-NN-HD-NI-HD-HD-NN-HD-HD-HD-NI-NN-NI-HD	93
101623	16	NG-NN-NG-NI-NN-HD-NI-HD-HD-NN-HD-HD-HD-NI-NN-NI	94
101624	15	NN-HD-NI-NN-NI-NG-HD-HD-HD-NI-HD-NI-NN-NN-HD	92
101625	17	NG-NN-NG-NI-NN-HD-NI-HD-HD-NN-HD-HD-HD-NI-NN-NI-HD	93
101626	17	NG-HD-NG-HD-HD-HD-HD-NI-NN-HD-HD-HD-NG-NN-HD-NG-HD	95
101627	17	NN-NI-NI-NN-NN-NG-NN-NN-HD-NN-NG-NG-NN-NG-HD-HD-HD	96
101632	17	NI-HD-HD-NG-HD-NG-NN-NG-NN-NN-NN-NN-HD-HD-NI-NG-HD	97
101633	17	HD-NG-HD-NG-NG-NG-NN-NI-NG-HD-NG-NN-HD-NN-HD-HD-NG	98
101638	17	NI-HD-HD-NN-HD-NI-NG-NN-NI-NN-HD-HD-HD-NI-NN-HD	99
101639	17	HD-NN-NN-NN-NN-NI-NI-NN-NN-HD-NN-NN-HD-HD-NI-NN-HD	100
101640	17	NI-HD-HD-NG-HD-NG-NN-NG-NN-NN-NN-NN-HD-HD-NI-NG-HD	97
101641	17	HD-NG-HD-NG-NG-NG-NN-NI-NG-HD-NG-NN-HD-NN-HD-HD-NG	98

[0183] A continuación, los TALEN se probaron en pares en células K562 para determinar la capacidad de inducir modificaciones en las dianas cromosómicas PD1 endógenas, y los resultados mostraron que casi todos los pares de proteínas estaban activos. Las comparaciones de actividad en paralelo con el par ZFN 12942/25029 (véase la Publicación de Patente de EE.UU. Nº 2011-136895) que se muestra a continuación en la Tabla 6, mostraron que los TALEN y ZFN tienen actividades que están en el mismo intervalo aproximado. Nótese que los números de carril mostrados en la Tabla 6 corresponden a los carriles mostrados en la Figura 1.

Tabla 6: Actividad de PD1 TALEN

Carril	Par TALEN	% NHEJ
1	101621/101618	23,5
2	101621/101619	18,1
3	101621/101620	0
4	101622/101618	14,7
5	101622/101619	14,7
6	101622/101620	10,6
7	101623/101618	6,8
8	101623/101619	18,2
9	101623/101620	11,6
10	101625/101624	10,1
11	12942/25029 (ZFN)	14,7
G	GFP	0
12	101627/101626	12,5
13	101633/101632	14,7
14	101639/101638	0
15	101641/101640	23
G	GFP	0

[0184] Los TALEN específicos a CTLA-4 se diseñan y ensamblan como se describe anteriormente. La prueba de actividad en la diana cromosómica CTLA-4 endógena revela que los TALEN están activos.

Ejemplo 3: Generación de células T que comprenden un CAR que también carecen de PD1 y/o CTLA-4

[0185] Para generar una población de células T que expresa un CAR y en donde PD1 y/o CTLA-4 son eliminados, se generan CAR que contienen células T. Las células (por ejemplo, PBMC, células T como LIT, células CD4+ o CD8+) se purifican a partir de fuentes naturales, por ejemplo, un paciente con melanoma metastásico, y se cultivan y/o expanden de acuerdo con procedimientos estándar. Las células pueden estimularse, por ejemplo, como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. Nº 20080311095. Las células se transducen con CAR, por ejemplo un CAR que comprende un scFv específico de ErbB2 o un scFv específico de VEGFR2. Los ácidos nucleicos que codifican los scFv se construyen primero mediante un enfoque de PCR y se verifica la secuencia. Se unen a restos de señalización zeta CD28 y CD3 y se introducen en las células (p. ej., mediante mecanismos retrovirales o lentivirales u otros mecanismos de direccionamiento/entrega).

[0186] Las células se trataron a continuación con los ARNm que codifican nucleasas específicas a PD1 y/o CTLA-4 y la población es analizada por el ensayo Cel-I para verificar interrupción PD1 o CTLA-4 y la inserción CAR. Las células T modificadas genéticamente se prueban luego en líneas de células tumorales que expresan ErbB2 o VEGF2R y se demuestra que lisan específicamente estas líneas de células diana.

Ejemplo 4: ZFP TFs específicos a PD1

[0187] ZFP TFs específicos a PD1 fueron diseñados para reprimir la expresión de PD1. Estas proteínas se muestran a continuación en la Tabla 7a y 7b.

Tabla 7a: Proteínas de dedos de zinc dirigidas a PD1 humana para ZFP-TF

SBS N°	Diseño					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
22937	RSDTLSV (SEQ ID NO: 101)	DNSTRIK (SEQ ID NO: 102)	RSDHLSQ (SEQ ID NO: 49)	RSDVRKN (SEQ ID NO: 103)	DRSHLTR (SEQ ID NO: 104)	RSDNLTT (SEQ ID NO: 12)
22945	RSDDL TR (SEQ ID NO: 37)	RSDHLSR (SEQ ID NO: 105)	RSDNLAR (SEQ ID NO: 106)	QSGNLAR (SEQ ID NO: 107)	RSDNLAR (SEQ ID NO: 106)	RSDALAR (SEQ ID NO: 7)
22954	QSGDLTR (SEQ ID NO: 108)	RSDDL TR (SEQ ID NO: 37)	RSDNLSV (SEQ ID NO: 109)	RSANLTR (SEQ ID NO: 48)	RSDVLSK (SEQ ID NO: 110)	QNATRIK (SEQ ID NO: 13)
22957	RSDVLSE (SEQ ID NO: 47)	ARSTRTN (SEQ ID NO: 111)	DRSHLTR (SEQ ID NO: 104)	DRSHLAR (SEQ ID NO: 112)	QSGNLAR (SEQ ID NO: 107)	QSGHLSR (SEQ ID NO: 34)
22959	RSDNLSE (SEQ ID NO: 113)	DRSHLAR (SEQ ID NO: 112)	DRSHLTR (SEQ ID NO: 104)	QSSDLRR (SEQ ID NO: 4)	RSDHLST (SEQ ID NO: 114)	DRSNRKT (SEQ ID NO: 115)

Tabla 7b: Proteínas de dedos de zinc dirigidas a PD1 humana para ZFP-TF, sitios de destino

SBS N°	Sitio de destino
22937	ggTAGGGCGTGGGGGCCACGggcccacc_ (SEQ ID NO: 16)
22945	atGTGGAGGAAGAGGGGGCGggagcaag_ (SEQ ID NO: 117)
22954	gaGCAGTGGAGAAGGCGGCActctggtg_ (SEQ ID NO: 118)
22957	gtGGAGAAGGCGGCACTCTGgtggggct_ (SEQ ID NO: 119)
22959	acAACTGGGCTGGCGGCCAGgatggctc_ (SEQ ID NO: 120)

[0188] Los dominios de unión a ADN específicos a PD1 descritos en la Tabla 7a se fusionaron después a un dominio de represión KRAB del gen KOX1 humano. Para probar la actividad de los TF de ZFP que reprimen PD1, los TF de ZFP se transfectaron en células humanas y se controló la expresión de PD1 usando RT-PCR en tiempo real. Específicamente, las células Jurkat se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10% y las células 1e⁵ se transfectaron con 1 µg de ADN plasmídico que codifica las fusiones ZFPKOX indicadas por Amaxa Nucleofector® siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0189] Se incubaron las células transfectadas durante 2 días, y los niveles de endógeno humano PD1 y normalización 18S de control se analizaron por PCR en tiempo real (Applied Biosystems), de acuerdo con protocolos estándar. Los niveles de PD1 se expresaron como proporciones de PD1/18S normalizadas a las de las muestras transfectadas simuladamente (establecidas como 1).

[0190] Las ZFP dirigidas a PD1 reprimieron la expresión de PD1.

[0191] El análisis de transferencia Western se realizaron utilizando protocolos estándar para confirmar la reducción en el nivel de proteína PD1.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una célula T genéticamente modificada que expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde una secuencia exógena que codifica una CAR se integra en el genoma de la célula T usando una o más nucleasas, y además en donde la expresión de al menos uno de los genes del punto de control inmunológico endógeno, gen de receptor de muerte programada PDCD1 (PD1) o el gen CTLA-4 se reprime en la célula T mediante modificación genética utilizando una nucleasa dirigida para PD1 o CTLA-4.
- 10 **2.** La célula T según la reivindicación 1, en donde el gen del punto de control inmunológico es un gen CTLA-4.
- 3.** La célula T según la reivindicación 1, en donde el gen del punto de control inmunológico es un gen PD1.
- 15 **4.** La célula T según la reivindicación 1, en donde la célula T se selecciona del grupo que consiste en una célula CD4+, una célula CD8+ y una célula infiltrante de tumor (LIT).
- 5.** La célula T según la reivindicación 1, en donde la secuencia exógena que codifica el CAR está integrada en el genoma de la célula T en un locus de puerto seguro.
- 20 **6.** La célula T según la reivindicación 1, en donde la secuencia exógena que codifica el CAR se integra aleatoriamente en el genoma de la célula T.
- 7.** La célula T según la reivindicación 1, en donde el CAR comprende un dominio de señalización de un receptor de células T (RCT).
- 25 **8.** La célula T según la reivindicación 7, en donde el CAR comprende un dominio de especificidad scFv.
- 9.** La célula T según la reivindicación 1, en donde se estimula la célula T.
- 30 **10.** La célula T según la reivindicación 9, en donde la célula T se estimula con cuentas anti-CD23/CD8.
- 11.** La célula T según la reivindicación 1, que comprende además al menos un transgén adicional.
- 35 **12.** La célula T según la reivindicación 11, en donde el al menos un transgén adicional codifica un receptor de células T (RCT) específico de TAA.
- 13.** La célula T según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una o más nucleasas comprenden una nucleasa con dedos de zinc (ZFN), una nucleasa de dominio efector TAL (TALEN) o un sistema nucleasa CRISPR/Cas.
- 40 **14.** La célula T según cualquier reivindicación anterior, en donde la nucleasa diana es:
- (a) una nucleasa TALE y se une a un sitio diana en PD1 como se muestra en la Tabla 5a; o
(b) un ZFN y se une a un sitio diana en CTLA-4 como se muestra en la Tabla 3.
- 45 **15.** Un método para producir la célula T de la reivindicación 1, comprendiendo el método:
- (i) integrar la secuencia exógena que codifica el CAR en el genoma de la célula T usando una o más nucleasas; y
(ii) reprimir la expresión de un gen del receptor de muerte programada endógeno PDCD1 (PD1) o un gen CTLA-4 endógeno en la célula T mediante modificación genética usando una nucleasa dirigida para PD1 o CTLA-4,
- 50 en donde la secuencia exógena que codifica el CAR se inserta en un gen de puerto seguro mediante integración dirigida.
- 55 **16.** El método de la reivindicación 15, en donde:
- (a) el gen de puerto seguro se selecciona del grupo que consiste en AAVS1, CCR5, HPRT y Rosa;
(b) la secuencia exógena que codifica el CAR es transportada por un vector plásmido o un vector viral;
(c) la una o más nucleasas de la reivindicación 15 (i) se introducen en la célula como ARNm;
60 (d) el método comprende además estimular la célula T, tal como estimular la célula T con cuentas anti-CD23/CD8;
(e) el método comprende además integrar al menos un transgén adicional en el genoma de las células T, tal como un transgén que codifica un receptor de células T (RCT) específico de TAA; y/o
65 (f) el CAR comprende un dominio de señalización de un receptor de células T (RCT) y, opcionalmente, un dominio de especificidad scFv.

17. La célula T genéticamente modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para su uso en el tratamiento del cáncer.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

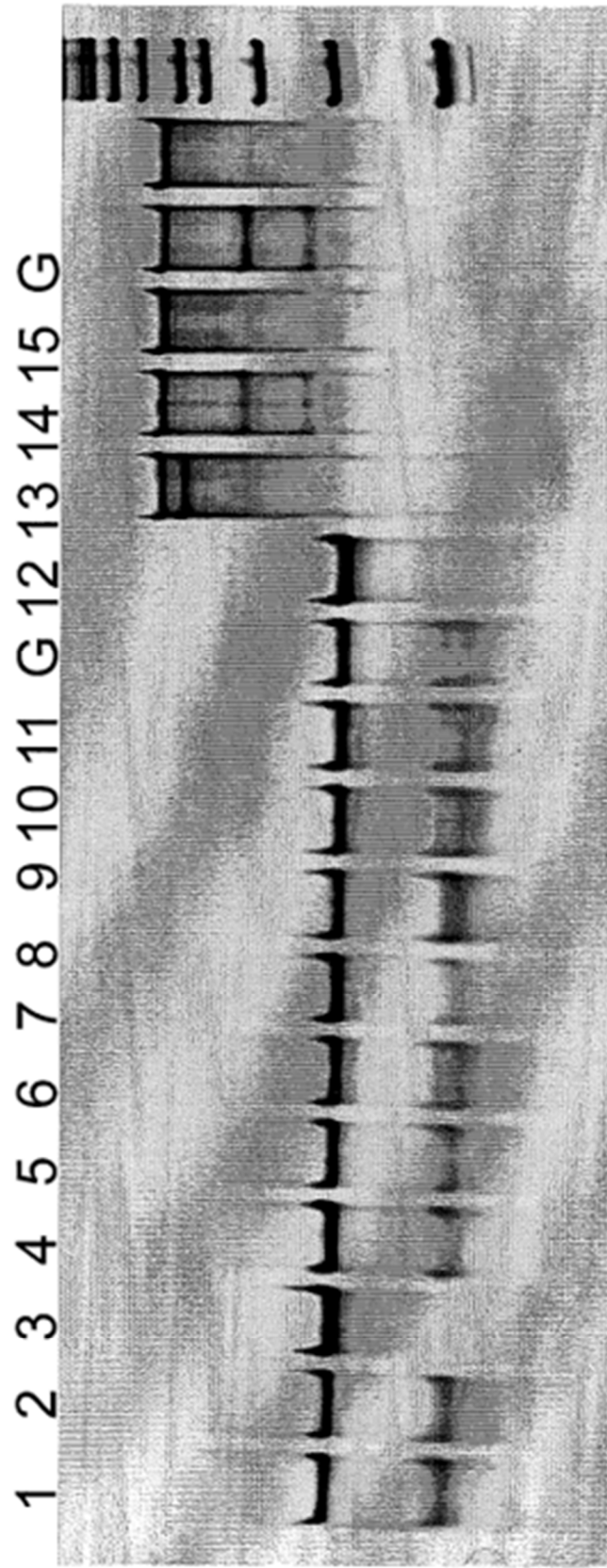


Figura 2

