

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 926 467**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/90** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 5/078** (2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2016 PCT/US2016/027253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16168275**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2016 E 16718143 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2022 EP 3283635**

54 Título: **Métodos y composiciones para la modificación del ADN genómico**

30 Prioridad:

**13.04.2015 US 201562146618 P**

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

**26.10.2022**

73 Titular/es:

**MAXCYTE, INC. (100.0%)  
22 Firstfield Road, Suite 110  
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**LI, LINHONG y  
PESHA, MADHUSUDAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 926 467 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para la modificación del ADN genómico

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere de manera general al campo de la biotecnología. Más particularmente, se refiere a nuevos métodos y composiciones para la modificación del ADN genómico.

Descripción de la técnica relacionada

15 La modificación genómica dirigida presenta un potencial tremendo en el tratamiento de enfermedades. La modificación del ADN en un sitio diana o la integración específica de sitio de un transgén puede proporcionar enfoques de terapia génica más eficaces. Sin embargo, los enfoques actuales de ingeniería del genoma proporcionan una eficiencia muy baja de reparación o edición y presentan el potencial de introducir secuencias de ADN y resultados perjudiciales o no deseados.

20 Los enfoques terapéuticos actuales a la terapia génica utilizan vectores víricos para la transferencia génica. Sin embargo, los métodos de terapia génica que implican vectores víricos presentan la desventaja de introducir secuencias víricas en un huésped humano, que pueden inducir inmunogenicidad en el huésped. Existen métodos no víricos de terapia génica, aunque su utilización en un contexto clínico se ve dificultada por su baja eficiencia, toxicidad o falta de especificidad.

25 Los enfoques más eficientes de ingeniería del genoma proporcionarán, además, avances en la terapia *ex vivo*, ya que resultará posible aislar células de un paciente, modificar el genoma para corregir una mutación o integrar un transgén específicamente en un sitio y trasplantar de nuevo las propias células del paciente para conseguir un efecto terapéutico. Los métodos actuales son excesivamente ineficientes o excesivamente tóxicos para conseguir estos resultados. Existe una necesidad en la técnica de una tecnología que permita la modificación del ADN genómico dirigida en un sitio, que resulta eficiente, no tóxica y estable.

30 El documento n° WO2014/191128A1 da a conocer métodos de ingeniería de las células T para la inmunoterapia mediante la utilización del sistema de nucleasa Cas guiado por ARN.

35 Maier et al. investigaron en 2013 una modificación génica eficiente a escala clínica mediante la disrupción dirigida por la nucleasa con dedos de cinc del correceptor CCR5 del VIH.

Descripción resumida de la invención

40 Las composiciones y métodos se refieren a la modificación de secuencias de una secuencia de ADN genómico diana endógeno. Un aspecto se refiere a un método *in vitro* para la modificación de secuencias específica de sitio de una región de ADN genómico diana en células, que comprende: poner en contacto las células con una composición activadora; transfectar las células con una composición de transfección que comprende: (a) ADN donante y (b) un agente de digestión del ADN. El ADN donante comprende dos regiones. Una región es una región homóloga que comprende una secuencia de ácidos nucleicos homóloga de la región diana de ADN genómico, y la otra región es una región de modificación de secuencia. En el método anteriormente indicado, la secuencia de ADN genómico se modifica específicamente en la región diana del ADN genómico.

50 La expresión "modificación de secuencia" es un cambio en la secuencia del ADN y puede incluir una adición, un cambio o una delección de la secuencia de ADN genómico endógena. En términos de adición, la modificación de la secuencia puede ser la integración de un transgén en un sitio genómico diana. Por ejemplo, para una secuencia genómica diana, el ADN donante comprende una secuencia complementaria, idéntica u homóloga a la secuencia genómica diana y una región de modificación de secuencia. La región de modificación de secuencia típicamente está localizada entre los extremos homólogos. La modificación de secuencia no es complementaria a la secuencia genómica diana y contiene una alteración de la secuencia genómica diana.

55 El ADN donante indicado en la presente memoria comprende una secuencia homóloga, idéntica o complementaria a la secuencia de ADN genómico diana y una modificación de secuencia de la secuencia de ADN genómico diana.

60 El término "complementario" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al apareamiento de bases de Watson-Crick entre nucleótidos y específicamente se refiere a nucleótidos unidos por enlaces de hidrógeno entre sí con residuos de timina o uracilo unidos a residuos de adenina por dos enlaces de hidrógeno y residuos de citosina y guanina unidos mediante tres enlaces de hidrógeno. En general, un ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que se describe como presentando un "porcentaje de complementariedad" respecto a una segunda secuencia de nucleótidos especificada. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos puede presentar una

complementariedad de 80 %, 90 % o 100 % respecto a una segunda secuencia de nucleótidos especificada, que indica que 8 de 10, 9 de 10 o 10 de 10 nucleótidos de una secuencia son complementarios a la segunda secuencia de nucleótidos especificada. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos 3'-TCGA-5' es 100 % complementaria a la secuencia de nucleótidos 5'-AGCT-3'. Además, la secuencia de nucleótidos 3'-TCGA- es 100 % complementaria a una región de la secuencia de nucleótidos 5'-TTAGCTGG-3'. El experto en la materia reconocerá que dos secuencias de nucleótidos complementarias incluyen una cadena de sentido y una cadena antisentido.

El término "homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácidos nucleicos. La expresión "región homóloga" se refiere a una región en el ADN donante con un determinado grado de homología respecto a la secuencia de ADN genómico diana. La homología puede determinarse mediante la comparación de una posición en cada secuencia que puede alinearse para los fines de comparación. En el caso de que una posición en la secuencia comparada esté ocupada por la misma base o aminoácido, las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones correspondientes u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos de 40 % de identidad, aunque preferentemente menos de 25 % de identidad, respecto a una de las secuencias de la presente invención.

Un polinucleótido o región polinucleótida (o un polipéptido o región polipeptídica) que presenta un determinado porcentaje (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %) de "identidad de secuencia" u "homología" respecto a otra secuencia significa que, una vez alineadas, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son iguales al comparar las dos secuencias. Dicha alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencias puede determinarse utilizando programas de software conocidos de la técnica, por ejemplo, los indicados en Ausubel et al., editores (2007) Current Protocols in Molecular Biology.

El término "transfectar" se refiere a métodos para introducir materiales bioactivos, tales como ácidos nucleicos, proteínas, enzimas o moléculas pequeñas en una célula. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN, administrado en forma de plásmido u oligómero, y/o ARN o combinaciones de los mismos.

El término "electroporación" se refiere a un método de transfección en el que se aplica un campo eléctrico aplicado externamente en la célula. En determinadas realizaciones, el método de electroporación utilizado es la electroporación estática.

En determinadas realizaciones, el método de transfección utilizado es la electroporación. En una realización adicional, el método de electroporación es la electroporación de flujo. La electroporación de flujo, que se refiere a un procedimiento que comprende: transferir una suspensión de células y la carga de moléculas en un aparato que comprende una cámara de fluidos o camino de flujo de fluido; en el que dicha cámara de fluidos o camino de flujo de fluido comprende electrodos dispuestos a lo largo de los laterales de la cámara de fluidos o camino de flujo de fluido y configurados para someter las partículas biológicas en el interior de la cámara de fluidos o camino de flujo de fluido a un campo eléctrico adecuado para la electroporación, y para transferir la suspensión de células electroporadas al exterior del aparato. Dicho método resulta particularmente eficaz para un volumen a gran escala de células. La electroporación estática, en contraste, implica la electroporación de un volumen fijo y limitado de células debido a las restricciones asociadas al desplazamiento de electricidad a través de un líquido y la distancia entre electrodos opuestos.

En un determinado aspecto, la transfección del constructo de expresión al interior de las células comprende hacer fluir una suspensión de células por un campo eléctrico en una cámara de flujo, en el que el campo eléctrico se produce por electrodos opuestos de carga contraria que definen por lo menos parcialmente la cámara de flujo, en la que la resistencia térmica de la cámara de flujo es inferior a aproximadamente 10°C por vatio. En otro aspecto determinado, la transfección de las células comprende utilizar un dispositivo de electroporación de flujo que comprende una cámara para contener una suspensión de células que deben electroporarse; la cámara se define por lo menos parcialmente por electrodos opuestos cargables con carga contraria, y en la que la resistencia térmica de la cámara es inferior a aproximadamente 10°C por vatio.

En un determinado aspecto, la transfección del constructo de expresión al interior de las células comprende electroporar o exponer una suspensión de las células a un campo eléctrico en una cámara, en la que el campo eléctrico se produce por electrodos opuestos de carga contraria que definen por lo menos parcialmente la cámara, en la que la resistencia térmica de la cámara es inferior a aproximadamente 10°C por vatio. En otro aspecto determinado, la transfección de las células comprende utilizar un dispositivo de electroporación que comprende una cámara para contener una suspensión de células que deben electroporarse; la cámara se define por lo menos parcialmente por electrodos opuestos cargables con carga contraria, y en la que la resistencia térmica de la cámara es inferior a aproximadamente 10°C por vatio.

En determinadas realizaciones, la resistencia térmica de la cámara es de entre aproximadamente 0,1°C por vatio y 10°C por vatio. Por ejemplo, la resistencia térmica de la cámara puede ser de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 o 10°C por vatio, o cualquier resistencia térmica derivable en la misma.

Los electrodos opuestos cargables con carga contraria pueden separarse entre sí por como mínimo 1 mm, por lo menos 2 mm, por lo menos 3 mm o cualquier distancia o intervalo derivable en los mismos. En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, la cámara puede presentar una proporción entre la superficie combinada de los electrodos en contacto con el tampón y la distancia entre los electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm. Por ejemplo, la proporción puede ser de entre 1 y aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 cm, o cualquier valor o intervalo derivable en el mismo. En determinados aspectos, la cámara presenta una proporción entre la superficie combinada de electrodo en contacto con el tampón y la distancia entre electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm, y los electrodos opuestos cargables con carga opuesta están separados entre sí por como mínimo 1 mm. En otros aspectos, la cámara presenta una proporción entre la superficie combinada de electrodos en contacto con tampón y la distancia entre electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm, y los electrodos opuestos cargables con carga opuesta están separados entre sí por como mínimo 3 mm. En aspectos todavía adicionales, la cámara presenta una proporción entre la superficie combinada de electrodos en contacto con tampón y la distancia entre electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm, y los electrodos opuestos cargables con carga contraria están separados entre sí por como mínimo aproximadamente 3 mm a aproximadamente 2 cm. Por ejemplo, los electrodos opuestos cargables con carga contraria pueden separarse entre sí por aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mm, o cualquier distancia derivable entre ellos, o los electrodos opuestos cargables con carga contraria pueden separarse entre sí por aproximadamente 1,0, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 cm o cualquier distancia derivable entre ellos. En algunos aspectos de dichas realizaciones, las células electroporadas no resultan sustancialmente degradadas térmicamente de esta manera.

En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, la cámara puede presentar una proporción entre la superficie combinada de los electrodos en contacto con el tampón y la distancia entre los electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm. Por ejemplo, la proporción puede ser de entre 1 y aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 cm, o cualquier valor o intervalo derivable entre los mismos. En determinadas realizaciones, la cámara presenta una proporción entre la superficie combinada de electrodo en contacto con el tampón y la distancia entre electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm, y los electrodos opuestos cargables con carga opuesta están separados entre sí por como mínimo 1 mm. En otros aspectos, la cámara presenta una proporción entre la superficie combinada de electrodos en contacto con tampón y la distancia entre electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm, y los electrodos opuestos cargables con carga opuesta están separados entre sí por como mínimo 3 mm. En realizaciones todavía adicionales, la cámara presenta una proporción entre la superficie combinada de electrodos en contacto con tampón y la distancia entre electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm, y los electrodos opuestos cargables con carga contraria están separados entre sí por como mínimo aproximadamente 3 mm a aproximadamente 2 cm. Por ejemplo, los electrodos opuestos cargables con carga contraria pueden separarse entre sí por aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mm, o cualquier distancia derivable entre ellos, o los electrodos opuestos cargables con carga contraria pueden separarse entre sí por aproximadamente 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 cm o cualquier distancia derivable entre ellos. En algunas realizaciones, las células electroporadas no resultan sustancialmente degradadas térmicamente de esta manera.

En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, el dispositivo puede comprender, además, un elemento de enfriamiento para disipar calor. Por ejemplo, el elemento de enfriamiento puede comprender un elemento de enfriamiento termoelectrónico. A título de otro ejemplo, el elemento de enfriamiento puede comprender un líquido de enfriamiento que fluye en contacto con el electrodo. A título de todavía otro ejemplo, el elemento de enfriamiento puede comprender un sumidero de calor operativamente asociado al electrodo. La resistencia térmica de la cámara puede ser inferior a aproximadamente 3°C por vatio. En algunas realizaciones, la resistencia térmica de la cámara es de entre aproximadamente 0,5°C por vatio y 4°C por vatio, o la resistencia térmica de la cámara es de entre aproximadamente 1°C por vatio y 3°C por vatio. Por ejemplo, la resistencia térmica de la cámara puede ser de aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 o 4,0°C por vatio, o cualquier valor derivable de ellos.

En determinados métodos *in vitro* que implican transfectar células mediante electroporación, el método *in vitro* implica exponer una suspensión de células a un campo eléctrico con una intensidad superior a 0,5 kV/cm. Por ejemplo, el campo eléctrico puede presentar una intensidad superior a aproximadamente 3,5 kV/cm. En determinados aspectos, el campo eléctrico presenta una intensidad superior a aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 o 3,5 kV/cm, o cualquier valor derivable de ellos.

En algunas realizaciones, transfectar las células comprende utilizar un dispositivo de electroporación de flujo que comprende: paredes que definen un canal de flujo con una zona de electroporación configurada para recibir y contener transitoriamente un flujo continuo de una suspensión de células que deben electroporarse; un portal de flujo de entrada en comunicación de fluidos con el canal de flujo, en el que la suspensión puede introducirse en el canal de flujo por el

portal de flujo de entrada; un portal de flujo de salida en comunicación de fluidos con el canal de flujo, de manera que la suspensión puede retirarse del canal de flujo por el portal de salida; las paredes que definen el canal de flujo dentro de la zona de electroporación que comprende un primer electrodo que forma una parte sustancial de una primera pared del canal de flujo y un segundo electrodo que forma una parte sustancial de una segunda pared del canal de flujo frente a la primera pared, y el primer y segundo electrodos son tales que al situarse en comunicación eléctrica con una fuente de energía eléctrica, se forma un campo eléctrico entre ellos a través del cual puede fluir la suspensión, y en el que la resistencia térmica del canal de flujo es inferior a aproximadamente 10°C por vatio.

En determinadas de dichas realizaciones, el primer y segundo electrodos o electrodos opuestos cargables con carga opuesta se separan entre sí por como mínimo 1 mm. Además, la cámara puede presentar una proporción entre la superficie combinada de electrodos en contacto con el tampón y la distancia entre los electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm. En realizaciones particulares, la cámara puede presentar una proporción entre la superficie combinada de electrodos en contacto con el tampón y la distancia entre electrodos de entre aproximadamente 1 y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 cm, o cualquier valor o intervalo derivable de los mismos. En determinadas realizaciones, las células electroporadas mediante los métodos de electroporación indicados en la presente memoria no resultan sustancialmente degradados térmicamente de esta manera. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, la cámara es una cámara de flujo.

En un aspecto, el dispositivo de electroporación comprende una cámara para contener una suspensión de células que deben electroporarse; la cámara se define por lo menos parcialmente por electrodos opuestos cargables con carga opuesta, y en la que la cámara presenta una proporción entre la superficie combinada de electrodos en contacto con el tampón y la distancia entre los electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm. En aspectos particulares, la proporción es de entre aproximadamente 1 y 70 cm. En otros aspectos particulares, la proporción es de entre aproximadamente 1 y 50 cm. Por ejemplo, la proporción puede ser de entre aproximadamente 1 y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 cm, o cualquier valor o intervalo derivable de los mismos. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, la cámara es una cámara de flujo.

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación de flujo que comprende paredes que definen un canal de flujo configurado para recibir y contener transitoriamente un flujo continuo de una suspensión de células que debe electroporarse; un portal de flujo de entrada en comunicación de fluidos con el canal de flujo, en el que la suspensión puede introducirse en el canal de flujo por el portal de flujo de entrada; un portal de flujo de salida en comunicación de fluidos con el canal de flujo, de manera que la suspensión puede retirarse del canal de flujo por el portal de salida; las paredes que definen el canal de flujo comprenden un primer electrodo que forma por lo menos una parte de una primera pared del canal de flujo y un segundo electrodo que forma por lo menos una parte de una segunda pared del canal de flujo frente a la primera pared, y el primer y segundo electrodos son tales que al situarse en comunicación eléctrica con una fuente de energía eléctrica, se forma un campo eléctrico entre ellos a través del cual puede fluir la suspensión, y en el que la resistencia térmica del canal de flujo es inferior a aproximadamente 10°C por vatio. En determinadas realizaciones, la resistencia térmica del canal de flujo es de entre aproximadamente 0,1°C por vatio y 10°C por vatio. Por ejemplo, la resistencia térmica del canal de flujo puede ser de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 o 10°C por vatio, o cualquier resistencia térmica derivable en la misma. El primer y segundo electrodos pueden separarse por como mínimo 1 mm, por lo menos 2 mm, por lo menos 3 mm o cualquier distancia o intervalo derivable de los mismos. En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, la cámara de flujo puede presentar una proporción entre la superficie combinada de los electrodos en contacto con el tampón y la distancia entre los electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm. Por ejemplo, la proporción puede ser de entre 1 y aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 cm, o cualquier valor o intervalo derivable en el mismo. En determinadas realizaciones, la cámara de flujo presenta una proporción entre la superficie combinada de electrodo en contacto con el tampón y la distancia entre electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm, y el primer y segundo electrodos están separados entre sí por como mínimo 1 mm. En otros aspectos, la cámara de flujo presenta una proporción entre la superficie combinada de electrodos en contacto con tampón y la distancia entre electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm, y el primer y segundo electrodos están separados entre sí por como mínimo 3 mm. En realizaciones todavía adicionales, la cámara de flujo presenta una proporción entre la superficie combinada de electrodos en contacto con tampón y la distancia entre electrodos de entre aproximadamente 1 y 100 cm, y el primer y segundo electrodos están separados entre sí por como mínimo aproximadamente 3 mm a aproximadamente 2 cm. Por ejemplo, el primer y segundo electrodos pueden separarse entre sí por aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mm, o cualquier distancia derivable entre ellos, o el primer y segundo electrodos pueden separarse entre sí por aproximadamente 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0

cm o cualquier distancia derivable entre ellos. En algunas realizaciones, las células electroporadas en el canal de flujo no resultan sustancialmente degradadas térmicamente de esta manera.

En determinados métodos y dispositivos *in vitro* dados a conocer, la resistencia térmica de la cámara es de entre aproximadamente 0,1°C por vatio y aproximadamente 4°C por vatio. En algunos aspectos, la resistencia térmica de la cámara es de entre aproximadamente 1,5°C por vatio y aproximadamente 2,5°C por vatio. Por ejemplo, la resistencia térmica de la cámara puede ser de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 o 4,0°C por vatio, o cualquier resistencia derivable de ellos.

En determinados métodos y dispositivos *in vitro* dados a conocer, el dispositivo de electroporación de flujo comprende: paredes que definen un canal de flujo configurado para recibir y contener transitoriamente un flujo continuo de una suspensión que comprende partículas; un portal de flujo de entrada en comunicación de fluidos con el canal de flujo, en el que la suspensión puede introducirse en el canal de flujo por el portal de flujo de entrada; un portal de flujo de salida en comunicación de fluidos con el canal de flujo, en el que la suspensión puede extraerse del canal de flujo por el portal de flujo de salida; las paredes que definen el canal de flujo comprenden una primera placa de electrodo que forma una primera pared del canal de flujo y una segunda placa de electrodo que forma una segunda pared del canal de flujo opuesta a la primera pared; en la que la superficie de los electrodos en contacto con la suspensión y la distancia entre electrodos se seleccionan de manera que la resistencia térmica del canal de flujo es inferior a aproximadamente 4°C por vatio; los electrodos emparejados situados en comunicación eléctrica con una fuente de energía eléctrica, en la que se forma un campo eléctrico entre los electrodos; de manera que la suspensión de las partículas que fluyen por el canal de flujo puede someterse a un campo eléctrico formado entre los electrodos. En determinadas realizaciones, las placas de electrodo que definen el canal de flujo comprenden, además, una junta formada de un material eléctricamente no conductor y dispuesta entre la primera y segunda placas de electrodo para mantener las placas de electrodo separadas, en el que la junta define un canal en las mismas que forma paredes laterales opuestas del canal de flujo. La junta puede formar, por ejemplo, un sello con cada una de la primera y segunda placas de electrodo. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende una pluralidad de canales de flujo y la junta comprende una pluralidad de canales que forma paredes laterales opuestas de cada una de la pluralidad de canales. En algunas realizaciones, uno de entre el portal de flujo de entrada y el portal de flujo de salida comprende un orificio formado en una de las placas de electrodo y en comunicación de fluidos con el canal de flujo. El otro de entre el portal de flujo de entrada y el portal de flujo de salida puede comprender un orificio formado en una de las placas de electrodo y en comunicación de fluidos con el canal de flujo. En determinados aspectos, el portal de flujo de entrada y el portal de flujo de salida comprende un orificio formado en la otra de las placas de electrodo y en comunicación de fluidos con el canal de flujo. En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, el dispositivo puede comprender, además, un elemento de enfriamiento asociado operativamente al canal de flujo para disipar calor. Por ejemplo, el elemento de enfriamiento puede comprender un elemento de enfriamiento termoelectrónico. A título de otro ejemplo, el elemento de enfriamiento puede comprender un líquido de enfriamiento que fluye en contacto con el electrodo. A título de todavía otro ejemplo, el elemento de enfriamiento puede comprender un sumidero de calor operativamente asociado al electrodo. La resistencia térmica del canal de flujo puede ser inferior a aproximadamente 3°C por vatio. En algunas realizaciones, la resistencia térmica del canal de flujo es de entre aproximadamente 0,5°C por vatio y 4°C por vatio, o la resistencia térmica del canal de flujo es de entre aproximadamente 1°C por vatio y 3°C por vatio. Por ejemplo, la resistencia térmica del canal de flujo puede ser de aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 o 4,0°C por vatio, o cualquier valor derivable de ellos.

En determinados métodos y dispositivos *in vitro* dados a conocer, el primer electrodo puede comprender una estructura eléctricamente conductora alargada, en la que el segundo electrodo comprende una estructura eléctricamente conductora tubular, en la que los electrodos se disponen concéntricamente de manera que el segundo electrodo tubular circunda el primer electrodo en una relación espaciada respecto al mismo, y en el que el canal de flujo está dispuesto dentro de un espacio anular definido entre el primer y segundo electrodos. Los electrodos pueden formar por lo menos una parte de las paredes que definen el canal de flujo. En algunas realizaciones, los espaciadores anulares concéntricos para mantener el primer y segundo electrodos se encuentran en relación concéntrica y espaciada. En determinados aspectos, el dispositivo se dispone en serie o en paralelo respecto a un segundo dispositivo similar.

En determinados métodos *in vitro* que implican transfectar células mediante electroporación de flujo, el canal de flujo presenta una resistencia térmica inferior a aproximadamente 10°C por vatio. En algunos métodos que implican transfectar las células mediante electroporación de flujo, el método implica hacer fluir una suspensión de células que debe electroporarse por un canal de flujo y exponer la suspensión a un campo eléctrico mientras fluyen por el canal de flujo, en el que el campo eléctrico presenta una intensidad superior a 0,5 kV/cm. Por ejemplo, el campo eléctrico puede presentar una intensidad superior a aproximadamente 3,5 kV/cm. En determinadas realizaciones, el campo eléctrico presenta una intensidad superior a aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 o 3,5 kV/cm, o cualquier valor derivable de ellos.

En las realizaciones dadas a conocer con respecto al dispositivo de electroporación de flujo, se encuentra específicamente contemplado que los parámetros e intervalos de parámetros indicados para la electroporación de flujo

sean aplicables a dispositivos de electroporación estática utilizados en los métodos indicados en la presente memoria. En realizaciones específicas, se utiliza la electroporación de flujo y se excluye la electroporación estática o la electroporación no de flujo. En una realización específica adicional, se utiliza la electroporación estática y se excluye la electroporación de flujo.

Los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, la utilización de otros métodos de transfección conocidos de la técnica, tales como métodos de transfección de base química y de base no química. Entre los métodos de transfección de base química se incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, dendrímeros, lipofección y polímeros catiónicos, tales como DEAE-dextrano o polietilénimina. Entre los métodos no químicos se incluyen el exprimido celular, la sonoporación, la transfección óptica, la impalefección y el transporte hidrodinámico. Se encuentran incluidos, además, métodos basados en partículas, tales como la utilización de una pistola génica, las magnetofecciones (es decir, la transfección asistida por imanes) y el bombardeo de partículas.

Los métodos indicados en la presente memoria utilizan una etapa activadora de las células. En algunas realizaciones, dicha cepa activadora de las células es previa a la transfección de las mismas. En algunas realizaciones, las células se transfectan en un periodo de tiempo inferior a siete días después de poner en contacto las células con la composición activadora. En algunas realizaciones, las células se transfectan en un periodo de tiempo inferior a tres días después de poner en contacto las células con la composición activadora. En algunas realizaciones, las células se transfectan en un periodo de tiempo de 2 días o menos después de poner en contacto las células con la composición activadora. En algunas realizaciones, las células se transfectan dos días después de poner en contacto las células con la composición activadora. En algunas realizaciones, las células se transfectan en un periodo de tiempo inferior a 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 días después de poner en contacto las células con la composición activadora. En algunas realizaciones, las células se transfectan en un periodo de tiempo inferior a 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días después de poner en contacto las células con la composición activadora.

En algunas realizaciones, el agente de digestión del ADN se selecciona de entre un TALEN, transposasa, integrasa y nucleasa. En algunas realizaciones, el agente de digestión del ADN se encuentra codificado en uno o más ARN. En algunas realizaciones, el agente de digestión del ADN es una nucleasa. En algunas realizaciones, el agente de digestión del ADN es Cas9. En algunas realizaciones, la composición de transfección comprende, además, ARN CRISPR. En algunas realizaciones, la composición de transfección comprende, además, ARN guía. En algunas realizaciones, la nucleasa es una nucleasa específica de sitio.

En algunas realizaciones, el ADN donante es un plásmido. En algunas realizaciones, el ADN donante es un oligo. En algunas realizaciones, el ADN donante es un oligo de cadena sencilla. La concentración del ADN donante en la composición de transfección puede ser de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1000 µg/ml o de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 o 50 µg/ml o cualquier intervalo derivable de los mismos.

Cualquiera de los métodos *in vitro* dados a conocer puede incluir una etapa de utilización de dilución limitante de las células transfectadas para obtener colonias de una sola célula. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dilución limitante" se refiere al procedimiento de diluir significativamente un cultivo celular con el objetivo de conseguir una sola célula en cada cultivo. Al reproducirse dicha célula individual aislada, el cultivo resultante contendrá únicamente clones de la célula original. Por ejemplo, puede utilizarse una placa multipocillo para obtener cultivos o colonias de una sola célula. Por ejemplo, puede utilizarse la dilución limitante para un estudio de iPS derivadas de una célula del paciente (p. ej., para la restauración en pacientes de anemia falciforme). Las células iPS pueden modificarse mediante la utilización del enfoque de dilución limitante a fin de formar una célula corregida que expresa hemoglobina y expandirlas para la administración en el paciente.

En cualquiera de los métodos *in vitro* dados a conocer, puede utilizarse una etapa que comprende expandir una célula clonal aislada y seleccionada para producir células clonales con una modificación particular de la secuencia del ADN genómico.

En los métodos *in vitro* dados a conocer que implican la expansión de una célula clonal aislada, la expansión puede ser para la fabricación a gran escala. Por ejemplo, las células pueden expandirse en un volumen superior a 1 litro o las células pueden expandirse en un volumen superior a 3 litros. En determinadas realizaciones, las células se expanden en un volumen superior a 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 o 3,0 litros, o cualquier valor derivable de los mismos.

En cualquiera de los métodos *in vitro* dados a conocer, puede utilizarse una etapa adicional que comprende congelar células transfectadas y seleccionadas o cribadas. También puede utilizarse una etapa todavía adicional, en la que se expanden las células previamente transfectadas y congeladas y seleccionadas/cribadas.

En los métodos *in vitro* dados a conocer, el cultivo celular puede incluir cualesquiera ingredientes adicionales conocidos por el experto ordinario en la materia, tal como seleccionaría fácilmente el experto ordinario en la materia basándose en el tipo de célula que se cultiva. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en butirato sódico o sal comparable. En algunas realizaciones, las células se cultivan en medio sin suero.

En los métodos *in vitro* dados a conocer, puede utilizarse una etapa adicional que comprende expandir una célula clonal aislada y seleccionada o cribada para producir células clonales con una modificación de la secuencia del ADN genómico.

Aspectos adicionales, que no están cubiertos por la invención reivindicada, se refieren a un método para producir una línea celular estable que comprende una modificación de la secuencia del ADN genómico de una secuencia diana del ADN genómico, en la que el método comprende: poner en contacto las células con una composición activadora; transfectar las células con una composición de transfección que comprende: (a) ADN donante y (b) un agente de digestión del ADN, en el que el ADN donante comprende: (i) una región homóloga que comprende secuencias de ácidos nucleicos homólogas de la región diana de ADN genómico, y (ii) una región de modificación de la secuencia, y el cribado de células transfectadas para la modificación de la secuencia del ADN genómico en la región diana del ADN genómico; aislar las células transfectadas y cribadas mediante dilución limitante a fin de obtener células clonales; expandir las células transfectadas y aisladas a fin de producir una línea celular que comprende la modificación de la secuencia del ADN genómico.

La exposición proporciona, además, una línea celular o célula transfectada producida mediante los métodos indicados en la presente memoria.

Un aspecto adicional que no está cubierto por la invención reivindicada se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que presenta o que se sospecha que presenta una enfermedad o condición mediante la administración de una cantidad eficaz de una línea celular o de células transfectadas producidas mediante los métodos indicados en la presente memoria.

Otro aspecto que no está cubierto por la invención reivindicada se refiere a un método de investigación clínica que comprende administrar una cantidad eficaz de una línea celular o de células transfectadas producidas mediante los métodos indicados en la presente memoria.

Se encuentra específicamente contemplado que puedan excluirse realizaciones indicadas en la presente memoria. Se encuentra adicionalmente contemplado que, en donde se indica un intervalo, puedan excluirse determinados intervalos.

Aspectos adicionales, que no están cubiertos por la invención reivindicada, se refieren a un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende poner en contacto células con una composición activadora; transfectar las células con una composición de transfección que comprende: (a) ADN donante y (b) un agente de digestión del ADN, en el que el ADN donante comprende: (i) una región homóloga que comprende una secuencia de ácidos nucleicos homóloga de la región diana de ADN genómico y (ii) un receptor de antígeno quimérico (RAQ) y en la que la secuencia del ADN genómico se modifica específicamente en la región diana del ADN genómico para integrar el RAQ y administrar las células en el paciente. En algunas realizaciones, la composición de transfección es no vírica.

En algunas realizaciones, las células son autólogas. En algunas realizaciones, las células son células T o células NK. Alternativamente, las células pueden ser una célula huésped tal como se define a lo largo de toda la solicitud. En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia maligna de células B. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia linfoblástica aguda. En algunas realizaciones, las células se aíslan a partir de sangre del paciente. En algunas realizaciones, las células se aíslan a partir de un donante compatible genéticamente. En algunas realizaciones, las células son células donantes. En algunas realizaciones, las células se aíslan mediante aféresis. En algunas realizaciones, el método comprende, además, aislar las células a partir del paciente.

Aspectos adicionales se refieren a un método *in vitro* para la modificación de secuencias específica de sitio de una región diana del ADN genómico diana en células, que comprende: poner en contacto las células con una composición activadora; transfectar las células con una composición no vírica de transfección que comprende: (a) ADN donante y (b) un agente de digestión del ADN, en el que el ADN donante comprende: (i) una región homóloga que comprende una secuencia de ácidos nucleicos homóloga de la región diana del ADN genómico, y (ii) una región de modificación de secuencia, y en la que la secuencia de ADN genómico se modifica específicamente en la región diana del ADN genómico. En algunas realizaciones, las células son células inmunitarias. En algunas realizaciones, las células inmunitarias son células T. En algunas realizaciones, las células T son células T primarias. En algunas realizaciones, la composición activadora comprende anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. En algunas realizaciones, la transfección de las células comprende la electroporación de flujo de las células.

La utilización de la composición o composiciones puede emplearse basándose en los métodos *in vitro* indicados en la presente memoria. La utilización de una o más composiciones puede emplearse en la preparación de medicamentos destinados a tratamientos según los métodos indicados en la presente memoria. Otras realizaciones se comentan a lo largo de toda la presente solicitud. Cualquier realización comentada con respecto a un aspecto de la invención se refiere también a otros aspectos de la invención, y a la inversa. Se entiende que las realizaciones en la sección de



Ejemplos son realizaciones o que son aplicables a todos los aspectos de la tecnología indicada en la presente memoria.

5 Tal como se utiliza en la presente especificación, "un" o "una" puede referirse a uno(a) o más. Tal como se utiliza en la presente memoria en la reivindicación o reivindicaciones junto con la expresión "que comprende", los términos "un" o "una" pueden referirse a uno(a) o más de uno(a).

10 Los métodos de la exposición se indica en la presente memoria que comprenden los elementos o etapas recitados, aunque pueden consistir, además, en los elementos o etapas recitados. En el caso de que los métodos consistan en los elementos o etapas recitados, los métodos excluyen los elementos o etapas no recitados. Los métodos de la exposición, además, pueden "consistir esencialmente en los elementos o etapas recitados". En el caso de que los métodos "consistan esencialmente en los elementos o etapas recitados", los métodos excluyen elementos o ingredientes activos que modifican la naturaleza de la composición o etapas que alteran el resultado del método.

15 La utilización del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para referirse a "y/o", a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas únicamente o a que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la exposición apoya una definición que se refiere únicamente a alternativas y a "y/o". Tal como se utiliza en la presente memoria, "otro" puede significar por lo menos un segundo elemento o más.

20 A lo largo de toda la presente solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para referirse a que un valor incluye la variación de error inherente al dispositivo, en donde el método se utiliza para determinar el valor, o a la variación que existe entre los sujetos del estudio.

25 Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente. Sin embargo, debería entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferentes de la invención, se proporcionan a título meramente ilustrativo.

#### Breve descripción de los dibujos

30 Los dibujos a continuación forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención se entenderá mejor en referencia a uno o más de estos dibujos, en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en la presente memoria.

35 FIG. 1: integración dirigida de GFP en K562 mediante ARNm CRISPR- (ARNg/Cas9 - VAAS1) y ADN plasmídico de GFP. La FIG. 1 muestra el porcentaje de células que expresan GFP (R2) 1, 5 y 12 días después de la transfección por electroporación (o control de no electroporación (EP-)) con ADN plasmídico de GFP (ADN-CRISPR) o con ADN plasmídico de GFP y el complejo ARNg/Cas9 CRISPR con diana en la integración en el sitio de VAAS1 (ADN+CRISPR). Tal como se muestra en la FIG. 1, el 37 % de las células transfectadas con ADN+CRISPR mantuvo la expresión de GFP doce días después de la transfección, mientras que solo el 0,8 % de las células transfectadas con ADN CRISPR- mantuvo la expresión de GFP doce días después de la transfección. La FIG. 2A-C: el plásmido de ADN indujo citotoxicidad significativa de las células T expandidas durante 10 días antes de la electroporación. La FIG. 2 muestra la viabilidad (FIG. 2A), la proliferación (FIG. 2B) y la expresión de GFP (FIG. 2C) de células de control no transfectadas (EP-) o de células transfectadas por electroporación con ADN plasmídico de GFP, ARNm-GFP o Cas9/ARNg. La FIG. 2 demuestra que la transfección de ADN plasmídico induce citotoxicidad en células T expandidas.

40 La FIG. 3A-C: ventana de transfección de las células T expandidas después de la activación. Las células T se activaron con el activador de células T humanas DYNABEADS® CD3/CD28 (disponible comercialmente de Life Technologies) y a continuación se transfectaron por electroporación con ADN plasmídico un, dos o tres días después de la activación. La FIG. 3 muestra la viabilidad de las células transfectadas un día (FIG. 3A), dos días (FIG. 3B) y tres días (FIG. 3C) después de la activación.

45 La FIG. 4A-C: ventana de transfección de las células T expandidas después de la activación. Las células T se activaron con el activador de células T humanas DYNABEADS® CD3/CD28 y a continuación se transfectaron por electroporación con ADN plasmídico un, dos o tres días después de la activación. La FIG. 4 muestra el porcentaje de células que expresan GFP después de la transfección un día (FIG. 4A), dos días (FIG. 4B) y tres días (FIG. 4C) después de la activación.

50 La FIG. 5: Las células T se activaron con el activador de células T humanas DYNABEADS® CD3/CD28 y a continuación se transfectaron por electroporación con ADN plasmídico un, dos o tres días después de la activación. La FIG. 5 muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células transfectadas un día (FIG. 5A), dos días (FIG. 5B) y tres días (FIG. 5C) después de la activación.

55 La FIG. 6A-C: ventana de transfección de las células T expandidas después de la activación. Las células T se activaron con el activador de células T humanas DYNABEADS® CD3/CD28 y a continuación se transfectaron por electroporación con ADN plasmídico un, dos o tres días después de la activación. La FIG. 6 muestra la proliferación de células después de la transfección (los resultados son de tres experimentos independientes de transfección y un experimento de control sin ADN plasmídico) un día (FIG. 6A), dos días (FIG. 6B) y tres días (FIG. 6C) después de la activación.

La FIG. 7: integración dirigida de GFP en células T expandidas mediante ARNm CRISPR- (ARNg/Cas9-VAAS1) y ADN plasmídico de GFP. Se activaron las células T expandidas según los métodos anteriormente indicados y se electroporaron dos días después de la activación. La FIG. 7 muestra el porcentaje de células que expresan GFP (R2) 1, 4 y 11 días después de la transfección por electroporación (o control de no electroporación (EP-)) con ADN plasmídico de GFP (ADN CRISPR-) o con ADN plasmídico de GFP y el complejo ARNg/Cas9 CRISPR con diana en la integración en el sitio de VAAS1 (ADN+CRISPR). Tal como se muestra en la FIG. 7, el 4% de las células transfectadas con ADN+CRISPR mantuvo la expresión de GFP once días después de la transfección, mientras que solo el 0,3 % de las células transfectadas con ADN-CRISPR mantuvo la expresión de GFP once días después de la transfección.

La FIG. 8: integración dirigida de GFP en células T expandidas mediante ARNm-CRISPR (ARNg/Cas9-VAAS1) y ADN plasmídico de GFP. Se activaron las células T expandidas según los métodos anteriormente indicados y se electroporaron dos días después de la activación. La FIG. 8 muestra el porcentaje de células que expresan GFP (R2) 6 días después de la transfección por electroporación (o control de no electroporación (EP-)) con ADN plasmídico de GFP (ADN CRISPR-) o con ADN plasmídico de GFP y el complejo ARNg/Cas9 CRISPR con diana en la integración en el sitio de VAAS1 (ADN CRISPR+). Tal como se muestra en la FIG. 8, el 2,3 % de las células transfectadas con ADN CRISPR+ mantuvo la expresión de GFP seis días después de la transfección, mientras que 0 % de las células transfectadas con ADN-CRISPR mantuvo la expresión de GFP seis días después de la transfección.

La FIG. 9A-D: integración dirigida de GFP en células T expandidas mediante ARNm CRISPR- (ARNg/Cas9) con diana en el sitio de VAAS1 y el ADN plasmídico de GFP (ADN donante). Las células se activaron tal como se ha indicado anteriormente y se transfectaron un, dos, tres y cuatro días después de la activación. Para estos experimentos se utilizaron 50, 100 o 200 µg/ml de ADN plasmídico de GFP según se indica. Se midió la proliferación (FIG. 9A), el porcentaje de células expresantes de GFP (FIG. 9B), el número relativo de sucesos integrados (FIG. 9C) y la viabilidad celular (FIG. 9D) para las células transfectadas tres, seis, diez y catorce días después de la activación. Se calculó el número relativo de sucesos integrados como número de células multiplicado por el porcentaje de células positivas para GFP.

La FIG. 10A-B: oligo de ADN donante ejemplar con región de modificación de la secuencia (mayúscula y no sombreado) y región homóloga (minúscula y sombreado). La FIG. 10A muestra un ejemplo en el que se insertó un codón de parada como adición en un ADN genómico diana. La FIG. 10B muestra un ejemplo en el que se modificó una sola base en el ADN genómico diana.

La FIG. 11: ejemplo de integración dirigida de transgén: se ilustra un ejemplo en el que el ADN donante es un plásmido de doble cadena (se ilustra únicamente una cadena de secuencia por simplicidad) con una región de modificación de la secuencia de un transgén X de 2000 pb y una región homóloga, que se ilustra como una secuencia en minúscula y sombreada. El plásmido puede contener, además, secuencias plasmídicas adicionales, tales como marcadores, orígenes de replicación y similares.

La FIG. 12: integración dirigida de PGK-eGFP-PoliA en el sitio de VAAS1 de fibroblastos primarios humanos mediante ARNm CRISPR- y ADN plasmídico donante (sin selección): se muestra el análisis de FACS de fibroblastos primarios humanos transfectados con PGK-eGFP-PoliA con (Cas9+/ARNg) o sin (Cas9-/ARNg) el sistema de ARNm CRISPR-. Tal como se muestra en esta figura, solo las células transfectadas con el ADN plasmídico donante y el sistema CRISPR mostraron una expresión estable de GFP más allá de los 15 días posteriores a la transfección (comparar la fila 4, primer gráfico con el segundo gráfico para la expresión de GFP 23 días después de la transfección y la fila 4, tercer gráfico con el cuarto gráfico para la expresión de GFP 26 días después de la transfección).

La FIG. 13A-C: integración dirigida de SA-2A-eGFP-PoliA en el sitio de VAAS1 de K562 mediante ARNm-CRISPR y ADN plasmídico donante (sin selección): se muestra un análisis de viabilidad (FIG. 13A), expresión de GFP (FIG. 13B) y la intensidad media de fluorescencia (FIG. 13C) de las células transfectadas con ADN plasmídico donante (SA-2A-eGFP-PoliA) y (+) o (-) el sistema CRISPR, que presenta como diana la integración en el sitio de VAAS1 de las células K562. Solo las células transfectadas con el ADN donante y el sistema CRISPR mostraron una expresión estable de GFP y de la intensidad media de fluorescencia durante periodos prolongados después de la transfección.

La FIG. 14: integración dirigida de PGK-eGFP-PoliA en el sitio de VAAS1 de K562 mediante ARNm-CRISPR y ADN plasmídico donante (sin selección): se muestra el análisis de FACS de células K562 transfectadas con PGK-eGFP-PoliA y con (+CRISPR, segunda y cuarta filas) o sin (-CRISPR, primera y tercera filas) sistema de ARNm CRISPR-. El análisis de FACS se llevó a cabo en las células un, cinco, seis, once, catorce, diecinueve, veintitrés y veintinueve días después de la transfección. Tal como se muestra en esta figura, solo las células transfectadas con el ADN plasmídico donante y el sistema de CRISPR mostraron una expresión estable de GFP más allá de seis o siete días después de la transfección.

La FIG. 15: integración dirigida de PGK-eGFP-PoliA en el sitio de VAAS1 de las células T expandidas mediante ARNm CRISPR- y ADN plasmídico donante (sin selección; EP dos días después de la activación, 100 µg/ml de ADN plasmídico): se muestra el análisis de FACS de células T humanas transfectadas con PGK-eGFP-PoliA y con (+CRISPR, segunda y cuarta filas) o sin (-CRISPR, primera y tercera filas) sistema de ARNm-CRISPR. Las células se electroporaron dos días después de la activación de las células (tal como se ha indicado anteriormente) y se llevó a cabo un análisis de FACS de las células un, cuatro, seis, siete, nueve, diez, doce y catorce días después de la transfección. Tal como se muestra en esta figura, solo las células transfectadas con el ADN plasmídico donante y el sistema de CRISPR mostraron una expresión estable de GFP más allá de cuatro o seis días después de la transfección.

La FIG. 16: integración dirigida de PGK-CAR-aCD19BBz-PoliA en el sitio de VAAS1 de K562 mediante ARNm CRISPR- y ADN plasmídico donante (sin selección). Se muestran en el análisis de FACS, células K562 transfectadas con PGK-CAR-aCD19BBz-PoliA y con (+CRISPR) o sin (-CRISPR) el sistema ARNm-CRISPR con dirige el transgén al sitio de VAAS1. El análisis de FACS se llevó a cabo en las células un día y ocho días después de la transfección. Tal como se muestra en esta figura, solo las células transfectadas con el ADN plasmídico donante y el sistema CRISPR mostraron una cantidad significativa de expresión de GFP (44 %) ocho días después de la transfección.

#### Descripción de realizaciones ilustrativas

Las composiciones y métodos se refieren a la modificación de secuencias de una secuencia de ADN genómico diana endógena. Un aspecto determinado se refiere a un método *in vitro* para la modificación de secuencias específica de sitio de una región de ADN genómico diana en células, que comprende: poner en contacto las células con una composición activadora; transfectar las células con una composición de transfección que comprende: (a) ADN donante y (b) un agente de digestión del ADN. El ADN donante comprende dos regiones. Una región es una región homóloga que comprende una secuencia de ácidos nucleicos homóloga de la región diana de ADN genómico, y la otra región es una región de modificación de secuencia. En el método anteriormente indicado, la secuencia de ADN genómico se modifica específicamente en la región diana del ADN genómico.

Los solicitantes han encontrado que la adición de una etapa de activación antes de la transfección celular supera la toxicidad asociada a la administración de ADN plasmídico en los enfoques tradicionales de ingeniería del genoma. Una ventaja adicional de este método es la falta de integración aleatoria de las secuencias de transgén. La integración aleatoria de las secuencias diana puede causar efectos no deseados debido a la incapacidad de controlar el sitio de integración. Entre dichos efectos no deseados se incluyen la inactivación de genes del huésped, el silenciamiento o falta de expresión adecuada del transgén y el requisito de procedimientos extensivos de cribado para determinar el sitio de integración del transgén. Se encuentra contemplado que este método pueda utilizarse como enfoque de terapia génica único para células que muestren toxicidad frente al ADN plasmídico. Entre dichas células se incluyen células primarias, células madre, células T primarias, células progenitoras hematopoyéticas y otras células conocidas de la técnica y descritas en la presente memoria como células difíciles de transfectar.

#### Ácidos nucleicos

##### B. ADN donante

Las realizaciones se refieren a la modificación de secuencias diana de ADN genómico mediante la transfección de células con una composición que comprende ADN donante y un agente de digestión del ADN.

La expresión "ADN genómico endógeno" se refiere al ADN cromosómico de la célula. La expresión "secuencia diana de ADN genómico" se refiere a un sitio de ADN genómico endógeno que es la diana de una modificación de la secuencia del ADN. La modificación de la secuencia del ADN puede ser una que cambie una o más bases de la secuencia diana del ADN genómico en un sitio específico o en múltiples sitios específicos. Un cambio puede incluir modificar 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más pares de bases de la secuencia diana de ADN genómico en 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más pares de bases diferentes. Una delección puede ser una delección de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 o 500 pares de bases. Una adición puede ser la adición de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más pares de bases. Una modificación de secuencia puede clasificarse como un cambio y delección, un cambio y adición, etc., en el caso de que la modificación de la secuencia altere el ADN genómico diana de múltiples maneras. En una realización, la modificación de la secuencia es un codón de parada. En una realización adicional, la modificación de la secuencia de ADN es uno o más codones de parada. En realizaciones adicionales, la modificación de la secuencia de ADN es 1, 2, 3, 4, 5 o 10 codones de parada. En el caso de que la modificación de la secuencia sea un codón de parada, puede incrementarse la eficiencia y/o la fiabilidad de la edición génica.

En el caso de que la modificación de la secuencia sea la integración de un transgén, el transgén puede ser la longitud de una secuencia génica típica o la longitud típica de la región codificante de un gen. En algunas realizaciones, el transgén en la región de modificación secuencia presenta una longitud de entre 100 y 10000 ácidos nucleicos. En realizaciones adicionales, el transgén presenta una longitud de entre 500 y 5000 ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el transgén presenta una longitud de entre 1000 y 3000 o de entre 1000 y 5000 ácidos nucleicos.

La modificación de secuencia del ADN también puede ser la integración específica de sitio de un transgén. El término "transgén" se refiere a un gen o material genético que es transferido mediante ingeniería genética al genoma de un huésped. El transgén puede ser la expresión de un gen terapéutico que está mutado o es deficiente en el huésped. El transgén puede comprender, además, un marcador, tal como GFP, o un marcador de superficie celular que permite el rastreo de las células transfectadas *in vivo* o *in vitro*.

El ADN donante puede ser ADN plasmídico, un fragmento de ADN linealizado o un oligo. ADN plasmídico se refiere a un fragmento circular de ADN. El plásmido puede contener uno o más transgenes. Por ejemplo, el plásmido puede

codificar un agente de digestión de ADN que de manera específica de sitio realiza un corte en el ADN genómico endógeno y un transgén que se integra en el ADN genómico en el punto de corte o en proximidad al mismo.

El término "oligo" u "oligonucleótido" se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, en su caso, ácido ribonucleico (ARN). El término debería entenderse, además, que incluye, como equivalentes, derivados, variantes y análogos de ARN o ADN constituidos de análogos de nucleótidos y, según resulte aplicable a la realización que se describe, polinucleótidos de cadena sencilla (de sentido o antisentido) y de doble cadena. Entre los desoxirribonucleótidos se incluyen desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina y desoxitimidina. En aras de la claridad, al hacer referencia en la presente memoria a un nucleótido de un ácido nucleico, que puede ser ADN o ARN, se utilizan los términos "adenosina", "citidina", "guanosina" y "timidina". Se entiende que, en el caso de que el ácido nucleico sea ARN, un nucleótido que presenta una base uracilo es una uridina. En algunas realizaciones, se utiliza el término "oligo" para definir un ácido nucleico que presenta 150 bases o menos. En algunas realizaciones, se utiliza el término "oligo" para definir un ácido nucleico que presenta 100, 50 o 25 bases o menos.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se utilizan intercambiablemente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, sea desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden presentar cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o no conocida. A continuación, se proporcionan ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento génico (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, ARNdc, ARNip, miARN, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, y sondas y cebadores de ácidos nucleicos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. En caso de haber, las modificaciones de la estructura de nucleótidos pueden realizarse antes o después del ensamblaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje. El término se refiere, además, a moléculas de doble cadena o de cadena sencilla. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de la presente invención que sea un polinucleótido comprende tanto la forma de doble cadena como cada una de las dos formas de cadena sencilla complementarias que es conocido o se espera que constituyan la forma de doble cadena.

Los polinucleótidos biológicamente equivalentes son aquellos que presentan el porcentaje especificado de homología y que codifican un polipéptido que presenta una actividad biológica igual o similar.

En determinadas realizaciones, la región homóloga del ADN donante es 100 % homóloga. En realizaciones adicionales, la región homóloga del ADN donante es homóloga al 85 %, 90 %, 95 % o 99 %.

En determinadas realizaciones, el ADN donante comprende por lo menos aproximadamente 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1400 o 1600 (o cualquier intervalo derivable de los mismos) ácidos nucleicos de secuencia que es homóloga a la secuencia diana de ADN genómico. En algunas realizaciones, el ADN donante comprende por lo menos aproximadamente 20 ácidos nucleicos de secuencia que es idéntica a la secuencia del ADN genómico. En el presente contexto, la expresión "secuencia idéntica" se refiere a una secuencia que se corresponde exactamente con la secuencia del ADN genómico. La secuencia idéntica puede encontrarse en una región que se encuentra en el extremo 5' de la modificación de secuencia de ADN y en una región que se encuentra en el extremo 3' de una modificación de secuencia de ADN. A título de ejemplo ilustrativo, en el caso de que el ADN donante comprenda por lo menos 20 ácidos nucleicos de secuencias homólogas, el ADN donante puede comprender, por ejemplo, 10 ácidos nucleicos de secuencia homóloga en cada lado de la modificación de secuencia. De manera similar, el ADN donante que comprende 10 ácidos nucleicos de secuencias homólogas puede comprender, por ejemplo, 5 ácidos nucleicos de secuencia complementaria en cada lado de la modificación de secuencia. En algunas realizaciones, la región homóloga comprende 1600 ácidos nucleicos que son homólogos de la secuencia genómica diana. En algunas realizaciones, el ADN donante comprende 800 ácidos nucleicos de región homóloga en el extremo 5' de la región de modificación de secuencia 800 ácidos nucleicos de región homóloga en el extremo 3' de la región de modificación de secuencia.

En el caso de que el ADN donante sea un oligo de ADN de cadena sencilla, puede presentar una longitud aproximada de entre 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 ácidos nucleicos y aproximadamente 50, 75, 100, 125 o 150 ácidos nucleicos, o cualquier intervalo derivable de los mismos. En determinadas realizaciones, el oligo presenta más de 20 ácidos nucleicos, o más de 21, 22, 23, 24, 25, 30 o 40 ácidos nucleicos. En realizaciones específicas, el oligo es de entre aproximadamente 30 y 150 ácidos nucleicos, de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 150 ácidos nucleicos, de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 100 ácidos nucleicos, o de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 ácidos nucleicos.

La concentración del ADN donante durante el procedimiento de transfección puede ser la concentración final del ADN donante en la composición de transfección y/o el recipiente de muestra de transfección. La concentración de ADN donante puede ser de entre aproximadamente 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250 o 300 y aproximadamente 350,

400, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 o 5000 µg/ml, o cualquier intervalo derivable de los mismos. En determinadas realizaciones, la concentración del ADN donante es de por lo menos 30 µg/ml. En realizaciones adicionales, la concentración del ADN donante es de por lo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150 o 200 µg/ml.

#### C. Agente de digestión de ADN.

La presente invención proporciona métodos *in vitro* para modificar una secuencia diana de ADN genómico mediante la transfección de las células mediante transfección con ADN donante y un agente de digestión del ADN. La expresión "agente de digestión del ADN" se refiere a un agente que es capaz de romper enlaces (es decir, enlaces fosfodiéster) entre las subunidades nucleótidas de los ácidos nucleicos. En una realización específica, el agente de digestión del ADN está codificado en ARN. En otras realizaciones, el agente de digestión de ADN es una proteína, un enzima, o un mimético de molécula pequeña que presenta actividad enzimática. En algunas realizaciones, el agente de digestión de ADN está codificado en ADN. En una realización específica, el agente de digestión de ADN está codificado en ADN plasmídico. En algunas realizaciones, el agente de digestión de ADN y el ADN donante están codificados en el mismo plásmido.

En una realización, el agente de digestión de ADN es una transposasa. Por ejemplo, puede utilizarse un transposón de ADN sintético (p. ej., el sistema de transposón "Sleeping Beauty") diseñado para introducir secuencias de ADN definidas con precisión en un cromosoma de animales vertebrados. El sistema de transposón Sleeping Beauty está compuesto de una transposasa Sleeping Beauty (SB) y un trasposón que ha sido diseñado para insertar secuencias específicas de ADN en genomas de animales vertebrados. Los transposones de ADN se traslocan de un sitio de ADN a otro con una simple operación de cortar y pegar. La transposición es un proceso preciso en el que un segmento de ADN definido es extraído de una molécula de ADN y desplazado a otro sitio en una misma molécula o genoma de ADN o en una diferente.

Al igual que todas las demás transposasas Tc1/tipo Mariner, la transposasa SB inserta un transposón en un par de bases del dinucleótido TA en una secuencia de ADN receptora. El sitio de inserción puede ser en cualquier otro sitio en la misma molécula de ADN o en otra molécula (o cromosoma) de ADN. En los genomas de mamífero, incluyendo los seres humanos, existen aproximadamente 200 millones de sitios TA. El sitio de inserción TA se duplica en el proceso de integración del transposón. Dicha duplicación de la secuencia TA es una característica distintiva de la transposición y se utiliza para determinar el mecanismo en algunos experimentos. La transposasa puede estar codificada dentro del transposón o la transposasa puede ser suministrada por otra fuente, en cuyo caso el transposón se convierte en un elemento no autónomo. Los transposones no autónomos resultan más útiles como herramientas genéticas debido a que, después de la inserción, no pueden continuar extrayéndose y reinsertándose de manera independiente. Todos los transposones de ADN identificados en el genoma humano y en otros genomas de mamífero son no autónomos debido a que, aunque contienen genes de transposasa, los genes son no funcionales y son incapaces de generar una transposasa que pueda movilizar el transposón.

En una realización adicional, el agente de digestión de ADN es una integrasa. Por ejemplo, la integrasa phiC31 es una recombinasa específica de secuencia codificada dentro del genoma del bacteriófago phiC31. La integrasa de phiC31 media en la recombinación entre dos secuencias de 34 pares de bases denominadas sitios de unión (att); uno se encuentra en el fago y el otro, en el huésped bacteriano. Dicha serina integrasa se ha mostrado que funciona eficientemente en muchos tipos celulares diferentes, incluyendo las células de mamífero. En presencia de la integrasa de phiC31, un plásmido donante que contenga attB puede integrarse unidireccionalmente en un genoma diana mediante la recombinación en sitios con similitud de secuencia con el sitio attP nativo (denominados sitios pseudo-attP). La integrasa de phiC31 puede integrar un plásmido de cualquier tamaño, en forma de una sola copia, y no requiere cofactores. Los transgenes integrados se expresan establemente y son heredables.

En una realización específica, el agente de digestión de ADN es una nucleasa. Las nucleasas son enzimas que hidrolizan los ácidos nucleicos. Las nucleasas pueden clasificarse como endonucleasas o exonucleasas. Una endonucleasa es cualquiera de un grupo de enzimas que cataliza la hidrólisis de enlaces entre ácidos nucleicos en el interior de una molécula de ADN o ARN. Una exonucleasa es cualquiera de un grupo de enzimas que cataliza la hidrólisis de nucleótidos únicos desde el extremo de una cadena de ADN o ARN. Las nucleasas pueden clasificarse, además, basándose en si digieren específicamente ADN o ARN. Una nucleasa que cataliza específicamente la hidrólisis del ADN puede denominarse desoxirribonucleasa o ADNasa, mientras que una nucleasa que cataliza específicamente la hidrólisis del ARN puede denominarse ribonucleasa o ARNasa. Algunas nucleasas son específicas de secuencias de ácidos nucleicos de cadena sencilla o de doble cadena. Algunos enzimas presentan tanto propiedades de exonucleasa como de endonucleasa. Además, algunos enzimas son capaces de digerir tanto secuencias de ADN como de ARN. El término "nucleasa" se utiliza en la presente memoria para referirse de manera general a cualquier enzima que hidroliza secuencias de ácidos nucleicos.

Las condiciones de reacción óptimas varían entre las diferentes nucleasas. Entre los factores que deberían considerarse se incluyen la temperatura, el pH, los cofactores enzimáticos, la composición salina, la fuerza iónica y los estabilizadores. Los proveedores de nucleasas disponibles comercialmente (p. ej., Promega Corp., New England Biolabs, Inc.) proporcionan información sobre las condiciones óptimas para cada enzima. La mayoría de nucleasas se

utilizan entre pH 7,2 y pH 8,5, medida a la temperatura de incubación. Además, la mayoría de nucleasas muestran actividad máxima a 37°C; sin embargo, unos cuantos enzimas requieren temperaturas más altas o más bajas para una actividad óptima (p. ej., Taq I, 65°C; Sma I, 25°C). La concentración del ADN también puede ser un factor, ya que una concentración elevada de ADN puede reducir la actividad enzimática y las concentraciones de ADN excesivamente diluidas pueden caer por debajo de la  $K_m$  del enzima y afectar también a la actividad enzimática.

Entre los ejemplos no limitativos de nucleasas se incluyen ADNasa I, benzonasa, exonucleasa I, exonucleasa III, nucleasa de judía Mungo, nucleasa BAL 31, ARNasa I, S1 nucleasa, exonucleasa lambda, RecJ y exonucleasa de T7. La ADNasa I es una endonucleasa que corta no específicamente el ADN, liberando productos dinucleótidos, trinucleótidos y oligonucleótidos con extremos 5'-fosforilados y 3'-hidroxilados. La ADNasa I actúa sobre el ADN de cadena sencilla y de doble cadena, la cromatina y los híbridos ARN:ADN. La exonucleasa I cataliza la eliminación de los nucleótidos del ADN de cadena sencilla en la dirección 3' a 5'. La exonucleasa III cataliza la eliminación por pasos de mononucleótidos desde los extremos 3'-hidroxilo del ADN dúplex. La exonucleasa III actúa, además, en muescas en el ADN dúplex para producir huecos de cadena sencilla. El ADN de cadena sencilla es resistente a la exonucleasa III. La nucleasa de judía Mungo degrada las extensiones de cadena sencilla de los extremos del ADN. La nucleasa de judía Mungo también es una ARN endonucleasa. La nucleasa BAL 31 degrada los extremos tanto 3' como 5' del ADN dúplex. La nucleasa BAL 31 también es una endonucleasa de cadena sencilla altamente específica que corta en muescas, huecos y regiones de cadena sencilla del ADN y ARN dúplex. La ARNasa I es una ARN endonucleasa específica de cadena sencilla que cortará en todos los dinucleótidos de ARN. La nucleasa S1 degrada el ADN y ARN de cadena sencilla endonucleolíticamente, rindiendo productos terminados en 5'-fosforilo. Los ácidos nucleicos de doble cadena (ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN) son resistentes a la degradación por nucleasa S1, excepto con concentraciones extremadamente altas de enzima. La exonucleasa lambda cataliza la eliminación de los mononucleótidos 5' del ADN dúplex. Su sustrato preferente es el ADN de doble cadena 5'-fosforilado, aunque la exonucleasa lambda también degradará los sustratos de cadena sencilla y no fosforilados a una tasa muy reducida. La exonucleasa lambda no puede iniciar la digestión del ADN en muescas o huecos; RecJ es una exonucleasa específica del ADN de cadena sencilla que cataliza la eliminación de los desoxinucleótido monofosfatos del ADN en la dirección 5' a 3'. La exonucleasa de T7 cataliza la eliminación de los mononucleótidos 5' del ADN dúplex. La exonucleasa de T7 cataliza la eliminación de nucleótidos de los extremos 5' o en huecos y muescas de ADN de doble cadena.

Las endonucleasas de restricción son otro ejemplo de nucleasas que pueden utilizarse en relación con los métodos de la presente invención. En la Tabla 1 se proporcionan ejemplos no limitativos de endonucleasas de restricción y sus secuencias de reconocimiento.

Tabla 1. Secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción.

| ENZIMA  | SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO | SEC ID n° | ENZIMA   | SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO | SEC ID n° |
|---------|-----------------------------|-----------|----------|-----------------------------|-----------|
| AatII   | GACGTC                      |           | Fnu4H I  | GCNGC                       |           |
| Acc65 I | GGTACC                      |           | Fok I    | GGATG                       |           |
| Acc I   | GTMKAC                      |           | Fse I    | GGCCGGCC                    |           |
| Aci I   | CCGC                        |           | Fsp I    | TGCGCA                      |           |
| Acl I   | AACGTT                      |           | Hae II   | RGCGCY                      |           |
| Afe I   | AGCGCT                      |           | Hae III  | GGCC                        |           |
| Afl II  | CTTAAG                      |           | Hga I    | GACGC                       |           |
| Afl III | ACRYGT                      |           | Hha I    | GCGC                        |           |
| Age I   | ACCGGT                      |           | Hinc II  | GTYRAC                      |           |
| Ahd I   | GACNNNNNGTC                 | 1         | Hind III | AAGCTT                      |           |
| Alu I   | AGCT                        |           | Hinf I   | GANTC                       |           |
| Alw I   | GGATC                       |           | HinP1 I  | GCGC                        |           |
| AlwN I  | CAGNNNCTG                   |           | Hpa I    | GTTAAC                      |           |
| Apa I   | GGGCCC                      |           | Hpa II   | CCGG                        |           |
| ApaL I  | GTGCAC                      |           | Hph T    | GGTGA                       |           |
| Apo I   | RAATTY                      |           | Kas I    | GGCGCC                      |           |
| Asc I   | GGCGCGCC                    |           | Kpn I    | GGTACC                      |           |
| Ase I   | ATTAAT                      |           | Mbo I    | GATC                        |           |
| Ava I   | CYCGRG                      |           | Mbo II   | GAAGA                       |           |
| Ava II  | GGWCC                       |           | Mfe I    | CAATTG                      |           |
| Avr II  | CCTAGG                      |           | Mlu I    | ACGCGT                      |           |
| Bae I   | NACNNNNGTAPyCN              | 2         | Mly I    | GAGTCNNNNN                  | 11        |
| BamH I  | GGATCC                      |           | Mnl I    | CCTC                        |           |
| Ban I   | GGYRCC                      |           | Msc I    | TGGCCA                      |           |
| Ban II  | GRGCYC                      |           | Mse I    | TTAA                        |           |
| Bbs I   | GAAGAC                      |           | Msl I    | CAYNNNNRTG                  | 12        |

(continuación)

| ENZIMA           | SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO | SEC ID nº | ENZIMA         | SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO | SEC ID nº |
|------------------|-----------------------------|-----------|----------------|-----------------------------|-----------|
| <u>Bbv I</u>     | GCAGC                       |           | <u>MspA1 I</u> | CMGCKG                      |           |
| <u>BbvC I</u>    | CCTCAGC                     |           | <u>Msp I</u>   | CCGG                        |           |
| <u>Bcg I</u>     | CGANNNNNNTGC                | 3         | <u>Mwo I</u>   | GCNNNNNNNGC                 | 13        |
| <u>BciV I</u>    | GTATCC                      |           | <u>Nae I</u>   | GCCGGC                      |           |
| <u>Bcl I</u>     | TGATCA                      |           | <u>Nar I</u>   | GGCGCC                      |           |
| <u>Bfa I</u>     | CTAG                        |           | <u>Nci I</u>   | CCSGG                       |           |
| <u>Bgl I</u>     | GCCNNNNNGGC                 | 4         | <u>Nco I</u>   | CCATGG                      |           |
| <u>Bgl II</u>    | AGATCT                      |           | <u>Nde I</u>   | CATATG                      |           |
| <u>Blp I</u>     | GCTNAGC                     |           | <u>NgoMI V</u> | GCCGGC                      |           |
| <u>Bmr I</u>     | ACTGGG                      |           | <u>Nhe I</u>   | GCTAGC                      |           |
| <u>Bpm I</u>     | CTGGAG                      |           | <u>Nla III</u> | CATG                        |           |
| <u>BsaA I</u>    | YACGTR                      |           | <u>Nla IV</u>  | GGNNCC                      |           |
| <u>BsaB I</u>    | GATNNNNATC                  | 5         | <u>Not I</u>   | GCGGCCGC                    |           |
| <u>BsaH I</u>    | GRCGYC                      |           | <u>Nru I</u>   | TCGCGA                      |           |
| <u>Bsa I</u>     | GGTCTC                      |           | <u>Nsi I</u>   | ATGCAT                      |           |
| <u>BsaJ I</u>    | CCNNGG                      |           | <u>Nsp I</u>   | RCATGY                      |           |
| <u>BsaW I</u>    | WCCGGW                      |           | <u>Pac I</u>   | TTAATTAA                    |           |
| <u>BseR I</u>    | GAGGAG                      |           | <u>PaeR7 I</u> | CTCGAG                      |           |
| <u>Bsg I</u>     | GTGCAG                      |           | <u>Pci I</u>   | ACATGT                      |           |
| <u>BsiE I</u>    | CGRYCG                      |           | <u>PfiF I</u>  | GACNNNGTC                   |           |
| <u>BsiHKA I</u>  | GWGCWC                      |           | <u>PfiM I</u>  | CCANNNNNTGG                 | 14        |
| <u>BsiW I</u>    | CGTACG                      |           | <u>PleI</u>    | GAGTC                       |           |
| <u>Bsl I</u>     | CCNNNNNNNGG                 | 6         | <u>Pme I</u>   | GTTTAAAC                    |           |
| <u>BsmA I</u>    | GTCTC                       |           | <u>PmlI</u>    | CACGTG                      |           |
| <u>BsmB I</u>    | CGTCTC                      |           | <u>PpuM I</u>  | RGGWCCY                     |           |
| <u>BsmF I</u>    | GGGAC                       |           | <u>PshA I</u>  | GACNNNGTC                   | 15        |
| <u>Bsm I</u>     | GAATGC                      |           | <u>Psi I</u>   | TTATAA                      |           |
| <u>BsoB I</u>    | CYCGRG                      |           | <u>PspG I</u>  | CCWGG                       |           |
| <u>Bsp1286 I</u> | GDGCHC                      |           | <u>PspOM I</u> | GGGCCC                      |           |
| <u>BspD I</u>    | ATCGAT                      |           | <u>Pst I</u>   | CTGCAG                      |           |
| <u>BspE I</u>    | TCCGGA                      |           | <u>Pvu I</u>   | CGATCG                      |           |
| <u>BspH I</u>    | TCATGA                      |           | <u>Pvu II</u>  | CAGCTG                      |           |
| <u>BspM I</u>    | ACCTGC                      |           | <u>Rsa I</u>   | GTAC                        |           |
| <u>BsrB I</u>    | CCGCTC                      |           | <u>Rsr II</u>  | CGGWCCG                     |           |
| <u>BsrD I</u>    | GCAATG                      |           | <u>Sac I</u>   | GAGCTC                      |           |
| <u>BsrF I</u>    | RCCGGY                      |           | <u>Sac II</u>  | CCGCGG                      |           |
| <u>BsrG I</u>    | TGTACA                      |           | <u>Sal I</u>   | GTCGAC                      |           |
| <u>Bsr I</u>     | ACTGG                       |           | <u>Sap I</u>   | GCTCTTC                     |           |
| <u>BssH II</u>   | GCGCGC                      |           | <u>Sau3A I</u> | GATC                        |           |
| <u>BssK I</u>    | CCNNGG                      |           | <u>Sau96 I</u> | GNCC                        |           |
| <u>Bst4C I</u>   | ACNGT                       |           | <u>Sbf I</u>   | CCTGCAGG                    |           |
| <u>BssS I</u>    | CACGAG                      |           | <u>Sca I</u>   | AGTACT                      |           |
| <u>BstAP I</u>   | GCANNNNNTGC                 | 7         | <u>ScrF I</u>  | CCNGG                       |           |
| <u>BstB I</u>    | TTCGAA                      |           | <u>SexA I</u>  | ACCWGGT                     |           |
| <u>BstE II</u>   | GGTNACC                     |           | <u>SfaN I</u>  | GCATC                       |           |
| <u>BstF5 I</u>   | GGATGNN                     |           | <u>Sfc I</u>   | CTRYAG                      |           |
| <u>BstN I</u>    | CCWGG                       |           | <u>Sfi I</u>   | GGCCNNNNNGGCC               | 16        |
| <u>BstU I</u>    | CGCG                        |           | <u>Sfo I</u>   | GGCGCC                      |           |
| <u>BstX I</u>    | CCANNNNNTGG                 | 8         | <u>SgrA I</u>  | CRCCGGYG                    |           |
| <u>BstY I</u>    | RGATCY                      |           | <u>Sma I</u>   | CCCGGG                      |           |
| <u>BstZ17 I</u>  | GTATAC                      |           | <u>Sml I</u>   | CTYRAG                      |           |
| <u>Bsu36 I</u>   | CCTNAGG                     |           | <u>SnaB I</u>  | TACGTA                      |           |
| <u>Btg I</u>     | CCPuPyGG                    |           | <u>Spe I</u>   | ACTAGT                      |           |
| <u>Btr I</u>     | CACGTG                      |           | <u>Sph I</u>   | GCATGC                      |           |
| <u>Cac8 I</u>    | GCNNGC                      |           | <u>Ssp I</u>   | AATATT                      |           |
| <u>Cla I</u>     | ATCGAT                      |           | <u>Stu I</u>   | AGGCCT                      |           |
| <u>Dde I</u>     | CTNAG                       |           | <u>Sty I</u>   | CCWWGG                      |           |

(continuación)

| ENZIMA  | SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO | SEC ID nº | ENZIMA   | SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO | SEC ID nº |
|---|-----------------------------|-----------|----------|-----------------------------|-----------|
| Dpn I   | GATC                        |           | Swa I    | ATTAAAT                     |           |
| Dpn II  | GATC                        |           | Taq I    | TCGA                        |           |
| Dra I   | TTTAAA                      |           | Tfi I    | GAWTC                       |           |
| Dra III   | CACNNNGTG                   |           | Tli I    | CTCGAG                      |           |
| Drd I   | GACNNNNNNGTC                | 9         | Tse I    | GCWGC                       |           |
| Eae I   | YGGCCR                      |           | Tsp45 I  | GTSAC                       |           |
| Eag I   | CGGCCG                      |           | Tsp509 I | AATT                        |           |
| Ear I   | CTCTTC                      |           | TspR I   | CAGTG                       |           |
| Eci I   | GGCGGA                      |           | Tth111 I | GACNNNGTC                   |           |
| EcoN I  | CCTNNNNNAGG                 | 10        | Xba I    | TCTAGA                      |           |
| EcoO109 I   | RGNCCY                      |           | Xcm I    | CCANNNNNNNNNTGG             | 17        |
| EcoR I  | GAATTC                      |           | Xho I    | CTCGAG                      |           |
| EcoR V  | GATATC                      |           | Xma I    | CCCGGG                      |           |
| Fau I   | CCCGCNNNN                   |           | Xmn I    | GAANNNTTC                   | 18        |
| donde R=A o G, K=G o T, S=G o C, Y=C o T, M=A o C, W=A o T, B=no A (C, G o T), H=no G (A, C o T), D=no C (A, G o T), V=no T (A, C o G), y N=cualquier nucleótido. |                             |           |          |                             |           |

El experto ordinario en la materia podrá seleccionar una nucleasa apropiada según las características de la secuencia genómica diana y el ADN donante. En una realización, la nucleasa es una nucleasa específica de sitio. En una realización relacionada, la nucleasa presenta una secuencia de reconocimiento de por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 12, por lo menos 14, por lo menos 16, por lo menos 18, por lo menos 20 o por lo menos 25 pares de bases.

En una realización, la nucleasa específica de sitio es una nucleasa Cas. En una realización relacionada, la nucleasa Cas es Cas9. En una realización adicional, la nucleasa es Cas9 y la composición comprende, además, un ARN guía. Otro ejemplo de un sistema de nucleasa específico de secuencia que puede utilizarse con los métodos y composiciones indicados en la presente memoria incluye el sistema Cas9/CRISPR (Wiedenheft, B. et al. Nature 482, 331-338 (2012); Jinek, M. et al. Science 337, 816-821 (2012); Mali, P. et al. Science 339, 823-826 (2013); Cong, L. et al. Science 339, 819-823 (2013)). El sistema Cas9/CRISPR (por sus siglas en inglés, repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas) aprovecha la unión del ADN guiada por el ARN y el corte específico de secuencia del ADN diana. La combinación ARN de guía/Cas9 proporciona especificidad de sitio a la nucleasa. Un ARN guía (ARNg) contiene aproximadamente 20 nucleótidos que son complementarios a una secuencia diana de ADN genómico cadena arriba de un sitio PAM (por sus siglas en inglés, motivos contiguos del protoespaciador) genómico (NNG) y una región de andamiaje de ARN constante. La proteína Cas (asociada a CRISPR) 9 se une al ARNg y al ADN diana al que se une el ARNg e introduce una rotura en la doble cadena en una localización definida cadena arriba del sitio PAM. Cas9 aloja dos dominios de nucleasa independientes homólogos de las endonucleasas HNH y RuvC, y mediante la mutación de cualquiera de los dos dominios, la proteína Cas9 puede convertirse en una nickasa que introduce roturas de cadena sencilla (Cong, L. et al. Science 339, 819-823 (2013)). Se encuentra específicamente contemplado que los métodos y composiciones inventivos puedan utilizarse con la versión inductora de cadena sencilla y de doble cadena de Cas9, así como con otras ADN nucleasas guiadas por ARN, tales como otros sistemas de tipo Cas9 bacterianos. La nucleasa específica de secuencia de los métodos y composiciones indicados en la presente memoria puede construirse, quimerizarse o aislarse a partir de un organismo. La nucleasa específica de secuencia puede introducirse en la célula en forma de un ARN codificante de la nucleasa específica de secuencia, tal como un ARNm.

En una realización, el agente de digestión de ADN es una nucleasa específica de sitio, tal como una nucleasa con dedos de cinc. Las nucleasas con dedos de cinc generalmente comprenden un dominio de unión a ADN (es decir, dedos de cinc) y un dominio de corte (es decir, nucleasa). Los dominios de unión de dedos de cinc pueden manipularse para reconocer y unirse a cualquier secuencia de ácidos nucleicos seleccionada. Ver, por ejemplo, Beerli et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nat. 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; Zhang et al. (2000) J. Biol. Chem. 275(43):33850-33860; Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26:702-708; and Santiago et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:5809-5814. Un dominio de unión con dedos de cinc construido puede presentar una nueva especificidad de unión en comparación con una proteína de dedos de cinc natural. Entre los métodos de ingeniería se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el diseño racional y diversos tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, la utilización de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos dobles, tripletes y/o cuadrupletes y secuencias de aminoácidos de dedo de cinc individuales, en las que cada secuencia de nucleótidos doblete, triplete o cuadruplete está asociada a una o más secuencias de aminoácidos de dedos de cinc que se unen a la secuencia triplete o cuadruplete particular. Ver, por ejemplo, las patentes US nº



6.453.242 y nº 6.534.261. A título de ejemplo, el algoritmo descrito en la patente US nº 6.453.242 puede utilizarse para diseñar un dominio de unión de dedo de cinc con diana en una secuencia preseleccionada.

También pueden utilizarse métodos alternativos, tales como el diseño racional utilizando una tabla de códigos de reconocimiento no degenerados, a fin de diseñar un dominio de unión de dedo de cinc con diana en una secuencia específica (Sera et al. (2002) *Biochemistry* 41 :7074-7081). Pueden encontrarse herramientas en web disponibles públicamente para la identificación de potenciales sitios diana en secuencias de ADN y el diseño de dominios de unión de dedos de cinc en <http://www.zincfingertools.org> and <http://bindr.gdcb.iastate.edu/ZiFiT/>, respectivamente (Mandell et al. (2006) *Nuc. Acid Res.* 34:W516-W523; Sander et al. (2007) *Nuc. Acid Res.* 35:W599-W605).

Puede diseñarse un dominio de unión de dedos de cinc para reconocer y unirse a una secuencia de ADN de entre aproximadamente 3 nucleótidos y aproximadamente 21 nucleótidos de longitud, o preferentemente de entre aproximadamente 9 y aproximadamente 18 nucleótidos de longitud. En general, los dominios de unión de dedos de cinc comprenden por lo menos tres regiones de reconocimiento de dedo de cinc (es decir, dedos de cinc). En una realización, el dominio de unión de dedo de cinc puede comprender cuatro regiones de reconocimiento de dedo de cinc. En otra realización, el dominio de unión de dedo de cinc puede comprender cinco regiones de reconocimiento de dedo de cinc. En todavía otra realización, el dominio de unión de dedo de cinc puede comprender seis regiones de reconocimiento de dedo de cinc. Puede diseñarse un dominio de unión de dedo de cinc para la unión a cualquier secuencia de ADN diana adecuada. Ver, por ejemplo, la patente US nº 6.607.882, nº 6.534.261 y nº 6.453.242.

Entre los métodos ejemplares de selección de una región de reconocimiento de dedo de cinc pueden incluirse sistemas de expresión fágica y de dos híbridos, y se dan a conocer en las patentes US nº 5.789.538, nº 5.925.523, nº 6.007.988, nº 6.013.453, nº 6.410.248, nº 6.140.466, nº 6.200.759 y nº 6.242.568, así como los documentos nº WO 98/37186, nº WO 98/53057, nº WO 00/27878, nº WO 01/88197 y nº GB 2,338,237. Además, la potenciación de la especificidad de unión de los dominios de unión de dedos de cinc se ha descrito en, por ejemplo, el documento nº WO 02/077227.

Los dominios de unión de dedos de cinc y los métodos para el diseño y construcción de proteínas de fusión (y polinucleótidos codificantes de los mismos) son conocidos por el experto en la materia y se describen en detalle en las solicitudes publicadas de patente US nº 2005/0064474 y nº 2006/0188987. Las regiones de reconocimiento de dedo de cinc y/o proteínas de dedo de cinc multidedo pueden unirse entre sí mediante la utilización de secuencias conectoras adecuadas, incluyendo, por ejemplo, conectores de cinco o más aminoácidos de longitud. Ver las patentes US nº 6.479.626, nº 6.903.185 y nº 7.153.949, para ejemplos no limitativos de secuencias conectoras de seis o más aminoácidos de longitud. El dominio de unión de dedos de cinc indicado en la presente memoria puede incluir una combinación de conectores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína.

En algunas realizaciones, la nucleasa de dedos de cinc puede comprender, además, una señal o secuencia de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés). Un NLS es una secuencia de aminoácidos que facilita la dirección de la proteína nucleasa con dedos de cinc al interior del núcleo para introducir una rotura en la doble cadena en la secuencia diana en el cromosoma. Las señales de localización nuclear son conocidas de la técnica. Ver, por ejemplo, Makkerh et al. (1996) *Current Biology* 6:1025-1027.

Una nucleasa con dedos de cinc incluye, además, un dominio de corte. La parte de dominio de corte de la nucleasa con dedos de cinc puede obtenerse a partir de cualquier endonucleasa o exonucleasa. Entre los ejemplos no limitativos de endonucleasas a partir de las que puede derivarse un dominio de corte se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las endonucleasas de restricción y las endonucleasas de reconocimiento. Ver, por ejemplo, 2002-2003 Catalog, New England Biolabs, Beverly, Mass y Belfort et al. *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388 o [www.neb.com](http://www.neb.com). Se conocen enzimas adicionales que cortan el ADN (p. ej., la nucleasa S1, la nucleasa de judía Mungo, la ADNasa I pancreática, la nucleasa microcócica y la endonucleasa HO de levadura). Ver, además, Linn et al. (editores) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. Puede utilizarse uno o más de dichos enzimas (o fragmentos funcionales de los mismos) como fuente de dominios cortados.

También puede derivarse un dominio de corte a partir de un enzima o parte del mismo, tal como se ha indicado anteriormente, que requiera la dimerización para la actividad de corte. Pueden requerirse dos nucleasas con dedos de cinc para el corte, ya que cada nucleasa comprende un monómero del dímero enzimático activo. Alternativamente, una única nucleasa con dedos de cinc puede comprender ambos monómeros para crear un dímero enzimático activo. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "dímero enzimático activo" es un dímero enzimático capaz de cortar una molécula de ácidos nucleicos. Pueden derivarse dos monómeros de corte a partir de la misma endonucleasa (o fragmentos funcionales de la misma) o cada monómero puede derivarse de una endonucleasa diferente (o fragmentos funcionales de la misma).

En el caso de que se utilicen dos monómeros de corte para formar un dímero enzimático activo, los sitios de reconocimiento para las dos nucleasas con dedos de cinc se disponen preferentemente de manera que la unión de las dos nucleasas con dedos de cinc a sus sitios de reconocimiento respectivos sitúe los monómeros de corte en una orientación espacial mutua que permita que los monómeros de corte formen un dímero enzimático activo, p. ej., mediante dimerización. Como resultado, los límites próximos de los sitios de reconocimiento pueden estar separados por aproximadamente 5 a aproximadamente 18 nucleótidos. Por ejemplo, los límites próximos pueden estar separados

por aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleótidos. Sin embargo, se entenderá que puede intermediar cualquier número entero de nucleótidos o pares de nucleótidos entre dos sitios de reconocimiento (p. ej., entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50 pares de nucleótidos o más). Los límites próximos de los sitios de reconocimiento de las nucleasas con dedos de cinc, tales como, por ejemplo, las indicadas en detalle en la presente memoria, pueden estar separados por 6 nucleótidos. En general, el sitio de corte se encuentra entre los sitios de reconocimiento.

Las endonucleasas de restricción (enzimas de restricción) se encuentran presentes en muchas especies y son capaces de la unión específica de secuencia al ADN (en un sitio de reconocimiento) y el corte del ADN en el sitio de unión o en proximidad al mismo. Determinados enzimas de restricción (p. ej., de tipo IIS) cortan el ADN en sitios alejados del sitio de reconocimiento y presentan dominios de unión y de corte separables. Por ejemplo, el enzima de tipo IIS FokI cataliza el corte de doble cadena del ADN a 9 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en una cadena y a 13 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en la otra. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.356.802, nº 5.436.150 y nº 5.487.994, así como Li et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :883-887; Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31, 978-31, 1982. De esta manera, una nucleasa con dedos de cinc puede comprender el dominio de corte de por lo menos un enzima de restricción de tipo IIS y uno o más dominios de unión con dedos de cinc, que pueden haberse manipulado o no. Se describen enzimas de restricción de tipo IIS ejemplares, por ejemplo, en la publicación de patente internacional nº WO 07/014.275. Enzimas de restricción adicionales contienen, además, dominios de unión y corte separables, y estos también se encuentran contemplados en la presente exposición. Ver, por ejemplo, Roberts et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31 :418-420.

En otra realización, la endonucleasa dirigida puede ser una meganucleasa. Las meganucleasas son endodesoxirribonucleasas caracterizadas por un sitio de reconocimiento grande, es decir, el sitio de reconocimiento generalmente presenta una longitud de entre aproximadamente 12 pares de bases y aproximadamente 40 pares de bases. Como consecuencia de dicho requisito, el sitio de reconocimiento generalmente ocurre únicamente una vez en cualquier genoma dado. Las meganucleasas naturales reconocen sitios de corte de 15 a 40 pares de bases y habitualmente se agrupan en cuatro familias: la familia LAGLIDADG, la familia GIY-YIG, la familia de la caja His-Cyst y la familia de HNH. Las meganucleasas pueden presentar como diana una secuencia cromosómica específica mediante la modificación de su secuencia de reconocimiento utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

En una realización adicional, la endonucleasa dirigida puede ser una nucleasa de actividad similar a activador de transcripción (TALE, por sus siglas en inglés). Los TALE son factores de transcripción del patógeno vegetal *Xanthomonas* que pueden manipularse fácilmente para unirse a nuevas dianas de ADN. Los TALE o versiones truncadas de los mismos pueden unirse al dominio catalítico de endonucleasas, tales como FokI, para crear endonucleasas dirigidas denominadas nucleasas TALE o TALEN, por sus siglas en inglés.

En todavía otra realización, la endonucleasa dirigida puede ser una nucleasa específica de sitio. En particular, la nucleasa específica de sitio puede ser una endonucleasa "cortadora rara", cuya secuencia de reconocimiento se observa raramente en el genoma. Preferentemente, la secuencia de reconocimiento de la nucleasa específica de sitio se encuentra en una sola copia en un genoma.

En todavía otra realización, la endonucleasa dirigida puede ser un agente inductor dirigido artificial de corte en la doble cadena de ADN (también denominado cortador de ADN de restricción artificial). Por ejemplo, el agente inductor dirigido artificial de corte en la doble cadena de ADN puede comprender un complejo de metal/quelante que corta el ADN y por lo menos un oligonucleótido que es complementario al sitio de corte diana. Por lo tanto, el agente inductor dirigido artificial de corte en la doble cadena de ADN no contiene ninguna proteína. El metal del complejo de metal/quelante puede ser cerio, cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, magnesio, manganeso, cinc y similares. El quelante del complejo de metal/quelante puede ser EDTA, EGTA, BAPTA y similares. En una realización preferente, el complejo de metal/quelante puede ser Ce(IV)/EGTA. En otra realización preferente, el agente inductor dirigido artificial de corte en la doble cadena de ADN puede comprender un complejo de Ce(IV)/EGTA y dos cadenas de ácidos péptido-nucleicos (APN) pseudocomplementarios (Katada et al., Current Gene Therapy, 2011, 11(1):38-45).

En una realización adicional, la nucleasa puede ser una nucleasa dirigida. Entre las endonucleasas dirigidas se incluyen 1-5'cel, I-CeuI, I-PspI, VI-Sce, I-SceTV, I- CsmI, I-PanI, I-Scell, I-PpoI, I-ScellI, I-Crel, I-TevI, 1-Tev y I-7evIII. Sus secuencias de reconocimiento son conocidas. Ver también las patentes US nº 5.420.032, nº 6.833.252; Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Ou on et al. (1989) Gene 82: 115-118; Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1 125- 1 127; 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.

En determinadas realizaciones, la nucleasa comprende una endonucleasa dirigida (no natural) manipulada (meganucleasa). Las secuencias de reconocimiento de las endonucleasas dirigidas y las meganucleasas, tales como I-Scel, I-CeuI, VI- PspI, VI-Sce, I-ScelN, I-CsmI, 1-PanI, I-Scell, I-PpoI, I-ScellI, I-Crel, I-TevI, I-TevII y I-7evIII, son conocidas. Ver también las patentes US nº 5.420.032, nº 6.833.252; Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Dujon et al. (1989) Gene 82: 115-118; Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) Trends

Genet. 12:224-228; Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263: 163- 180; Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353 y el catálogo de New England Biolabs. Además, la especificidad de unión al ADN de las endonucleasas dirigidas y las meganucleasas pueden manipularse para unirse a sitios diana no naturales. Ver, por ejemplo, Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962; Ashworth et al. (2006) Nature 441:656-659; Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66; publicación de patente US nº 20070117128. Los dominios de unión a ADN de las endonucleasas dirigidas y las meganucleasas pueden alterarse en el contexto de la nucleasa globalmente (es decir, de manera que la nucleasa incluya el dominio de corte afín) o pueden fusionarse con un dominio de corte heterólogo.

- 10 En una realización, el agente de digestión del ADN es una nucleasa específica de sitio del grupo o seleccionada del grupo que consiste en omega, dedo de cinc, TALE y CRISPR/Cas9.

#### D. Marcadores

- 15 En determinadas realizaciones de la invención, las células que contiene una modificación de secuencia del ADN genómico o células que han sido transfectadas con una composición de la presente invención pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* mediante la inclusión de un marcador en la composición. El marcador puede encontrarse en el mismo plásmido o ADN linealizado que el ADN donante o el marcador puede encontrarse en un fragmento separado de ADN. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable a la célula, permitiendo una fácil identificación de las células que ha sido transfectada con la composición. Generalmente, un marcador seleccionable es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es uno en el que su presencia impide su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia farmacológica o un gen/marcador de resistencia antibiótica.

- 25 Habitualmente, la inclusión de un marcador de selección farmacológica ayuda en la clonación e identificación de los transformantes, por ejemplo, genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina, G418, fleomicina, blasticidina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Además de marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de los transformantes basándose en la implementación de condiciones, también se encuentran contemplados otros tipos de marcadores, incluyendo marcadores cribables, tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Alternativamente, pueden utilizarse enzimas cribables, tales como timidina quinasa (*tk*) del virus del herpes simple o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la materia también conocerá cómo utilizar marcadores inmunitarios, posiblemente junto con el análisis de FACS. Ejemplos adicionales de marcadores seleccionables y cribables son bien conocidos por el experto en la materia. En determinadas realizaciones, el marcador es un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un marcador luminiscente, un marcador fotoactivable, un marcador fotoconvertible o un marcador colorimétrico. Entre los marcadores fluorescentes se incluyen, por ejemplo, GFP y variantes, tales como YFP, RFP, etc., y otras proteínas fluorescentes, tales como DsRed, mPlum, mCherry, YPet, Emerald, CyPet, T-Sapphire y Venus. Entre los marcadores fotoactivables se incluyen, por ejemplo, KFP, PA-mRFP y Dronpa. Entre los marcadores fotoconvertibles se incluyen, por ejemplo, mEosFP, KikGR y PS-CFP2. Entre las proteínas luminiscentes se incluyen, por ejemplo, Neptune, FP595 y fialidina. Entre los ejemplos no limitativos de marcadores de cribado se incluyen

- 45 El marcador utilizado en la invención puede estar codificado en un ARN o ADN. En una realización específica, el marcador se encuentra codificado en ADN plasmídico. En algunas realizaciones, el marcador y ADN donante se encuentran en el mismo plásmido.

- En determinadas realizaciones, tras la electroporación, las células que han internalizado las composiciones electroporadas se seleccionan mediante selección negativa. En otras realizaciones, tras la electroporación, las células que han internalizado los constructos electroporados se seleccionan mediante selección positiva. En algunas realizaciones, la selección implica exponer las células a concentraciones de un agente de selección que comprometería la viabilidad de la célula que no exprese un gen de resistencia de selección o no incorpore un gen de resistencia de selección durante la electroporación. En algunas realizaciones, la selección implica exponer las células a una concentración condicionalmente letal del agente de selección. En algunas realizaciones, el agente o compuesto de selección es un antibiótico. En otras realizaciones, el agente de selección es G418 (también conocido como geneticina y sulfato de G418), puromicina, zeocina, higromicina, fleomicina o blasticidina, solo o en combinación. En determinadas realizaciones, la concentración del agente de selección se encuentra comprendida en el intervalo de entre 0.1 µg/l y 0,5 µg/l, 0,5 µg/l y 1 µg/l, 1 µg/l y 2 µg/l, 2 µg/l y 5 µg/l, 5 µg/l y 10 µg/l, 10 µg/l y 100 µg/l, 100 µg/l y 500 µg/l, 0,1 mg/l y 0,5 mg/l, 0,5 mg/l y 1 mg/l, 1 mg/l y 2 mg/l, 2 mg/l y 5 mg/l, 5 mg/l y 10 mg/l, 10 mg/l y 100 mg/l, 100 mg/l y 500 mg/l, 0,1 g/l y 0,5 g/l, 0,5 g/l y 1 g/l, 1 g/l y 2 g/l, 2 g/l y 5 g/l, 5 g/l y 10 g/l, 10 g/l y 100 g/l, or 100g/l y 500g/l o cualquier intervalo a partir de los mismos. En determinadas realizaciones, la concentración de agente de selección es (y)g/l, en donde "y" puede ser cualquier valor, incluyendo, aunque sin limitación, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o cualquier intervalo derivable a partir de los mismos. En algunas realizaciones, el agente de selección se encuentra presente en el medio de cultivo a una concentración condicionalmente letal de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8,

5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 o 10 g/l o cualquier intervalo derivable a partir de los mismos.

En determinadas realizaciones, los segmentos de ácidos nucleicos, con independencia de la longitud de la secuencia codificante misma, pueden combinarse con otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzima de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes, y similares, de manera que su longitud total puede variar considerablemente.

#### E. Vectores

Polipéptidos, tales como el ADN donante, por ejemplo, pueden estar codificados por una molécula de ácidos nucleicos en la composición. En determinadas realizaciones, la molécula de ácidos nucleicos puede encontrarse en forma de un vector de ácidos nucleicos. El término "vector" se utiliza para referirse a una molécula de ácidos nucleicos portadora en la que puede insertarse una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga para la introducción en una célula, en donde puede replicarse y expresarse. Una secuencia de ácidos nucleicos puede ser "heteróloga", lo que significa que es, en un contexto, foránea a la célula en la que se está introduciendo el vector o respecto al ácido nucleico en que se ha incorporado, que incluye una secuencia homóloga respecto a la secuencia en la célula o el ácido nucleico, aunque en una posición dentro de la célula huésped o ácido nucleico en donde no se encuentra habitualmente. Entre los vectores se incluyen ADN, ARN, plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (p. ej., los YAC). El experto en la materia posee los conocimientos para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándares (por ejemplo, Sambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1996). Los vectores pueden utilizarse en una célula huésped para producir un anticuerpo.

La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácidos nucleicos codificante de por lo menos parte de un producto génico capaz de ser transcrito o de integrarse establemente en el genoma de una célula huésped y posteriormente transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN seguidamente se traducen en una proteína, polipéptido o péptido. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de "secuencias de control", que se refiere a secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la transcripción y posiblemente, traducción, de una secuencia codificante operablemente ligada en un organismo huésped particular. Además de secuencias de control que controla la transcripción y traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácidos nucleicos que sirven a otras funciones también y se indican en la presente memoria. Se encuentra contemplado que los vectores de expresión que expresan un marcador puedan resultar útiles en la invención. En otras realizaciones, el marcador está codificado en un ARNm y no en un vector de expresión.

Un "promotor" es una secuencia de control. El promotor es típicamente una región de una secuencia de ácidos nucleicos en la que se controla el inicio y velocidad de la transcripción. Puede contener elementos genéticos a los que pueden unirse proteínas y moléculas reguladoras, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las expresiones "situado operativamente", "unido operativamente", "bajo el control" y "bajo el control transcripcional" se refieren a que un promotor se encuentra en una localización y/o orientación funcional correcta en relación a una secuencia de ácidos nucleicos para controlar el inicio y expresión transcripcional de esa secuencia. puede utilizarse o no un promotor junto con un "intensificador", que se refiere a una secuencia reguladora de acción en cis que participa en la activación transcripcional de una secuencia de ácidos nucleicos.

El promotor particular que se utilice para controlar la expresión de un polinucleótido codificante de un péptido o proteína no se cree que sea crítica, con la condición de que pueda expresar el polinucleótido en una célula diana, preferentemente una célula bacteriana. En el caso de que la diana sea una célula humana, resulta preferible situar la región codificante del polinucleótido contiguamente y bajo el control de un promotor que sea capaz de expresarse en una célula humana. En términos generales, dicho promotor podría incluir un promotor bacteriano, humano o vírico.

Puede resultar necesaria una señal de inicio específica para la traducción eficiente de secuencias codificantes. Entre dichas señales se incluyen el codón de inicio ATG o secuencias contiguas. Podría necesitarse que se proporcionen señales de control traduccional exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. El experto ordinario en la materia será fácilmente capaz de determinar lo anterior y proporcionar las señales necesarias.

Entre los vectores puede incluirse un sitio de clonación múltiple (SCM), que es una región de ácidos nucleicos que contiene múltiples sitios de enzima de restricción, cualquiera de los cuales puede utilizarse junto con tecnología recombinante estándar para digerir el vector. (Ver Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998 y Cocea, 1997).

La mayoría de las moléculas de ARN eucariótico transcritas experimentará procesamiento del ARN para eliminar los intrones de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias eucarióticas genómicas pueden requerir sitios de procesamiento donantes y/o aceptores para garantizar el procesamiento correcto del transcrito para la expresión proteica. (Ver Chandler *et al.*, 1997)

Los vectores o constructos generalmente comprenden por lo menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" comprende secuencias de ADN que participan en la terminación específica de un transcrito de ARN por una ARN polimerasa. De esta manera, en determinadas realizaciones, se encuentra contemplada una

señal de terminación que finaliza la producción de un transcrito de ARN. Puede ser necesario *in vivo* un terminador para conseguir los niveles de mensaje deseables. En sistemas eucarióticos, la región del terminador puede comprender, además, secuencias de ADN específicas que permitan el corte específico de sitio del nuevo transcrito de manera que se exponga un sitio de poliadenilación. Lo anterior señala que una polimerasa endógena especializada

5 añadida un tramo de aproximadamente 200 residuos de A (poliA) al extremo 3' del transcrito. Las moléculas de ARN modificadas con dicha cola poliA aparentemente son más estables y se traducen con mayor eficiencia. De esta manera, en otras realizaciones que implican eucariotas, resulta preferente que el terminador comprenda una señal para el corte del ARN, y resulta más preferente que la señal del terminador promueva la poliadenilación del mensaje.

10 En la expresión, particularmente en la expresión eucariótica, típicamente se incluye una señal de poliadenilación para llevar a cabo una poliadenilación correcta del transcrito.

Con el fin de propagar un vector en una célula huésped, puede contener uno o más sitios origen de replicación (con frecuencia denominados "ori"), que es una secuencia de ácidos nucleicos específica en la que se inicia la replicación.

15 Alternativamente, puede utilizarse una secuencia replicadora autónoma (SRA) en el caso de que la célula huésped sea una levadura.

Algunos vectores pueden utilizar secuencias de control que les permiten replicarse y/o expresarse en células tanto procarióticas como eucarióticas. El experto en la materia entenderá adicionalmente las condiciones bajo las que

20 incubar la totalidad de las células huésped anteriormente indicadas para mantenerlas y permitir la replicación de un vector. También se entienden y conocen las técnicas y condiciones que permitirían la producción a gran escala de vectores, así como la producción de los ácidos nucleicos codificados por vectores y sus polipéptidos, proteínas o péptidos afines.

En determinadas realizaciones específicas, la composición transfectada en la célula mediante electroporación es no vírica (es decir, no contiene ningún componente vírico). Se encuentra contemplado que métodos no víricos reduzcan la toxicidad y/o mejoren la seguridad del método. Se encuentra contemplado que la combinación del uso de oligos de

25 ADN de cadena sencilla y agentes de digestión del ADN proporcionados en forma de ARN proporcionen una ventaja de citotoxicidad reducida y eficiencia incrementada de la modificación de la secuencia del ADN genómico.

30 F. Modificaciones de la secuencia de ácidos nucleicos.

En el contexto de la presente exposición, la expresión "ADN donante no modificado" se refiere de manera general a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN). En algunas realizaciones,

35 una molécula de ácidos nucleicos comprende ADN no modificado. Dicho término incluye ADN compuesto de nucleobases naturales, azúcares y enlaces internucleósido covalentes. La expresión "análogo de ADN" se refiere a ADN que presenta una o más partes no naturales que funcionan de una manera similar a los oligonucleótidos. Dichos oligonucleótidos no naturales con frecuencia se seleccionan sobre las formas naturales debido a propiedades deseables, tales como, por ejemplo, una incorporación celular incrementada, una afinidad incrementada para otros

oligonucleótidos o dianas de ácidos nucleicos y una estabilidad incrementada en presencia de nucleasas. El término "oligonucleótido" puede utilizarse para referirse a oligonucleótidos no modificados o análogos de oligonucleótidos.

Entre los ejemplos específicos de moléculas de ácidos nucleicos se incluyen moléculas de ácidos nucleicos que contienen enlaces internucleósido modificados, es decir, no naturales. Dichos enlaces internucleósido no naturales

45 con frecuencia se seleccionan sobre las formas naturales debido a propiedades deseables, tales como, por ejemplo, una incorporación celular incrementada, una afinidad incrementada para otros oligonucleótidos o dianas de ácidos nucleicos y una estabilidad incrementada en presencia de nucleasas. En una realización específica, la modificación comprende un grupo metilo.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden presentar uno o más enlaces internucleósido modificados. Tal como se define en la presente especificación, entre los oligonucleótidos que presentan enlaces internucleósido modificados se

50 incluyen enlaces internucleósido que conservan un átomo de fósforo y enlaces internucleósido que no presentan un átomo de fósforo. Para los fines de la presente especificación y tal como en ocasiones se hace referencia en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no presentan un átomo de fósforo en su esqueleto internucleósido también pueden considerarse oligonucleósidos.

Las modificaciones de las moléculas de ácidos nucleicos pueden incluir modificaciones en las que se modifica uno o ambos nucleótidos terminales.

Un enlace internucleósido modificado que contiene fósforo adecuado es el enlace internucleósido fosforotioato. Se conocen de la técnica varios otros esqueletos oligonucleótidos modificados (enlaces internucleósido) y pueden resultar

60 útiles en el contexto de la presente realización.

Entre las patentes US representativas que enseñan la preparación de enlaces internucleósido que contienen fósforo se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las patentes US nº 3.687.808, nº 4.469.863, nº 4.476.301, nº 5.023.243, nº

65 5.177.196, nº 5.188.897, nº 5.264.423, nº 5.276.019, nº 5.278.302, nº 5.286.717, nº 5.321.131, nº 5.399.676, nº

5.405.939, n° 5.453.496, n° 5.455.233, n° 5.466.677, n° 5.476.925, n° 5.519.126, n° 5.536.821, n° 5.541.306, n° 5.550.111, n° 5.563.253, n° 5.571.799, n° 5.587.361, n° 5.194.599, n° 5.565.555, n° 5.527.899, n° 5.721.218, n° 5.672.697, n° 5.625.050, n° 5.489.677 y n° 5.602.240.

5 Los esqueletos de ADN (enlaces internucleósido) modificados que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos presentan enlaces internucleósido que están formados por alquilo de cadena corta o enlaces internucleósido cicloalquilo, enlaces internucleósido mixtos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósido heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Entre ellos se incluyen los que presentan esqueletos amida, y otros, incluyendo los que presentan partes componentes mixtas de N, O, S y CH<sub>2</sub>.

10 Entre las patentes US representativas que enseñan la preparación de los oligonucleótidos que no contienen fósforo anteriormente indicados se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las patentes US n° 5.034.506, n° 5.166.315, n° 5.185.444, n° 5.214.134, n° 5.216.141, n° 5.235.033, n° 5.264.562, n° 5.264.564, n° 5.405.938, n° 5.434.257, n° 5.466.677, n° 5.470.967, n° 5.489.677, n° 5.541.307, n° 5.561.225, n° 5.596.086, n° 5.602.240, n° 5.610.289, n° 5.602.240, n° 5.608.046, n° 5.610.289, n° 5.618.704, n° 5.623.070, n° 5.663.312, n° 5.633.360, n° 5.677.437, n° 5.792.608, n° 5.646.269 y n° 5.677.439.

15 Los compuestos de aDN incluyen, además, miméticos. El término mimético tal como se aplica al ADN pretende incluir compuestos de ADN en los que solo el anillo de furanosa o tanto el anillo de furanosa como el enlace internucleósido se sustituyen por grupos nuevos, la sustitución de solo el anillo de furanosa por, por ejemplo, un anillo morfolino, también se denomina en la técnica sustituto de azúcar. La fracción base heterocíclica o una fracción base heterocíclica modificada se mantiene para la hibridación con un ácido nucleico diana apropiado.

20 Entre los miméticos de ADN pueden incluirse compuestos tales como los ácidos péptidonucleicos (APN) y los ácidos nucleicos ciclohexenilo (conocidos como CeNa; ver Wang et al., J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 8595-8602). Entre las patentes US representativas que enseñan la preparación de miméticos de oligonucleótidos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, las patentes US n° 5.539.082, n° 5.714.331 y n° 5.719.262. Otra clase de mimético se denomina ácido nucleico fosfonomonoéster e incorpora un grupo fósforo en el esqueleto. Dicha clase de mimético se informa que presenta propiedades físicas, biológicas y farmacológicas útiles en los campos de la inhibición de la expresión génica (oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de sentido y oligonucleótidos formadores de tríplex), como sondas para la detección de ácidos nucleicos y como auxiliares para la utilización en biología molecular. Se ha informado de otro mimético en el que el anillo furanosilo ha sido sustituido por una fracción ciclobutilo.

25 Las moléculas de ácidos nucleicos pueden contener, además, una o más fracciones de azúcar modificadas o sustituidas. Las fracciones bases se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácidos nucleicos apropiado. Las modificaciones de azúcar pueden proporcionar estabilidad frente a nucleasas, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos oligoméricos.

30 Entre los azúcares modificados representativos se incluyen los azúcares carbocíclicos o acíclicos, los azúcares que presentan grupos sustituyentes en una o más de sus posiciones 2', 3' o 4', azúcares que presentan sustituyentes en lugar de uno o más átomos de hidrógeno del azúcar y azúcares que presentan un enlace entre dos otros átomos cualesquiera en el azúcar. Se conoce un gran número de modificaciones de azúcar en la técnica, azúcares modificados en la posición 2' y los que presentan un puente entre 2 átomos cualesquiera del azúcar (de manera que el azúcar es bicíclico) resultan particularmente útiles en la presente realización. Entre los ejemplos de modificaciones de azúcar útiles en la presente realización se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, compuestos que comprenden un grupo sustituyente azúcar seleccionado de entre: OH; F; O-, S-, o N-alquilo; o O-alquil-O-alquilo, en el que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C1 a C10, o alqueno y alquino C2 a C10, sustituido o no sustituido. Resultan particularmente adecuados: 2-metoxietoxi (también conocido como 2'-O-metoxietilo, 2'-MOE, o 2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 2'-O-metilo (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-fluoro (2'-F), o nucleótidos de azúcar modificado bicíclicos que presentan un grupo puente que conecta el átomo de carbono 4' con el átomo de carbono 2', en el que entre los grupos puente ejemplares se incluyen --CH<sub>2</sub>--O--, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>--O o --CH<sub>2</sub>--N(R<sub>3</sub>)--O en el que R<sub>3</sub> es H o alquilo C1-C12.

35 Una modificación que proporciona una resistencia incrementada a nucleasas y una afinidad de unión muy elevada a los nucleótidos es la cadena lateral 2'-MOE (Baker et al., J. Biol. Chem. 272, 11944-12000, 1997). Una de las ventajas inmediatas de la sustitución 2'-MOE es la mejora de la afinidad de unión, que es superior a muchas modificaciones en 2' similares, tales como O-metilo, O-propilo y O-aminopropilo. Los oligonucleótidos que presentan el sustituyente 2'-MOE también se ha mostrado que son inhibidores antisentido de la expresión génica con características prometedoras para la utilización *in vivo* (Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., Química, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637 y Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926).

40 Los grupos sustituyentes 2'-azúcar puede encontrarse en la posición arabino (superior) o ribo (inferior). Una modificación 2'-arabino es 2'-F. También pueden realizarse modificaciones similares en otras posiciones del compuesto oligomérico, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleósido 3'-terminal o en oligonucleótidos 2'-5'-ligados y en la posición 5' del nucleótido 5'-terminal. Los compuestos oligoméricos también pueden presentar miméticos de azúcar, tales como fracciones ciclobutilo, en lugar del azúcar pentofuranosilo. Entre las patentes US

representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras sacáridas modificadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las patentes US nº 4.981.957, nº 5.118.800, nº 5.319.080, nº 5.359.044, nº 5.393.878, nº 5.446.137, nº 5.466.786, nº 5.514.785, nº 5.519.134, nº 5.567.811, nº 5.576.427, nº 5.591.722, nº 5.597.909, nº 5.610.300, nº 5.627.053, nº 5.639.873, nº 5.646.265, nº 5.658.873, nº 5.670.633, nº 5.792.747 y nº 5.700.920.

Se dan a conocer grupos sustituyentes de azúcar representativos en la patente US nº 6.172.209 titulada "Capped 2'-Oxyethoxy Oligonucleotides".

Se dan a conocer grupos sustituyentes de azúcar cíclicos representativos en la patente US nº 6.271.358 titulada "RNA Targeted 2'-Oligomeric compounds that are Conformationally Preorganized".

Se dan a conocer grupos sustituyentes guanidino representativos en la patente US nº 6.593.466 titulada "Functionalized Oligomers".

Se dan a conocer grupos sustituyentes acetamido representativos en la patente US nº 6.147.200.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden contener, además, una o más modificaciones o sustituciones de nucleobases (con frecuencia denominadas en la técnica simplemente "base") que son estructuralmente distinguibles, aunque funcionalmente intercambiables con nucleobases naturales o sintéticas no modificadas. Dichas modificaciones de nucleobase pueden proporcionar estabilidad frente a nucleasas, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos oligoméricos. Tal como se utiliza en la presente memoria, entre las nucleobases "no modificadas" o "naturales" se incluyen las bases purina adenina (A) y guanina, y las bases pirimidina timidina (T), citosina (C) y uracilo (U). Entre las nucleobases modificadas a las que también se hace referencia en la presente memoria como fracciones de base heterocíclica se incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales, con muchos ejemplos, tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina, entre otros.

Entre las fracciones de base heterocíclica también pueden incluirse aquellas en las que la base purina o pirimidina se sustituye por otros heterociclos, por ejemplo, 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Entre algunas nucleobases se incluyen las dadas a conocer en la patente US nº 3.687.808; las dadas a conocer en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858 a 859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990; las dadas a conocer en Englisch et al., Angewandte Chemie, edición internacional, 1991, 30, 613 y las dadas a conocer en Sanghvi, Y. S., capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289 a 302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunas determinadas de dichas nucleobases resultan particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos. Entre ellas se incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

Se dan a conocer modificaciones adicionales de las moléculas de ácidos nucleicos en la publicación de patente US

nº 2009/0221685. En la presente memoria se dan a conocer conjugados adecuados adicionales a las moléculas de ácidos nucleicos.

## II. Cultivo celular

### A. Células huésped.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" pueden utilizarse intercambiamente. La totalidad de dichos términos incluye, además, células recién aisladas y células activadas o expandidas cultivadas *ex vivo*. La totalidad de dichos términos incluye también su progenie, que es todas y cada una de las generaciones siguientes. Debe interpretarse que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o accidentales. En el contexto de expresar una secuencia de ácidos nucleicos heterólogos, "célula huésped" se refiere a una célula procariótica o eucariótica, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula huésped puede, y ha sido, utilizada como un receptor para vectores o virus. Una célula huésped puede "transfectarse" o "transformarse", que se refiere a un procedimiento por el que un ácido nucleico exógeno, tal como una secuencia codificante de proteína recombinante, se transfiere o se introduce en la célula huésped. Una célula transformada incluye la célula del sujeto primario y su progenie.

En determinados aspectos de la exposición, la transfección puede llevarse a cabo en cualquier célula procariótica o eucariótica. En algunas realizaciones, la electroporación implica la transfección de una célula humana. En otras realizaciones, la electroporación implica la transfección de una célula animal. En determinadas realizaciones, la transfección implica la transfección de una línea celular o un tipo de célula híbrida. En algunos aspectos de la exposición, la célula o células que se transfectan son células de cáncer, células tumorales o células inmortalizadas. En algunos casos, las células o líneas celulares tumorales, cancerosas o inmortalizadas y, en otros casos, células o líneas celulares tumorales, cancerosas o inmortalizadas entran en su estado o condición respectiva de manera natural. En determinados aspectos de la exposición, las células o líneas celulares pueden ser células A549, células B, B16,

BHK-21, C2C12, C6, CaCo-2, CAP/, CAP-T, CHO, CHO2, CHO-DG44, CHO-K1, COS-1, Cos-7, CV-1, células dendríticas, DLD-1, células madre embrionarias (ME) o derivadas, H1299, HEK, 293, 293T, 293FT, Hep G2, células madre hematopoyéticas, HOS, Huh-7, células madre pluripotentes inducidas (MPi) o derivadas, Jurkat, K562, L5278Y, LNCaP, MCF7, MDA-MB-231, MDCK, células mesenquimales, Min-6, células monocíticas, Neuro2a, NIH 3T3, NIH3T3L1, K562, NK-cells, NS0, Panc-1, PC12, PC-3, células de sangre periférica, células plasmáticas, fibroblastos primarios, RBL, Renca, RLE, SF21, SF9, SH-SY5Y, SK-MES-1, SK-N-SH, SL3, SW403, célula de adquisición de pluripotencia estimuladas por estímulo (STAP, por sus siglas en inglés) o derivadas SW403, células T, THP-1, células tumorales, U2OS, U937, linfocitos de sangre periférica, células T expandidas, células madre hematopoyéticas o células Vero. En determinados aspectos de la exposición, las células son linfocitos de sangre periférica, células T expandidas, células asesinas naturales (células NK), células madre, células madre hematopoyéticas o células primarias. En un aspecto específico de la exposición, las células son células madre hematopoyéticas. En un aspecto específico adicional de la exposición, las células son linfocitos de sangre periférica. En las realizaciones específicas de la invención, las células son células T tal como se definen en las reivindicaciones.

En determinados aspectos de la exposición, la célula es una que es conocido de la técnica que resulta difícil de transfectar. Dichas células son conocidas de la técnica y entre ellas se incluyen, por ejemplo, células primarias, células de insecto, células SF9, células Jurkat, células CHO, células madre, células de división lenta y células que no se dividen. En algunas realizaciones, las células son células T. En algunos aspectos de la exposición, las células son células primarias. En algunas realizaciones, las células son células madre. En algunos aspectos de la exposición, las células son células madre hematopoyéticas, incluyendo células progenitoras mieloides y linfoides. En algunos aspectos de la exposición, las células son células madre mesenquimales. En algunos aspectos de la exposición, no parte de la invención, la célula es una célula germinal, tal como un óvulo o espermatozoide. En algunos aspectos de la exposición, no parte de la invención, la célula es un embrión fertilizado. En algunos aspectos de la exposición, no parte de la invención, la célula es un embrión fertilizado humano.

En algunas realizaciones, las células pueden someterse a métodos de dilución limitante para permitir la expansión de las poblaciones clonales de las células. Los métodos de clonación mediante dilución limitante son bien conocidos por el experto en la materia. Dichos métodos se han descrito, por ejemplo, para hibridomas, aunque pueden aplicarse a cualquier célula. Dichos métodos se describen en (Cloning hybridoma cells by limiting dilution, *Journal of tissue culture methods*, 1985, volumen 9, número 3, páginas 175 a 177, de Joan C. Renner, Bruce L. Brown y Roland M. Nardone).

En algunas realizaciones, las células se cultivan antes de la transfección o después de la transfección. En otras realizaciones, las células se cultivan durante la etapa de selección después de la transfección. En todavía otras realizaciones, las células se cultivan durante el mantenimiento y la selección clonal y la etapa inicial de expansión. En todavía otras realizaciones, las células se cultivan durante la etapa de cribado. En otras realizaciones, las células se cultivan durante la etapa de producción a gran escala. Los métodos de cultivar las células en suspensión y adherentes son bien conocidos por el experto en la materia. En algunas realizaciones, las células se cultivan en suspensión, utilizando recipientes de cultivo celular y medios de cultivo celular disponibles comercialmente. Ejemplos de recipientes de cultivo disponibles comercialmente que pueden utilizarse en algunas realizaciones, incluyendo placas ADME/TOX, portaobjetos con cámara celular y cubreobjetos, equipos de recuento celular, superficies de cultivo celular, recipientes de cultivo celular Corning HYPERFlask, material de cultivo recubierto, material criogénico Nalgene, cámara de cultivo, placas de cultivo, matraces de cultivo de vidrio, matraces de cultivo de plástico, formatos de cultivo 3D, placas multipocillo de cultivo, insertos de placa de cultivo, probetas de cultivo de vidrio, probetas de cultivo de plástico, recipientes de cultivo celular apilables, cámara de cultivo hipóxica, placa Petri y soportes de matraces, recipientes de cultivo Quickfit, cultivo celular para escalado con frascos rotativos, cultivo celular 3D o bolsas de cultivo celular.

En otras realizaciones, los medios pueden formularse utilizando componentes bien conocidos por el experto en la materia. Las formulaciones y métodos de cultivo celular se describen en detalle en las referencias a continuación: *Short Protocols in Cell Biology* J. Bonifacino, et al., ed., John Wiley & Sons, 2003, 826 páginas; *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual* D. Spector & R. Goldman, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, 450 páginas.; *Stem Cells Handbook* S. Sell, ed., Humana Press, 2003, 528 páginas.; *Animal Cell Culture: Essential Methods*, John M. Davis, John Wiley & Sons, Mar 16, 2011; *Basic Cell Culture Protocols*, Cheryl D. Helgason, Cindy Miller, Humana Press, 2005; *Human Cell Culture Protocols, Series: Methods in Molecular Biology*, Vol. 806, Mitry, Ragai R.; Hughes, Robin D. (Eds.), 3a ed. 2012, XIV, 435 página 89, Humana Press; *Cancer Cell Culture: Method and Protocols*, Cheryl D. Helgason, Cindy Miller, Humana Press, 2005; *Human Cell Culture Protocols, Series: Methods in Molecular Biology*, Vol. 806, Mitry, Ragai R.; Hughes, Robin D. (Eds.), 3a ed. 2012, XIV, 435 página 89, Humana Press; *Cancer Cell Culture: Method and Protocols*, Simon P. Langdon, Springer, 2004; *Molecular Cell Biology*. 4a edición, Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al., New York: W. H. Freeman; 2000., Sección 6.2 Growth of Animal Cells in Culture.

En algunas realizaciones, durante la etapa de cribado y expansión y/o durante la etapa de producción a gran escala (también denominada alimentación por lotes y comparación), las células electroporadas y expandidas que resultan de la selección o cribado pueden comprender una secuencia de ADN genómico modificada.

B. Composición activadora.



Los métodos *in vitro* indicados en la presente memoria se refieren a la puesta en contacto de las células con una composición activadora antes de la transfección de las células. Las células pueden activarse según métodos conocidos de la técnica y/o descritos en la presente memoria. Por ejemplo, las células T pueden activarse según lo siguiente:

| Subgrupos de células T | Th1                                | Th1/Th2                            | Th1           | Th17       | T <sub>reg</sub>     | Th2/Th9 |
|------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------|------------|----------------------|---------|
| Activadas por          | Anti-CD3/CD28;<br>PMA; pervanadato | Anti-CD3/CD28;<br>PMA; pervanadato | IFN- $\alpha$ | IL6; IL-21 | IL-2; IL-7;<br>IL-15 | IL-4    |

Los kits para la activación de las células T también se encuentran disponibles comercialmente. Entre los kits ejemplares se incluyen partículas antibiotina (p. ej., MACSiBead o DYNABEADS<sup>®</sup>) y los anticuerpos biotinilados contra CD2, CD3 y CD28 humanos. Las partículas antibiotina cargadas con los anticuerpos biotinilados se utilizan para mimetizar las células presentadoras de antígenos y para activar las células T en reposo a partir de PBMC, así como células T purificadas. La expansión de las células T se consigue mediante el cultivo y reactivación el día 14 de cultivo.

Las células T también pueden activarse con mitógenos, tales como ConA, PHA y PWM, por ejemplo.

### III. Aplicaciones terapéuticas y de identificación de fármacos.

En determinadas realizaciones, las células y líneas celulares producidas mediante métodos indicados en la presente memoria son métodos que, con la modificación del ADN genómico, proporcionan un efecto terapéutico. Pueden aislarse células primarias, modificadas mediante métodos indicados en la presente memoria, y utilizarse *ex vivo* para la reintroducción en el sujeto que debe tratarse. Entre las células primarias adecuadas se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), linfocitos de sangre periférica (PBL) y otros subgrupos de células sanguíneas, tales como, aunque sin limitarse a ellas, células T CD4<sup>+</sup> o células T CD8<sup>+</sup>. Entre otras células primarias adecuadas se incluyen células progenitoras, tales como células progenitoras mieloides o linfoides. Entre las células adecuadas se incluyen, además, células tales como, a título de ejemplo, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés), células madre hematopoyéticas (HSC), células madre neuronales, células madre mesenquimales, células madre musculares y células madre cutáneas. Por ejemplo, las iPSC pueden obtenerse *ex vivo* a partir de un paciente que sufre una mutación genética conocida asociada, y esta mutación puede modificarse para producir el alelo de tipo salvaje mediante la utilización de métodos indicados en la presente memoria. A continuación, las iPSC pueden diferenciarse en neuronas dopaminérgicas y reimplantarse en el paciente. En otra aplicación terapéutica *ex vivo*, pueden aislarse células madre hematopoyéticas a partir de un paciente que sufre de una mutación genética conocida, que seguidamente pueden modificarse para corregir la mutación genética. A continuación, las HSC pueden administrarse de nuevo en el paciente para producir un efecto terapéutico o pueden diferenciarse en cultivo para producir una célula hematopoyética más madura antes de la administración en el paciente.

En algunas realizaciones, la secuencia modificada de ADN genómico y/o el ADN donante comprende un gen asociado a una enfermedad. En algunas realizaciones, la región de modificación de secuencia comprende un gen asociado a una enfermedad. Los genes asociados a una enfermedad son conocidos de la técnica. Se encuentra contemplado que un gen asociado a una enfermedad sea un gen dado a conocer en internet, en [genecards.org/cgi-bin/listdiseasecards.pl?type=full&no\\_limit=1](http://genecards.org/cgi-bin/listdiseasecards.pl?type=full&no_limit=1).

En una realización, el método comprende modificar el ADN genómico en las células madre hematopoyéticas (también conocidas como hemocitoblastos) o en las células progenitoras mieloides.

Otro ejemplo en el que puede utilizarse terapéuticamente el método dado a conocer es la integración específica de sitio de receptor de antígeno quimérico (RAQ). La expresión "receptor de antígeno quimérico" o "RAQ" se refiere a receptores manipulados, que injertan una especificidad arbitraria en una célula efectora inmunitaria. Dichos receptores se utilizan para injertar la especificidad de un anticuerpo monoclonal en una célula T. Los receptores se denominan quiméricos debido a que están compuestos de partes procedentes de diferentes fuentes. La forma más habitual de dichas moléculas son fusiones de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv, por sus siglas en inglés) derivadas de anticuerpos monoclonales, fusionados con CD3-zeta transmembrana y endodominio: dominios intracelulares CD28 o 41BB, o combinaciones de los mismos. Dichas moléculas resultan en la transmisión de una señal en respuesta al reconocimiento por el scFv de su diana. Un ejemplo de tales constructos es 14g2a-zeta, que es una fusión de un scFv derivado del hibridoma 14g2a (que reconoce el disialogangliósido GD2). Al expresar las células T dicha molécula, reconocen y eliminan las células diana que expresan GD2 (p. ej., células de neuroblastoma). Para reconocer las células B malignas, los investigadores han redirigido la especificidad de las células T mediante la utilización de un inmunorreceptor quimérico específico para la molécula del linaje B, CD19. Las partes variables de las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina se fusionan mediante un conector flexible, formando un scFv. Dicho scFv está precedido por un péptido de señal para dirigir la proteína naciente al retículo endoplásmico y su posterior expresión en superficie (en donde se escinde). Un espaciador flexible permite que el scFv se oriente en diferentes direcciones para permitir la unión de antígenos. El dominio transmembranal es una típica hélice alfa hidrofóbica habitualmente derivada de la molécula original del endodominio de señalización que sobresale hacia el interior de la célula y transmite la señal deseada. Los RAQ son proteínas que permiten a las células reconocer una proteína (antígeno) específica

sobre las células tumorales. Los RAQ son receptores manipulados que injertan una especificidad arbitraria en una célula efectora inmunitaria. Típicamente, dichos receptores se utilizan para injertar la especificidad de un anticuerpo monoclonal en una célula T.

Se están investigando receptores artificiales de las células T como terapia para el cáncer, utilizando una técnica denominada de transferencia de células adoptivas. Se extraen células T de un paciente y se modifican de manera que expresen receptores específicos de la forma particular de cáncer. Las células T, que a continuación reconocen y eliminan las células de cáncer, se reintroducen en el paciente. La modificación de las células T obtenidas de donantes aparte del paciente también se encuentran en investigación.

Dichas células T RAQ manipuladas pueden expandirse *in vitro* y la población expandida de células T RAQ seguidamente puede infundirse en el paciente. Después de la infusión, las células T se multiplican en el cuerpo del paciente y, con la guía de su receptor manipulado, reconocen y eliminan las células de cáncer que presentan el antígeno sobre sus superficies. Los métodos terapéuticos actuales implican la introducción de RAQ mediante infección vírica. Sin embargo, siempre existen cuestiones de seguridad al utilizar la infección vírica en métodos terapéuticos. Por lo tanto, los métodos indicados en la presente memoria son enfoques no víricos a la terapia génica y la ingeniería del genoma. Anteriormente no había sido posible transfectar células inmunitarias con ADN plasmídico ya que ello conducía a toxicidad de las células. Los solicitantes han encontrado que una etapa de activación previa a la transfección celular supera el problema de la viabilidad y permite transfectar segmentos largos de ADN (y/o a concentraciones altas) en las células, manteniendo simultáneamente un alto nivel de viabilidad. Mediante la utilización de los métodos indicados en la presente memoria puede integrarse el RAQ en un sitio específico de las células inmunitarias. En algunas realizaciones, las células son células inmunitarias autólogas. La expresión a largo plazo del RAQ en las células T o asesinas naturales (NK) puede utilizarse para el tratamiento de la leucemia o el tratamiento de tumores asociados a determinados antígenos. Puede utilizarse una no-selección o una selección de las células con la integración específica de sitio del RAQ. Para el enfoque de selección, puede integrarse un marcador seleccionable en el mismo sitio y en el mismo plásmido que el RAQ o el marcador seleccionable puede integrarse en otra localización específica de sitio. Para el enfoque de no selección, se encuentra contemplado que la presencia de antígeno (tumor) servirá como presión selectiva natural, de manera que la población celular positiva para RAQ resultará adicionalmente estimulada y expandida *in vivo*, mientras que las células negativas para RAQ se agotarán naturalmente, ya que no existe activación. Las células T o NK para fines terapéuticos pueden obtenerse mediante aféresis con o sin purificación. A continuación, las células pueden activarse, transfectarse e inyectarse nuevamente en el paciente tal como se indica en los métodos de la exposición. Tal como se muestra en la FIG. 16, los datos indicados en la presente memoria muestran la integración específica de sitio con éxito del RAQ en células K562.

Un ejemplo adicional de cómo pueden utilizarse terapéuticamente los métodos dados a conocer es en la expresión del transgén CFTR (por sus siglas en inglés, regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística) en las células epiteliales de un paciente que presenta fibrosis quística debido a la pérdida de la función del CFTR. Se ha explorado la terapia génica como cura potencial para la fibrosis quística. Idealmente, la terapia génica introduce una copia normal del gen CFTR en las células afectadas. La transferencia del gen CFTR normal en las células de epitelio afectadas resultaría en la producción de CFTR funcional en todas las células diana, sin reacciones adversas o una respuesta inflamatoria. Los estudios han mostrado que, para evitar las manifestaciones pulmonares de la fibrosis quística, solo se requiere 5 % a 10 % de la cantidad normal de gen CFTR. Se han sometido a ensayo múltiples enfoques para la transferencia génica, tales como liposomas y vectores víricos en modelos animales y en ensayo clínico. Sin embargo, se ha encontrado que ambos métodos son opciones de tratamiento relativamente ineficientes. El motivo principal es que muy pocas células incorporan el vector y expresan el gen, por lo que el tratamiento presenta poco efecto. Se encuentra contemplado que el transgén CFTR funcional pueda integrarse de manera específica de sitio en las células epiteliales o organoides de células madre intestinales que han sido activados antes de la transfección del ADN donante. A continuación, las células pueden transplantarse en las vías respiratorias del paciente, en donde realizarán la función normal del gen CFTR.

En un ejemplo adicional, los métodos indicados en la presente memoria pueden utilizarse para tratar pacientes con hemofilia. Los pacientes con hemofilia no pueden inducir coágulos sanguíneos y sufren de sangrados externos e internos que potencialmente son letales. La integración genómica dirigida específica de sitio puede llevarse a cabo utilizando transgén de factor VIII o factor IX como ADN donante. Pueden aislarse células hepáticas, musculares o de vasos sanguíneos primarios o células progenitoras de hígado, músculo o vaso sanguíneo a partir del paciente o de un huésped donante. A continuación, las células pueden activarse y, tras la activación de las células, estas pueden transplantarse en el paciente para la expresión por el transgén del Factor VIII o Factor IX integrado.

En un ejemplo adicional, la integración dirigida del transgén puede utilizarse para el desarrollo de líneas celulares. Los solicitantes han demostrado en los Ejemplos que la expresión de un transgén en una célula mediante la utilización de los métodos indicados en la presente memoria resulta en la expresión de prácticamente el 40 % del transgén, lo que es indicativo de la alta eficiencia de este método. Por lo tanto, dicho método podría sustituir al método tradicional de integración aleatorizada y selección de colonias. Los métodos indicados en la presente memoria pueden utilizarse para la optimización de la línea celular para la secreción de proteína mediante la integración del transgén con un promotor externo para expresar diversas citoquinas o anticuerpos para el uso terapéutico o preclínico.

En determinados aspectos, que no están cubiertos por la invención reivindicada, los métodos indicados en la presente memoria se refieren a un método mejorado para la terapia *ex vivo*. Puede aislarse una población de células a partir de un sujeto; las células seguidamente pueden activarse mediante métodos conocidos de la técnica y/o indicados en la presente memoria, y el ADN genómico de las células puede modificarse de una manera que corrija un defecto o integre de manera específica de sitio un gen diana. A continuación, la población de células puede trasplantarse en el sujeto para el uso terapéutico. En determinados casos, la población de células aislada puede comprender un subgrupo de células sensibles a determinadas manipulaciones *in vitro*, tales como métodos tradicionales de transfección y/o electroporación, por ejemplo, o el subgrupo de células puede ser resistente a métodos tradicionales de transfección y/o electroporación o de manipulación del ADN genómico. Se encuentra contemplado que la modificación del ADN genómico con métodos indicados en la presente memoria resultará en una mayor eficiencia de la modificación de las secuencias en dichas poblaciones.

Un aspecto de la exposición se refiere a un método *in vitro* para la modificación específica de sitio de secuencias de una región de ADN genómico diana en células aisladas de un sujeto, que comprende: aislar las células de un sujeto; activar las células con una composición activadora; transfectar las células con una composición de transfección que comprende: (a) ADN donante y (b) un agente de digestión del ADN, en el que el ADN donante comprende: (i) una región homóloga que comprende una secuencia de ácidos nucleicos homóloga de la región diana del ADN genómico, y (ii) una región de modificación de secuencia, y en la que la secuencia de ADN genómico se modifica específicamente en la región diana del ADN genómico.

Además, las células y líneas celulares producidas mediante los métodos utilizados en la presente memoria pueden resultar útiles para el desarrollo de fármacos y/o estudios genéticos inversos. Dichas células y animales podrían revelar fenotipos asociados a una mutación particular o a la modificación de su secuencia, y pueden utilizarse para el cribado de fármacos que interactuarán específicamente con la mutación o mutaciones o proteínas mutantes en cuestión, o que resultarán útiles para el tratamiento de la enfermedad en un animal con la misma. Dichas líneas celulares pueden proporcionar, además, herramientas para investigar los efectos de mutaciones específicas, ya que una línea celular y su línea celular "modificada" correspondiente representan controles "genéticamente idénticos" y, de esta manera, proporcionan una potente herramienta para reparar mutaciones específicas de enfermedad, el cribado e identificación de fármacos y la investigación de los mecanismos de enfermedades. Se contempla adicionalmente que dicha tecnología pueda proporcionar una alternativa científicamente superior a las técnicas actuales de inactivación génica, tales como el ARN de interferencia (ARNi) y los ARN de horquilla cortos (ARNhc), por ejemplo. En un ejemplo, una modificación de la secuencia de ADN es un codón de parada que se introduce en un gen de interés para estudiar un mecanismo de desarrollo o de enfermedad, o para una aplicación terapéutica.

Las composiciones de la exposición pueden utilizarse para la administración *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, las composiciones de la exposición pueden resultar útiles como vacunas del cáncer.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "administración *in vitro*" se refiere a manipulaciones realizadas en las células extraídas o fuera de un sujeto, incluyendo, aunque sin limitación, las células en cultivo. La expresión "administración *ex vivo*" se refiere a células que han sido manipuladas *in vitro* y posteriormente administradas en un sujeto. La expresión "administración *in vivo*" incluye todas las manipulaciones realizadas en un sujeto, incluyendo las administraciones.

En determinados aspectos de la presente exposición, las composiciones pueden administrarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En determinadas realizaciones *in vitro*, se incuban células T autólogas con composiciones de la presente exposición. A continuación, las células pueden utilizarse para el análisis *in vitro*, o alternativamente para la administración *ex vivo*.

Los aspectos metodológicos de la exposición, que no están cubiertos por la invención reivindicada, también se refieren a métodos para vacunar un sujeto y/o para tratar determinados cánceres mediante un método que comprende: poner en contacto células con una composición activadora; transfectar las células con una composición de transfección que comprende (a) ADN donante y (b) un agente de digestión del ADN, en el que el ADN donante comprende: (i) una región homóloga que comprende una secuencia de ácidos nucleicos homóloga de la región diana de ADN genómico y (ii) un receptor de antígeno quimérico (RAQ) y en la que la secuencia del ADN genómico se modifica específicamente en la región diana del ADN genómico para integrar el RAQ y administrar las células en el paciente. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es autóloga. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria se ha puesto en contacto con un antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno expresado por las células de cáncer del sujeto. En algunas realizaciones, el antígeno está libre de células. La expresión "libre de células" se refiere a una composición que no presenta ningún componente celular. En algunas realizaciones, el antígeno es un extracto del tumor del paciente. En algunas realizaciones, el antígeno es un polipéptido. En algunas realizaciones, el antígeno comprende uno o más de entre un lisado de células tumorales, células tumorales apoptóticas, antígeno asociado a tumor y ARNm derivado de tumor.

En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula presentadora de antígenos. Entre los ejemplos de las células presentadoras de antígenos se incluyen células dendríticas, macrófagos, células B y células tumorales (células

presentadoras de antígenos falsas) en las que se expresa forzosamente un factor de estimulación de células T (p. ej., B7 o 4-1 BBL) y similares mediante, por ejemplo, transferencia génica. En algunas realizaciones, la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.

5 La vía de administración de la célula inmunitaria puede ser, por ejemplo, intratumoral, intracutánea, subcutánea, intravenosa, intralinfática e intraperitoneal. En algunas realizaciones, la administración es intratumoral o intralinfática. En algunas realizaciones, las células inmunitarias se administran directamente en un tejido de cáncer o en un ganglio linfático.

10 En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula T. Las células T pueden ser células que se han puesto en contacto con un antígeno o con células presentadoras de antígenos. Por ejemplo, las APC pueden cultivarse con antígenos tumorales específicos del cáncer del paciente para diferenciarlas en, por ejemplo, linfocitos T citotóxicos (LTC) positivos para CD8 o células T ayudantes positivas para CD4. Las células T establecidas de esta manera pueden administrarse en un individuo con cáncer.

15 El origen de las células T no expuestas no está específicamente limitado y pueden derivarse, por ejemplo, de sangre periférica de un animal vertebrado. La célula T no expuesta puede ser una célula positiva para CD8 o una célula positiva para CD4 aislada a partir de una fracción de PBMC. En algunas realizaciones, las células T no expuestas son células positivas para CD8 o células positivas para CD4 mezcladas con otras células y componentes sin aislarlas de la fracción de PBMC en términos de la eficiencia de la inducción de las CTL. Por ejemplo, en el caso de que se cultiven células de una fracción PBMC en un medio complementado con suero y antígeno tumoral, las PBMC se diferencian formando precursores de células dendríticas. A continuación, los precursores de células dendríticas se unen al péptido y se diferencian en células dendríticas como las células presentadoras de antígenos que presentan dicho péptido/antígeno tumoral. Las células presentadoras de antígenos estimulan las células T positivas CD8 en las PBMC, diferenciándose en LTC. De esta manera, pueden obtenerse LTC capaces de reconocer el péptido añadido. Las LTC obtenidas de esta manera pueden aislarse y utilizarse como la vacuna del cáncer que son. Alternativamente, pueden cultivarse adicionalmente en presencia de interleuquina, tal como IL-2, la célula presentadora de antígeno y el antígeno tumoral antes de utilizarlas como la vacuna de cáncer. La vía para su administración no se encuentra específicamente limitada y entre los ejemplos se incluyen las vías intracutánea, subcutánea, intravenosa e intratumoral.

#### 30 IV. Transfección

La transfección es el procedimiento de introducción deliberada de ácidos nucleicos en células. En determinadas realizaciones, la transfección es no vírica, lo que indica que las secuencias utilizadas en el fondo de plásmido son no víricas y el ADN no entra en la célula mediante mecanismos víricos. La transfección de las células animales típicamente implica abrir poros transitorios u "orificios" en la membrana celular para permitir la incorporación del material. La transfección puede llevarse a cabo mediante la utilización de métodos conocidos de la técnica y descritos posteriormente.

40 Métodos no químicos de transfección.

Electroporación.

45 Determinadas realizaciones implican la utilización de la electroporación para facilitar la entrada de una o más moléculas de ácidos nucleicos en las células huésped.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, "electroporación" o "electrocarga" se refiere a la aplicación de una corriente eléctrica o campo eléctrico en una célula para facilitar la entrada de una molécula de ácidos nucleicos en la célula. El experto en la materia entenderá que se encuentra contemplada en la presente invención cualquier método y técnica de electroporación.

55 En determinadas realizaciones de la invención, la electrocarga puede llevarse a cabo tal como se indica en las patentes US número 5.612.207, n° 5.720.921, n° 6.074.605; n° 6.090.617; n° 6.485.961; n° 7.029.916, n° 7.141.425, n° 7.186.559, n° 7.771.984 y la publicación de patente US n° 2011/0065171.

Otros métodos y dispositivos para la electrocarga que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención también se indica en, por ejemplo, las solicitudes publicadas de patente PCT n° WO 03/018751 y n° WO 2004/031353; las solicitudes de patente US n° 10/781.440, n° 10/080.272 y n° 10/675.592 y las patentes US n° 6.773.669, n° 6.090.617 y n° 6.617.154.

60 En determinadas realizaciones de la invención, la electroporación puede llevarse a cabo tal como se indica en la solicitud de patente US n° de serie 10/225.446, presentada el 31 de agosto de 2002, la exposición completa.

65 En realizaciones adicionales de la invención, la electroporación de flujo se lleva a cabo utilizando instrumentos de electroporación de flujo MaxCyte STX®, MaxCyte VLX® o MaxCyte GT®. En realizaciones específicas, se utiliza la electroporación estática o de flujo con parámetros indicados en toda la exposición.

Los métodos reivindicados de transfección de células mediante electroporación, preferentemente electroporación de flujo, puede conseguir eficiencias de transfección superiores a 40 %, superiores a 50 % y superiores a 60 %, 70 %, 80 % o 90 % (o cualquier intervalo derivable de los mismos). La eficiencia de transfección puede medirse como el porcentaje de las células que expresan el producto del gen o el nivel de secreción del producto expresado por el gen. Las células mantienen una elevada viabilidad durante y después del procedimiento de electroporación. La viabilidad es rutinariamente superior a 50 %. La viabilidad de las células electroporadas puede ser como máximo o por lo menos de aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % (o cualquier intervalo derivable de los mismos), de la viabilidad de la población no electroporada inicial o de una población electroporada y transfectada con un constructo de control.

En algunas realizaciones, los métodos *in vitro* actuales utilizando un aparato de electroporación de flujo para la estimulación eléctrica de suspensiones de partículas, que comprende un ensamblaje celular de electroporación de flujo que presenta uno o más portales de flujo de entrada, uno o más portales de flujo de salida, y uno o más canales de flujo, en el que los canales de flujo comprenden dos o más paredes, en las que los canales de flujo se configuran adicionalmente para recibir y contener transitoriamente un flujo continuo de partículas en suspensión desde los portales de flujo de entrada, y los electrodos emparejados dispuestos en relación a los canales de flujo de manera que cada electrodo forma por lo menos una pared de los canales de flujo; los electrodos comprenden, además, poner los electrodos en comunicación eléctrica con una fuente de energía eléctrica, de manera que las suspensiones de partículas que flujo por los canales pueden someterse a un campo eléctrico formado entre los electrodos.

En algunas realizaciones, los métodos actuales utilizan la electroporación de flujo para superar la limitación del tamaño muestral. Con dicho método, se pasa una suspensión celular por electrodos de barra paralelos que están contenidos en una celda de flujo que preferentemente es desechable.

En realizaciones adicionales, los métodos de electroporación de flujo o estática indicados en la presente memoria se utilizan para superar la degradación térmica de la muestra. Debe entenderse que las diferentes configuraciones de células pueden utilizarse en los métodos actuales. Durante la electroporación, las células se someten a pulsos eléctricos de unas características determinadas. Por ejemplo, las configuraciones específicas para la preparación de células de muestra son: voltaje, 750 V; anchura de impulso, 650  $\mu$ s; tiempo entre impulsos: 100 s; 2 pulsos bifásicos en una ráfaga; tiempo entre ráfagas: 12 s; caudal: 0,05 ml/s. La molécula o moléculas de interés seguidamente pueden difundirse en la celda siguiendo gradientes de concentración y/o eléctricos. La presente invención opcionalmente puede someter las células a un abanico de intensidades de campo eléctrico.

Otra ventaja de los actuales métodos de electroporación de flujo es la velocidad a la que puede transfectarse una gran población de células. Por ejemplo, una población de linfocitos puede transfectarse mediante electroporación al electroporar la muestra en menos de 5 horas, preferentemente en menos de 4 horas y lo más preferentemente, en menos de 3 horas, y todavía más preferentemente en menos de 2 horas. El tiempo de electroporación es el tiempo en que se procesa la muestra mediante el procedimiento de electroporación de flujo. En determinadas realizaciones, se transfectan  $10^{10}$  células en 30 minutos o menos mediante la utilización de electroporación de flujo. En realizaciones adicionales, pueden transfectarse  $2 \times 10^{11}$  células en 30 minutos o en 60 minutos o menos mediante la utilización de electroporación de flujo.

Para la electroporación de flujo, el procedimiento se inicia conectando la celda de flujo con soluciones y suspensiones celulares en los recipientes, con los líquidos y muestras necesarios. Se introduce solución de cebado (solución salina) y suspensión celular mediante los comandos necesarios en el sistema de electroporación, que controlan el funcionamiento de la bomba y las válvulas de pinza. A medida que las células pasan por el camino de flujo entre electrodos, se aplican pulsos eléctricos del voltaje, duración y frecuencia deseados. El producto y líquidos residuales se recogen en los recipientes designados.

El usuario introduce el voltaje deseado y otros parámetros en el sistema de electroporación de flujo de la presente invención. Tal como se ha señalado anteriormente, se encuentra disponible opcionalmente un abanico de configuraciones. El ordenador se comunica con la electrónica en la torre para cargar el banco condensador hasta el voltaje deseado. A continuación, conmutadores apropiados manipulan el voltaje antes de la administración en el camino de flujo para crear el campo eléctrico (los conmutadores proporcionan pulsos alternantes o ráfagas para minimizar el desgaste de los electrodos producidos por la exposición prolongada al campo eléctrico). El voltaje se administra de acuerdo con los parámetros de duración y frecuencia fijados por el operador en el sistema de electroporación de flujo de la presente invención. El sistema de electroporación de flujo de la presente invención a continuación se describe en detalle.

El procedimiento de electroporación de flujo puede iniciarse poniendo, por ejemplo, una cámara de electroporación en comunicación de fluidos con soluciones y suspensiones celulares en los recipientes (p. ej., mediante tubos), que puede llevarse a cabo en un medio aséptico o estéril. Puede introducirse una suspensión celular y/o otros reactivos en la cámara de electroporación utilizando una o más bombas, vacíos, válvulas, otros dispositivos mecánicos que modifican la presión o volumen de aire dentro de la cámara de electroporación y combinaciones de los mismos, que pueden causar que la suspensión celular y/o otros reactivos fluyan hacia el interior de la cámara de electroporación en un

tiempo deseado y a la velocidad deseada. En el caso de que una parte de la suspensión celular y/o otros reactivos se introduzcan en la cámara de electroporación, se aplican impulsos eléctricos de un voltaje, duración y/o intervalo deseado en la suspensión celular y/o otros reactivos. Después de la electroporación, la suspensión celular procesada y/o otros reactivos pueden extraerse de la cámara de electroporación utilizando una o más bombas, vacíos, válvulas, otros dispositivos eléctricos, mecánicos, neumáticos o de microfluidos que modifican el desplazamiento, presión o volumen en el interior de la cámara de electroporación, y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, puede utilizarse la gravedad o la transferencia manual para introducir o extraer de una cámara de electroporación la muestra o muestra procesada. Si se desea, puede introducirse una nueva suspensión celular y/o otros reactivos en la cámara de electroporación. Puede recogerse una muestra electroporada por separado de una muestra que todavía no ha sido electroporada. La serie anterior de sucesos puede coordinarse temporalmente mediante un ordenador acoplado con, por ejemplo, circuitos electrónicos (p. ej., que proporcionan el impulso eléctrico), bombas, vacíos, válvulas, combinaciones de los mismos, y otros componentes que afectan y controlan el flujo de una muestra hacia el interior y exterior de la cámara de electroporación. A título de ejemplo, puede implementarse el procedimiento de electroporación con un ordenador, incluyendo un operador mediante una interfaz gráfica de usuario en un monitor y/o un teclado. Entre los ejemplos de válvulas adecuadas se incluyen válvulas de pinza, válvulas de mariposa y/o válvulas de bolas. Entre los ejemplos de bombas adecuadas se incluyen las bombas centrífugas o de desplazamiento positivo.

A título de ejemplo, un dispositivo de electroporación de flujo puede comprender por lo menos dos electrodos separados por un espaciador, en el que el espaciador y los dos o más electrodos definen una cámara. En algunas realizaciones, la cámara de electroporación puede comprender, además, por lo menos tres puertos que atraviesan el espaciador, en el que un primer puerto es para el flujo de la muestra hacia el interior de la cámara, un segundo puerto es para el flujo de muestra procesada hacia el exterior de la cámara y un tercer puerto es para el flujo de fluido no de muestra hacia el interior o exterior de la cámara. En algunas realizaciones, el fluido no de muestra fluye hacia el exterior de la cámara al fluir una muestra hacia el interior de la cámara, y el fluido no de muestra fluye hacia el interior de la cámara al fluir hacia el exterior de la cámara la muestra procesada. A título de otro ejemplo, un dispositivo de electroporación de flujo puede comprender una cámara de electroporación con una parte superior e inferior que comprende por lo menos dos electrodos paralelos, en el que la cámara se forma entre los dos electrodos y presenta dos puertos de la cámara en la parte inferior de la cámara de electroporación y dos puertos de la cámara en la parte superior de la cámara de electroporación. Dicho dispositivo puede comprender, además, por lo menos un recipiente para muestras en comunicación de fluidos con la cámara de electroporación por un primer puerto de cámara en la parte inferior de la cámara, y la cámara de electroporación puede encontrarse en comunicación de fluidos con el recipiente para muestras por un segundo puerto de la cámara en la parte superior de la cámara, formando un primer camino de fluidos. Además, por lo menos un recipiente para producir puede encontrarse en comunicación de fluidos con la cámara de electroporación por el tercer puerto de la cámara en la parte inferior de la misma, y la cámara de electroporación puede encontrarse en comunicación de fluidos con el recipiente de producto por un cuarto puerto de la cámara en la parte superior de la cámara, formando un segundo camino de fluidos. En algunas realizaciones, puede utilizarse una cámara de electroporación con un único puerto. En otras realizaciones, pueden utilizarse otras diversas combinaciones adecuadas de electrodos, espaciadores, puertos y recipientes. La cámara de electroporación puede comprender un volumen interno de entre aproximadamente 1 y 10 ml; sin embargo, en otras realizaciones, la cámara de electroporación puede comprender un volumen interno inferior (p. ej., 0,75 ml, 0,5 ml, 0,25 ml o menos) o un volumen interno mayor (p. ej., 15 ml, 20 ml, 25 ml o superior). En algunas realizaciones, la cámara de electroporación y componentes asociados pueden ser desechables (p. ej., materiales de clase VI de grado médico), tales como bolsas de PVC, tubos de PVC, conectores, tubos de bomba de silicona y similares.

Cualquier número de recipientes (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) puede encontrarse en comunicación de fluidos con la cámara de electroporación. Los recipientes pueden ser recipientes plegables, expandibles o de volumen fijo. Por ejemplo, un primer recipiente (p. ej., una fuente de muestras o recipiente de muestras) puede comprender una suspensión celular y puede incluir o no una sustancia que pasará al interior de las células en la suspensión celular durante la electroporación. En el caso de que no se incluye la sustancia, puede incluirse un segundo recipiente que comprenda dicha sustancia, de manera que la sustancia pueda mezclarse en línea antes de la entrada en la cámara de electroporación o en la cámara de electroporación. En una configuración adicional, puede unirse otro recipiente, que puede contener fluidos que se desecharán. Puede utilizarse uno o más recipientes adicionales como recipiente de la muestra procesada o de producto. El recipiente de muestra procesada o producto contendrá células u otros productos producidos en el procedimiento de electroporación. Además, uno o más recipientes pueden comprender diversos fluidos o gases no de muestra que pueden utilizarse para separar la muestra en volúmenes discretos o volúmenes unitarios. El recipiente de fluidos o gases no de muestra puede encontrarse en comunicación de fluidos con la cámara de electroporación mediante un tercer y/o cuarto puerto. El recipiente de fluido o gas no de muestra puede incorporarse en el recipiente de muestra procesada o el recipiente de muestra (p. ej., el recipiente de fluido no de muestra puede comprender una parte del recipiente de muestra procesada o el recipiente de muestra) y, de esta manera, el fluido o gas no de muestra puede transferirse desde el recipiente de muestra procesada a otro recipiente (que puede incluir el recipiente de muestra) durante el procesamiento de la muestra. El recipiente de fluido o gas no de muestra puede incorporarse en la cámara, con la condición de que la compresión del fluido o gas no de muestra no afecte a la electroporación. Aspectos adicionales de la invención pueden incluirse otros recipientes que se acoplan con el recipiente de muestra y puede suministrar reactivos u otras muestras a la cámara.

En realizaciones adicionales, el dispositivo de electroporación es electroporación estática y no implica un flujo de células, aunque por el contrario implica una suspensión de células en una única cámara. En el caso de que se utilice dicho dispositivo, los parámetros indicados para la electroporación de flujo puede utilizarse para limitar la degradación térmica, mejorar la viabilidad celular, mejorar la eficiencia de incorporación de modificaciones de secuencias, y mejorar la eficiencia de transfección y similares. Entre dichos parámetros se incluyen, por ejemplo, los parámetros de electroporación de flujo indicados en toda la solicitud y la resistencia térmica de la cámara, el espaciado de los electrodos, la proporción entre la superficie combinada de los electrodos en contacto con el tampón y la distancia entre los electrodos, y el campo eléctrico.

En determinadas realizaciones, la densidad de células durante la electroporación es una variable controlada. La densidad celular durante la electroporación puede variar o modificarse según, aunque sin limitación, el tipo celular, la eficiencia deseada de electroporación o la viabilidad deseada de las células electroporadas resultantes. En determinadas realizaciones, la densidad celular es constante durante toda la electroporación. En otros aspectos, se modifica la densidad celular durante el procedimiento de la electroporación. En determinadas realizaciones, la densidad celular antes de la electroporación puede encontrarse comprendida entre el intervalo de entre  $1 \times 10^4$  células/ml y  $(y) \times 10^4$ , en donde "y" puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otros aspectos, la densidad celular antes de la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de  $1 \times 10^5$  células/ml y  $(y) \times 10^5$ , en donde "y" es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En todavía otras realizaciones, la densidad celular antes de la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^6$  células/ml y  $(y) \times 10^6$ , en donde "y" puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En determinadas realizaciones, la densidad celular antes de la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^7$  células/ml y  $(y) \times 10^7$ , en donde "y" puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o cualquier intervalo derivable de los mismos. En todavía otros aspectos, la densidad celular antes de la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^7$  células/ml y  $1 \times 10^8$  células/ml, de entre  $1 \times 10^8$  células/ml y  $1 \times 10^9$  células/ml, de entre  $1 \times 10^9$  células/ml y  $1 \times 10^{10}$  células/ml, de entre  $1 \times 10^{10}$  células/ml y  $1 \times 10^{11}$  células/ml, o de entre  $1 \times 10^{11}$  células/ml y  $1 \times 10^{12}$  células/ml. En determinadas realizaciones, la densidad celular antes de la electroporación puede ser de  $(y) \times 10^6$ , en donde "y" puede ser cualquier valor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 o cualquier intervalo derivable de los mismos. En determinados aspectos, la densidad celular antes de la electroporación puede ser de  $(y) \times 10^{10}$ , en donde "y" puede ser cualquier valor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 (o cualquier intervalo derivable de los mismos).

En determinadas realizaciones, la densidad de células durante la electroporación es una variable controlada. La densidad celular durante la electroporación puede variar o modificarse según, aunque sin limitación, el tipo celular, la eficiencia deseada de electroporación o la viabilidad deseada de las células electroporadas resultantes. En determinadas realizaciones, la densidad celular es constante durante toda la electroporación. En otras realizaciones, la densidad celular se modifica durante el procedimiento de la electroporación. En determinadas realizaciones, la densidad celular durante la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^4$  células/ml y  $(y) \times 10^4$ , en donde "y" puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En otras realizaciones, la densidad celular durante la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^5$  células/ml y  $(y) \times 10^5$ , en donde "y" es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En todavía otras realizaciones, la densidad celular durante la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^6$  células/ml y  $(y) \times 10^6$ , en donde "y" puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En determinadas realizaciones, la densidad celular durante la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^7$  células/ml y  $(y) \times 10^7$ , en donde "y" puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En todavía otras realizaciones, la densidad celular durante la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^7$  células/ml y  $1 \times 10^8$  células/ml, de entre  $1 \times 10^8$  células/ml y  $1 \times 10^9$  células/ml, de entre  $1 \times 10^9$  células/ml y  $1 \times 10^{10}$  células/ml, de entre  $1 \times 10^{10}$  células/ml y  $1 \times 10^{11}$  células/ml, o de entre  $1 \times 10^{11}$  células/ml y  $1 \times 10^{12}$  células/ml. En determinadas realizaciones, la densidad celular durante la electroporación puede ser de  $(y) \times 10^6$ , en donde "y" puede ser cualquier valor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En determinados aspectos, la densidad celular antes de la electroporación puede ser de  $(y) \times 10^{10}$ , en donde "y" puede ser cualquier valor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 (o cualquier intervalo derivable de los mismos).

En determinadas realizaciones, la densidad celular después de la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^4$  células/ml y  $(y) \times 10^4$ , en donde "y" puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En otras realizaciones, la densidad celular después de la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^5$  células/ml y  $(y) \times 10^5$ , en donde "y" es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En todavía otras realizaciones, la densidad celular después de la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^6$  células/ml y  $(y) \times 10^6$ , en donde "y" puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En determinadas realizaciones, la densidad celular después de la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^7$  células/ml y  $(y) \times 10^7$ , en

donde "y" es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En todavía otras realizaciones, la densidad celular después de la electroporación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^7$  células/ml y  $1 \times 10^8$  células/ml, de entre  $1 \times 10^8$  células/ml y  $1 \times 10^9$  células/ml, de entre  $1 \times 10^9$  células/ml y  $1 \times 10^{10}$  células/ml, de entre  $1 \times 10^{10}$  células/ml y  $1 \times 10^{11}$  células/ml, o de entre  $1 \times 10^{11}$  células/ml y  $1 \times 10^{12}$  células/ml (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En determinadas realizaciones, la densidad celular durante la electroporación puede ser de  $(y) \times 10^6$ , en donde "y" puede ser cualquier valor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En determinados aspectos, la densidad celular antes de la electroporación puede ser de  $(y) \times 10^{10}$ , en donde "y" puede ser cualquier valor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 (o cualquier intervalo derivable de los mismos).

En determinadas realizaciones, la electroporación puede llevarse a cabo en cualquier célula procariótica o eucariótica. En algunas realizaciones, la electroporación implica la electroporación de una célula humana. En otras realizaciones, la electroporación implica la electroporación de una célula animal. En determinadas realizaciones, la electroporación implica la electroporación de una línea celular o un tipo de célula híbrida. En algunas realizaciones, la célula o células que se electroporan son células de cáncer, células tumorales o células inmortalizadas. En algunos casos, las células o líneas celulares tumorales, cancerosas o inmortalizadas y, en otros casos, células o líneas celulares tumorales, cancerosas o inmortalizadas entran en su estado o condición respectiva de manera natural. En determinadas realizaciones, las células o líneas celulares electroporadas pueden ser células A549, células B, B16, BHK-21, C2C12, C6, CaCo-2, CAP/, CAP-T, CHO, CHO2, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-DUXB11 COS-1, Cos-7, CV-1, células dendríticas, DLD-1, células madre embrionarias (ME) o derivadas, H1299, HEK, 293, 293T, 293FT, Hep G2, células madre hematopoyéticas, HOS, Huh-7, células madre pluripotentes inducidas (MPi) o derivadas, Jurkat, K562, L5278Y, LNCaP, MCF7, MDA-MB-231, MDCK, células mesenquimales, Min-6, células monocíticas, Neuro2a, NIH 3T3, NIH3T3L1, células NK, NS0, Panc-1, PC12, PC-3, células de sangre periférica, células plasmáticas, fibroblastos primarios, RBL, Renca, RLE, SF21, SF9, SH-SY5Y, SK-MES-1, SK-N-SH, SL3, SW403, célula de adquisición de pluripotencia estimuladas por estímulo (STAP, por sus siglas en inglés) o derivadas SW403, células T, THP-1, células tumorales, U2OS, U937 o células Vero.

En determinadas realizaciones, la célula es una que es conocido de la técnica que resulta difícil de transfectar. Dichas células son conocidas de la técnica y entre ellas se incluyen, por ejemplo, células primarias, células de insecto, células SF9, células Jurkat, células CHO, células madre, células de división lenta y células que no se dividen.

En algunas realizaciones, la célula es una célula madre o progenitora hematopoyética. Debido al potencial médico significativo de las células madre y progenitoras hematopoyéticas, se ha llevado a cabo un trabajo sustancial para intentar mejorar los métodos para la diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas a partir de células madre embrionarias. En el adulto humano, las células madre hematopoyéticas presentes principalmente en la médula ósea producen poblaciones heterogéneas de células progenitoras hematopoyéticas ( $CD34^+$ ) en división activa que se diferencian en todas las células del sistema hemático. En un adulto humano, los progenitores hematopoyéticos proliferan y se diferencian, resultando en la generación de cientos de miles de millones de células sanguíneas maduras diariamente. Las células progenitoras hematopoyéticas también se encuentran presentes en la sangre del cordón. *In vitro*, las células madre embrionarias humanas pueden diferenciarse en células progenitoras hematopoyéticas. Las células progenitoras hematopoyéticas también pueden expandirse o enriquecerse a partir de una muestra de sangre periférica. Las células hematopoyéticas pueden ser de origen humano, de origen murino o de cualquier otra especie de mamífero.

En algunos casos, puede electroporarse un número determinado de células en un periodo de tiempo determinado. Dada la flexibilidad, consistencia y reproducibilidad de la plataforma indicada, puede electroporarse hasta aproximadamente, o más de aproximadamente  $(y) \times 10^4$ ,  $(y) \times 10^5$ ,  $(y) \times 10^6$ ,  $(y) \times 10^7$ ,  $(y) \times 10^8$ ,  $(y) \times 10^9$ ,  $(y) \times 10^{10}$ ,  $(y) \times 10^{11}$ ,  $(y) \times 10^{12}$ ,  $(y) \times 10^{13}$ ,  $(y) \times 10^{14}$  o  $(y) \times 10^{15}$  células (o cualquier intervalo derivable de los mismos), en donde "y" puede ser cualquier valor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 (o cualquier intervalo derivable de los mismos) en menos de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 segundos (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En otro casos, hasta aproximadamente, o más de aproximadamente  $(y) \times 10^4$ ,  $(y) \times 10^5$ ,  $(y) \times 10^6$ ,  $(y) \times 10^7$ ,  $(y) \times 10^8$ ,  $(y) \times 10^9$ ,  $(y) \times 10^{10}$ ,  $(y) \times 10^{11}$ ,  $(y) \times 10^{12}$ ,  $(y) \times 10^{13}$ ,  $(y) \times 10^{14}$  o  $(y) \times 10^{15}$  células (o cualquier intervalo derivable de los mismos) pueden electroporarse, en donde "y" puede ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 (o cualquier intervalo derivable de los mismos), en menos de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 o 120 minutos (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En todavía otros aspectos, hasta aproximadamente, o más de aproximadamente  $(y) \times 10^4$ ,  $(y) \times 10^5$ ,  $(y) \times 10^6$ ,  $(y) \times 10^7$ ,  $(y) \times 10^8$ ,  $(y) \times 10^9$ ,  $(y) \times 10^{10}$ ,  $(y) \times 10^{11}$ ,  $(y) \times 10^{12}$ ,  $(y) \times 10^{13}$ ,  $(y) \times 10^{14}$  o  $(y) \times 10^{15}$  células (o cualquier intervalo derivable de los mismos) puede electroporarse, en donde "y" puede ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 (o cualquier intervalo derivable de los mismos) en menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas (o cualquier intervalo derivable de los mismos).

La expresión  $(y) \times 10^e$  se entiende que significa que una variable "y" puede adoptar cualquier valor numérico, que se multiplica por 10 que está elevado a un valor exponente "e". Por ejemplo,  $(y) \times 10^4$ , en donde "y" es 2, se entiende que



significa  $2 \times 10^4$ , que es equivalente a  $2 \times 10.000$ , que es igual a 20.000.  $(y) \times 10^4$  también puede expresarse como  $(y) \times 10^4$  o  $(y) \times 10^4$  o  $(y) \times 10^4$ .

Los volúmenes de células o medios pueden variar según la cantidad de células que deben electroporarse, el número de células que debe cribarse, el tipo de células que debe cribarse, el tipo de proteína que debe producirse, la cantidad de proteína deseada, la viabilidad celular y determinadas características celulares relacionadas con las concentraciones celulares deseables. Entre los ejemplos de volúmenes que pueden utilizarse en métodos y composiciones se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 ml o l (o cualquier intervalo derivable de los mismos), y cualquier intervalo derivable de los mismos. Los recipientes que pueden contener dichos volúmenes se encuentran contemplados para la utilización en realizaciones indicadas en la presente memoria. Entre dichos recipientes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, placas de cultivo celular, placas Petri, matraces, biobolsas, biorrecipientes, biorreactores o tanques. Los recipientes para volúmenes a gran escala se encuentran particularmente contemplados, tales como los que pueden contener más de 10 l, o más. En determinadas realizaciones, se utilizan volúmenes de 100 l o más.

Se encuentra específicamente contemplado que la electroporación de células mediante métodos indicados en la presente memoria proporcione beneficios de eficiencia incrementada y/o toxicidad reducida. Dichas mediciones pueden llevarse a cabo mediante la medición de la cantidad de células que incorpora la modificación de la secuencia del ADN genómico, la medición de la cantidad de células que expresa el marcador y/o la medición de la viabilidad de las células después de la electroporación.

En algunas realizaciones, la eficiencia de la modificación de la secuencia es superior a aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 %. La eficiencia de la modificación de la secuencia puede medirse mediante la determinación del número de células con la modificación de la secuencia y la división del número total de células. La incorporación de la modificación de la secuencia del ADN genómico puede determinarse mediante métodos conocidos de la técnica, tales como la secuenciación directa del ADN genómico, la digestión por restricción diferencial (en el caso de que la modificación de la secuencia añada, elimine o modifique un sitio de enzima de restricción), la electroforesis en gel, la electroforesis en matriz capilar, EM MALDI-TOF, la hibridación específica de alelos dinámica, las balizas moleculares, el polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción, la extensión de cebadores, la electroforesis en gel de gradiente térmico y similares.

En otras realizaciones, la viabilidad celular después de la electroporación es de por lo menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 o 85 %. La viabilidad celular puede medirse mediante métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, las células pueden contarse antes y después de la electroporación con un aparato de recuento celular. En otras realizaciones, se mide la apoptosis. Se cree que la introducción de grandes cantidades de ácidos nucleicos puede inducir la apoptosis. Se encuentra contemplado que los métodos indicados en la presente memoria conduzcan a menos apoptosis que otros métodos de la técnica. En determinadas realizaciones, la cantidad de células que muestra apoptosis después de la electroporación es inferior a 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 %. La apoptosis se refiere al procedimiento específico de muerte celular programada y puede medirse mediante métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, la apoptosis puede medirse mediante ensayos de anexina-V, ensayos de detección de caspasa 3/7 activada y el ensayo de apoptosis Vybrant® (Life Technologies).

En realizaciones adicionales, el porcentaje de células que expresa el ácido nucleico codificante del marcador es superior a aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 %.

En el caso de que una realización específica de la exposición incluya un intervalo o valor específico, tal como se indica en la presente memoria, se encuentra específicamente contemplado que los intervalos y valores específicos (es decir, concentraciones, longitudes de ácidos nucleicos y porcentajes) puedan excluirse en realizaciones de la invención. También se encuentra contemplado que, en el caso de que la exposición incluya una lista de elementos (p. ej., tipos celulares), realizaciones de la invención pueden excluir específicamente uno o más elementos de la lista.

3. Otros métodos no químicos

El exprimido celular es un método de transfección que permite la administración de moléculas en el interior de células mediante un aplastamiento suave de la membrana celular. Es una plataforma de microfluidos de alto rendimiento libre de vectores para la administración intracelular. No se basa en materiales exógenos o campos eléctricos.

La sonoporación utiliza ultrasonidos de alta intensidad para inducir la formación de poros en las membranas celulares. Dicha formación de poros se atribuye principalmente a la cavitación de burbujas de gases que interactúan con las

membranas celulares próximas, ya que resulta potenciada por la adición de agente de contraste de ultrasonidos, una fuente de núcleos de cavitación.

La transfección óptica es un método en el que se genera transitoriamente un orificio minúsculo (diámetro  $\sim 1 \mu\text{m}$ ) en la membrana plasmática de una célula utilizando un láser altamente enfocado. En esta técnica, se trata una célula cada vez, lo que lo convierte en particularmente útil para el análisis de células individuales.

La administración hidrodinámica en ratones y ratas, aunque en menor medida en animales más grandes, el ADN con más frecuencia en plásmidos, incluyendo transposones, puede administrarse en el hígado mediante inyección hidrodinámica que implica la infusión de un volumen relativamente grande en la sangre en menos de 10 segundos; prácticamente la totalidad del ADN se expresa en el hígado mediante dicho procedimiento.

Métodos de transfección de base química.

La transfección de base química puede clasificarse en varios tipos: ciclodextrina, polímeros, liposomas o nanopartículas (con o sin funcionalización química o vírica).

Uno de los métodos más económicos utiliza fosfato cálcico. Se combina solución salina tamponada con HEPES (HeBS, por sus siglas en inglés) que contiene iones fosfato con una solución de cloruro cálcico que contiene el ADN que debe transfectarse. Al combinar las dos, se forma un fino precipitado del calcio cargado positivamente y el fosfato cargado negativamente, uniendo el ADN que debe transfectarse sobre su superficie. A continuación, se añade la suspensión del precipitado a las células que deben transfectarse (habitualmente un cultivo celular que se cultiva en forma de una monocapa). Mediante un proceso que no se entiende del todo, las células incorporan parte del precipitado, y con él, el ADN.

Otros métodos utilizando compuestos orgánicos altamente ramificados, denominados dendrímeros, para unirse al ADN y conseguir que entre en la célula.

Un método muy eficiente es la inclusión del ADN que debe transfectarse en liposomas, es decir, cuerpos pequeños unidos a membranas que de algún modo son similares en estructura a una célula y que pueden fusionarse realmente con la membrana celular, liberando el ADN en el interior de la célula. Para las células eucarióticas, la transfección se consigue mejor utilizando liposomas catiónicos (o mezclas), debido a que las células son más sensibles.

Otro método es la utilización de polímeros catiónicos, tales como DEAE-dextrano o polietilenimina. El ADN cargado negativamente se une al polímero y el complejo es incorporado por la célula mediante endocitosis.

Métodos basados en partículas.

Un enfoque directo a la transfección es la pistola génica, en la que se acopla un ADN a una nanopartícula de un sólido inerte (habitualmente oro) que a continuación se "dispara" directamente al interior del núcleo de la célula diana.

La magnetofección, o transfección asistida por imanes, es un método de transfección, que utiliza la fuerza magnética para administrar el ADN en las células diana. Los ácidos nucleicos en primer lugar se asocian a nanopartículas magnéticas. A continuación, la aplicación de fuerza magnética impulsa los complejos de partículas de ácidos nucleicos hacia las células diana, o hacia el interior de las mismas, en donde se libera la carga.

La "impalefección" se lleva a cabo mediante el empalado de las células con nanoestructuras y matrices alargadas de dichas nanoestructuras, tales como nanofibras de carbono o nanoalambres de silicio que han sido funcionalizados con ADN plasmídico.

Otro método de transfección basado en partículas se conoce como bombardeo de partículas. El ácido nucleico se administra mediante penetración en la membrana a alta velocidad, habitualmente conectado a microproyectiles.

## Ejemplos

Se incluyen los ejemplos siguientes para ilustrar formas las realizaciones preferentes de la invención. Debe apreciar el experto en la materia que las técnicas dadas a conocer en los ejemplos a continuación representan técnicas que el inventor ha encontrado que funcionan bien en la práctica de la invención y, de esta manera, puede considerarse que constituyen modos preferentes para su práctica. Sin embargo, el experto en la materia debería, a la luz de la presente exposición, apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se dan a conocer y todavía obtener un resultado igual o similar sin apartarse del alcance de la invención según se define en las reivindicaciones.

Ejemplo 1: integración dirigida de transgenes en ADN genómico con ayuda de nucleasas específicas y ADN plasmídico donante.

Debido al potencial terapéutico, existe una elevada demanda de una integración dirigida eficiente de transgenes en el ADN genómico celular. Además del potencial terapéutico, la integración dirigida eficiente del transgén presenta aplicabilidad en la producción de proteínas (p. ej., la producción de anticuerpos). Para la integración dirigida de un transgén, este típicamente se administra en un segmento grande de ADN o en un plásmido, que puede presentar toxicidad en determinadas células, tales como células primarias, células madre, células hematopoyéticas o células inmunitarias. Por lo tanto, para que la integración dirigida de transgenes resulte terapéuticamente relevante, el método debe proporcionar elevadas eficiencia y especificidad de integración en el ADN genómico diana de las células terapéuticamente relevantes.

Se ha planteado la hipótesis de que las células, tales como las células hematopoyéticas o las células inmunitarias, presentan diferentes sensibilidades frente a la transfección con ADN plasmídico durante el procedimiento de activación. Se encuentra contemplado que existe una ventana temporal en la que las células hematopoyéticas expandidas pueden mostrar una tolerancia incrementada y una toxicidad reducida a la transfección de ADN plasmídico.

Para someter a ensayo dicha hipótesis, se llevó a cabo la integración dirigida en células K562 y en células T humanas. Se utilizó ARN guía (ARNg) Cas9. El molde de ARNg se preparó mediante amplificación por PCR con cebadores conjugados con promotor de T7. Los cebadores utilizados fueron: SM285.AAVS1.g2.F: ttaatacgcactactataGGGGCCACTAGGGACAGGAT (SEC ID nº 19) y SM212.sgRNA.R: aaaagcaccgcactcggtgcc (SEC ID nº 20). El molde de Cas9 se obtuvo mediante linearización con endonucleasa (XhoI 1) del plásmido Cas9. A continuación, se generó el ARNm mediante el kit mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA (disponible comercialmente de Ambion). El ADN donante utilizado era ADN plasmídico que comprendía GFP.

#### Integración dirigida del transgén GFP en K562.

La FIG. 1 muestra que GFP se expresa en 27 %, 32 % y 37 % de las células, 1, 5 y 12 días después de la transfección mediante electroporación. Tal como se esperaba, no se observó expresión significativa de GFP en células que no habían sido sometidas a electroporación (-EP), mientras que 35 % de las células expresó GFP en una transfección que no incluía ARN guía y Cas9, que proporciona una integración dirigida. Sin embargo, dicha expresión era transitoria y por lo tanto se observó una cantidad significativa de expresión de GFP en los puntos temporales analizados siguientes de 5 y 12 días. Solo las células transfectadas con el sistema CRISPR retuvieron un nivel significativo de expresión de GFP pasado el punto temporal de 1 día (FIG. 1). Lo anterior se confirmó adicionalmente en un experimento adicional, en el que el plásmido PGK-eGFP-PoliA se introdujo dirigidamente en el sitio VAAS1 de las células K562 utilizando el sistema CRISPR. Tal como se muestra en la FIG. 14, la integración dirigida (+CRISPR) permite la expresión estable de GFP en los puntos temporales de por lo menos 29 días después de la transfección (FIG. 14, segunda y cuarta filas).

Las células K562 transfectadas se sometieron a ensayo para viabilidad, expresión e intensidad media de fluorescencia (FIG. 13). El plásmido transfectado en las células K562 no mostró ninguna reducción de la viabilidad celular (FIG. 13A). Tal como se muestra en la FIGS. 13B-13C, solo las células K562 transfectadas con el sistema CRISPR retuvieron una cantidad significativa de expresión de GFP más allá de los 5 días después de la transfección. Lo anterior era esperable, ya que la cotransfección del transgén con el sistema CRISPR permite una integración específica de sitio estable del transgén. La expresión del transgén se mantiene en dichas células sin presión selectiva.

En resumen, el ADN plasmídico no indujo citotoxicidad significativa de las células K562 y se observó una integración dirigida eficiente (30 % a 40 %) sin selección de las células.

#### Integración dirigida del transgén de GFP en fibroblastos.

Para someter a ensayo si la integración dirigida de un transgén de GFP (PGK-eGFP-PoliA) puede integrarse en fibroblastos, se electroporaron fibroblastos humanos con ADN plasmídico de GFP (PGK-eGFP-PoliA) con (+Cas9/ARNg) o sin (-Cas9/ARNg) el sistema CRISPR. Se observó un nivel comparable de expresión de GFP en los dos experimentos hasta 15 días después de la transfección, aunque solo las células transfectadas con el sistema CRISPR retuvieron una expresión significativa de GFP 23 y 26 días después de la transfección (FIG. 12).

#### Integración dirigida de transgén de GFP en células T humanas.

Tal como se muestra en la FIG. 2, las células T humanas mostraron una viabilidad reducida (FIG. 2A), una proliferación reducida (FIG. 2B) y una expresión reducida de GFP (FIG. 2C) después de la transfección con ADN plasmídico. Sin embargo, dichos efectos negativos se superaron en las células transfectadas con ARNm-GFP, sugiriendo que el ADN plasmídico es una fuente de toxicidad.

A continuación, se sometió a ensayo si las células transfectadas con ADN plasmídico en diferentes puntos temporales después de la activación de las células afectaba a la viabilidad de las células. Las células T electroporadas 1 día después de la activación con activador de células T humanas CD3/CD28 DYNABEADS® (disponible comercialmente

de Life Technologies) no mostraron una reducción significativa de la viabilidad en comparación con el control (FIG. 3A). Transfección 2 días después de la activación resultó en una reducción de la viabilidad celular (FIG. 3B) en comparación con un día después de la activación, aunque la viabilidad celular todavía era superior a 40 % en cada muestra sometida a ensayo. A los tres días, se observó una reducción adicional de la viabilidad celular (FIG. 3C). Estos datos indican que la activación de las células reduce la toxicidad asociada a la transfección con ADN plasmídico. Al someter a ensayo las mismas células para la expresión de GFP (FIG. 4A-C) y la intensidad media de fluorescencia (IMF, FIG. 5A-C), se observó el nivel más alto de expresión de GFP al transfectar las células dos días después de la activación (FIG. 4B y FIG. 5B).

La ventana de transfección se estudió adicionalmente en células T expandidas. Las células T se activaron tal como se ha indicado anteriormente y se electroporaron un día, dos días o tres días después de la activación. La FIG. 6 mostró la proliferación de las células electroporadas en los diferentes puntos temporales. Las células electroporadas un día después de la activación mostraron la máxima proliferación celular (FIG. 6A) y las células electroporadas tres días después de la activación mostraron la cantidad mínima de proliferación celular. Estos datos muestran que la activación de las células, antes de la transfección, proporciona una mejor tolerancia del ADN plasmídico.

A continuación, se sometió a ensayo si la integración dirigida de un transgén podía llevarse a cabo mediante electroporación de las células T después de la activación. Las células T expandidas se activaron tal como se ha indicado anteriormente y después se electroporaron con 100 µg/ml de ADN plasmídico con GFP dos días después de la activación. Tal como se muestra en la FIG. 7, el control de no electroporación (-EP) mostró un nivel bajo de fluorescencia de fondo. Un porcentaje de 3 % de las células transfectadas con ADN plasmídico de GFP, aunque sin sistema CRISPR (ARNg/Cas9) que permite la integración específica de sitio en el sitio VAAS1, mostraba fluorescencia de GFP un día después de la transfección. Sin embargo, la expresión de GFP en dichas células era transitoria y se redujo cuatro días después de la transfección a 2 % y a 0,3 % once días después de la transfección. En contraste, las células con el sistema CRISPR mantuvieron la expresión de GFP once días después de la transfección. El 4 %, 5 % y 4 % de dichas células mostró expresión de GFP un día, cuatro días y once días después de la transfección, respectivamente. Se repitió dicho experimento y los resultados confirmaron que las células transfectadas con ADN plasmídico de GFP y complejo de CRISPR mantuvo la expresión de GFP (2,3 % de las células) 6 días después de la transfección, mientras que las células transfectadas con solo ADN plasmídico de GFP solo no expresó GFP seis días después de la transfección (FIG. 8).

La FIG. 9 muestra los resultados de células transfectadas un día, dos días, tres días o cuatro días después de la activación de las células. La FIG. 9A muestra la proliferación de las células transfectadas con 50, 100 o 200 µg/ml de ADN plasmídico sin el sistema CRISPR o 50, 100 o 200 µg/ml de ADN plasmídico con sistema CRISPR. Tal como se muestra en la FIG. 9A, la proliferación celular cayó al transfectar las células tres o más días después de la transfección. Además, la proliferación aparentemente no era dependiente de la concentración de ADN. La FIG. 9D muestra la viabilidad de las células. Tal como se muestra en la FIG. 9D, la viabilidad celular también cayó al transfectar las células tres o más días después de la transfección, y aparentemente la viabilidad no era dependiente de la concentración del ADN. La FIG. 9B muestra que el porcentaje máximo de células expresantes de GFP se alcanzó al transfectar las células dos días después de la activación. La FIG. 9C muestra que el número relativo de sucesos integrados (calculados como número de células x porcentaje de células positivas para GFP) era máximo al transfectar las células dos días después de la activación.

Dichos experimentos se confirmaron adicionalmente mediante análisis de FACS de células T expandidas y activadas tal como se ha indicado anteriormente y se electroporaron dos días después de la activación con 100 µg/ml de ADN plasmídico y -CRISPR (FIG. 15, primera y tercera filas) o +CRISPR (FIG. 15, segunda y cuarta filas). Tal como se muestra en la FIG. 15, solo las células transfectadas con CRISPR mostraron una expresión estable del transgén más allá del punto temporal de 4 o 6 días.

En conclusión, la activación de las células T antes de la transfección con ADN plasmídico superó la toxicidad y pérdida de toxicidad asociadas al ADN plasmídico en estas células.

La totalidad de los métodos reivindicados en la presente memoria puede prepararse y ejecutarse sin necesidad de experimentación indebida a la luz de la presente exposición. Aunque las composiciones y métodos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferentes, resultará evidente para el experto en la materia que pueden aplicarse variaciones en los métodos y en las etapas, o en la secuencia de etapas del método descrito en la presente memoria. Más específicamente, resultará evidente que determinados agentes que están relacionados química y fisiológicamente pueden sustituirse por los agentes indicados en la presente memoria, consiguiendo los mismos resultados o resultados similares.

## REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la modificación específica de secuencia de la secuencia de una región diana de ADN genómico en células T de mamífero, que comprende:

poner en contacto las células con una composición activadora, en la que la composición activadora comprende anticuerpos anti-CD3 y anticuerpos anti-CD28;  
transfectar las células con una composición de transfección no vírica que comprende (a) ADN donante, especialmente en el que el ADN donante es un plásmido, (b) un agente de digestión del ADN, especialmente seleccionado de entre un TALEN, transposasa, integrasa o nucleasa, en particular una nucleasa específica de sitio, preferentemente la nucleasa Cas9, en particular en la que el agente de digestión del ADN está codificado en uno o más ARN, y opcionalmente (c) un ARN guía, en el que el ADN donante comprende:  
(i) una región homóloga que comprende una secuencia de ácidos nucleicos homóloga de la región diana de ADN genómico, y  
(ii) una región de modificación de la secuencia;

en el que la secuencia de ADN genómico se modifica específicamente en la región diana de ADN genómico, especialmente en el que la transfección de las células comprende la electroporación de las células, en particular en el que la electroporación es electroporación de flujo utilizando un dispositivo de electroporación de flujo, y

en el que las células se transfectan en un periodo de tiempo de 2 días o en un periodo de tiempo de 1 día después de poner en contacto las células con la composición activadora.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el ADN donante comprende un transgén, o el ADN donante es un oligo, especialmente un oligo de cadena sencilla.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que la concentración del ADN donante en la composición de transfección es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 500 µg/ml.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células son células T primarias de mamífero.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuencia diana de ADN genómico comprende un gen asociado a enfermedad y/o en el que el ADN donante comprende un gen asociado a enfermedad, y/o en el que el ADN donante comprende un receptor de antígeno quimérico (RAQ), en particular en el que la región de modificación de la secuencia del ADN donante comprende el RAQ.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ADN donante comprende una región homóloga que comprende por lo menos 10 ácidos nucleicos, por lo menos 20 ácidos nucleicos o por lo menos 30 ácidos nucleicos de secuencia homóloga.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la modificación de la secuencia de ADN es uno o más codones de parada, en el que la modificación de la secuencia cambia uno o más pares de bases de la secuencia genómica, en el que la modificación de la secuencia añade uno o más pares de bases de la secuencia genómica, en el que la modificación de la secuencia deletiona uno o más pares de bases de la secuencia genómica, o en el que la modificación de la secuencia de ADN es la integración dirigida específica de sitio de un transgén.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende, además, expandir una célula clonal aislada y seleccionada para producir células clonales que presentan la modificación de la secuencia del ADN, especialmente en el que las células se expanden para la producción a gran escala, especialmente en el que las células se expanden en un volumen superior a 1 litro, en particular en el que las células se expanden en un volumen de 3 litros o más.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende, además, cribar las células para la modificación de la secuencia y/o que comprende, además, congelar las células transfectadas y/o que comprende, además, expandir las células transfectadas que han sido previamente congeladas.

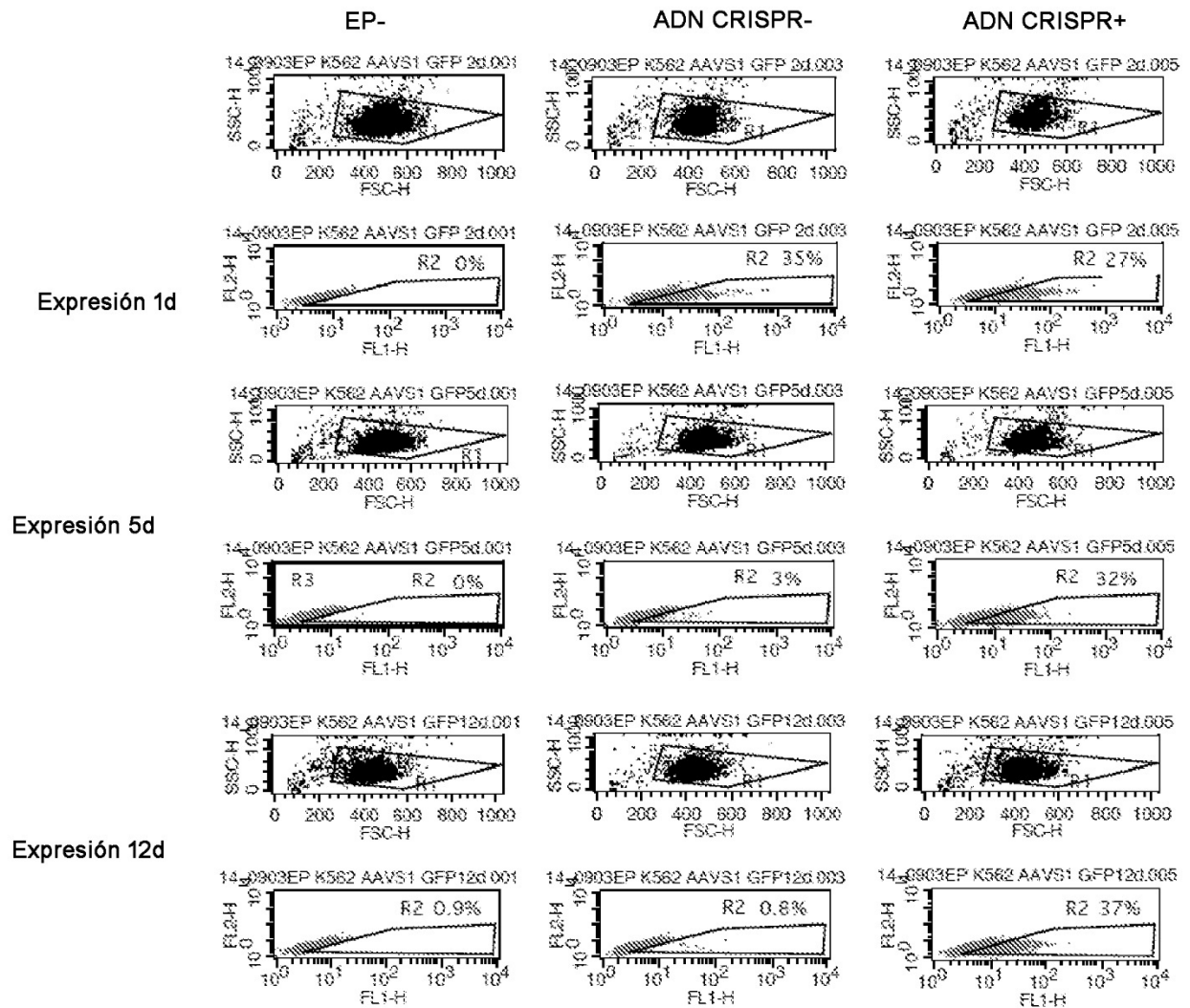
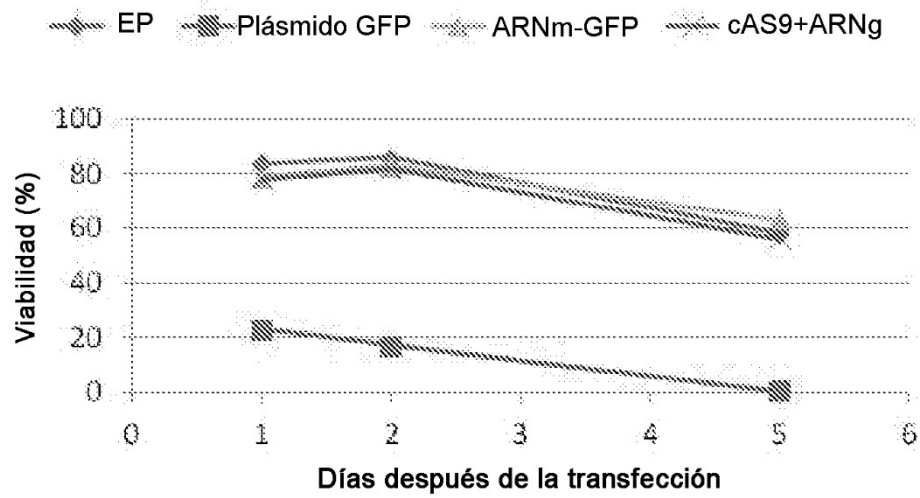
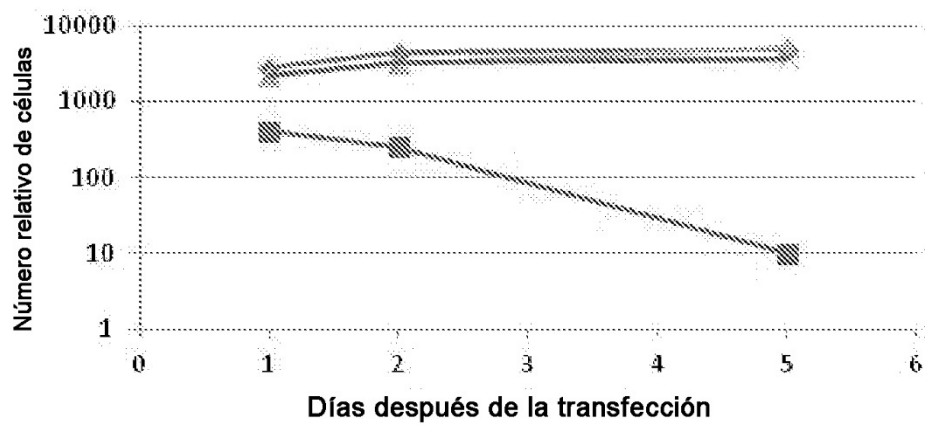


FIG. 1

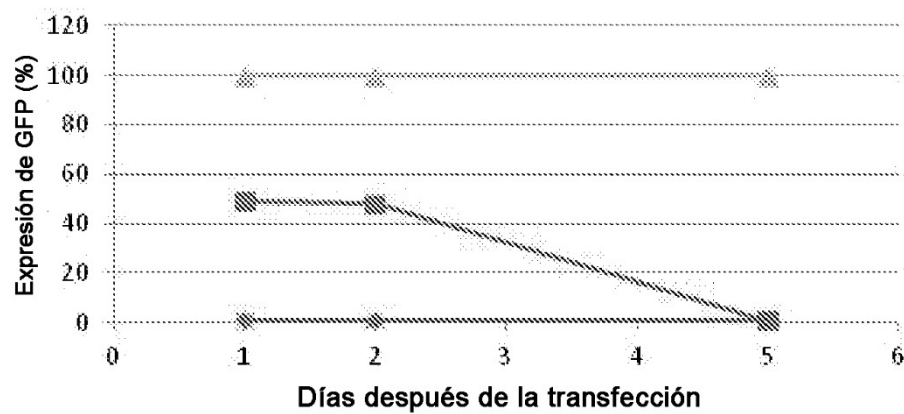
**FIG. 2 LEYENDA**



**FIG. 2A**

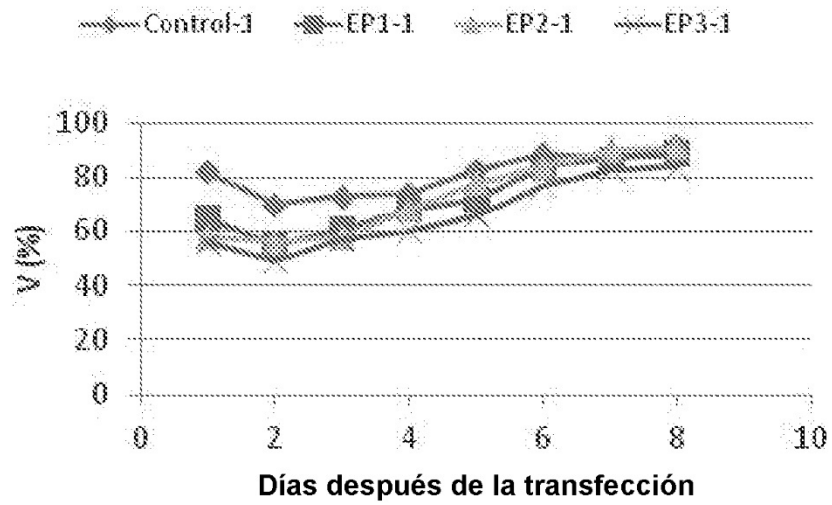


**FIG. 2B**

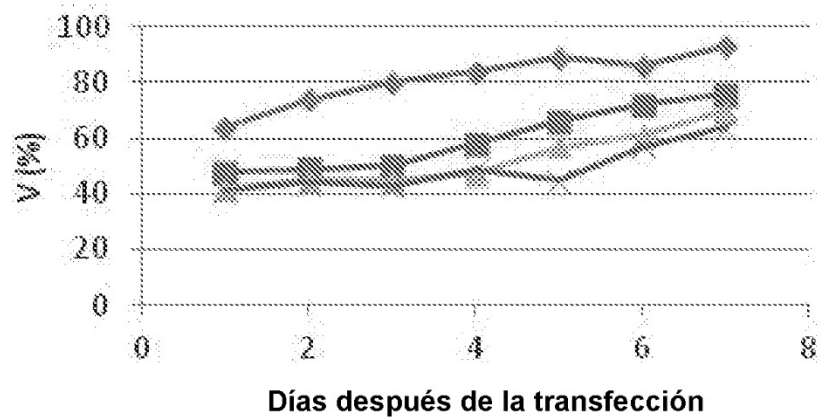


**FIG. 2C**

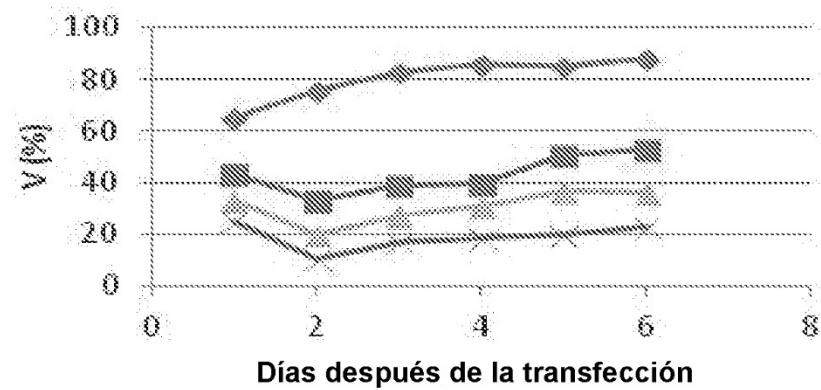
**FIG. 3 LEYENDA**



**FIG. 3A**



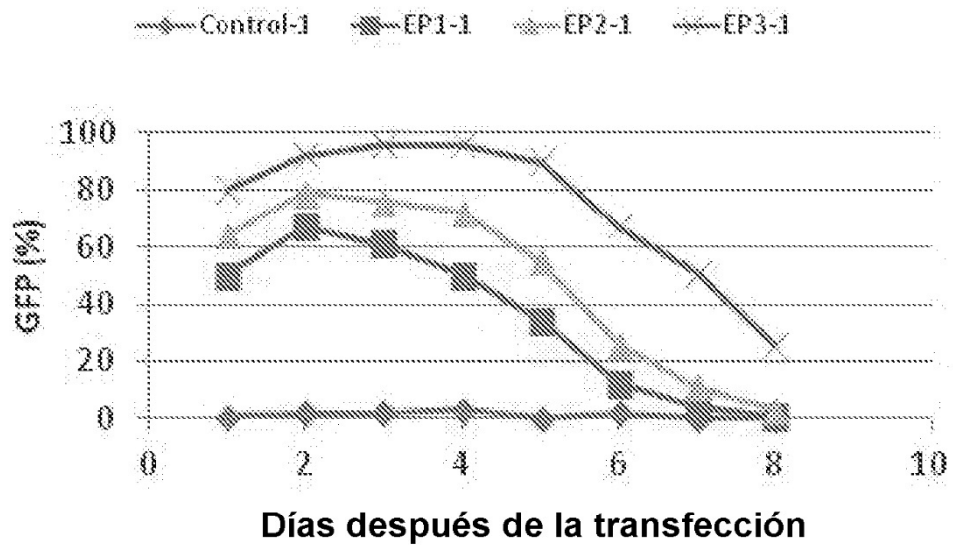
**FIG. 3B**



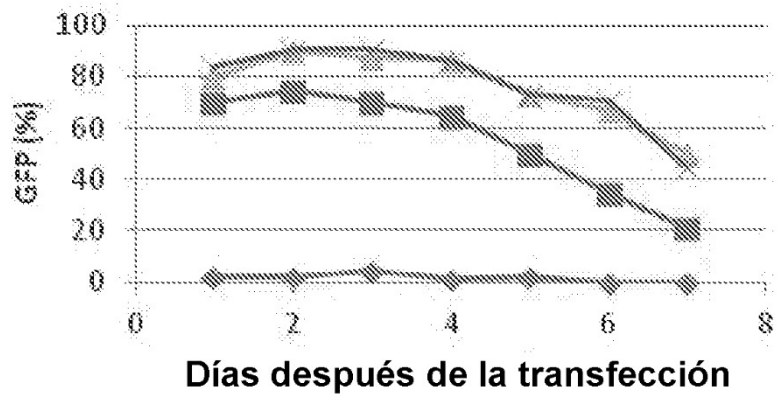
**FIG. 3C**



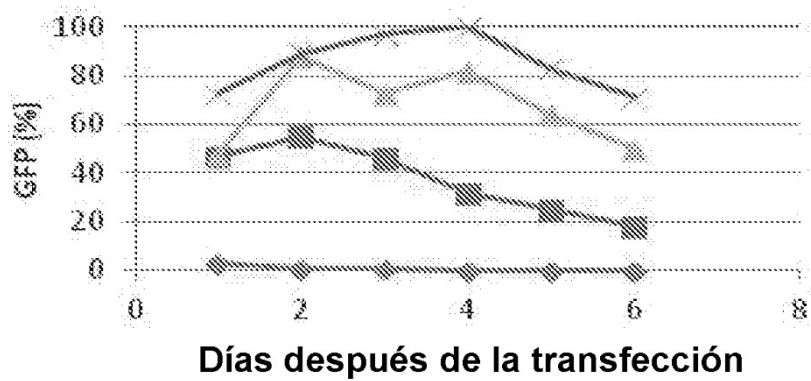
**FIG. 4 LEYENDA**



**FIG. 4A**

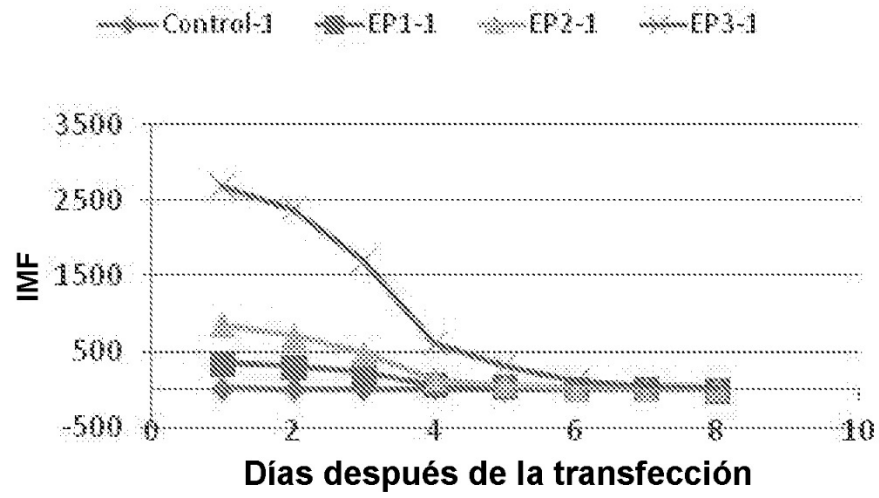


**FIG. 4B**

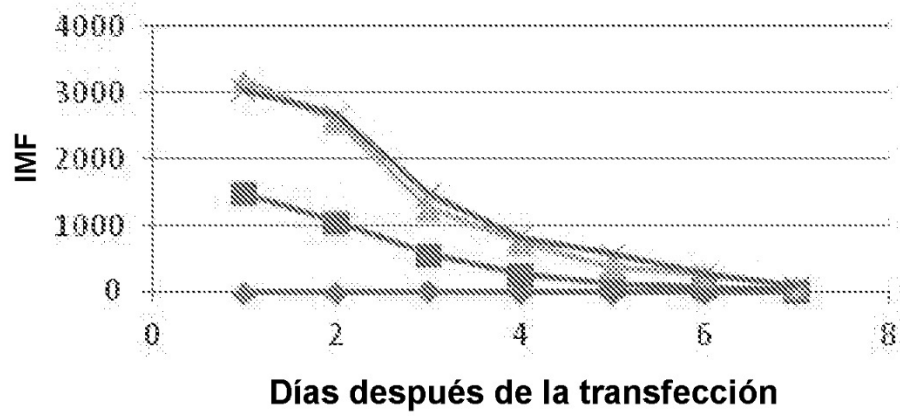


**FIG. 4C**

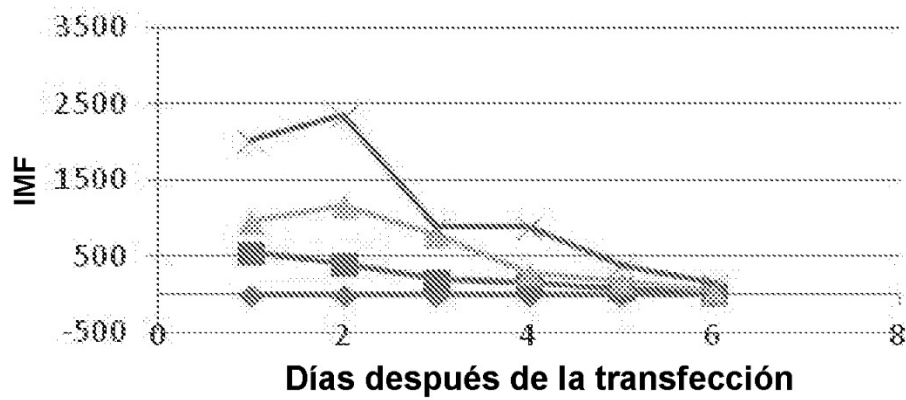
**FIG. 5 LEYENDA**



**FIG. 5A**



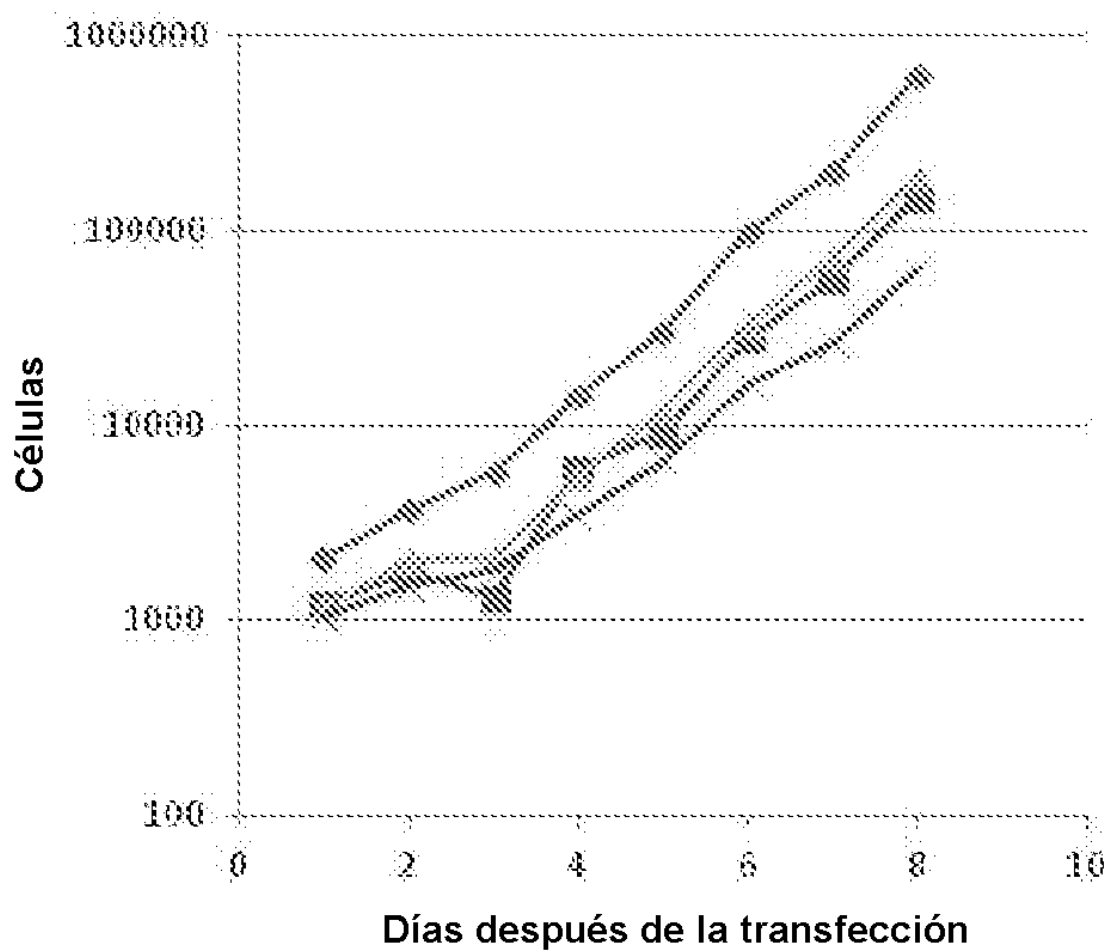
**FIG. 5B**



**FIG. 5C**

**FIG. 6 LEYENDA**

Control-1   EP1-1   EP2-1   EP3-1



**FIG. 6A**

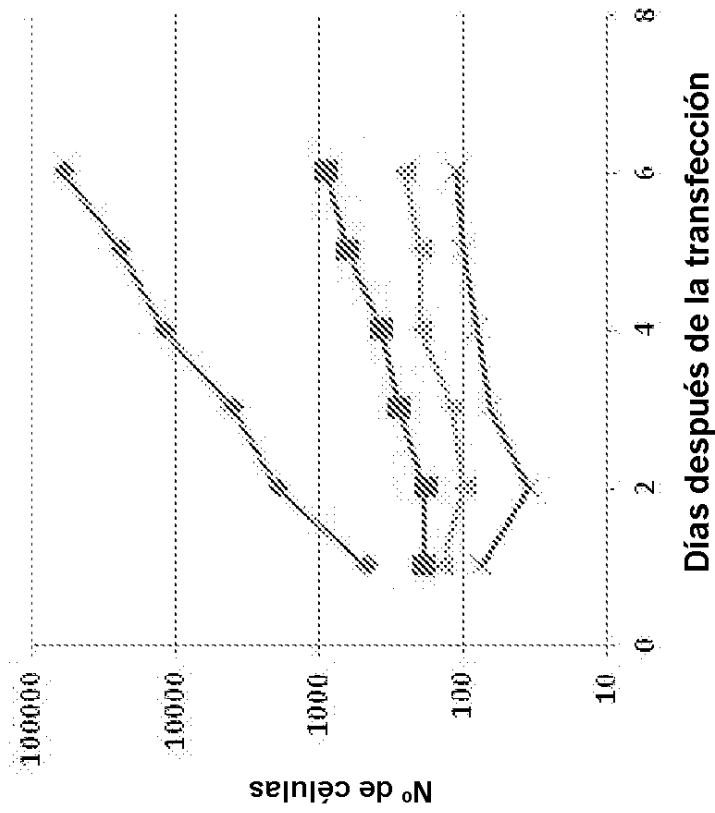


FIG. 6B

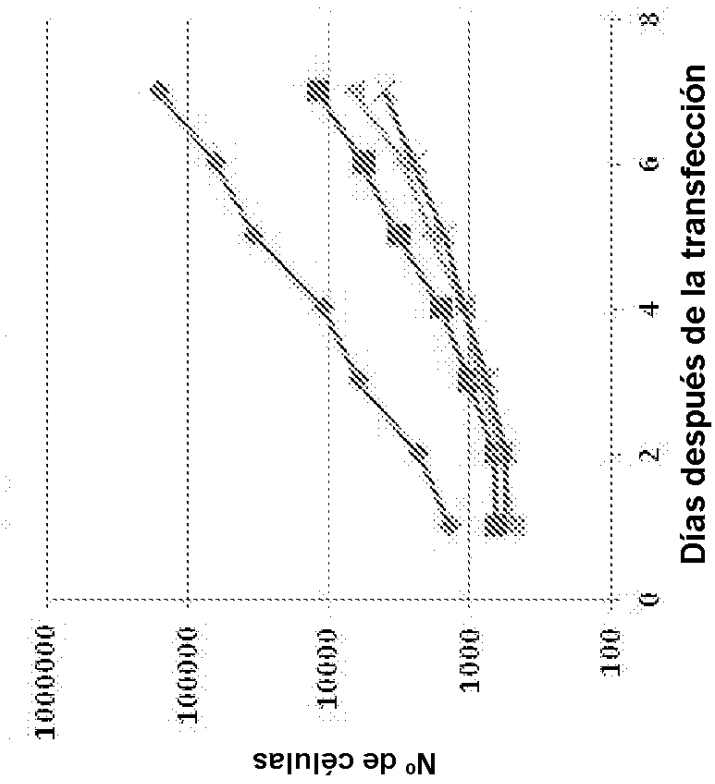


FIG. 6C

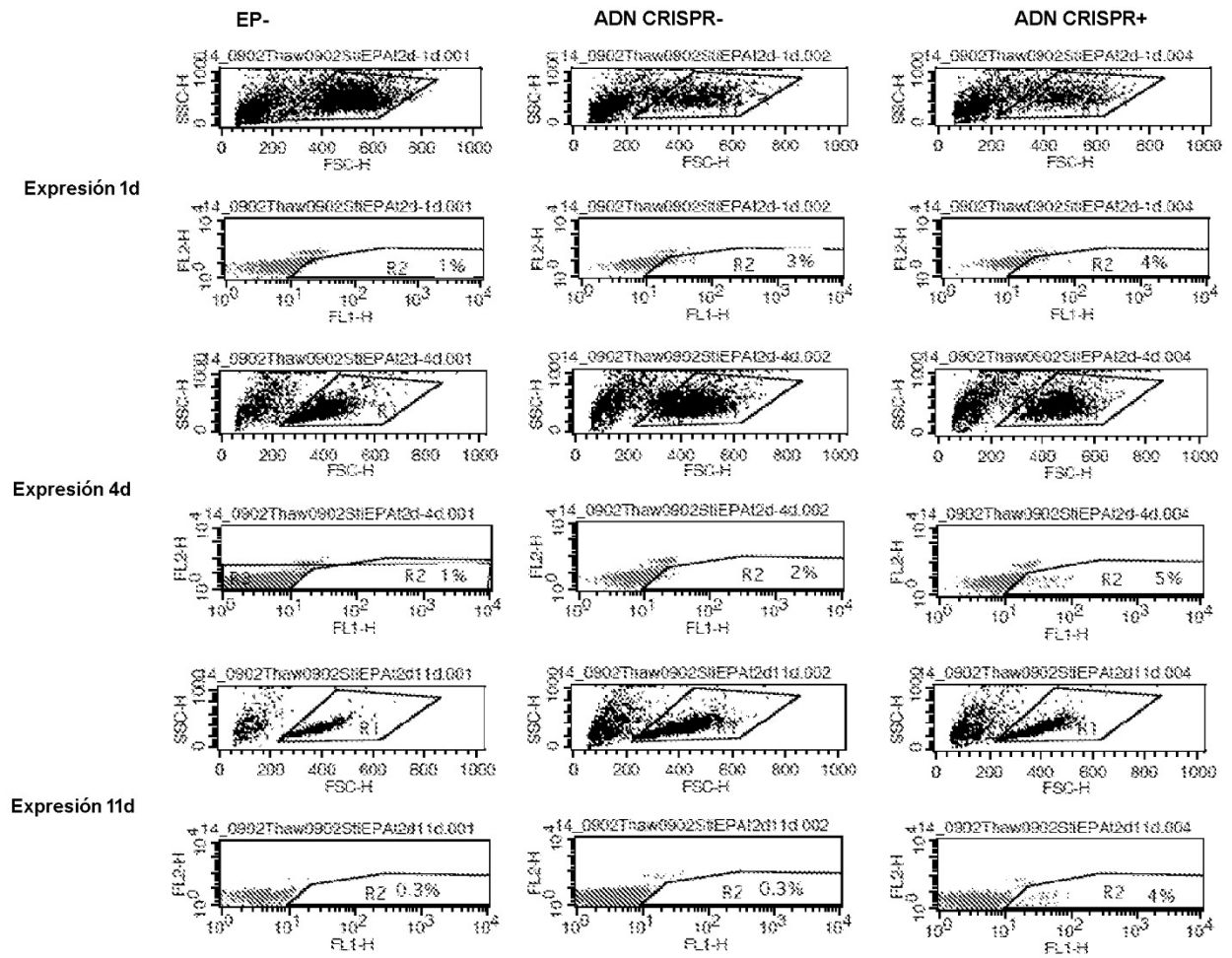
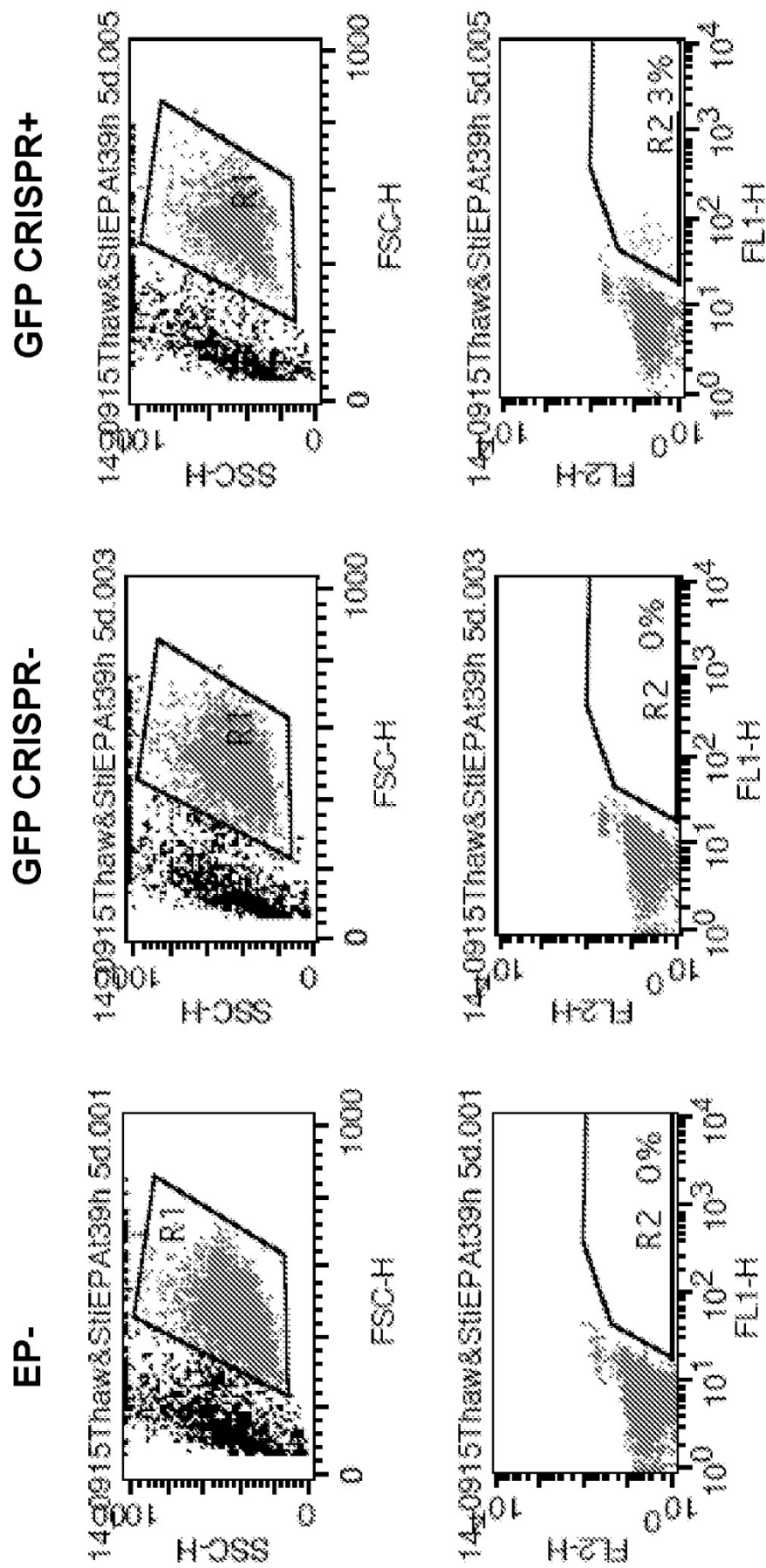


FIG. 7



**FIG. 8**

FIG. 9 Leyenda

3d después de la activ. 6d después de la activ. 10 d después de la activ. 14d después de la activ.

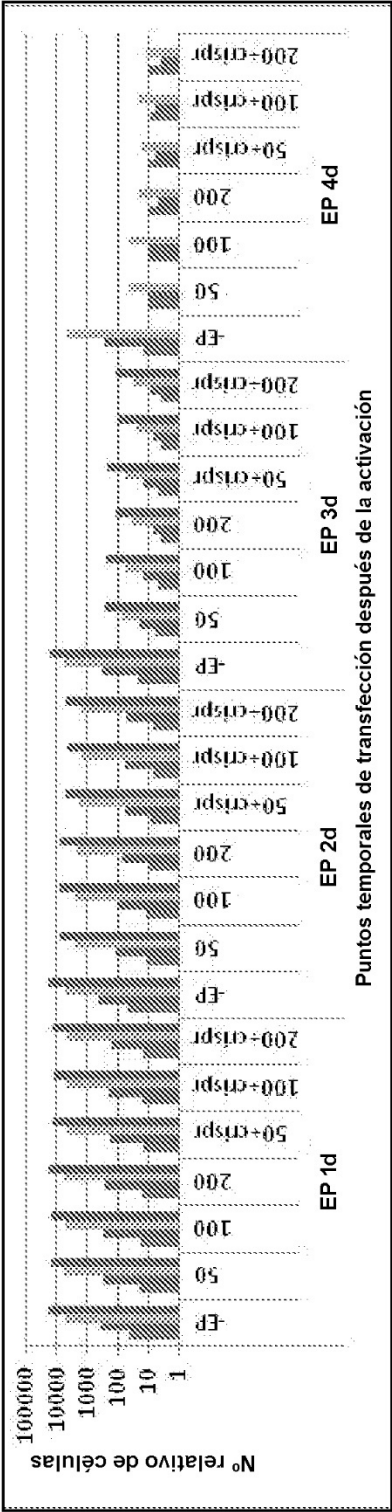


FIG. 9A

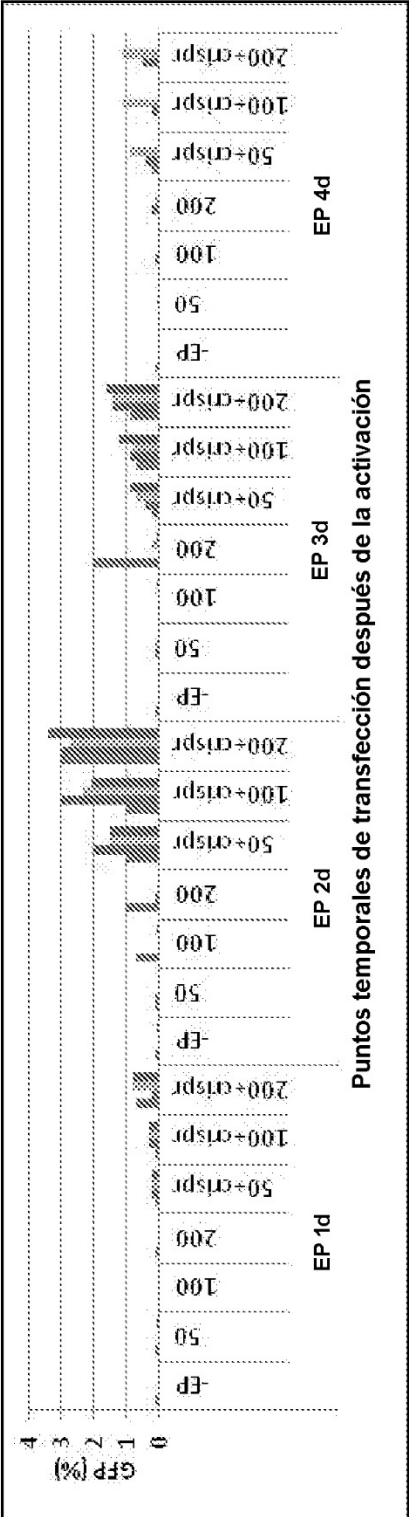
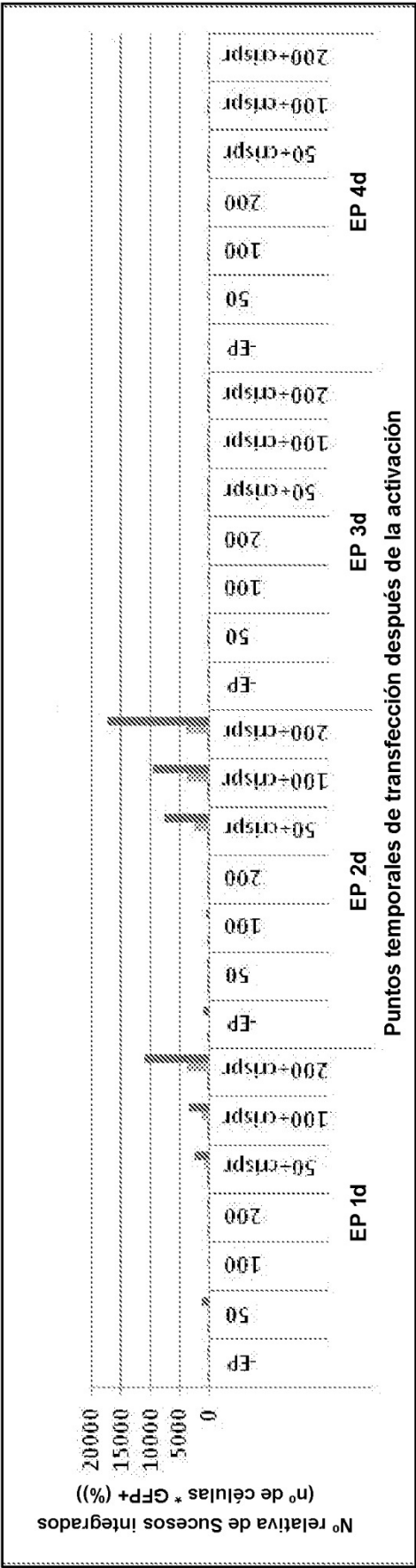
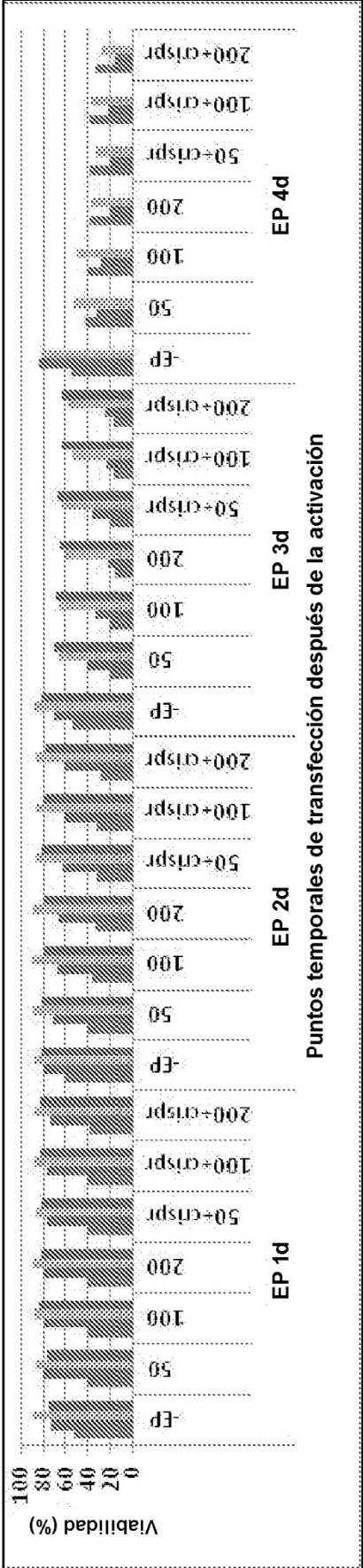


FIG. 9B



**FIG. 9C**



**FIG. 9D**



ADN donante:

atggtgcatctgactcctgTAGtggagaagtctgccgttact

ADN genómico diana:

atggtgcatctgactcctgtggagaagtctgccgttact

taccacgtagactgaggacacctcttcagacggcaatga

**FIG. 10A**

ADN donante:

atggtgcatctgactcctgAggagaagtctgccgttact

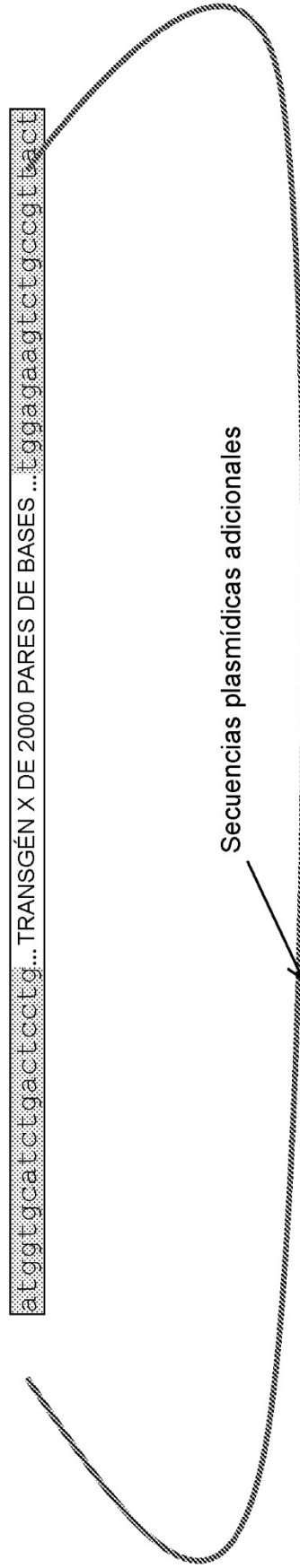
ADN genómico diana:

atggtgcatctgactcctgtggagaagtctgccgttact

taccacgtagactgaggacacctcttcagacggcaatga

**FIG. 10B**

ADN plasmídico donante de doble cadena:



ADN genómico diana:

atggtgcatctgactcctgtggagaagtcctgccgttact  
taccacgtagactgaggacacctcttcagacggcaatga

**FIG. 11**

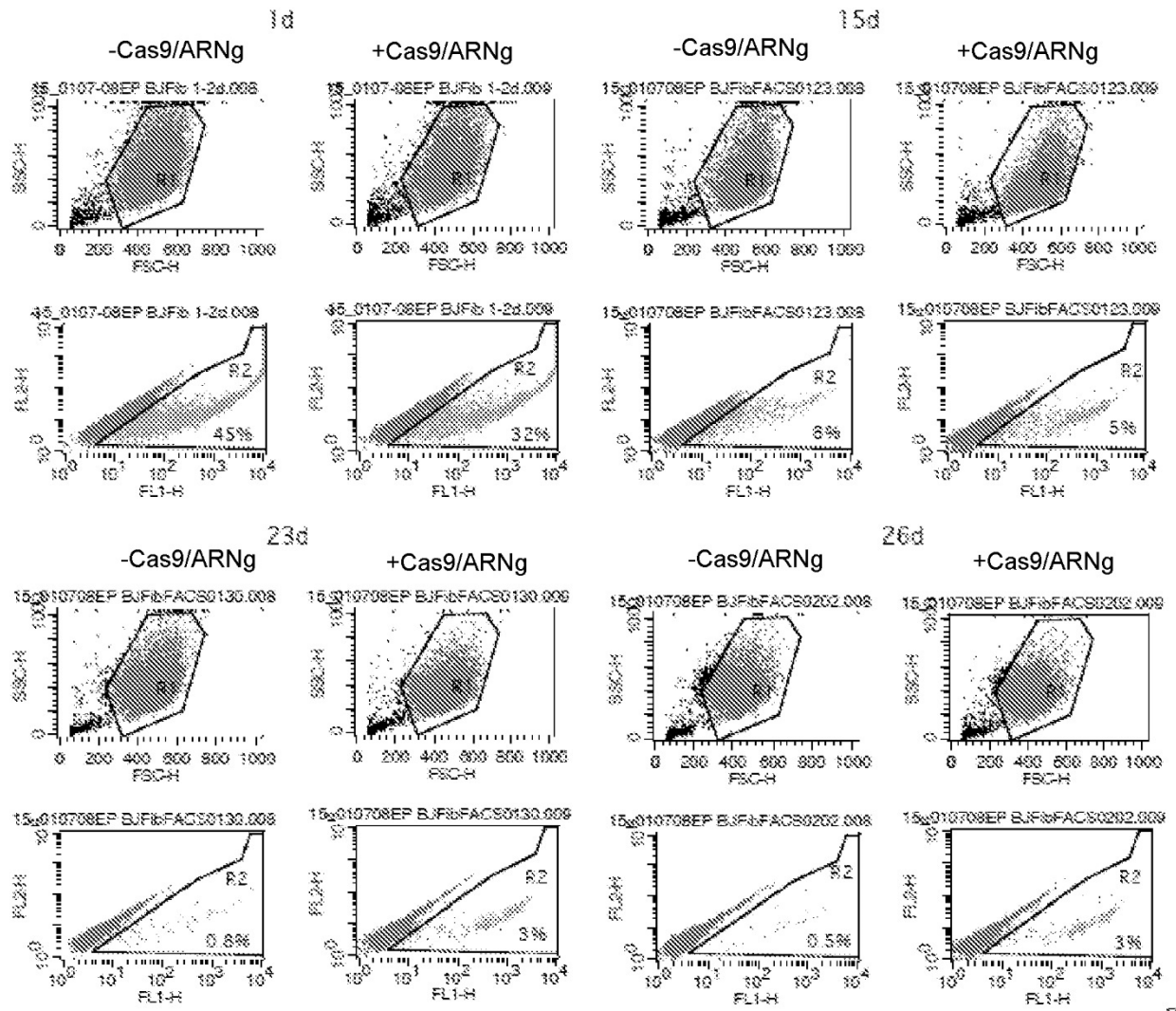
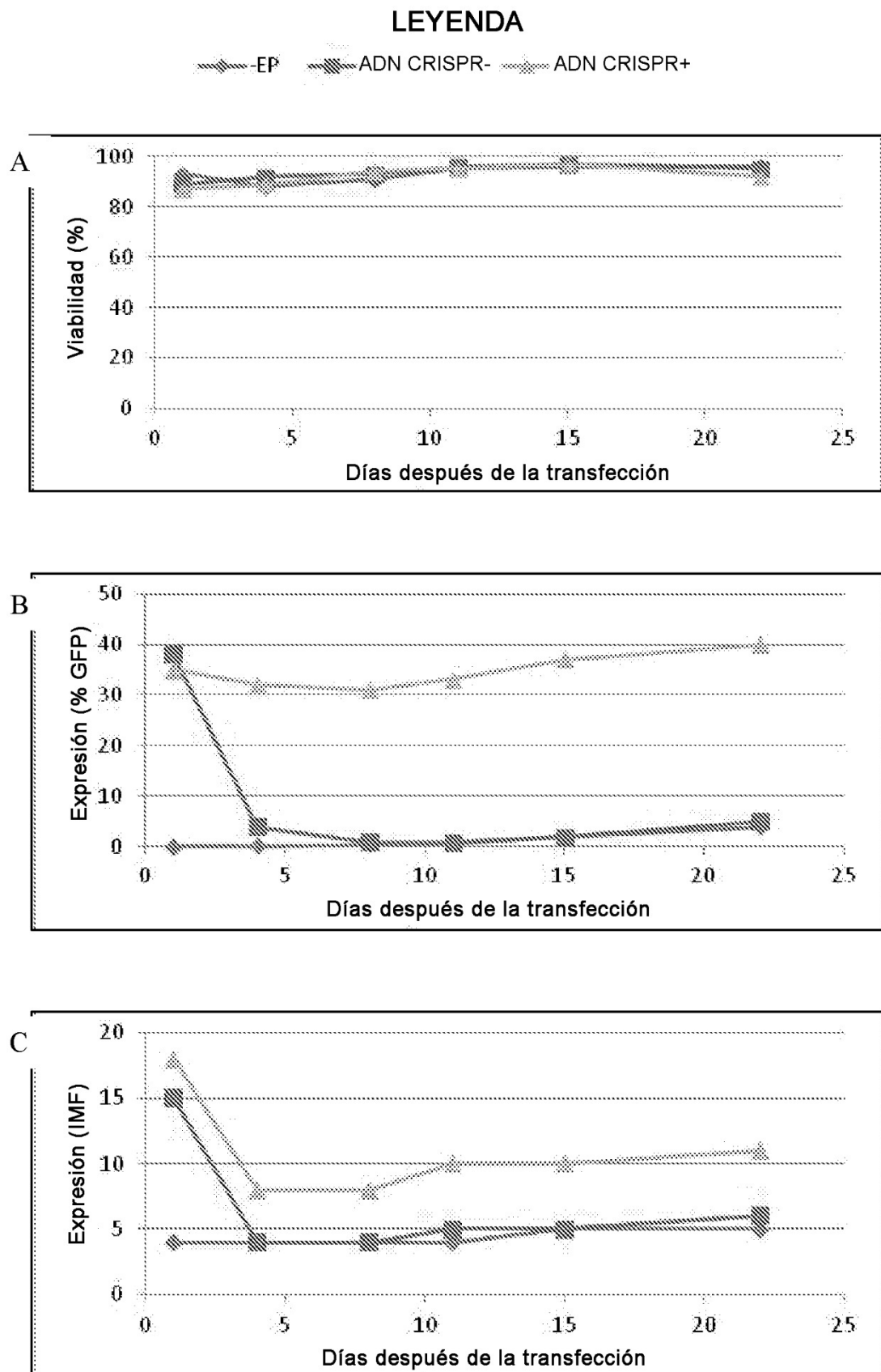
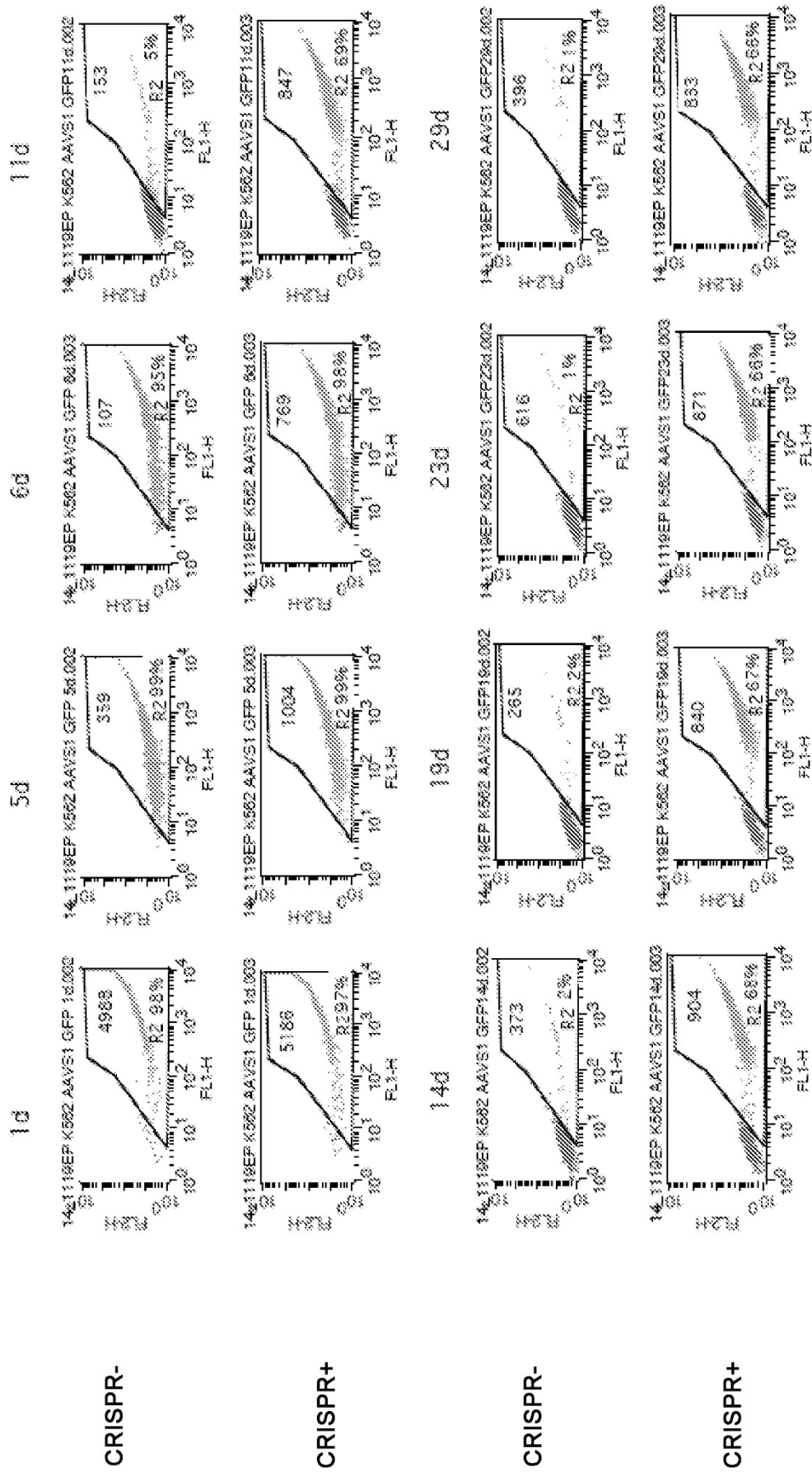


FIG. 12



**FIG. 13A-C**



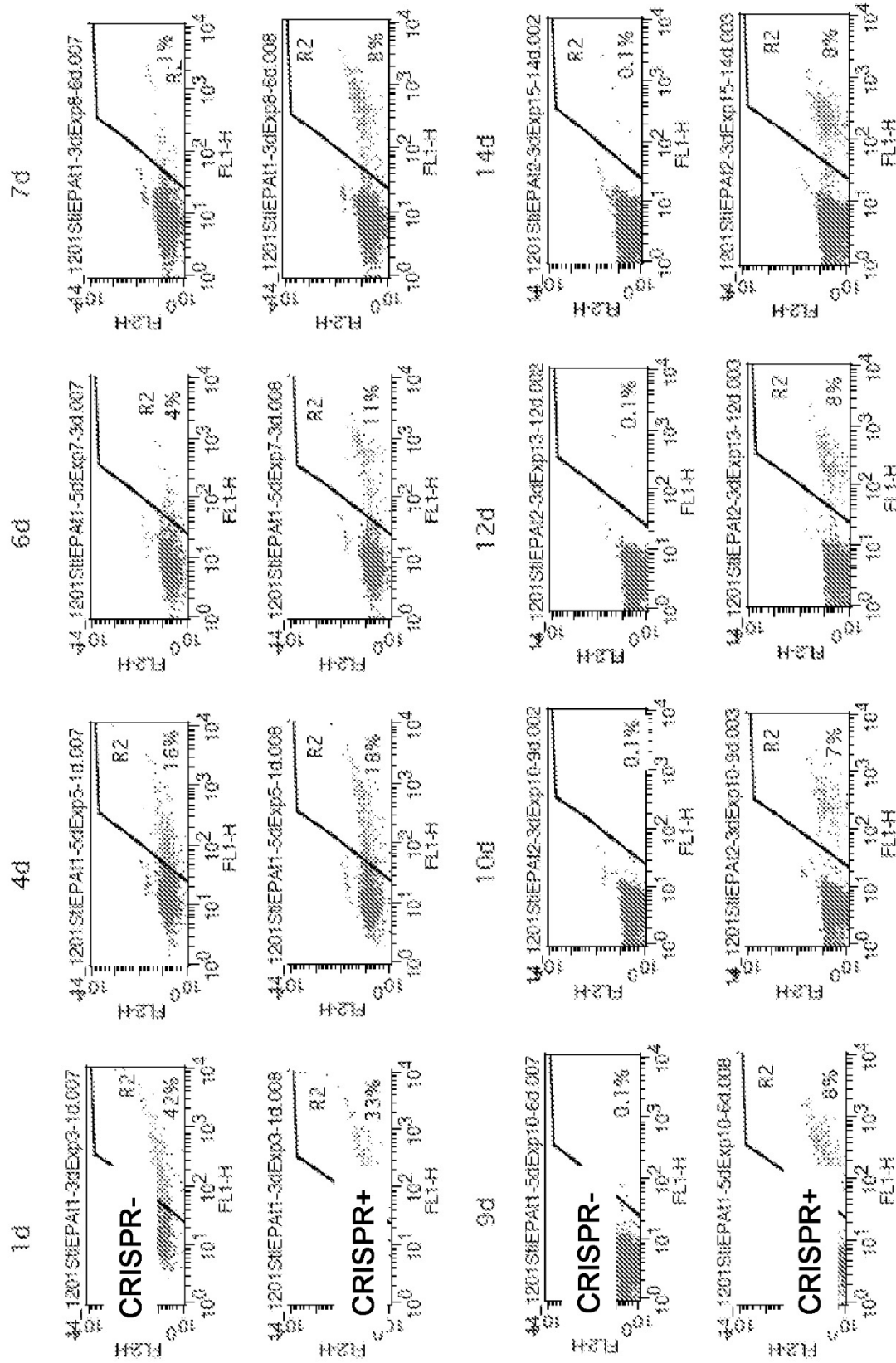


FIG. 15

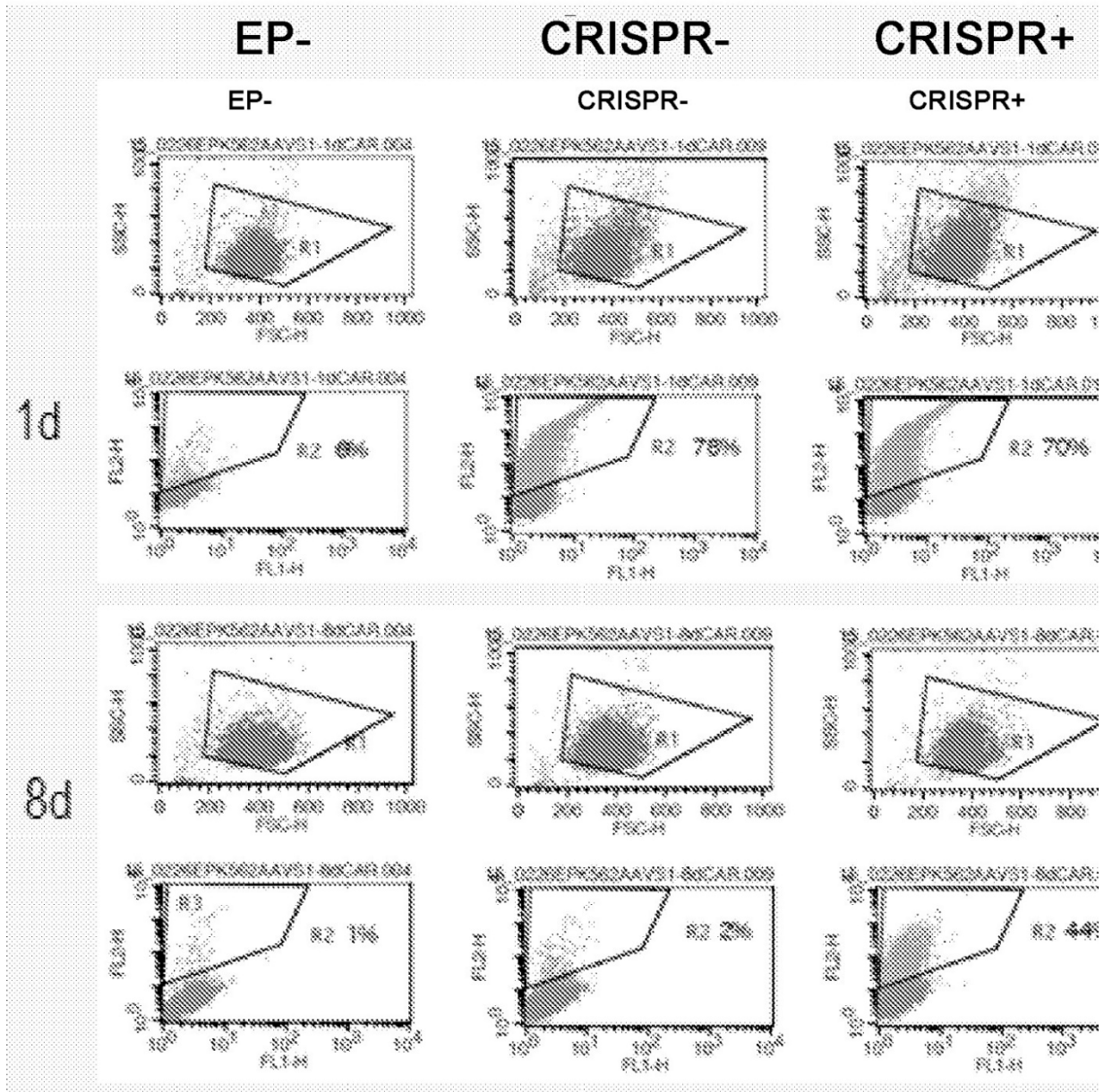


FIG. 16