

MEGANUCLEASAS DISEÑADAS QUE TIENEN ESPECIFICIDAD PARA UNA SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO EN EL GENOMA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B

Campo de la invención

La divulgación se refiere a los campos de la virología, biología molecular y la tecnología de ácido nucleico recombinante. En particular, la divulgación se refiere a meganucleasas diseñadas optimizadas que tienen especificidad por una secuencia de reconocimiento dentro del genoma de los genotipos A-G del virus de la hepatitis B. Estas meganucleasas diseñadas son útiles en métodos para tratar infecciones por el virus de la hepatitis B y enfermedades causadas por el virus de la hepatitis B.

Referencia a un listado de secuencias presentado de forma electrónica como un archivo XML

La solicitud actual contiene un listado de secuencias que se ha presentado en formato XML vía USPTO Patent Center y se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Dicha copia XML creada el 2 de octubre de 2024, se llama "P89339_2030USP3.xml" y tiene un tamaño de 108,321 bytes.

Antecedentes de la invención

El virus de la hepatitis B (HBV) es un importante problema de salud en todo el mundo y más de 350 millones de personas son portadoras crónicas. La infección por HBV es una enfermedad infecciosa grave y común del hígado. La infección crónica se asocia con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades hepáticas graves, incluida la cirrosis hepática y el carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés), una de las formas más comunes de cáncer humano. El riesgo estimado de HCC en portadores crónicos de HBV es aproximadamente 100 veces mayor que en individuos no infectados. Aproximadamente un tercio de la población mundial se ha infectado en algún momento de sus vidas, incluidos 240 millones a 350 millones que tienen infecciones crónicas. Más de 750,000 personas mueren de hepatitis B cada año. Aproximadamente 300,000 de estas muertes se deben al cáncer de hígado. Los fármacos anti-HBV actualmente disponibles tienen limitaciones. Por ejemplo, la administración de interferón alfa se asocia con reacciones adversas graves. Los análogos de nucleósidos son viroestáticos y requieren administración a largo plazo.

El genoma de HBV exhibe variabilidad genética con una tasa estimada de $1.4-3.2 \times 10^{-5}$ sustituciones de nucleótidos por sitio por año. Un gran número de variantes de virus surgen durante la replicación como resultado de incorporaciones erróneas de nucleótidos en ausencia de cualquier capacidad de corrección de errores por parte de la polimerasa viral. Esta variabilidad ha dado como resultado subtipos bien reconocidos del virus. El HBV se ha clasificado en genotipos bien definidos con base en una divergencia intergrupala de 8 % o más en la secuencia genómica completa, cada uno con una distribución geográfica distinta. Por ejemplo, el genotipo A está extendido en el África subsahariana, el norte de Europa y el África occidental; los genotipos B y C son comunes en Asia; el genotipo C se observa principalmente en el sudeste asiático; el genotipo D es dominante en África, Europa, los países

mediterráneos e India; el genotipo G se ha reportado en Francia, Alemania y los Estados Unidos; y el genotipo H se encuentra comúnmente en América Central y del Sur. El genotipo I se ha reportado recientemente en Vietnam y Laos. El genotipo más nuevo de HBV, el genotipo J, se ha identificado en las Islas Ryukyu en Japón.

El HBV es un virus de ADN envuelto que pertenece a la familia Hepadnaviridae. Contiene un genoma pequeño, parcialmente bicatenario (DS), de ADN circular relajado (ADNrc) que se replica mediante transcripción inversa de un intermediario de ARN, el ARN pregenómico (ARNpg). El genoma de ADN circular de HBV es inusual porque el ADN no es completamente bicatenario. Un extremo de la cadena de longitud completa se enlaza a la ADN polimerasa viral. El genoma es de aproximadamente 3020–3320 nucleótidos de longitud (para la cadena de longitud completa) y 1700–2800 nucleótidos de longitud (para la cadena de longitud corta). La cadena de sentido negativo (no codificante) es complementario al ARNm viral.

Hay cuatro genes conocidos codificados por el genoma, denominados C, X, P y S. La proteína central está codificada por el gen C (HBcAg), y su codón de inicio está precedido por un codón de inicio AUG en fase corriente arriba, a partir del cual se produce la proteína pre-central. HBeAg se produce mediante procesamiento proteolítico de la proteína pre-central. La ADN polimerasa está codificada por el gen P. El gen S codifica el antígeno de superficie (HBsAg). El gen HBsAg es un único marco de lectura abierto largo, pero contiene tres codones de "inicio" (ATG) en fase con el marco de lectura que dividen el gen en tres secciones: pre-S1, pre-S2 y S. Debido a los múltiples codones de inicio, se producen polipéptidos de tres tamaños diferentes llamados Grande (el orden desde la superficie hasta el interior: pre-S1/pre-S2/S), Mediano (pre-S2/S) y Pequeño (S). La función de la proteína codificada por el gen X no está del todo comprendida, pero se asocia con el desarrollo de cáncer de hígado. Estimula los genes que promueven el crecimiento celular e inactiva las moléculas reguladoras del crecimiento.

El ADN viral se encuentra en el núcleo poco después de la infección de la célula. El ADN parcialmente bicatenario se convierte en completamente bicatenario al completar la cadena de sentido (+) y eliminar una molécula de proteína de la cadena de sentido (-), así como una secuencia corta de ARN de la cadena de sentido (+). Las bases no codificantes se eliminan de los extremos de la cadena de sentido (-) y los extremos se vuelven a unir.

El ciclo de vida del HBV comienza cuando el virus se adhiere a la célula hospedera y se internaliza. Estudios recientes han demostrado que el polipéptido cotransportador de sodio-taurocolato (NTCP) es un receptor funcional en la infección por HBV. El ADN circular relajado (ADNrc) del virión se transporta al núcleo, donde se repara para formar un ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc). El ADNccc episomal sirve como molde para la transcripción del ARN pregenómico (ARNpg) y los otros ARNm virales por la ADN polimerasa II del hospedero. Los transcritos se exportan luego al citoplasma, donde se produce la traducción de las proteínas virales. La transcriptasa inversa (RT) se une al ARNpg y desencadena el ensamblaje de las proteínas centrales en nucleocápsides inmaduras que contienen

ARN. Luego, las nucleocápsides inmaduras se someten a un proceso de maduración mediante el cual el ARNpg es retrotranscrito por la RT para producir el ADNrc maduro. Una característica única de la retrotranscripción de los hepadnavirus es la iniciación de la síntesis de ADN de la cadena negativa mediante la RT, que conduce al enlace covalente de la RT al extremo 5' del ADN de la cadena negativa.

Las nucleocápsides maduras que contienen ADNrc se envuelven luego por las proteínas de superficie viral y se secretan como viriones (vía de secreción) o, alternativamente, se reciclan de vuelta en el núcleo para amplificar aún más la reserva de ADNccc (vía de reciclaje). La persistencia del ADNccc en los hepatocitos desempeña un papel clave en la persistencia viral, la reactivación de la replicación viral después del cese de la terapia antiviral y la resistencia al tratamiento.

Las endonucleasas *homing* son un grupo de nucleasas de origen natural las cuales reconocen de 15 a 40 sitios de escisión de pares de bases comúnmente encontrados en los genomas de plantas y hongos. A menudo se asocian con elementos de ADN parásitos, como los intrones e inteínas de autoempalme del grupo 1. Promueven naturalmente la recombinación homóloga o la inserción de genes en ubicaciones específicas en el genoma hospedero al producir una ruptura de cadena doble en el cromosoma, que recluta la maquinaria de reparación de ADN celular (Stoddard (2006), Q. Rev. Biophys. 38: 49-95). Las endonucleasas *homing* se agrupan comúnmente en cuatro familias: la familia LAGLIDADG (SEQ ID NO: 2), la familia GIY-YIG, la familia de caja His-Cyst y la familia HNH. Estas familias se caracterizan por motivos estructurales, que afectan la actividad catalítica y la secuencia de reconocimiento. Por ejemplo, los miembros de la familia LAGLIDADG (SEQ ID NO: 2) se caracterizan por tener una o dos copias del motivo LAGLIDADG conservado (véase, Chevalier *et al.* (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774). Las endonucleasas *homing* LAGLIDADG con una sola copia del motivo LAGLIDADG forman homodímeros, mientras que los miembros con dos copias del motivo LAGLIDADG se encuentran como monómeros. Los métodos para producir endonucleasas *homing* son conocidos en la materia.

I-Crel (SEQ ID NO: 1) es un miembro de la familia LAGLIDADG de endonucleasas *homing*, que reconoce y corta una secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases en el cromosoma del cloroplasto del alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Las técnicas de selección genética se han utilizado para modificar la preferencia de sitio de escisión de I-Crel de tipo silvestre (Sussman *et al.* (2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41; Chames *et al.* (2005), Nucleic Acids Res. 33: e178; Seligman *et al.* (2002), Nucleic Acids Res. 30: 3870-9, Arnould *et al.* (2006), J. Mol. Biol. 355: 443-58). Se han descrito métodos para el diseño racional de endonucleasas *homing* mono-LAGLIDADG que son capaces de rediseñar integralmente la I-Crel y otras endonucleasas *homing* para dirigirse a sitios de ADN ampliamente divergentes, incluyendo sitios en genomas de mamíferos, levaduras, plantas, bacterianos y virales (véase, por ejemplo, WO 2007/047859).

Como primero se describió en WO 2009/059195, I-Crel y sus derivados diseñados son normalmente diméricos pero se pueden fusionar en un solo polipéptido utilizando un enlazador peptídico corto que une el C-terminal de una primera subunidad al N-terminal de una segunda subunidad (véase

también Li *et al.* (2009), Nucleic Acids Res. 37:1650-62; Grizot *et al.* (2009), Nucleic Acids Res. 37:5405-19). De esta forma, una meganucleasa de “cadena única” puede ser expresada a partir de un transcrito individual.

Se ha sugerido el uso de meganucleasas diseñadas para el tratamiento de infecciones por HBV. Por ejemplo, WO 2010/136841 sugiere el uso de meganucleasas diseñadas para escindir el genoma de virus que no se integran genómicamente. Estas meganucleasas incluyen variantes de I-Crel dirigidas a secuencias de reconocimiento de meganucleasa de 22 pares de bases que difieren de aquellas descritas en la presente, y que solo están presentes en unos pocos genotipos de HBV.

Los solicitantes divulgaron previamente en PCT/US2017/56638, PCT/US2019/27203 y PCT/US2020/063479 una cantidad de meganucleasas diseñadas que tienen especificidad para secuencias de reconocimiento presentes en el genoma de HBV, que incluyen la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 (SEQ ID NO: 3) que está presente ventajosamente en el genoma de por lo menos los genotipos A-G del HBV.

La presente divulgación mejora las meganucleasas diseñadas previamente descritas en la técnica en varios aspectos. Cuando se genera una endonucleasa para administración terapéutica a un paciente, es fundamental que la especificidad de blanco se potencie (es decir, aumente) en tanto que se reduzca o elimine el corte fuera del blanco dentro del genoma de la célula blanco. Aquí, los solicitantes han desarrollado meganucleasas diseñadas adicionales que se dirigen a la secuencia de reconocimiento HBV 11-12. Las meganucleasas de la presente divulgación tienen secuencias novedosas y únicas que se generaron a través de una extensa experimentación. Además, las meganucleasas descritas en la presente tienen una cantidad de propiedades mejoradas e inesperadas en comparación con las meganucleasas diseñadas previamente divulgadas, que incluyen una reducción significativa del corte fuera del blanco en el genoma de la célula hospedera. En particular, las meganucleasas diseñadas descritas en la presente demuestran una potenciación significativa (es decir, aumento) en la formación de indeles (es decir, inserciones o deleciones dentro del genoma de HBV en el sitio de escisión, indicativo de corte en el blanco) en líneas celulares que comprenden una copia integrada del genoma de HBV. Por lo tanto, las meganucleasas de la divulgación avanzan adicionalmente en la técnica de diversas maneras que son necesarias para el desarrollo de un producto clínico que se dirige a la infección por HBV y al carcinoma hepatocelular relacionado con HBV.

Breve descripción de la invención

En un aspecto, la divulgación proporciona una meganucleasa diseñada que se une y escinde una secuencia de reconocimiento que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 3 dentro del genoma del virus de la hepatitis B (HBV, por sus siglas en inglés), en donde la meganucleasa diseñada comprende una primera subunidad y una segunda subunidad, en donde la primera subunidad se une a un primer medio sitio de reconocimiento de la secuencia de reconocimiento y comprende una primera región hipervariable (HVR1, por sus siglas en inglés) y en donde la segunda subunidad se une a un segundo

medio sitio de reconocimiento de la secuencia de reconocimiento y comprende una segunda región hipervariable (HVR2, por sus siglas en inglés).

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 204 a 259 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97 % de identidad de secuencia con los residuos 204 a 259 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende uno o más residuos correspondientes a los residuos 204, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 220, 222, 224, 226, 248, 250, 255 y 257 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende los residuos que corresponden a los residuos 204, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 220, 222, 224, 226, 248, 250, 255, y 257 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 237 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 241 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 251 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 252 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 253 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende Y, R, K, o D en un residuo correspondiente al residuo 246 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende los residuos 204 a 259 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 187 a 333 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 187 a 333 de la SEQ ID NO: 5 o la

SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 185 a 343 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 185 a 343 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 260 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende G, S o A en un residuo correspondiente al residuo 199 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende E, Q, o K en un residuo correspondiente al residuo 260 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende los residuos 187 a 333 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende los residuos 185 a 343 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 24 a 79 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende uno o más residuos correspondientes a los residuos 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 y 77 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende los residuos que corresponden a los residuos 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75, y 77 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende un residuo correspondiente al residuo 51 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende Y, R, K, o D en un residuo correspondiente al residuo 66 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende los residuos 24 a 79 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que

tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 7 a 153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 7 a 153 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 6 a 153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 6 a 153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 5 a 153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 5 a 153 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad es una subunidad N-terminal y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 4 a 153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 4 a 153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 3 a 153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 3 a 153 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

5 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 2 a 153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6. En
10 algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 2 a 153 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

15 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 1 a 153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

20 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 1 a 153 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 19 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

25 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 80 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 96 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

30 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 99 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 100 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende G, S, o A en un residuo correspondiente al residuo 19 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

35 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende E, Q, o K en un residuo correspondiente al residuo 80 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 7 a 153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 6 a153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

5 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 5 a153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 4 a153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 3 a153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

10 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 2 a153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 1 a153 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

15 En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada es una meganucleasa de cadena sencilla que comprende un enlazador y en donde el enlazador une covalentemente la primera subunidad y la segunda subunidad.

En algunas modalidades, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 16.

20 En algunas modalidades, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15.

En algunas modalidades, el extremo N-terminal del enlazador se fusiona al residuo (es decir, un residuo D) correspondiente al residuo 153 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, y el extremo C-terminal del enlazador se fusiona al residuo (es decir, un residuo Y) correspondiente al residuo 185 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

25 En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una primera subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 187 a 333 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6; un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, en donde el enlazador se une covalentemente a la primera subunidad y la segunda subunidad; y una segunda subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 7 a 153 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

30 En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una primera subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 185 a 343 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6; un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, en donde el enlazador se une covalentemente a la primera subunidad y la segunda subunidad; y una segunda subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 1 a 153 de SEQ

ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 4 a 343 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia con los residuos 4 a 343 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 3 a 343 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En ciertas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia con los residuos 3 a 343 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 2 a 343 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia con los residuos 2 a 343 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En ciertas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos de los residuos 4 a 343 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos

de los residuos 3 a 343 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos de los residuos 2 a 343 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada está codificada por una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada está codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una señal de localización nuclear.

En algunas modalidades, la señal de localización nuclear se encuentra en el extremo N-terminal de la meganucleasa diseñada.

En algunas modalidades, la señal de localización nuclear se encuentra en el extremo C-terminal de la meganucleasa diseñada.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una primera señal de localización nuclear en el extremo N-terminal y una segunda señal de localización nuclear en el extremo C-terminal.

En algunas modalidades, la señal de localización nuclear comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, la señal de localización nuclear comprende la SEQ ID NO: 17.

En ciertas modalidades, la señal de localización nuclear comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 65. En algunas modalidades, la secuencia de localización nuclear comprende la SEQ ID NO: 65.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de localización nuclear N-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17, y una secuencia de localización nuclear C-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% o al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de localización nuclear N-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17 y una secuencia de localización nuclear C-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de localización nuclear N-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17, y una secuencia de localización nuclear C-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 65.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de localización nuclear N-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17 y una secuencia de localización nuclear C-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 65.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de localización nuclear N-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 65, y una secuencia de localización nuclear C-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% o al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de localización nuclear N-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 65 y una secuencia de localización nuclear C-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de localización nuclear N-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 65, y una secuencia de localización nuclear C-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 65.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de localización nuclear N-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 65 y una secuencia de localización nuclear C-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 65.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una meganucleasa diseñada descrita en la presente para usarse como un medicamento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una región no traducida (UTR) 5' ALB que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia

con SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 82. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una región no traducida (UTR) 5' ALB que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 82.

5 En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una UTR 3' SNRPB que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 83. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una UTR 3' SNRPB que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 83.

10 En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de terminación. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de terminación de poliA. En algunas modalidades, la secuencia de terminación de poliA comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, la secuencia de terminación de poli A comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 20.

15 En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de Kozak. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de Kozak que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 21 o la SEQ ID NO: 84.

En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada está empobrecida en timidina o uridina.

20 En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada está optimizada en codones para la expresión hepática.

En algunas modalidades, el polinucleótido es un ARNm.

25 En algunas modalidades, el ARNm comprende: (a) una UTR 5' ALB que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 82; (b) la secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada, en donde la secuencia de ácido nucleico está empobrecida en uridina y optimizada en codones para la expresión hepática; (c) una UTR 3' SNRPB que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 83; y (d) una secuencia de terminación de poliA.

30 En algunas modalidades, el ARNm comprende: (a) una UTR 5' ALB que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 82; (b) una secuencia de Kozak que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 84; (c) la secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada, en donde la secuencia de ácido nucleico está empobrecida en uridina y optimizada en codones para la expresión hepática; (d) una UTR 3' SNRPB que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 83; y (e) una secuencia de terminación de poliA.

35 En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al

En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en

la SEQ ID NO: 74. En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 75. En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 76. En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 77. En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 78. En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 79. En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 80. En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 81.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente para usarse como un medicamento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un constructo de ADN recombinante que comprende un polinucleótido descrito en la presente (es decir, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente).

En algunas modalidades, el constructo de ADN recombinante es un ADN plasmídico.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende: (a) una región no traducida (UTR) 5' ALB que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 18; (b) la secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada; (c) una UTR 3' SNRPB que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 19; y (d) una secuencia de terminación de poliA. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico está empobrecida en timidina y optimizada en codones para la expresión hepática.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende: (a) una UTR 5' ALB que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 18; (b) una secuencia de Kozak que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 21; (c) la secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada; (d) una UTR 3' SNRPB que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 19; y (e) una secuencia de terminación de poliA. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico está empobrecida en timidina y optimizada en codones para la expresión hepática.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 66. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 66. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 67. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 68. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 69. En

algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 70. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 72. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 73. En algunas modalidades, el constructo de ADN recombinante codifica un virus recombinante que comprende el polinucleótido. En algunas modalidades, el virus recombinante es un adenovirus recombinante, un lentivirus recombinante, un retrovirus recombinante o un virus adeno-asociado recombinante (AAV). En algunas modalidades, el virus recombinante es un AAV recombinante.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende un promotor enlazado operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada. En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de hígado.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un constructo de ADN recombinante que comprende un polinucleótido descrito en la presente (es decir, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente) para usarse como un medicamento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un virus recombinante que comprende un polinucleótido descrito en la presente (es decir, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente).

En algunas modalidades, el virus recombinante es un adenovirus recombinante, un lentivirus recombinante, un retrovirus recombinante o un AAV recombinante. En algunas modalidades, el virus recombinante es un AAV recombinante.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende un promotor enlazado operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada. En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de hígado.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un virus recombinante que comprende un polinucleótido descrito en la presente (es decir, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente) para usarse como un medicamento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición de nanopartículas lipídicas que comprende nanopartículas lipídicas que comprenden un polinucleótido descrito en la presente (es decir, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente).

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición de nanopartículas lipídicas descrita en la presente para usarse como un medicamento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una meganucleasa diseñada descritos en la presente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polinucleótido descrito en la presente (es decir, que

comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente).

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un constructo de ADN recombinante descrito en la presente (es decir, que comprende un polinucleótido descrito en la presente).

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un virus recombinante descrito en la presente (es decir, que comprende un polinucleótido descrito en la presente).

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una composición de nanopartículas lipídicas descritos en la presente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica descrita en la presente para usarse como un medicamento.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona una célula hospedera que comprende un polinucleótido descrito en la presente (es decir, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente).

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para inactivar un gen de polimerasa (pol) de un genoma de HBV o un fragmento de genoma de HBV, el método que comprende introducir en una
20 célula eucariota que comprende el genoma de HBV o fragmento de genoma de HBV: (a) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente, en donde la meganucleasa diseñada se expresa en la célula eucariota; o (b) una meganucleasa diseñada descrita en la presente; en donde la meganucleasa diseñada produce un sitio de escisión en la secuencia de reconocimiento que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 3
dentro del gen pol, en donde el gen pol se inactiva mediante la introducción de una inserción o delección
25 (indel) en el sitio de escisión, o en donde el gen pol se inactiva mediante la eliminación del genoma de HBV o el fragmento de genoma de HBV.

En algunas modalidades, el genoma de HBV o el fragmento de genoma de HBV está comprendido por ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc). En algunas modalidades, el ADNccc
30 se elimina después de la generación del sitio de escisión. En algunas modalidades, el gen pol se inactiva en el ADNccc mediante la introducción del indel en el sitio de escisión. En algunas modalidades, el indel se introduce mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ). En algunas modalidades, el gen pol inactivado no codifica una proteína polimerasa de HBV activa y/o de longitud completa.

En algunas modalidades, el genoma de HBV o el fragmento de genoma de HBV está
35 comprendido en el genoma de la célula eucariota. En algunas modalidades, el genoma es el genoma nuclear. En algunas modalidades, el genoma es el genoma mitocondrial. En algunas modalidades, el indel se introduce mediante NHEJ. En algunas modalidades, el gen pol inactivado no codifica una proteína polimerasa de HBV activa y/o de longitud completa.

En algunas modalidades, el método inactiva un gen de antígeno S de HBV (HBsAg) en el genoma de HBV o el fragmento de genoma de HBV.

En algunas modalidades, la célula eucariota es una célula humana. En algunas modalidades, la célula humana es una célula hepática. En algunas modalidades, la célula hepática es un hepatocito.

En algunas modalidades, el polinucleótido es un polinucleótido descrito en la presente (es decir, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente).

En algunas modalidades, el polinucleótido se introduce en la célula eucariota mediante un ARNm o un virus recombinante.

En algunas modalidades, el ARNm es un ARNm descrito en la presente. En algunas modalidades, el ARNm se introduce en la célula eucariota poniendo en contacto la célula eucariota con una nanopartícula lipídica que comprende el ARNm.

En algunas modalidades, el virus recombinante es un virus recombinante descrito en la presente. En algunas modalidades, el virus recombinante es un AAV recombinante. En algunas modalidades, el AAV recombinante tiene un serotipo de AAV8.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para inactivar un gen pol de un genoma de HBV o un fragmento de genoma de HBV en una célula blanco en un sujeto, el método que comprende administrar a la célula blanco que comprende el genoma de HBV o fragmento de genoma de HBV: (a) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente, en donde la meganucleasa diseñada se expresa en la célula blanco; o (b) una meganucleasa diseñada descrita en la presente; en donde la meganucleasa diseñada produce un sitio de escisión en la secuencia de reconocimiento que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 3 dentro del gen pol, en donde el gen pol se inactiva mediante la introducción de un indel en el sitio de escisión, o en donde el gen pol se inactiva mediante la eliminación del genoma de HBV o el fragmento de genoma de HBV.

En algunas modalidades, el genoma de HBV o el fragmento de genoma de HBV está comprendido por ADNccc. En algunas modalidades, el ADNccc se elimina después de la generación del sitio de escisión. En algunas modalidades, el gen pol se inactiva en el ADNccc mediante la introducción del indel en el sitio de escisión. En algunas modalidades, el indel se introduce mediante NHEJ. En algunas modalidades, el gen pol inactivado no codifica una proteína polimerasa de HBV activa y/o de longitud completa.

En algunas modalidades, el genoma de HBV o el fragmento de genoma de HBV está comprendido en el genoma de la célula blanco. En algunas modalidades, el genoma es el genoma nuclear. En algunas modalidades, el genoma es el genoma mitocondrial. En algunas modalidades, el indel se introduce mediante NHEJ. En algunas modalidades, el gen pol inactivado no codifica una proteína polimerasa de HBV activa y/o de longitud completa.

En algunas modalidades, el método inactiva un gen de HBsAg en el genoma de HBV o el

fragmento de genoma de HBV. En algunas modalidades, la concentración sérica de HBsAg se reduce en el sujeto.

En algunas modalidades, la célula blanco es una célula hepática. En algunas modalidades, la célula hepática es un hepatocito.

En algunas modalidades, el polinucleótido es un polinucleótido descrito en la presente (es decir, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente).

En algunas modalidades, el polinucleótido es un ARNm o está comprendido en el genoma de un virus recombinante.

En algunas modalidades, el ARNm es un ARNm descrito en la presente. En algunas modalidades, el ARNm se administra a la célula blanco usando una nanopartícula lipídica que comprende el ARNm. En algunas modalidades, el polinucleótido se administra a la célula blanco usando un virus recombinante descrito en la presente que comprende el polinucleótido en su genoma. En algunas modalidades, el virus recombinante es un virus recombinante descrito en la presente. En algunas modalidades, el virus recombinante es un AAV recombinante. En algunas modalidades, el AAV recombinante tiene un serotipo de AAV8.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar una infección por HBV o una enfermedad asociada con infección por virus de la hepatitis B, el método que comprende administrar a una célula blanco en el sujeto: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente, en donde la meganucleasa diseñada se expresa en la célula blanco; o (b) una cantidad terapéuticamente eficaz de una meganucleasa diseñada descrita en la presente; en donde la célula blanco comprende un genoma de HBV o fragmento de genoma de HBV que comprende un gen pol, en donde la meganucleasa diseñada produce un sitio de escisión en una secuencia de reconocimiento que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 3 dentro del gen pol, en donde el gen pol se inactiva mediante la introducción de un indel en el sitio de escisión, o en donde el gen pol se inactiva mediante la eliminación del genoma de HBV o el fragmento de genoma de HBV.

En algunas modalidades, la enfermedad es hepatitis B crónica. En algunas modalidades, la enfermedad es carcinoma hepatocelular. En algunas modalidades, la enfermedad es cirrosis

En algunas modalidades, el genoma de HBV o el fragmento de genoma de HBV está comprendido por ADNccc. En algunas modalidades, el ADNccc se elimina después de la generación del sitio de escisión. En algunas modalidades, el gen pol se inactiva en el ADNccc mediante la introducción del indel en el sitio de escisión. En algunas modalidades, el indel se introduce mediante NHEJ. En algunas modalidades, el gen pol inactivado no codifica una proteína polimerasa de HBV activa y/o de longitud completa.

En algunas modalidades, el genoma de HBV o el fragmento de genoma de HBV está comprendido en el genoma de la célula blanco. En algunas modalidades, el genoma es el genoma

nuclear. En algunas modalidades, el genoma es el genoma mitocondrial. En algunas modalidades, el indel se introduce mediante NHEJ. En algunas modalidades, el gen pol inactivado no codifica una proteína polimerasa de HBV activa y/o de longitud completa. En algunas modalidades, el método

5 inactiva un gen de HBsAg en el genoma de HBV o el fragmento de genoma de HBV.

En algunas modalidades, la concentración sérica de HBsAg se reduce en el sujeto.

En algunas modalidades, la célula blanco es una célula hepática. En algunas modalidades, la célula hepática es un hepatocito.

En algunas modalidades, el polinucleótido es un polinucleótido descrito en la presente (es decir,

10 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente). En algunas modalidades, el polinucleótido es un ARNm o está comprendido en el genoma de un virus recombinante. En algunas modalidades, el ARNm es un ARNm descrito en la presente. En algunas modalidades, el ARNm se administra a la célula blanco usando una nanopartícula lipídica que comprende el ARNm. En algunas modalidades, el polinucleótido se administra a la célula blanco usando

15 un virus recombinante descrito en la presente que comprende el polinucleótido en su genoma. En algunas modalidades, el virus recombinante es un virus recombinante descrito en la presente. En algunas modalidades, el virus recombinante es un AAV recombinante. En algunas modalidades, el AAV recombinante tiene un serotipo de AAV8.

En algunas modalidades, al sujeto también se le administran uno, dos, tres, cuatro o más

20 agentes terapéuticos adicionales seleccionados de fármacos combinados para HBV, vacunas contra el HBV, inhibidores de la ADN polimerasa del HBV, inmunomoduladores, moduladores del receptor tipo toll (TLR), ligandos del receptor de interferón alfa, inhibidores de hialuronidasa, inhibidores de antígenos del HBV (por ejemplo, inhibidores del antígeno del núcleo del HBV (HBcAg), inhibidores del antígeno de superficie del HBV (HBsAg), inhibidores de HBx, inhibidores del antígeno E del HBV), anticuerpos contra

25 antígenos del HBV, ácidos nucleicos inhibidores dirigidos al HBV (por ejemplo, oligonucleótido antisentido, ARN interferente pequeño (ARNip), interferencia de ARN dirigida por ADN (ddRNAi)), inhibidores de la secreción o ensamblaje de HBsAg, inhibidores de entrada viral del HBV, inhibidores de puntos de control inmunitario, inhibidores de la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4), inhibidores de ciclofilina, moduladores de endonucleasa, inhibidores de la ribonucleótido reductasa,

30 inhibidores del ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc), agonistas del receptor X farnesoide (FXR), agonistas de STING, anticuerpos anti-HBV, antagonistas de quimiocinas CCR2, agonistas de timosina, citocinas, moduladores de nucleoproteínas, estimuladores del gen 1 inducible por ácido retinoico, estimuladores de NOD2, inhibidores de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), inhibidores de la vía de la indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), inhibidores de PD-1, inhibidores de PD-L1, timosina alfa-

35 1 recombinante, inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton (BTK), inhibidores de KDM, inhibidores de la replicación del HBV, inhibidores de arginasa, terapia génica y terapia celular, editores génicos, terapia celular y terapia de células TCR-T.

En algunas modalidades, al sujeto también se le administran uno, dos, tres, cuatro o más

agentes terapéuticos adicionales seleccionados de inhibidores de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), modulador de apolipoproteína A1, inhibidores de arginasa, inhibidores del atenuador de linfocitos B y T, inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton (BTK), antagonista de quimiocinas CCR2, inhibidores de CD137, inhibidores de CD160, inhibidores de CD305, agonista y modulador de CD4, compuestos dirigidos al antígeno del núcleo de la hepatitis B (HBcAg), moduladores alostéricos de la proteína central, inhibidores del ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc), inhibidores de ciclofilina, inhibidores de la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4), inhibidor de ADN polimerasa, moduladores de endonucleasa, modificadores epigenéticos, agonistas del receptor X farnesoide (FXR), inhibidores de la ADN polimerasa del HBV, inhibidores de la replicación del HBV, inhibidores de ARNasa del HBV, inhibidores de entrada viral del HBV, inhibidores de HBx, modulador de la proteína de envoltura grande de la hepatitis B, estimulador de la proteína grande de envoltura de la hepatitis B, modulador de proteína estructural de la hepatitis B, inhibidores del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), inhibidores de la secreción o ensamblaje del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), inhibidores del antígeno E del virus de la hepatitis B, inhibidores de la replicación del virus de la hepatitis B, inhibidor de proteína estructural del virus de la hepatitis, inhibidor de la transcriptasa inversa del VIH-1, inhibidor de hialuronidasa, inhibidores de proteínas de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), agonista de IL-2, agonista de IL-7, inmunomoduladores, inhibidores de indoleamina-2, inhibidores de la ribonucleótido reductasa, ligando de interleucina-2, inhibidores de ipi4, inhibidores de lisina desmetilasa, inhibidores de histona desmetilasa, inhibidores de KDM1, inhibidores de KDM5, inhibidores del miembro 1 de la subfamilia G del receptor tipo lectina de células asesinas naturales, inhibidores del gen 3 de activación de linfocitos, activadores del receptor beta de linfoxina, moduladores de Axl, moduladores de B7-H3, moduladores de B7-H4, moduladores de CD160, moduladores de CD161, moduladores de CD27, moduladores de CD47, moduladores de CD70, moduladores de GITR, moduladores de HVEM, moduladores de ICOS, moduladores de Mer, moduladores de NKG2A, moduladores de NKG2D, moduladores de OX40, moduladores de SIRPalpha, moduladores de TIGIT, moduladores de Tim-4, moduladores de Tyro, inhibidores del polipéptido cotransportador de taurocolato dependiente de sodio (Na⁺) (NTCP), inhibidores del receptor 2B4 de células asesinas naturales, estimulador del gen NOD2, inhibidor de nucleoproteína, moduladores de nucleoproteínas, agonista de receptor OX-40, inhibidores de PD-1, inhibidores de PD-L1, inhibidor de peptidilprolil isomerasa, inhibidores de fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), estimulador de gen 1 inducible por ácido retinoico, inhibidor de transcriptasa inversa, inhibidor de ribonucleasa, inhibidor de ARN/ADN polimerasa, inhibidor de gen SLC10A1, miméticos de SMAC, inhibidor de tirosina cinasa Src, agonistas del estimulador de genes de interferón (STING), estimuladores de NOD1, inhibidor de glicoproteína CD28 de superficie de células T, modulador de glicoproteína de superficie de células T CD8, agonista de timosina, ligando de timosina alfa 1, inhibidores de Tim-3, agonistas de TLR-3, agonistas de TLR-7, agonistas de TLR-9, estimulador de gen TLR9, moduladores de receptor de tipo toll (TLR) e inhibidor de ribonucleótido reductasa viral.

En algunas modalidades, al sujeto también se le administra un antiviral o un modulador

inmunitario. En algunas modalidades, al sujeto también se le administra uno o más productos farmacéuticos seleccionados de tenofovir disoproxil, tenofovir alafenamida, entecavir, bulevirtida, telbivudina, adefovir dipivoxilo, lamivudina, interferón pegilado e interferón alfa.

5

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. secuencia de reconocimiento HBV 11-12 en el gen de HBV. La secuencia de reconocimiento HBV 11-12, como blanco específico de las meganucleasas diseñadas de la presente divulgación, comprende dos medios sitios de reconocimiento. Cada medio sitio de reconocimiento comprende 9 pares de bases, separados por una secuencia central de 4 pares de bases. La secuencia de reconocimiento HBV 11-12 (SEQ ID NO: 3) comprende dos medios sitios de reconocimiento denominados HBV11 y HBV12.

Figura 2. Las meganucleasas diseñadas de la presente divulgación comprenden dos subunidades, en donde la primera subunidad que comprende la región HVR1 se une a un primer medio sitio de reconocimiento (por ejemplo, HBV11) y la segunda subunidad que comprende la región HVR2 se une a un segundo medio sitio de reconocimiento (por ejemplo, HBV12). En modalidades en las que la meganucleasa diseñada es una meganucleasa de cadena sencilla, la primera subunidad que comprende la región HVR1 se puede posicionar como la subunidad N-terminal o C-terminal. Asimismo, la segunda subunidad que comprende la región HVR2 se puede posicionar como subunidad N-terminal o C-terminal.

20

Figura 3. Alineamiento de las meganucleasas diseñadas HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2), HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2) y HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1.

Figura 4A a Figura 4E. Resultados de un ensayo de células CHO reporteras que evalúa la actividad de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 parental y variantes de HBV 11-12L.1090 que comprenden Enlazador1923 (Figura 4A), Enlazador1766 (Figura 4B), Enlazador1771 (Figura 4C), Enlazador1808 (Figura 4D) y Enlazador1814 (Figura 4E), con y sin diversas combinaciones de modificaciones de aminoácidos en las subunidades N-terminal y C-terminal, con respecto a los controles simulados y CHO 23-24.

25

Figura 5A a Figura 5B. Proporciona una gráfica de barras que muestra la formación de indel por las meganucleasas diseñadas HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) y HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1 en células HepG2-sAg a los 2 días (Figura 5A) y a los 6 días (Figura 5B).

30

Figura 6. Proporciona una gráfica de barras que muestra el porcentaje de indeles mediante ddPCR el día 2 y el día 6 a una dosis de 100 ng y 10 ng de la meganucleasa HBV11-12L.1090 que tiene ya sea Enlazador 1 o Enlazador 1923. Las meganucleasas que tienen la denotación Max 1.0 utilizaron el vector pRNA6 y no incluyen el empobrecimiento de uridina en la secuencia codificante de ARN y las que contienen Max 2.0 utilizaron un vector pRNA8 que sí incluyó el empobrecimiento de uridina.

35

Figura 7A a Figura 7F. Proporciona gráficas de líneas que muestran el porcentaje de inhibición de indeles y HBsAg para las meganucleasas indicadas en D2, D6 y D9 después de la transfección a

una dosis de 1 ng, 10 ng o 100 ng. En cada figura, se probaron cuatro meganucleasas diferentes. La primera meganucleasa fue una meganucleasa HBV 11-12L.1090 con el Enlazador 1923 etiquetado como QQ-Enlazador1923(1/2). La segunda meganucleasa probada fue una meganucleasa HBV11-12L.1090 con Enlazador1 etiquetado como QQ-Enlazador 1. La tercera meganucleasa probada fue la meganucleasa HBV11-12L.1090 con una mutación de glutamina (Q) a ácido glutámico (E) en una posición correspondiente a la posición 80 de I-Crel en la subunidad C-terminal con Enlazador1923 indicada como QE-Enlazador 1923(1/2). La cuarta meganucleasa probada fue la meganucleasa HBV11-12L.1090 con la misma mutación QE pero con Enlazador1 indicado como QE-Enlazador 1. También se muestra un control de mCherry a una dosis de transfección de 100 ng. La Figura 7A, la Figura 7C y la Figura 7E proporcionan el porcentaje de indeles en células HepG2-sAg transfectadas con 1 ng, 10 ng o 100 ng de ARN de cada una de las meganucleasas indicadas, respectivamente. La Figura 7B, la Figura 7D y la Figura 7F proporcionan el porcentaje de inhibición de HBsAg en células HepG2-sAg transfectadas con 1 ng, 10 ng o 100 ng de ARN de cada una de las meganucleasas indicadas, respectivamente.

Figura 8A y Figura 8B. Proporciona gráficas de curva de respuesta a la dosis para el porcentaje de indeles (Figura 8A) o de inhibición de HBsAg (Figura 8B) en células HepG2-sAg transfectadas con la meganucleasa HBV11-12L.1090 QQ-Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QQ-Enlazador1923 (1/2)) o la meganucleasa HBV11-12L.1090 QE-Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QE-Enlazador1923(1/2)). También se proporcionan los valores de EC_{50} y EC_{90} basados en estas curvas para cada meganucleasa para indeles o HBsAg.

Figura 9. Proporciona una gráfica que representa los resultados de un ensayo de captura de oligo para identificar el corte fuera del blanco inducido por la meganucleasa HBV11-12L.1090 QE-Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QE-Enlazador1923 (1/2)), la meganucleasa HBV11-12L.1090 QQ-Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QQ-Enlazador1923 (1/2)) o un control de oligo. El experimento se realizó por triplicado y los puntos rodeados con un círculo indican el sitio en el blanco.

Figura 10A a Figura 10D. Proporciona gráficas de barras que muestran los resultados de un ensayo de MTA ejecutado a partir de células HepG2-sAg transfectadas con las meganucleasas indicadas. La Figura 10A proporciona los resultados de MTA de células HepG2-sAg transfectadas con la meganucleasa HBV11-12L.1090QQ Enlazador1. La Figura 10B proporciona los resultados de MTA de células HepG2-sAg transfectadas con la meganucleasa HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2). La Figura 10C proporciona los resultados de MTA de células HepG2-sAg transfectadas con la meganucleasa HBV11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2). La Figura 10D proporciona los resultados combinados de los ensayos de MTA para cada una de las meganucleasas que muestran el % de edición del sitio blanco en comparación con el sitio fuera del blanco superior. En cada figura, la barra gris resalta el porcentaje de edición en el sitio en el blanco y las barras negras indican los sitios fuera del blanco en un límite de detección (LOD) > 0.2 %.

Figura 11A a Figura 11C. Proporciona gráficas de barras que muestran los resultados de un

ensayo de MTA ejecutado a partir de células HepG2sAg o PHH sin tratamiento previo transfectadas con meganucleasas HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1 (etiquetado como QQ Enlazador1), HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) (etiquetado como QQ Enlazador 1923(1/2), o HBV11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2) (etiquetado como QE Enlazador 1923(1/2)) y el porcentaje de edición en el sitio blanco (barras negras) o sitios fuera del blanco (barras grises). La Figura 11A muestra los resultados en el blanco y fuera del blanco para las meganucleasas indicadas transfectadas en células HepG2sAg a una curva de dosis limitada de 1 ng, 10 ng y 100 ng. La Figura 11B muestra los resultados en el blanco y fuera del blanco para las meganucleasas indicadas transfectadas en células HepG2sAg a la dosis de EC₅₀ o EC₉₀ utilizando el ensayo de MTA de amplicones fuera del blanco o ensayo de MTA de amplicones en el blanco. La Figura 11C muestra los resultados en el blanco y fuera del blanco para las meganucleasas indicadas transfectadas en células PHH sin tratamiento previo, que no albergan el sitio blanco HBV 11-12 en una curva de dosis limitada de 5 ng, 50 ng o 500 ng seis días después de la transfección.

Figura 12A y Figura 12B. Proporciona una gráfica de barras que muestra el porcentaje de indeles mediante ddPCR el día 3 y el día 6 en células Huh-1 Dex (Figura 12A) o células HepG2 (Figura 12B) transfectadas a una dosis de 100 ng, 10 ng o 1 ng y 10 ng de la meganucleasa HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2) (etiquetada como HBV11-12L.1090 QQ). También se muestra un control simulado y de mCherry.

Figura 13A y Figura 13B. Proporciona una gráfica de barras que muestra el porcentaje de indeles mediante ddPCR el día 3 y el día 6 de células Huh-1 Dex (Figura 13A) o células HepG2 (Figura 13B) transfectadas a una dosis de 100 ng, 10 ng o 1 ng de la meganucleasa HBV11-12L.1090QE Enlazador 1923(1/2) (marcada como HBV11-12L.1090 QE). También se muestra un control simulado y de mCherry.

Figura 14A y Figura 14B. Proporciona una gráfica de barras que muestra el nivel en UI/mL de HBsAg el día 3 y el día 6 en células Huh-1 Dex (Figura 14A) o células HepG2 (Figura 14B) transfectadas a una dosis de 100 ng, 10 ng o 1 ng de la meganucleasa HBV11-12L.1090QQ Enlazador 1923(1/2) (etiquetada como HBV11-12L.1090 QQ). También se muestra un control simulado y de mCherry.

Figura 15A y Figura 15B. Proporciona una gráfica de barras que muestra el nivel en UI/mL de HBsAg el día 3 y el día 6 en células Huh-1 Dex (Figura 15A) o células HepG2 (Figura 15B) transfectadas a una dosis de 100 ng, 10 ng o 1 ng y 10 ng de la meganucleasa HBV11-12L.1090QE Enlazador 1923(1/2) (etiquetada como HBV11-12L.1090 QE). También se muestra un control simulado y de mCherry.

Figura 16A a Figura 16F. Proporciona gráficas de barras que muestran el porcentaje de inhibición de HBsAg (Figura 16A), inhibición de ADN de HBV (Figura 16B), inhibición de ARN de HBV (Figura 16C), inhibición de HBeAg (Figura 16D), inhibición de ADNccc (Figura 16E) y porcentaje de viabilidad celular (Figura 16F) en células PHH infectadas con 800 GE/célula de HBV serotipo B y transfectadas los días 3 y 6 después de la infección con 1.0 µg o 0.1 µg de ARNm que codifica la

meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QQ Enlazador1923 (1/2) 1.0 µg o QQ Enlazador1923 (1/2) 0.1 µg). Las mediciones se tomaron los días 6, 9, 12 y 15 después de la infección para HBsAg, ADN de HBV, ARN de HBV y HBeAg. Las mediciones se tomaron los días 9, 12 y 15 después de la infección para los niveles de ADNccc y viabilidad celular.

Figura 17A a Figura 17F. Proporciona gráficas de barras que muestran el porcentaje de viabilidad celular (Figura 17A), inhibición de ADN de HBV (Figura 17B), inhibición de ARN de HBV (Figura 17C), inhibición de HBsAg (Figura 17D), inhibición de HBeAg (Figura 17E) e inhibición de ADNccc (Figura 17F), en células PHH infectadas con 800 GE/célula de HBV serotipo B y transfectadas los días 3 y 6 después de la infección con un intervalo de 0.001 µg a 1 µg/mL de ARNm que codifica la meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QQ) o HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QE).

La Figura 18A y la Figura 18B proporcionan una transferencia tipo Southern de los niveles de ADNccc en células PHH infectadas con 800 GE/célula de HBV serotipo B y transfectadas los días 3 y 6 después de la infección con un intervalo de 0.001 µg a 1 µg de ARNm que codifica la meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QQ; Figura 18A) o HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QE; Figura 18B). En la Figura 18A y la Figura 18B, cada carril marcado como TA1 o TA2 se refiere a los carriles correspondientes a las células transfectadas con las meganucleasas QQ o QE a la dosis indicada con y sin LAM a las dosis indicadas. Se proporciona un control con solo medio adicional, control LAM 6 nM y un control de ARNip dirigido a HBV en los carriles 11-13, respectivamente. El ADN del fragmento de HBV se proporciona en los carriles 1 y 14 tanto en la Figura 18A como en la Figura 18B. La Figura 18A tiene un control de carga positivo de ADNccc adicional en el carril 15.

Figura 19. Proporciona una gráfica de barras que muestra el porcentaje de viabilidad celular de células PHH infectadas con 800 GE/célula de HBV serotipo B y transfectadas los días 3 y 6 después de la infección con 0.1 µg o 1 µg de ARNm que codifica la meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QQ) o HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QE) sola o en combinación con el análogo de nucleósido, LAM.

Figura 20A a Figura 20D. Proporciona gráficas de líneas que muestran el porcentaje de inhibición de ADN de HBV (Figura 20A), inhibición de HBsAg (Figura 20B), inhibición de HBeAg (Figura 20C) e inhibición de ARN de HBV (Figura 20D), en células PHH infectadas con 800 GE/célula de HBV serotipo B y transfectadas los días 3 y 6 después de la infección con 0.1 µg de ARNm que codifica la meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QQ) o HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2) (etiquetada como QE). Como se indicó, algunas de las células también se trataron con el análogo de nucleósido, LAM o un ARNip dirigido a HBV.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa silvestre tipo I-Crel

de *Chlamydomonas reinhardtii*.

SEQ ID NO: 2 establece la secuencia de aminoácidos del motivo LAGLIDADG.

5 SEQ ID NO: 3 establece la secuencia de ácido nucleico de la cadena sentido de la secuencia de reconocimiento HBV 11-12.

SEQ ID NO: 4 establece la secuencia de ácido nucleico de la cadena antisentido de la secuencia de reconocimiento HBV 11-12.

SEQ ID NO: 5 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2).

10 SEQ ID NO: 6 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 7 establece la secuencia de aminoácidos de la subunidad HBV11 de la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2).

15 SEQ ID NO: 8 establece la secuencia de aminoácidos de la subunidad HBV11 de la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2).

SEQ ID NO: 9 establece la secuencia de aminoácidos de la subunidad HBV12 de la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2).

SEQ ID NO: 10 establece la secuencia de aminoácidos de la subunidad HBV12 de la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2).

20 SEQ ID NO: 11 establece la secuencia de ácido nucleico de la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 12 establece la secuencia de ácido nucleico de la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2).

25 SEQ ID NO: 13 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1(1/2).

SEQ ID NO: 14 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1(1/2).

SEQ ID NO: 15 establece la secuencia de aminoácidos del Enlazador1923.

SEQ ID NO: 16 establece la secuencia de aminoácidos del Enlazador1.

30 SEQ ID NO: 17 establece la secuencia de aminoácidos de una secuencia de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) SV40.

SEQ ID NO: 18 establece una secuencia de ácido nucleico de la región de secuencia no traducida (UTR) 5' ALB.

SEQ ID NO: 19 establece una secuencia de ácido nucleico de la UTR 3' SNRPB.

35 SEQ ID NO: 20 establece una secuencia de ácido nucleico de una secuencia de terminación de poliA.

SEQ ID NO: 21 establece una secuencia de ácido nucleico de una secuencia Kozak.

SEQ ID NO: 22 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia sonda.

- SEQ ID NO: 23 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador directo.
- SEQ ID NO: 24 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador inverso.
- SEQ ID NO: 25 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia sonda.
- 5 SEQ ID NO: 26 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador directo.
- SEQ ID NO: 27 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador inverso.
- SEQ ID NO: 28 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador inverso.
- SEQ ID NO: 29 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia sonda.
- SEQ ID NO: 30 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador directo.
- 10 SEQ ID NO: 31 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador inverso.
- SEQ ID NO: 32 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia sonda.
- SEQ ID NO: 33 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador directo.
- SEQ ID NO: 34 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador inverso.
- SEQ ID NO: 35 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia sonda.
- 15 SEQ ID NO: 36 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador directo.
- SEQ ID NO: 37 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador inverso.
- SEQ ID NO: 38 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador directo.
- SEQ ID NO: 39 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador inverso.
- SEQ ID NO: 40 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador directo.
- 20 SEQ ID NO: 41 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de cebador inverso.
- SEQ ID NO: 42 establece la secuencia de aminoácidos del Enlazador1766.
- SEQ ID NO: 43 establece la secuencia de aminoácidos del Enlazador1771.
- SEQ ID NO: 44 establece la secuencia de aminoácidos del Enlazador1808.
- SEQ ID NO: 45 establece la secuencia de aminoácidos del Enlazador1814.
- 25 SEQ ID NO: 46 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende un Enlazador1923 y no comprende modificaciones de la subunidad.
- SEQ ID NO: 47 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1923 y modificaciones de la subunidad del Grupo 1 (K96A/K57Y, E61T).
- 30 SEQ ID NO: 48 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1923 y modificaciones de la subunidad del Grupo 2 (Q99A, K100D / ninguna).
- SEQ ID NO: 49 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1923 y modificaciones de la subunidad del Grupo 3 (H37Y /W53F).
- 35 SEQ ID NO: 50 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1923 y modificaciones de la subunidad del Grupo 1 (K96A/K57Y, E61T) y del Grupo 3 (H37Y /W53F).

SEQ ID NO: 51 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1923 y modificaciones de la subunidad del Grupo 2 (Q99A, K100D / ninguna) y del Grupo 3 (H37Y /W53F).

5 SEQ ID NO: 52 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1923 y modificaciones de la subunidad del Grupo 1 (K96A/K57Y, E61T), Grupo 2 (Q99A, K100D / ninguna) y Grupo 3 (H37Y /W53F).

SEQ ID NO: 53 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende un Enlazador1766 y no comprende modificaciones de la subunidad.

10 SEQ ID NO: 54 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1766 y modificaciones de la subunidad del Grupo 1 (K96A/K57Y, E61T) y del Grupo 2 (Q99A, K100D / ninguna).

15 SEQ ID NO: 55 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1766 y modificaciones de la subunidad del Grupo 1 (K96A/K57Y, E61T), Grupo 2 (Q99A, K100D / ninguna) y Grupo 3 (H37Y /W53F).

SEQ ID NO: 56 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende un Enlazador1771 y no comprende modificaciones de la subunidad.

20 SEQ ID NO: 57 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1771 y modificaciones de la subunidad del Grupo 1 (K96A/K57Y, E61T) y del Grupo 2 (Q99A, K100D / ninguna).

SEQ ID NO: 58 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1771 y modificaciones de la subunidad del Grupo 1 (K96A/K57Y, E61T), Grupo 2 (Q99A, K100D / ninguna) y Grupo 3 (H37Y /W53F).

25 SEQ ID NO: 59 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende un Enlazador1808 y no comprende modificaciones de la subunidad.

SEQ ID NO: 60 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1808 y modificaciones de la subunidad del Grupo 1 (K96A/K57Y, E61T) y del Grupo 2 (Q99A, K100D / ninguna).

30 SEQ ID NO: 61 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1808 y modificaciones de la subunidad del Grupo 1 (K96A/K57Y, E61T), Grupo 2 (Q99A, K100D / ninguna) y Grupo 3 (H37Y /W53F).

SEQ ID NO: 62 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende un Enlazador1814 y no comprende modificaciones de la subunidad.

35 SEQ ID NO: 63 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1814 y modificaciones de la subunidad del Grupo 1 (K96A/K57Y, E61T) y del Grupo 2 (Q99A, K100D / ninguna).

SEQ ID NO: 64 establece la secuencia de aminoácidos de una meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 que comprende el Enlazador1814 y modificaciones de la subunidad del Grupo 1

(K96A/K57Y, E61T), Grupo 2 (Q99A, K100D / ninguna) y Grupo 3 (H37Y /W53F).

SEQ ID NO: 65 establece la secuencia de aminoácidos de una secuencia de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) SV40.

5 SEQ ID NO: 66 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 67 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2).

10 SEQ ID NO: 68 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 69 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 70 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2).

15 SEQ ID NO: 71 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 72 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2).

20 SEQ ID NO: 73 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 74 establece una secuencia de ácido nucleico de un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 75 establece una secuencia de ácido nucleico de un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2).

25 SEQ ID NO: 76 establece una secuencia de ácido nucleico de un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 77 establece una secuencia de ácido nucleico de un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2).

30 SEQ ID NO: 78 establece una secuencia de ácido nucleico de un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 79 establece una secuencia de ácido nucleico de un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 80 establece una secuencia de ácido nucleico de un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2).

35 SEQ ID NO: 81 establece una secuencia de ácido nucleico de un constructo de ARNm que codifica la meganucleasa HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2).

SEQ ID NO: 82 establece una secuencia de ácido nucleico de la región de secuencia no traducida (UTR) 5' ALB.

SEQ ID NO: 83 establece una secuencia de ácido nucleico de la UTR 3' SNRPB.

SEQ ID NO: 84 establece una secuencia de ácido nucleico de una secuencia Kozak.

5 **Descripción detallada de la invención**

1.1 Referencias y definiciones

La literatura de patentes y científica citada en la presente establece el conocimiento que está disponible para los técnicos en la materia. Las patentes emitidas, las solicitudes permitidas, las solicitudes extranjeras publicadas y las referencias, incluyendo las secuencias de base de datos
10 GenBank, las cuales se citan en la presente, están incorporadas aquí para referencia al mismo grado como si cada una fuera específica e individualmente indicada para ser incorporada para referencia.

La presente divulgación se puede realizar de diferentes formas y no se debe interpretar como limitada a las modalidades aquí expuestas. Más bien, estas modalidades se proporcionan para que esta divulgación sea exhaustiva y completa y transmita plenamente el alcance de la divulgación a los técnicos
15 en la materia. Por ejemplo, las características ilustradas con respecto a una modalidad se pueden incorporar a otras modalidades y las características ilustradas con respecto a una modalidad particular se pueden eliminar de dicha modalidad. Además, numerosas variaciones y adiciones a las modalidades aquí sugeridas serán evidentes para aquellos técnicos en la materia en vista de la presente divulgación, las cuales no se apartan de la presente divulgación.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que frecuentemente interpretaría un técnico en la materia a la que pertenece esta divulgación. La terminología utilizada en la presente descripción de la divulgación tiene el propósito de describir solo modalidades particulares y no pretende ser limitativa de la divulgación.
20

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan como referencia en la presente en su totalidad.
25

Como se usa en la presente, “un”, “una” o “el/la” puede significar uno o más de uno o una. Por ejemplo, “una” célula puede significar una sola célula o múltiples células.

Como se usa en la presente, a menos que se indique específicamente lo contrario, la palabra “o” se usa en el sentido inclusivo de “y/o” y no en el sentido exclusivo de “uno u otro”.

Como se usa en la presente, los términos “nucleasa” y “endonucleasa” se utilizan indistintamente para referirse a enzimas de existencia natural o diseñadas, las cuales cortan un enlace
30 fosfodiéster dentro de una cadena de polinucleótido.

Como se usa en la presente, los términos “escindir” o “escisión” se refieren a la hidrólisis de enlaces de fosfodiéster dentro del esqueleto de una secuencia de reconocimiento dentro de una
35 secuencia blanco que resulta en una ruptura de doble cadena dentro de la secuencia blanco, referido en la presente como un “sitio de escisión”.

Tal como se usa en la presente, el término “meganucleasa” se refiere a una endonucleasa que se une al ADN de cadena doble en una secuencia de reconocimiento que es mayor que 12 pares de

bases. En algunas modalidades, la secuencia de reconocimiento para una meganucleasa de la presente divulgación es de 22 pares de bases. Una meganucleasa puede ser una endonucleasa que se deriva de I-Crel (SEQ ID NO: 1), y puede referirse a una variante diseñada de I-Crel que se ha modificado en relación con I-Crel natural con respecto a, por ejemplo, especificidad de unión a ADN, actividad de escisión de ADN, afinidad de unión a ADN, o propiedades de dimerización. Los métodos para producir dichas variantes modificadas de I-Crel se conocen en la materia (por ejemplo, WO 2007/047859, incorporada mediante esta referencia en su totalidad). Una meganucleasa, tal como se usa en la presente, se une al ADN de cadena doble como un heterodímero. Una meganucleasa también puede ser una "meganucleasa de cadena sencilla" en la que un par de dominios de unión a ADN se unen en un único polipéptido usando un enlazador peptídico. El término "endonucleasa *homing*" es sinónimo del término "meganucleasa". Las meganucleasas de la presente divulgación son sustancialmente no tóxicas cuando se expresan en las células blanco como se describe en la presente, para que las células se puedan transfectar y mantener a 37 °C sin observar efectos perjudiciales sobre la viabilidad celular o reducciones significativas en la actividad de escisión de meganucleasas cuando se miden usando los métodos descritos en la presente.

Como se usa en la presente, el término "meganucleasa de cadena sencilla" se refiere a un polipéptido que comprende un par de subunidades de nucleasa unidas por un enlazador. Una meganucleasa de cadena sencilla tiene la organización: Subunidad N-terminal – Enlazador – Subunidad C-terminal. Las dos subunidades de meganucleasa generalmente no serán idénticas en la secuencia de aminoácidos y se unirán a secuencias de ADN no idénticas. Por lo tanto, las meganucleasas de cadena sencilla generalmente escinden secuencias de reconocimiento pseudo-palindrómicas o no palindrómicas. Una meganucleasa de cadena sencilla se puede denominar "heterodímero de cadena sencilla" o "meganucleasa heterodimérica de cadena sencilla" aunque, de hecho, no es dimérica. Para mayor claridad, a menos que se especifique otra cosa, el término "meganucleasa" puede referirse a una meganucleasa dimérica o de cadena sencilla.

Tal como se usa en la presente, el término "enlazador" se refiere a una secuencia de péptidos exógenos usada para unir dos subunidades de meganucleasa en un único polipéptido. Un enlazador puede tener una propensión a formar una estructura tridimensional específica bajo condiciones fisiológicas, tal como vueltas y/o regiones enrolladas (coils). En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 31 aminoácidos. En algunas modalidades, un enlazador puede tener al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15.

Como se usa en la presente, los términos "recombinante" o "diseñado", con respecto a una proteína, significa que tiene una secuencia de aminoácidos alterada como un resultado de la aplicación de técnicas de ingeniería genética a ácidos nucleicos que codifican la proteína y células u organismos que expresan la proteína. Con respecto a un ácido nucleico, el término "recombinante" o "diseñado"

significa que tiene una secuencia de ácidos nucleicos alterada como resultado de la aplicación de técnicas de ingeniería genética. Las técnicas de ingeniería genética incluyen, entre otras, tecnologías de PCR y clonación de ADN; tecnologías de transfección, transformación y otras tecnologías de transferencia génica; recombinación homóloga; mutagénesis dirigida al sitio; y fusión génica. De acuerdo con esta definición, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a una proteína de origen natural, pero producida por clonación y expresión en un hospedero heterólogo, no se considera recombinante o diseñada.

Tal como se usa en la presente, el término "silvestre" se refiere al alelo de origen natural más común (es decir, secuencia de polinucleótidos) en la población de alelos del mismo tipo de gen, en donde un polipéptido codificado por el alelo silvestre tiene sus funciones originales. El término "silvestre" también se refiere a un polipéptido codificado por un alelo de origen silvestre. Los alelos de tipo silvestre (es decir, polinucleótidos) y los polipéptidos se distinguen de un mutante o alelos variantes y polipéptidos, los cuales comprenden una o más mutaciones y/o sustituciones con relación a la(s) secuencia(s) de tipo silvestre. Mientras que un alelo o polipéptido silvestre puede conferir un fenotipo normal en un organismo, un alelo o polipéptido mutante o variante puede, en algunos casos, conferir un fenotipo alterado. Las nucleasas de tipo silvestre se distinguen de las nucleasas recombinantes o de existencia no natural. El término "silvestre" también puede hacer referencia a una célula, un organismo y/o un sujeto que posee un alelo silvestre de un gen particular, o una célula, un organismo y/o un sujeto utilizado con fines comparativos.

Tal como se usa en la presente, el término "modificado genéticamente" se refiere a una célula u organismo en el que, o en un antepasado del cual, una secuencia de ADN genómico se ha modificado deliberadamente mediante tecnología recombinante. Tal como se usa en la presente, el término "modificado genéticamente" comprende el término "transgénico."

Como se usa en la presente, el término con respecto a proteínas recombinantes, el término "modificación" significa cualquier inserción, delección o sustitución de un residuo de aminoácido en la secuencia recombinante en relación con una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia tipo silvestre o una natural).

Tal como se usa en la presente, los términos "secuencia de reconocimiento" o "sitio de reconocimiento" se refieren a una secuencia de ADN que se une y se escinde mediante una nucleasa. En el caso de una meganucleasa, una secuencia de reconocimiento comprende un par de "medios sitios" invertidos de 9 pares de bases que están separados por cuatro pares de bases. En el caso de una meganucleasa de cadena sencilla, el dominio N-terminal de la proteína contacta con un primer medio sitio y el dominio C-terminal de la proteína contacta con un segundo medio sitio. La escisión por una meganucleasa produce "salientes" 3' de cuatro pares de bases. Las "salientes" o los "extremos cohesivos" son segmentos de ADN de cadena sencilla cortos que se pueden producir mediante escisión de endonucleasa de una secuencia de ADN de cadena doble. En el caso de meganucleasas y meganucleasas de cadena sencilla derivadas de I-CreI, la saliente comprende las bases 10 a 13 de la

secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases.

Como se usa en la presente, los términos “sitio blanco” o “secuencia blanco” se refieren a una región del ADN cromosómico de una célula que comprende una secuencia de reconocimiento para una nucleasa.

Tal como se usa en la presente, el término “afinidad de unión al ADN” o “afinidad de unión” significa la tendencia de una meganucleasa a asociarse de manera no covalente con una molécula de ADN de referencia (por ejemplo, una secuencia de reconocimiento o una secuencia arbitraria). La afinidad de unión se mide mediante una constante de disociación, K_d . Como se usa en la presente, una nucleasa tiene afinidad de unión “alterada” si la K_d de la nucleasa para una secuencia de reconocimiento de referencia se incrementa o se reduce por una cantidad estadísticamente significativa con relación a una nucleasa de referencia.

Tal como se usa en la presente, el término “especificidad” se refiere a la capacidad de una nucleasa para reconocer y escindir moléculas de ADN de cadena doble solo en una secuencia particular de pares de bases denominada secuencia de reconocimiento, o solo en un conjunto particular de secuencias de reconocimiento. El conjunto de secuencias de reconocimiento compartirá determinadas posiciones conservadas o motivos de secuencia, pero puede encontrarse degenerada en una o más posiciones. Una nucleasa altamente específica es capaz de escindir solo una o muy pocas secuencias de reconocimiento. La especificidad se puede determinar por cualquier método conocido en la materia, tal como la identificación no sesgada de los DSB mediante secuenciación (GUIDE-seq), ensayo de captura de oligonucleótidos (oligo), secuenciación del genoma completo y secuenciación de nueva generación de largo alcance de la secuencia de reconocimiento. En algunas modalidades, la especificidad se mide usando GUIDE-seq. Como se usa en la presente, “especificidad” es sinónimo de una baja incidencia de escisión de secuencias diferentes de las secuencias blanco (secuencias no blanco), es decir, corte fuera del blanco. Una baja incidencia de corte fuera del blanco puede comprender una incidencia de escisión de secuencias no blanco de menos del 25%, menos del 20%, menos del 18%, menos del 15%, menos del 12.5%, menos del 10%, menos del 9%, menos del 8%, menos del 7%, menos del 6%, menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2.5%, menos del 2%, menos del 1.5%, menos del 1%, menos del 0.75%, menos del 0.5%, o menos del 0.25%.

Como se usa en la presente, una meganucleasa tiene especificidad “alterada” si se une a y escinde una secuencia de reconocimiento a la que no se une ni es escindida por una meganucleasa de referencia (por ejemplo, una de tipo silvestre) bajo condiciones fisiológicas o si la velocidad de escisión de una secuencia de reconocimiento se incrementa o reduce por una cantidad biológicamente significativa (por ejemplo, al menos $2\times$, o $2\times$ - $10\times$) con relación a una meganucleasa de referencia.

En algunas modalidades, las meganucleasas diseñadas descritas en la presente han mejorado (es decir, aumentado) la especificidad para la secuencia de reconocimiento blanco que comprende SEQ ID NO: 3 (es decir, HBV 1-12) en comparación con la meganucleasa HBV 11-12L. 1090QQ 1-Enlazador1 (cuya secuencia de aminoácidos se establece como SEQ ID NO: 13). Por lo tanto, en determinadas

modalidades, las meganucleasas diseñadas divulgadas en la presente, presentan una escisión fuera de blanco reducida en comparación con la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ 1-Enlazador1. La escisión fuera de blanco mediante una meganucleasa se puede medir usando cualquier método conocido en la materia, que incluye, por ejemplo, análisis de oligo-captura como se describe en la presente, un ensayo de endonucleasa T7 (T7E) como se describe en la presente, PCR digital como se describe en la presente, secuenciación dirigida de sitios fuera de blanco particulares, secuenciación de exomas, secuenciación de genoma completo, enriquecimiento en estreptavidina y secuenciación de nueva generación de etiquetado directo *in situ* de rupturas (BLESS) a escala genómica, GUIDE-seq, y secuenciación de translocaciones genómicas de alto rendimiento mediada por amplificación lineal (LAM-HTGTS) (véase, por ejemplo, Zischewski *et al.* (2017), *Biotechnology Advances* 35(1):95-104, que se incorpora mediante esta referencia en su totalidad).

Como se usa en la presente, el término "eficiencia de escisión" se refiere a la incidencia por la cual una meganucleasa escinde una secuencia de reconocimiento en una molécula de ADN de doble cadena en relación con la incidencia de todos los eventos de escisión por la meganucleasa en la molécula de ADN. La "eficiencia de escisión" es sinónimo de eficiencia de edición de ADN o edición en el blanco. La eficiencia de escisión y/o formación de indel mediante una meganucleasa se puede medir usando cualquier método conocido en la materia, que incluye un ensayo de T7E, PCR digital (ddPCR), ensayos de detección de desajuste, ensayo de escisión de desajuste, análisis de fusión de alta resolución (HRMA), ensayo de movilidad heterodúplex, secuenciación y electroforesis capilar en gel de PCR fluorescente (véase, por ejemplo, Zischewski *et al.* (2017) *Biotechnology Advances* 35(1):95-104, que se incorpora mediante esta referencia en su totalidad). En algunas modalidades, la eficiencia de escisión se mide por ddPCR. En algunas modalidades, las meganucleasas divulgadas generan eficiencias de escisión de al menos aproximadamente 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % en la secuencia de reconocimiento.

Un "indel", como se usa en la presente, se refiere a la inserción o delección de una nucleobase dentro de un ácido nucleico, tal como ADN. En algunas modalidades, es deseable generar una o más inserciones o delecciones (es decir, indeles) en el ácido nucleico, por ejemplo, en un ácido nucleico extraño tal como ADN viral. En consecuencia, como se usa en la presente, "eficiencia de la formación de indeles" se refiere a la incidencia con la que una meganucleasa genera uno o más indeles mediante la escisión de una secuencia de reconocimiento en relación con la incidencia de todos los eventos de escisión por la meganucleasa en la molécula de ADN. En algunas modalidades, la eficiencia de la formación de indel se mide por ddPCR. En algunas modalidades, las meganucleasas divulgadas generan eficiencias de formación de indel de al menos aproximadamente 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % en la secuencia de reconocimiento. Las meganucleasas divulgadas pueden generar eficiencias de escisión y/o eficiencias de formación de indel de al menos aproximadamente 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 % o 80% en la secuencia de reconocimiento.

Tal como se usa en la presente, el término “recombinación homóloga” o “HR” se refiere al proceso celular natural en el que se repara una ruptura del ADN bicatenario usando una secuencia de ADN homóloga como plantilla de reparación (véase, por ejemplo, Cahill *et al.* (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976). La secuencia de ADN homóloga puede ser una secuencia cromosómica endógena o un ácido nucleico exógeno que fue introducido en la célula.

Tal como se usa en la presente, el término “unión de extremos no homólogos” o “NHEJ” se refiere al proceso celular natural en el que se repara una ruptura del ADN bicatenario mediante la unión directa de dos segmentos de ADN no homólogos (véase, por ejemplo, Cahill *et al.* (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976). La reparación del ADN mediante unión de extremos no homólogos es propensa a errores y con frecuencia resulta en la adición o delección sin plantilla de secuencias de ADN en el sitio de reparación. En algunos casos, la escisión en una secuencia de reconocimiento blanco resulta en NHEJ en un sitio de reconocimiento blanco. La escisión inducida por nucleasa de un sitio blanco en la secuencia codificante de un gen seguida de reparación del ADN mediante NHEJ puede introducir mutaciones en la secuencia codificante, tales como mutaciones de cambio de marco de lectura, que interrumpen la función génica. De esta forma, las meganucleasas diseñadas se pueden utilizar para inactivar efectivamente un gen en una población de células.

Como se usa en la presente, el término “grupo de homología” o “secuencias homólogas a secuencias que flanquean un sitio de escisión de meganucleasa” se refiere a secuencias que flanquean los extremos 5' y 3' de una molécula de ácido nucleico, que promueven la inserción de la molécula de ácido nucleico en un sitio de escisión generado por una meganucleasa. En general, los grupos de homología pueden tener una longitud de al menos 50 pares de bases, preferiblemente al menos 100 pares de bases, y hasta 2000 pares de bases o más, y pueden tener al menos 90 %, preferiblemente al menos 95 %, o más, de homología de secuencia a sus secuencias correspondientes en el genoma. En algunas modalidades, los grupos de homología son de aproximadamente 500 pares de bases.

Tal como se usa en la presente con respecto a ambas secuencias de aminoácidos y secuencias de ácidos nucleicos, los términos “porcentaje de identidad”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de similitud”, “similitud de secuencia” y similares se refieren a una medida del grado de similitud de dos secuencias en función de un alineamiento de las secuencias que maximiza la similitud entre residuos de aminoácidos o nucleótidos alineados, y que es una función del número de residuos o nucleótidos idénticos o similares, el número de residuos o nucleótidos totales y la presencia y longitud de espacios en el alineamiento de secuencia. Se dispone de una variedad de algoritmos y programas informáticos para determinar la similitud de secuencia utilizando parámetros de uso convencional. Tal como se usa en la presente, la similitud de secuencia se mide usando el programa BLASTp para secuencias de aminoácidos y el programa BLASTn para secuencias de ácidos nucleicos, ambos disponibles a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov/), y se describen, por ejemplo, en Altschul *et al.* (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish y States (1993), Nature Genet. 3:266-272; Madden *et al.* (1996), Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul *et al.* (1997), Nucleic Acids Res. 25:33

89-3402); Zhang *et al.* (2000), J. Comput. Biol. 7(1-2):203-14. Como se usa en la presente, el porcentaje de similitud de dos secuencias de aminoácidos es la puntuación basada en los siguientes parámetros para el algoritmo BLASTp: tamaño de palabra = 3; penalización por abertura de espacio = -11; penalización por extensión de espacio = -1; y matriz de puntuación=BLOSUM62. Como se usa en la presente, el porcentaje de similitud de dos secuencias de ácido nucleico es la puntuación basada en los siguientes parámetros para el algoritmo BLASTn: tamaño de palabra = 11; penalización por abertura de espacio = -5; penalización por extensión de espacio = -2; recompensa de coincidencia = 1; y penalización por falta de coincidencia = -3.

Tal como se usa en la presente, el término “correspondiente a” con respecto a modificaciones de dos proteínas o secuencias de aminoácidos se usa para indicar que una modificación especificada en la primera proteína es una sustitución del mismo residuo de aminoácido que en la modificación en la segunda proteína, y que la posición de aminoácidos de la modificación en la primera proteína corresponde o se alinea con la posición de aminoácidos de la modificación en la segunda proteína cuando las dos proteínas se someten a alineamientos de secuencia estándar (por ejemplo, usando el programa BLASTp) y se alinean para obtener la máxima identidad de secuencia en toda la subunidad o proteína. Por lo tanto, la modificación del residuo “X” al aminoácido “A” en la primera proteína corresponderá a la modificación del residuo “Y” al aminoácido “A” en la segunda proteína si los residuos X e Y corresponden entre sí en un alineamiento de secuencia, y a pesar del hecho de que X e Y pueden estar en posiciones diferentes con respecto al N- o C- terminal.

Como se usa en la presente, el término “medio sitio de reconocimiento”, “medio sitio de secuencia de reconocimiento” o “medio sitio” significa una secuencia de ácido nucleico en una molécula de ADN bicatenario que es reconocida y unida por un monómero de una meganucleasa homodimérica o heterodimérica o por una subunidad de una meganucleasa de cadena sencilla o por una subunidad de una meganucleasa de cadena sencilla.

Como se usa en la presente, el término “región hipervariable” se refiere a una secuencia situada dentro de un monómero o subunidad de meganucleasa que comprende aminoácidos con variabilidad relativamente alta. Una región hipervariable puede comprender aproximadamente 50-60 residuos contiguos, aproximadamente 53-57 residuos contiguos o preferiblemente aproximadamente 56 residuos. En algunas modalidades, los residuos de una región hipervariable pueden corresponder a las posiciones 24 a 79 o posiciones 204 a 259 de la SEQ ID NO: 5 o 6. Una región hipervariable puede comprender uno o más residuos que entran en contacto con bases de ADN en una secuencia de reconocimiento y se pueden modificar para alterar la preferencia de bases del monómero o subunidad. Una región hipervariable puede comprender también uno o más residuos que se unen a la estructura principal del ADN cuando la meganucleasa se asocia con una secuencia de reconocimiento del ADN bicatenario. Dichos residuos se pueden modificar para alterar la afinidad de unión de la meganucleasa por la estructura principal del ADN y la secuencia de reconocimiento blanco. En diferentes modalidades, una región hipervariable puede comprender entre 1 a 20 residuos que muestran variabilidad y se pueden

modificar para influir en la preferencia de bases y/o la afinidad de unión al ADN. En modalidades particulares, una región hipervariable comprende entre aproximadamente 15 a 20 residuos que presentan variabilidad y pueden modificarse para influir en la preferencia de bases y/o afinidad de unión a ADN.

En algunas modalidades, los residuos variables dentro de una región hipervariable corresponden a una o más de las posiciones 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 y 77 de SEQ ID NO: 5 o 6. En algunas modalidades, los residuos variables dentro de una región hipervariable corresponde a la posición 51 de la SEQ ID NO: 5 o 6. En algunas modalidades, los residuos variables dentro de una región hipervariable corresponden a una o más de las posiciones 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 51, 68, 70, 75 y 77 de la SEQ ID NO: 5 o 6.

En algunas modalidades, los residuos variables dentro de una región hipervariable corresponden a una o más de las posiciones 204, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 220, 222, 224, 226, 248, 250, 255 y 257 de SEQ ID NO: 5 o 6. En algunas modalidades, los residuos variables dentro de una región hipervariable corresponden además a una o más de las posiciones 237, 241, 251, 252 y 253 de SEQ ID NO: 5 o 6. En otras modalidades, los residuos variables dentro de una región hipervariable corresponden a una o más de las posiciones 204, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 220, 222, 224, 226, 237, 241, 248, 250, 251, 252, 253, 255 y 257 de la SEQ ID NO: 5 o 6.

Los términos “constructo de ADN recombinante”, “constructo recombinante”, “casete de expresión”, “casete”, “constructo de expresión”, “constructo quimérico”, “constructo” y “fragmento de ADN recombinante” se utilizan indistintamente en la presente y son polinucleótidos de cadena simple o doble. Un constructo recombinante comprende una combinación artificial de fragmentos de ácido nucleico, por ejemplo, secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por ejemplo, un constructo quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de diferentes fuentes o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero ordenadas en una manera distinta a la que se observa en la naturaleza. Se puede utilizar dicho constructo por sí mismo o se puede utilizar junto con un vector.

Tal como se usa en la presente, un “vector” o “vector de ADN recombinante” puede ser un constructo que incluya un sistema de replicación y secuencias que sean capaces de transcripción y traducción de una secuencia codificante de polipéptidos en una célula hospedera dada. Si se utiliza un vector, entonces la elección del vector depende del método que se utilizará para transformar las células hospederas como es conocido por los técnicos en la materia. Los vectores pueden incluir, sin limitación, vectores de plásmido y vectores AAV recombinantes, o cualquier otro vector conocido en la técnica adecuado para suministrar un gen a una célula blanco. El experto en la técnica conoce bien los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector para transformar, seleccionar y propagar con éxito células hospederas que comprenden cualquiera de los nucleótidos aislados o secuencias de ácido nucleico descritas en este documento. En algunas modalidades, un “vector” se refiere también a un vector viral. Los vectores virales pueden incluir, sin limitación, vectores retrovirales, vectores

lentivirales, vectores adenovirales y vectores virales adenoasociados (AAV).

Tal como se usa en la presente, un ARNm “policistrónico” se refiere a un único ARN mensajero que comprende dos o más secuencias codificantes (es decir, cistrones) y codifica más de una proteína.

5 Un ARNm policistrónico puede comprender cualquier elemento conocido en la técnica para permitir la traducción de dos o más genes a partir de la misma molécula de ARNm que incluye, entre otros, un elemento IRES, un elemento T2A, un elemento P2A, un elemento E2A y un elemento F2A.

10 Como se usa en la presente, el término “enlazado operativamente” pretende significar un enlace funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, un enlace operable entre una secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa como se describe en la presente y una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor) es un enlace funcional que permite la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa. Los elementos enlazados operativamente pueden ser contiguos o no contiguos. Cuando se usan para referirse a la unión de dos regiones codificantes de proteínas, por enlazado operativamente se pretende que las regiones codificantes estén en el mismo marco de lectura.

15 Como se usa en la presente, “empobrecimiento de uridina” se refiere a la eliminación o reemplazo de residuos de uridina de una molécula de ARN (por ejemplo, ARNm) o residuos de timidina de una molécula de ADN que codifica una molécula de ARN. Las uridinas se pueden reemplazar con cualquier otro residuo, tal como adenosina o pseudouridina, dentro de cualquier región de la molécula de ARN, pero en algunas modalidades, las uridinas se eliminan y reemplazan dentro de la región no codificante de una molécula de ARN. En algunas modalidades, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % de las uridinas en una molécula de ARN se eliminan o reemplazan.

20 Como se usa en la presente, “optimizado en codones” se refiere a una secuencia codificante que se ha modificado para mejorar la expresión génica y aumentar la eficiencia traduccional al acomodar el sesgo de codones del organismo hospedero o tejido, en donde se disminuyen las limitaciones asociadas con las diferencias específicas de especie y específicas de tejido en el uso de codones y la abundancia de ARN de transferencia (ARNt). La secuencia codificante se puede optimizar en codones para la expresión en células de mamífero y/o tejidos específicos. Como se ha demostrado, el sesgo en el uso de codones de genes expresados específicamente en el hígado humano difiere del sesgo en el uso de codones de las secuencias de ADN codificantes del genoma humano (Dittmar *et al.* (2006) *PLoS*
25 *Genet.* 2: e221), en algunas modalidades, las secuencias que codifican una meganucleasa diseñada descrita en la presente se optimizan para la expresión en el hígado.

30 Como se usa en la presente, “inactivar” en referencia a un gen se refiere a la introducción de una mutación en el gen de modo que el gen inactivado resultante no codifique una proteína activa y/o de longitud completa o el gen se elimine (es decir, se degrade). Se puede eliminar un genoma de HBV o fragmento del mismo, inactivando así cualquier gen de HBV presente en el genoma de HBV o fragmento del mismo, a través de la escisión del genoma o fragmento de genoma que da como resultado la posterior degradación del genoma o fragmento del mismo.

Tal como se usa en la presente, un “control” o “célula control” se refiere a una célula que

proporciona un punto de referencia para medir cambios en el genotipo o fenotipo de una célula modificada genéticamente. Una célula control puede comprender, por ejemplo: (a) una célula de tipo silvestre, es decir, del mismo genotipo que el material de partida para la alteración genética que dio como resultado la célula genéticamente modificada; (b) una célula del mismo genotipo que la célula genéticamente modificada pero la cual ha sido transformada con un constructo nulo (es decir, con un constructo que no tiene ningún efecto conocido en el rasgo de interés); o (c) una célula genéticamente idéntica a la célula genéticamente modificada pero que no ha sido expuesta a condiciones o estímulos u otras modificaciones genéticas que podrían inducir la expresión o genotipo o fenotipo alterado. Un sujeto de control puede comprender, por ejemplo: un sujeto de tipo silvestre, es decir, un sujeto que no tiene una infección por HBV, que no está expuesto a condiciones o estímulos o modificaciones genéticas adicionales (por ejemplo, administración de una meganucleasa diseñada descrita en la presente). De manera alternativa, un sujeto de control puede comprender, por ejemplo: un sujeto que tiene una infección por HBV, que no está expuesto a condiciones o estímulos o modificaciones genéticas adicionales (por ejemplo, administración de una meganucleasa diseñada descrita en la presente) que puede alterar el estado de infección por HBV del sujeto.

Como se usa en la presente, los términos “tratamiento” o “que trata a un sujeto” se refieren a la administración de una meganucleasa diseñada de la divulgación, o un ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada de la divulgación a un sujeto infectado con HBV con el fin de ralentizar o detener la tasa de proliferación de HBV del virus al escindir el genoma de al menos una partícula de HBV. Este tratamiento reduce o previene la transfección y replicación del HBV en el sujeto, y proporciona un alivio parcial o completo de uno o más síntomas de infección por HBV o una enfermedad asociada con la infección por HBV en el sujeto. Los medios para evaluar el alivio de los síntomas de la infección por HBV o una enfermedad asociada con la infección por HBV pueden incluir la medición de las funciones hepáticas determinando los niveles de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) o midiendo la seroconversión, es decir, la desaparición y/o reducción de los niveles circulantes de HBeAg y/o HBsAg.

Además, el alivio o la reducción de los síntomas de la infección por HBV o una enfermedad asociada con la infección por HBV se puede determinar examinando biopsias hepáticas y midiendo el nivel de fibrosis tisular mediante métodos conocidos en la técnica. El número de partículas virales circulantes se puede determinar, por ejemplo, midiendo los niveles de ADN del HBV mediante PCR o detectando los niveles de HBsAg en la sangre. Los términos “tratamiento” o “que trata a un sujeto” se pueden referir además a la administración de una célula (por ejemplo, célula de hepatocito) que comprende un ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada, en donde la célula se administra a un tejido blanco (por ejemplo, hígado) y produce la meganucleasa diseñada en una cantidad suficiente para tratar una infección por HBV o una enfermedad asociada con una infección por HBV en el sujeto, lo que da como resultado un alivio parcial o completo de uno o más síntomas de la infección por HBV o la enfermedad asociada con la infección por HBV. En algunos aspectos, una

meganucleasa diseñada de la divulgación o un ácido nucleico que codifica la misma, se administra durante el tratamiento en la forma de una composición farmacéutica de la divulgación.

El término "una enfermedad asociada con la infección por el virus de la hepatitis B" se refiere a cualquier condición relacionada o resultante de la infección con un virus de la hepatitis B, tal como enfermedades/trastornos hepáticos crónicos, inflamaciones, condiciones fibróticas y trastornos proliferativos, tal como cánceres de hígado. La infección crónica persistente por HBV puede causar fatiga, daño hepático, cirrosis del hígado y carcinoma hepatocelular, un cáncer primario de hígado.

Los términos "que prolifera" y "proliferación" como se usan en la presente se refieren a virus HBV o HBV de ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc) que divide y/o infecta activamente células humanas. Por lo tanto, la reducción en la proliferación se refiere a cualquier disminución en la proliferación de HBV que incluye la reducción de al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con un control apropiado al que no se le ha administrado la meganucleasa diseñada, o el ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada, descrita en la presente. A lo largo de esta solicitud, el término "trastorno proliferativo" se refiere a cualquier enfermedad/trastorno marcado por proliferación no deseada o aberrante de células o tejido. Como se usa en la presente, el término "trastorno proliferativo" también se refiere a condiciones en las que el crecimiento no regulado y/o anormal de células puede conducir al desarrollo de una condición o enfermedad no deseada, que puede ser cancerosa o no cancerosa.

Como se usa en la presente, el término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para efectuar resultados biológicos y/o clínicos beneficiosos y deseables. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo de la formulación o composición utilizada, la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, condición física y capacidad de respuesta del sujeto a tratar. En modalidades específicas, una cantidad eficaz de la meganucleasa diseñada o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente reduce el nivel o proliferación de HBV o reduce al menos un síntoma de una enfermedad asociada con la infección por HBV en un sujeto con una infección por HBV.

El término "cg/kg" o "copias génicas/kilogramo" se refiere al número de copias de un ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente por peso en kilogramos de un sujeto al que se administra el ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada.

El término "nanopartícula lipídica" se refiere a una composición lipídica que tiene una estructura típicamente esférica con un diámetro promedio de entre 10 y 1000 nanómetros. En algunas formulaciones, las nanopartículas lipídicas pueden comprender al menos un lípido catiónico, al menos un lípido no catiónico y al menos un lípido conjugado. Las nanopartículas lipídicas conocidas en la técnica que son adecuadas para encapsular ácidos nucleicos, tales como ARNm, están contempladas para usarse.

Tal como se usa en la presente, la recitación de un intervalo numérico para una variable

pretende transmitir que la invención se puede poner en práctica con la variable igual a cualquiera de los valores dentro de ese intervalo. Por lo tanto, para una variable que es inherentemente discreta la variable puede ser igual a cualquier valor entero dentro del intervalo numérico, incluyendo los extremos de dicho intervalo. Del mismo modo, para una variable que es inherentemente continua, la variable puede ser igual a cualquier valor real dentro del intervalo numérico, incluyendo los extremos de dicho intervalo. Como un ejemplo, y sin limitación, una variable que se describe como que tiene valores entre 0 y 2 puede tomar los valores 0, 1 o 2 si la variable es inherentemente discreta y puede tomar los valores 0.0, 0.1, 0.01, 0.001 o cualquier otro valor real ≥ 0 y ≤ 2 si la variable es inherentemente continua.

2.1 Principio de la invención

La presente divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento de meganucleasas HBV 11-12 que tienen propiedades mejoradas en comparación con las meganucleasas HBV 11-12 descritas previamente, tal como especificidad mejorada (es decir, aumentada) que da como resultado un corte fuera del blanco reducido y una eficiencia mejorada (es decir, aumentada) de escisión y formación de indel en la secuencia de reconocimiento HBV 11-12, particularmente en células que comprenden una copia integrada del genoma de HBV.

Las meganucleasas HBV 11-12 divulgadas en la presente reconocen la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 (SEQ ID NO: 3) en el gen de polimerasa (P) del genoma del virus de la hepatitis B que codifica la ADN polimerasa viral. La secuencia de reconocimiento HBV 11-12 se conserva en al menos los genotipos A-G de HBV, lo que permite ventajosamente que las meganucleasas diseñadas divulgadas en la presente se dirijan a infecciones por HBV en todo el mundo.

Las meganucleasas HBV 11-12 divulgadas en la presente se denominan HBV 11-12L.1090QQEnlazador1923 (1/2), que se establece como SEQ ID NO: 5, y HBV 11-12L.1090QEEnlazador1923(1/2), que se establece como SEQ ID NO: 6. La nomenclatura "QQ" se refiere a la presencia de un residuo de aminoácido Q en la posición 80 y la posición 260 de la SEQ ID NO: 5 y en la posición 80 y la posición 271 de SEQ ID NO: 13. La nomenclatura "QE" se refiere a la presencia de un residuo de aminoácido Q en la posición 80 de SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 14 y la presencia de un residuo de aminoácido E en la posición 260 de SEQ ID NO: 6 y la posición 271 de la SEQ ID NO: 14. La secuencia del Enlazador1923 que une la primera y segunda subunidades de estas meganucleasas diseñadas se establece como SEQ ID NO: 15 y tiene una longitud más corta (es decir, 31 residuos de aminoácidos) que la secuencia del Enlazador1 establecida como SEQ ID NO: 16 (es decir, 42 residuos de aminoácidos) presente en la meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1 previamente identificada. El término "(1/2)" se refiere a la presencia de modificaciones de aminoácidos en la primera y segunda subunidades de una meganucleasa diseñada cuando las subunidades se unen mediante la secuencia del Enlazador1923. En las meganucleasas HBV11-12L.1090 descritas en la presente que comprenden la secuencia Enlazador1923, la subunidad N-terminal incluye una A en la posición 96, una A en la posición 99 y una D en la posición 100, y la subunidad C-terminal incluye una Y en una posición correspondiente a la posición 57 de SEQ ID NO: 1

(es decir, la posición 237 de la SEQ ID NO: 5 o 6) y una T en una posición correspondiente a la posición 61 de SEQ ID NO: 1 (es decir, la posición 241 de la SEQ ID NO: 5 o 6). En tanto que no se mantiene ninguna teoría o mecanismo de acción particular, se cree que el Enlazador1923 interactúa con estos
 5 residuos "(1/2)" modificados dentro del andamiaje I-Crel, lo que lleva a la estabilización de la meganucleasa diseñada.

La escisión en la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 puede permitir la unión de extremos no homólogos (NHEJ) en el sitio de escisión y puede alterar la expresión de una o más proteínas virales (por ejemplo, ADN polimerasa viral) debido a NHEJ en el sitio de escisión que da como resultado
 10 inserciones, deleciones o mutaciones de cambio de marco de lectura. De manera alternativa, la escisión del genoma de HBV en la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 puede promover la degradación del genoma de HBV y/o ADNccc de HBV. La interrupción de la expresión de las proteínas virales puede reducir o eliminar la infección y/o proliferación de HBV.

Además, la escisión en la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 puede permitir además la
 15 recombinación homóloga de secuencias de ácido nucleico exógenas directamente en el genoma de HBV para alterar la expresión de una o más proteínas virales. Por ejemplo, se puede introducir un "gen suicida" en un genoma de HBV mediante recombinación homóloga.

Por lo tanto, la presente divulgación abarca meganucleasas diseñadas que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 dentro de un genoma de HBV. La presente
 20 divulgación también abarca métodos para usar estas meganucleasas diseñadas en una composición farmacéutica y en métodos para inactivar un gen de polimerasa de un genoma de HBV o un fragmento de genoma de HBV en una célula eucariota y métodos para tratar una infección por HBV o una enfermedad asociada con la infección por HBV. Además, la divulgación abarca composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas meganucleasas diseñadas, o ácidos nucleicos que codifican
 25 meganucleasas diseñadas, y el uso de estas composiciones para el tratamiento de la infección por HBV y enfermedades asociadas con la infección por HBV (por ejemplo, carcinoma hepatocelular (HCC)).

2.2 Meganucleasas que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 dentro del genoma viral de la hepatitis B

Secuencias de reconocimiento

30 Se sabe en la técnica que es posible usar una nucleasa específica del sitio para hacer una ruptura de ADN en el genoma de un virus, y que dicha ruptura de ADN puede resultar en la modificación permanente del genoma vía reparación NHEJ mutagénica o vía recombinación homóloga con una secuencia de ADN transgénico, tal que el virión HBV no puede dividirse/replicarse o infectar más células humanas.

35 Las meganucleasas diseñadas de la divulgación se han diseñado para unirse y escindir una secuencia de reconocimiento HBV 11-12 (SEQ ID NO: 3). La secuencia de reconocimiento HBV 11-12 se coloca dentro del ORF del gen de la polimerasa de los genotipos múltiples de HBV, que incluyen al menos los genotipos A, B, C, D, E, F y G.

Ejemplos de meganucleasas diseñadas

Se conoce en la técnica que es posible usar una nucleasa específica del sitio para hacer una ruptura de ADN en el genoma de un virus, y que la ruptura de ADN puede dar como resultado la modificación permanente del genoma a través de NHEJ de modo que el virión de HBV ya no pueda dividirse/replicarse o infectar células humanas. La generación de una ruptura de ADN en un genoma viral también puede conducir a la degradación del genoma viral, lo que lo hace incapaz de dividirse, replicarse o ser infeccioso.

Por lo tanto, en algunas modalidades, la presente divulgación proporciona nucleasas diseñadas, particularmente meganucleasas diseñadas. En modalidades particulares, las meganucleasas son meganucleasas de cadena sencilla. Una meganucleasa de cadena sencilla comprende una subunidad N-terminal y una subunidad C-terminal unidas por un péptido enlazador. Cada uno de los dos dominios reconoce la mitad de la secuencia de reconocimiento (es decir, un medio sitio de reconocimiento) y el sitio de escisión de ADN se encuentra en el centro de la secuencia de reconocimiento cerca de la interfaz de las dos subunidades. Las rupturas de cadenas de ADN están desplazadas cuatro pares de bases de modo que la escisión de ADN por una meganucleasa genera un par de salientes de cadena sencilla 3' de cuatro bases.

En algunas modalidades, las meganucleasas diseñadas descritas en la presente, presentan al menos una característica optimizada en comparación con la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1 previamente descrita. Estas características optimizadas incluyen especificidad mejorada (es decir, aumentada) que da como resultado un corte fuera del blanco reducido y una eficiencia mejorada (es decir, aumentada) de escisión y formación de indel (es decir, inserción o delección) en la secuencia de reconocimiento HBV 11-12, particularmente en células que comprenden una copia integrada del genoma de HBV. Por lo tanto, en modalidades particulares, las meganucleasas diseñadas descritas en la presente cuando son administrables a una población de células blanco infectadas con HBV, son capaces de generar un mayor porcentaje de viriones o células con una escisión y/o un indel en el genoma de HBV (ya sea incorporado o sin incorporar). En algunas de estas modalidades, la población de células HBV o blanco comprende al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de células HBV o blanco que comprenden una escisión y/o un indel en el genoma de HBV (ya sea incorporado o sin incorporar). La escisión y/o formación de indel mediante una meganucleasa se puede medir usando cualquier método conocido en la materia, que incluye un ensayo de T7E, PCR digital, ensayos de detección de desajuste, ensayo de escisión de desajuste, análisis de fusión de alta resolución (HRMA), ensayo de movilidad heterodúplex, secuenciación y electroforesis capilar en gel de PCR fluorescente (véase, por ejemplo, Zischewski *et al.* (2017) *Biotechnology Advances* 35(1):95-104, que se incorpora mediante esta referencia en su totalidad).

En algunas modalidades, la célula blanco es una célula hepática. En algunas modalidades, la célula hepática es un hepatocito. En algunas modalidades, la célula blanco es un hepatocito humano primario (PHH). En algunas modalidades, la célula hospedera es un hepatocito mamífero no humano.

Las meganucleasas diseñadas que se describen en la presente, comprenden una primera subunidad, que comprende una primera región hipervariable (HVR1), y una segunda subunidad, que comprende una segunda región hipervariable (HVR2). Además, la primera subunidad se une a un primer medio sitio de reconocimiento en la secuencia de reconocimiento (es decir, el medio sitio HBV11), y la segunda subunidad se une a un segundo medio sitio de reconocimiento en la secuencia de reconocimiento (es decir, el medio sitio HBV12). En modalidades en donde la meganucleasa diseñada es una meganucleasa de cadena sencilla, las primera y segunda subunidades pueden ser orientadas para que la primera subunidad, la cual comprende la región HVR1 y une el primer medio sitio, esté colocada como la subunidad N-terminal y la segunda subunidad, la cual comprende la región HVR2 y une el segundo medio sitio, esté colocada como la subunidad C-terminal. En modalidades alternativas, las primera y segunda subunidades pueden ser orientadas para que la primera subunidad, la cual comprende la región HVR1 y une el primer medio sitio, esté colocada como la subunidad C-terminal y la segunda subunidad, la cual comprende la región HVR2 y une el segundo medio sitio, esté colocada como la subunidad N-terminal. Los ejemplos de meganucleasas diseñadas que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 se proporcionan en las SEQ ID NO: 5 y 6 y se describen adicionalmente a continuación.

HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2) (SEQ ID NO: 5)

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 204 a 259 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97 % de identidad con los residuos 204 a 259 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende uno o más residuos correspondientes a los residuos 204, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 220, 222, 224, 226, 248, 250, 255 y 257 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende los residuos que corresponden a los residuos 204, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 220, 222, 224, 226, 248, 250, 255, y 257 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 237 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 241 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 251 de la SEQ ID NO: 5.

5 En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 252 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 253 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende Y, R, K, o D en un residuo correspondiente al residuo 246 de la SEQ ID NO: 5.

10 En algunas modalidades, la región HVR1 comprende los residuos 204 a 259 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 187 a 333 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 187 a 333 de la SEQ ID NO: 5.

20 En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 185 a 343 de la SEQ ID NO: 5.

25 En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 185 a 343 de SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende G, S o A en un residuo correspondiente al residuo 199 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende E, Q, o K en un residuo correspondiente al residuo 260 de la SEQ ID NO: 5.

30 En algunas modalidades, la primera subunidad comprende los residuos 187 a 333 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende los residuos 185 a 343 de la SEQ ID NO: 5.

35 En algunas modalidades, la región HVR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 24 a 79 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende uno o más residuos correspondientes a los residuos 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 y 77 de la SEQ ID NO: 5.

5 En algunas modalidades, la región HVR2 comprende los residuos que corresponden a los residuos 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75, y 77 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende un residuo correspondiente al residuo 51 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende Y, R, K, o D en un residuo correspondiente al residuo 66 de la SEQ ID NO: 5.

10 En algunas modalidades, la región HVR2 comprende los residuos 24 a 79 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o
15 más de identidad de secuencia con los residuos 7 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 7 a 153 de SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al
20 menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 6 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 6 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

25 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 5 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

30 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 5 a 153 de SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad es una subunidad N-terminal y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al
35 menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 4 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que

tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 4 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 3 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 3 a 153 de SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 2 a 153 de la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 2 a 153 de SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 1 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 1 a 153 de SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 19 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 80 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 96 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 99 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 100 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende G, S, o A en un residuo correspondiente al residuo 19 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende E, Q, o K en un residuo

correspondiente al residuo 80 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 7 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

5 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 6 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 5 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

10 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 4 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 3 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

15 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 2 a 153 de la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 1 a 153 de la SEQ ID NO: 5.

20 En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada es una meganucleasa de cadena sencilla que comprende un enlazador y en donde el enlazador une covalentemente la primera subunidad y la segunda subunidad.

En algunas modalidades, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15.

25 En algunas modalidades, el extremo N-terminal del enlazador se fusiona al residuo (es decir, un residuo D) correspondiente al residuo 153 de SEQ ID NO: 5, y el extremo C-terminal del enlazador se fusiona al residuo (es decir, un residuo Y) correspondiente al residuo 185 de SEQ ID NO: 5.

30 En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una primera subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 187 a 333 de SEQ ID NO: 5; un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, en donde el enlazador se une covalentemente a la primera subunidad y la segunda subunidad; y una segunda subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 7 a 153 de SEQ ID NO: 5.

35 En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una primera subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 185 a 343 de SEQ ID NO: 5; un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, en donde el enlazador se une covalentemente a la primera subunidad y la segunda subunidad; y una segunda subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que

tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 1 a 153 de SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 4 a 343 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia con los residuos 4 a 343 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 3 a 343 de la SEQ ID NO: 5.

En ciertas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia correspondiente a los residuos 3 a 343 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 2 a 343 de la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia con los residuos 2 a 343 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5. En ciertas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos de los residuos 4 a 343 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos de los residuos 3 a 343 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos

de los residuos 2 a 343 de la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada está codificada por una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 11.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada está codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 11.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una señal de localización nuclear.

En algunas modalidades, la señal de localización nuclear se encuentra en el extremo N-terminal de la meganucleasa diseñada.

En algunas modalidades, la señal de localización nuclear se encuentra en el extremo C-terminal de la meganucleasa diseñada.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una primera señal de localización nuclear en el extremo N-terminal y una segunda señal de localización nuclear en el extremo C-terminal.

En algunas modalidades, la señal de localización nuclear comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, la señal de localización nuclear comprende la SEQ ID NO: 17.

HBV 11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2) (SEQ ID NO: 6)

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 204 a 259 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97 % de identidad con los residuos 204 a 259 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende uno o más residuos correspondientes a los residuos 204, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 220, 222, 224, 226, 248, 250, 255 y 257 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende los residuos que corresponden a los residuos 204, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 220, 222, 224, 226, 248, 250, 255, y 257 de la SEQ ID NO:

6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 237 de la SEQ ID NO: 6.

5 En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 241 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 251 de la SEQ ID NO: 6.

10 En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 252 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende un residuo correspondiente al residuo 253 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR1 comprende Y, R, K, o D en un residuo correspondiente al residuo 246 de la SEQ ID NO: 6.

15 En algunas modalidades, la región HVR1 comprende los residuos 204 a 259 de la SEQ ID NO: 6.

20 En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 187 a 333 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 187 a 333 de la SEQ ID NO: 6.

25 En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 185 a 343 de la SEQ ID NO: 6.

30 En algunas modalidades, la primera subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 185 a 343 de SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 260 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende G, S o A en un residuo correspondiente al residuo 199 de la SEQ ID NO: 6.

35 En algunas modalidades, la primera subunidad comprende E, Q, o K en un residuo correspondiente al residuo 260 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende los residuos 187 a 333 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera subunidad comprende los residuos 185 a 343 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 6.

5 En algunas modalidades, la región HVR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 24 a 79 de la SEQ ID NO: 6.

10 En algunas modalidades, la región HVR2 comprende uno o más residuos correspondientes a los residuos 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 y 77 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende los residuos que corresponden a los residuos 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75, y 77 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende un residuo correspondiente al residuo 51 de la SEQ ID NO: 6.

15 En algunas modalidades, la región HVR2 comprende Y, R, K, o D en un residuo correspondiente al residuo 66 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la región HVR2 comprende los residuos 24 a 79 de la SEQ ID NO: 6.

20 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 7 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 7 a 153 de SEQ ID NO: 6.

25 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 6 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

30 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 6 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

35 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 5 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 5 a 153 de SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad es una subunidad N-terminal y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 4 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 4 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 3 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 3 a 153 de SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 2 a 153 de la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 2 a 153 de SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 1 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con los residuos 1 a 153 de SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 19 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 80 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 96 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 99 de la SEQ ID NO: 6.

5 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo correspondiente al residuo 100 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende G, S, o A en un residuo correspondiente al residuo 19 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende E, Q, o K en un residuo correspondiente al residuo 80 de la SEQ ID NO: 6.

10 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 7 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 6 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

15 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 5 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 4 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 3 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

20 En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 2 a 153 de la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende los residuos 1 a 153 de la SEQ ID NO: 6.

25 En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada es una meganucleasa de cadena sencilla que comprende un enlazador y en donde el enlazador une covalentemente la primera subunidad y la segunda subunidad.

En algunas modalidades, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 16.

30 En algunas modalidades, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15.

En algunas modalidades, el extremo N-terminal del enlazador se fusiona al residuo (es decir, un residuo D) correspondiente al residuo 153 de SEQ ID NO: 6, y el extremo C-terminal del enlazador se fusiona al residuo (es decir, un residuo Y) correspondiente al residuo 185 de SEQ ID NO: 6.

35 En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una primera subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 187 a 333 de SEQ ID NO: 6; un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, en donde el enlazador se une covalentemente a la primera subunidad

y la segunda subunidad; y una segunda subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 7 a 153 de SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una primera subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 185 a 343 de SEQ ID NO: 6; un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, en donde el enlazador se une covalentemente a la primera subunidad y la segunda subunidad; y una segunda subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con los residuos 1 a 153 de SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 4 a 343 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia con los residuos 4 a 343 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 3 a 343 de la SEQ ID NO: 6.

En ciertas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia con los residuos 3 a 343 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con los residuos 2 a 343 de la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia con los residuos 2 a 343 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

En ciertas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos

que tiene al menos 92 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 4 a 343 de la SEQ ID NO: 6.

5 En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 3 a 343 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 2 a 343 de la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la segunda subunidad comprende un residuo diferente a M en una posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 6.

10 En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada está codificada por una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o más de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12.

20 En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada está codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una señal de localización nuclear.

En algunas modalidades, la señal de localización nuclear se encuentra en el extremo N-terminal de la meganucleasa diseñada.

25 En algunas modalidades, la señal de localización nuclear se encuentra en el extremo C-terminal de la meganucleasa diseñada.

En algunas modalidades, la meganucleasa diseñada comprende una primera señal de localización nuclear en el extremo N-terminal y una segunda señal de localización nuclear en el extremo C-terminal.

30 En algunas modalidades, la señal de localización nuclear comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, la señal de localización nuclear comprende la SEQ ID NO: 17.

En determinadas modalidades de las meganucleasas diseñadas descritas en la presente, la primera subunidad (es decir, que comprende HVR1) se puede colocar como la subunidad C-terminal, y la segunda subunidad (es decir, que comprende HVR2) se puede colocar como la subunidad N-terminal. En algunas modalidades de la configuración, tal como las ejemplificadas en SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6, la primera subunidad (es decir, la subunidad C-terminal) puede carecer de residuos en su extremo N-terminal que corresponden a los residuos 1 a 4 de I-Crel de tipo silvestre porque el sitio de

unión del enlazador polipeptídico está en el residuo Y correspondiente a la posición 5 de I-Crel de tipo silvestre. La primera subunidad puede comprender además residuos en su extremo C-terminal que corresponden a los residuos 154 a 163 de I-Crel de tipo silvestre. Además, en algunas modalidades de esta configuración, la segunda subunidad (es decir, la subunidad N-terminal) puede carecer de residuos en su extremo C-terminal que corresponden a los residuos 154 a 163 de I-Crel de tipo silvestre porque el sitio de unión del enlazador polipeptídico está en el residuo D correspondiente a la posición 153 de I-Crel de tipo silvestre. La segunda subunidad puede comprender además uno o más residuos en su extremo N-terminal que corresponden a uno o más de los residuos 1 a 6 de I-Crel de tipo silvestre (por ejemplo, residuos 1-6, 2-6, 3-6, 4-6 o 5-6).

En otras modalidades de las meganucleasas diseñadas descritas en la presente, la primera subunidad (es decir, que comprende HVR1) se puede colocar como la subunidad N-terminal, y la segunda subunidad (es decir, que comprende HVR2) se puede colocar como la subunidad C-terminal. En algunas modalidades de esta configuración, la primera subunidad (es decir, la subunidad N-terminal) puede carecer de residuos en su extremo C-terminal que corresponden a los residuos 154 a 163 de I-Crel de tipo silvestre porque el sitio de unión del enlazador polipeptídico está en el residuo D correspondiente a la posición 153 de I-Crel de tipo silvestre. La primera subunidad puede comprender además uno o más residuos en su extremo N-terminal que corresponden a uno o más de los residuos 1 a 6 de I-Crel de tipo silvestre (por ejemplo, residuos 1-6, 2-6, 3-6, 4-6 o 5-6). Además, en algunas modalidades de esta configuración, la segunda subunidad (es decir, la subunidad C-terminal) puede carecer de residuos en su extremo N-terminal que corresponden a los residuos 1 a 4 de I-Crel de tipo silvestre porque el sitio de unión del enlazador polipeptídico está en el residuo Y correspondiente a la posición 5 de I-Crel de tipo silvestre. La segunda subunidad puede comprender además residuos en su extremo C-terminal que corresponden a los residuos 154 a 163 de I-Crel de tipo silvestre.

En algunas modalidades, las meganucleasas diseñadas divulgadas comprenden (i) un aminoácido inactivador en la subunidad N-terminal que reduce o suprime la actividad de escisión; (ii) un aminoácido inactivador en la subunidad C-terminal que reduce o suprime la actividad de escisión; o (iii) un aminoácido inactivador en la subunidad N-terminal que reduce o suprime la actividad de escisión y un aminoácido inactivador en la subunidad C-terminal que reduce o suprime la actividad de escisión.

Como se usa en la presente, un aminoácido inactivador que "reduce" la actividad de escisión de una meganucleasa diseñada inactiva solo la subunidad que comprende ese aminoácido, en tanto que no afecta la capacidad de la otra subunidad para escindir su cadena de ADN. Por ejemplo, en los casos en que solo una subunidad comprende un aminoácido inactivador que reduce la actividad de escisión, la otra subunidad permanece activa y la meganucleasa diseñada se convierte en una nicasa que sigue siendo capaz de escindir una cadena del ADN de cadena doble. En otros casos en los que ambas subunidades comprenden un aminoácido inactivador que reduce la actividad de escisión, ninguna de las subunidades es activa, la meganucleasa diseñada no comprende ninguna actividad de escisión y no puede generar una ruptura de cadena sencilla o cadena doble en el ADN.

En comparación, un aminoácido inactivador que "suprime" la actividad de escisión de una meganucleasa diseñada puede estar presente solo en una subunidad, pero inactivará ambas subunidades de la meganucleasa diseñada, de modo que no comprenda ninguna actividad de escisión y no pueda generar una ruptura de cadena sencilla o cadena doble en el ADN.

En algunas modalidades, el aminoácido inactivador es A en una posición correspondiente a la posición 20 o posición 200 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el aminoácido inactivador es E en una posición correspondiente a la posición 47 o posición 227 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la subunidad N-terminal comprende E en una posición que corresponde a la posición 47 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, y la subunidad C-terminal comprende E en una posición correspondiente a la posición 227 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, en donde la meganucleasa diseñada no comprende actividad de escisión (es decir, se suprime la actividad).

En algunas modalidades, la subunidad N-terminal comprende A en una posición correspondiente a la posición 20 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, y/o la subunidad C-terminal comprende A en una posición correspondiente a la posición 200 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, en donde la meganucleasa diseñada no comprende actividad de escisión (es decir, se suprime la actividad).

En algunas modalidades, la subunidad N-terminal comprende E en una posición que corresponde a la posición 47 de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6 y la subunidad C-terminal no comprende un aminoácido inactivador, en donde la meganucleasa diseñada es una nicasa que solo es capaz de escindir la cadena antisentido de un sitio blanco de ADNbc.

En algunas modalidades, la subunidad C-terminal comprende E en una posición correspondiente a la posición 227 de SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6 y la subunidad N-terminal no comprende un aminoácido inactivador, en donde la meganucleasa diseñada es una nicasa que solo es capaz de escindir la cadena sentido de un sitio blanco de ADNbc.

En aquellas modalidades en donde la meganucleasa diseñada no comprende actividad de escisión (es decir, se suprime la actividad) debido a una o más modificaciones de aminoácidos inactivadoras, las meganucleasas diseñadas son capaces de unirse a un ADN de cadena doble que comprende la secuencia de reconocimiento de SEQ ID NO: 3 (es decir, HBV 11-12) sin escindir el ADN de cadena doble. En aquellas modalidades en donde la meganucleasa diseñada comprende una modificación de aminoácidos inactivadora de modo que solo una subunidad tiene actividad de escisión, y la meganucleasa diseñada es una nicasa, estas meganucleasas diseñadas son capaces de unirse a un ADN de cadena doble que comprende la secuencia de reconocimiento de SEQ ID NO: 3 (es decir, HBV 11-12) y escindir la cadena sentido o antisentido del ADN.

2.3 Métodos para administrar y expresar meganucleasas diseñadas optimizadas

En la presente se describen métodos para inactivar un gen de polimerasa (pol) de un genoma

de HBV o un fragmento de genoma de HBV que comprende introducir en una célula eucariota que comprende el genoma de HBV o fragmento del mismo una meganucleasa diseñada descrita en la presente o un ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada, en donde la meganucleasa diseñada produce un sitio de escisión en una secuencia de reconocimiento que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 3 (es decir, HBV 11-12) y el gen pol se inactiva mediante la introducción de un indel en el sitio de escisión o mediante la eliminación del genoma de HBV o un fragmento de este. Del mismo modo, se proporcionan métodos para reducir los síntomas de una infección por HBV y/o una enfermedad asociada con la infección por HBV, reducir la cantidad de HBV, reducir la tasa de proliferación de HBV y/o tratar una infección por HBV y/o una enfermedad asociada con la infección por HBV en un sujeto que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada, o una célula que expresa la meganucleasa diseñada. En los métodos descritos en la presente, una meganucleasa diseñada de la divulgación se puede administrar y/o expresar a partir de ADN/ARN en células blanco que pueden proporcionar la meganucleasa diseñada al genoma de HBV.

Introducción de meganucleasas diseñadas en células

Las proteínas meganucleasas diseñadas descritas en la presente o los polinucleótidos que las codifican, se pueden administrar a las células para escindir el ADN genómico o un fragmento de genoma de HBV mediante diversos mecanismos conocidos en la técnica, incluidos los que se detallan a continuación.

Las meganucleasas diseñadas descritas en la presente se pueden administrar a una célula en forma de proteína o, preferiblemente, como un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa diseñada. Tales polinucleótidos pueden ser, por ejemplo, ADN (por ejemplo, ADN plasmídico circular o linealizado, productos de PCR o genomas virales) o ARN (por ejemplo, ARNm).

Para modalidades en las que la secuencia codificante de meganucleasa diseñada se administra en forma de ADN, debe estar enlazado operativamente a un promotor para facilitar la transcripción del gen de meganucleasa. Los promotores de mamífero adecuados para usarse incluyen promotores constitutivos tales como el promotor temprano de citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés) (Thomsen *et al.* (1984), *Proc Natl Acad Sci USA*. 81(3):659-63) o el promotor temprano de SV40 (Benoist y Chambon (1981), *Nature*. 290(5804):304-10) así como promotores inducibles tales como el promotor inducible por tetraciclina (Dingermann *et al.* (1992), *Mol Cell Biol*. 12(9):4038-45). Una meganucleasa diseñada de la divulgación se puede enlazar operativamente también a un promotor sintético. Los promotores sintéticos pueden incluir, entre otros, al promotor JeT (WO 2002/012514). En modalidades específicas, una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada, tal como se describe en la presente, puede estar enlazada operativamente a un promotor específico de hígado. Ejemplos de promotores específicos del hígado incluyen, sin limitación, promotor de antitripsina alfa-1

humana, promotor específico del hígado híbrido (región de control del *locus* hepático del gen ApoE (ApoE-HCR) y un promotor de antitripsina alfa-1 específico de hígado), promotor de globulina fijadora de tiroxina (TGB) humana y un promotor de apolipoproteína A-II.

En algunas modalidades, en donde un único polinucleótido comprende dos secuencias de ácido nucleico separadas que codifican cada una, una meganucleasa diseñada tal como aquellas descritas en la presente, los genes de meganucleasa están enlazados operativamente a dos promotores separados. En modalidades alternativas, los dos genes de meganucleasas están enlazados operativamente a un único promotor y, en algunos ejemplos, pueden estar separados por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o una secuencia peptídica 2A (Szymczak y Vignali (2005) *Expert Opin Biol Ther.* 5:627-38). Dichas secuencias peptídicas 2A pueden incluir, por ejemplo, una secuencia T2A, P2A, E2A o F2A.

En modalidades específicas, un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una meganucleasa diseñada descrita en la presente se administra en un constructo de ADN recombinante o casete de expresión. Por ejemplo, el constructo de ADN recombinante puede incluir un casete de expresión (es decir, "casete") que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente.

En otras modalidades, el constructo de ADN recombinante comprende al menos un primer casete y un segundo casete, en donde el primer casete comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente, y en donde el segundo casete comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda meganucleasa diseñada que se une y escinde una segunda secuencia de reconocimiento que está presente en un genoma del virus de la hepatitis B, pero difiere de SEQ ID NO: 3.

En otras modalidades, el constructo de ADN recombinante comprende un casete que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico policistrónico, en donde el promotor conduce la expresión de la secuencia de ácido nucleico policistrónico para generar un ARNm policistrónico descrito en la presente en una célula blanco.

En otra modalidad particular, en las células se introduce un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente utilizando una plantilla de ADN monocatenario. El ADN monocatenario puede comprender además una repetición terminal invertida (ITR) 5' y/o 3' de AAV corriente arriba y/o corriente abajo de la secuencia que codifica la nucleasa diseñada. El ADN monocatenario puede además incluir un grupo de homología 5' y/o 3' corriente arriba y/o corriente abajo de la secuencia que codifica la meganucleasa diseñada.

En otra modalidad particular, se puede introducir en una célula un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente utilizando una plantilla de ADN linealizado. Tales plantillas de ADN linealizado se pueden producir mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ADN plasmídico que codifica una nucleasa puede ser digerido por una o más enzimas de restricción para que el ADN plasmídico circular se linealice

antes de ser introducido en una célula.

En algunas modalidades, el ARNm que codifica una meganucleasa diseñada se administra a una célula ya que esto reduce la probabilidad de que el gen que codifica la meganucleasa diseñada se integre al genoma de la célula.

Dicho ARNm puede ser producido utilizando métodos conocidos en la técnica, como la transcripción *in vitro*. En algunas modalidades, el ARNm tiene una caperuza o capuchón en los extremos 5' usando 7-metil-guanosina, análogos de caperuza anti-inversas (ARCA) (Patente estadounidense Núm. 7,074,596), análogos de CleanCap® tales como análogos de Cap 1 (Trilink, San Diego, CA), o se cubren enzimáticamente con enzima de caperuza de vaccinia o similar. En algunas modalidades, el ARNm puede estar poliadenilado. El ARNm puede contener varios elementos de secuencia no traducidos 5' y 3' para mejorar la expresión de la meganucleasa diseñada codificada y/o la estabilidad del propio ARNm. Los ejemplos no limitantes de estos elementos incluyen una región no traducida (UTR) 5' de albúmina (ALB) que tiene la secuencia establecida como SEQ ID NO: 82, (por ejemplo, codificada por SEQ ID NO: 18), una secuencia Kozak que tiene la secuencia establecida como SEQ ID NO: 84, (por ejemplo, codificada por SEQ ID NO: 21), una UTR 3' de ribonucleoproteína B nuclear pequeña (SNRPB) que tiene la secuencia establecida como SEQ ID NO: 83, (por ejemplo, codificada por SEQ ID NO: 19), y una secuencia de terminación poliA tal como la secuencia establecida como SEQ ID NO: 20. Dichos elementos pueden incluir, por ejemplo, elementos reguladores postraduccionales tales como un elemento regulador postraducciona del virus de la hepatitis de la marmota. El ARNm puede contener análogos de nucleósidos o nucleósidos de origen natural, tales como pseudouridina, 5-metilcitidina, N6-metiladenosina, 5-metiluridina o 2-tiouridina. Los análogos de nucleósidos adicionales incluyen, por ejemplo, los descritos en US 8,278,036. Como las secuencias de ARN ricas en uridina pueden desencadenar la respuesta inmunitaria innata, el ARNm se puede empobrecer en uridina. El polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente se puede optimizar en codones para la expresión en células de mamífero y, más específicamente, para la expresión en tejidos particulares, tal como el hígado.

En modalidades particulares, un ARNm que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente puede ser un ARNm policistrónico que codifica dos o más meganucleasas, tal como las descritas en la presente, que se expresan simultáneamente en una célula. En algunas modalidades, un ARNm policistrónico puede codificar al menos una primera y una segunda meganucleasa diseñada, en donde la primera meganucleasa diseñada es una meganucleasa diseñada descrita en la presente, y en donde la segunda meganucleasa diseñada se une y escinde una segunda secuencia de reconocimiento en el genoma de HBV que difiere de SEQ ID NO: 3, de modo que el genoma de HBV se escinde en múltiples sitios. En algunas modalidades, un ARNm policistrónico puede codificar una meganucleasa diseñada aquí descrita y al menos una proteína adicional que induce un efecto terapéuticamente benéfico en la célula. Un ARNm policistrónico puede comprender cualquier elemento conocido en la técnica para permitir la traducción de dos o más genes de la misma molécula de ARNm que incluye,

entre otros, un elemento IRES, un elemento T2A, un elemento P2A, un elemento E2A y un elemento F2A.

En algunas modalidades, los métodos comprenden administrar una meganucleasa diseñada descrita en la presente (o un ácido nucleico que codifica la misma) y un ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un gen suicida y secuencias homólogas a secuencias que flanquean el sitio de escisión de meganucleasa, en donde la meganucleasa diseñada se une y escinde una secuencia de reconocimiento que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 3 dentro del genoma del virus de la hepatitis B, escindiendo así el genoma de HBV, en donde el gen suicida se inserta en el genoma de HBV escindido mediante recombinación homóloga.

Un gen suicida es un ácido nucleico que codifica un producto que causa la muerte celular por sí solo o en presencia de otros compuestos. Un ejemplo representativo de dicho gen suicida es uno que codifica la timidina cinasa del virus del herpes simple. Ejemplos adicionales son genes que codifican timidina cinasa del virus de la varicela zóster y el gen bacteriano citosina desaminasa que puede convertir 5-fluorocitosina en el compuesto altamente tóxico 5-fluorouracilo. Los genes suicidas también incluyen como ejemplos no limitantes, genes que codifican caspasa-9, caspasa-8 o citosina desaminasa. En algunos ejemplos, la caspasa-9 se puede activar usando un inductor químico específico de dimerización (CID). En algunas modalidades, el gen suicida es directamente letal para el HBV o una célula blanco (por ejemplo, célula de HCC). En algunas de estas modalidades, el gen suicida directamente letal codifica un polipéptido tóxico o una proteína pro-apoptótica. En algunas modalidades, el gen suicida es indirectamente letal para la célula blanco y dirige el propio sistema inmunitario del sujeto para matar la célula blanco. En algunas de estas modalidades, el gen suicida indirectamente letal codifica una proteína de la superficie celular que el sistema inmunitario del sujeto reconoce como extraña y que es blanco de una respuesta inmunitaria humoral o celular. En otras de estas modalidades, el gen suicida indirectamente letal codifica un polipéptido que es presentado por una molécula de MHC Clase I, es reconocido como extraño por el sistema inmunitario del sujeto y es blanco de una respuesta inmunitaria citotóxica.

Las proteínas meganucleasas purificadas se pueden administrar dentro de células para la escisión del ADN genómico a través de una variedad de diferentes mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos más adelante.

El tejido(s) blanco para la administración de meganucleasas diseñadas de la divulgación incluye, sin limitación, células del hígado, tales como una célula de hepatocito o preferiblemente un hepatocito primario, muy preferiblemente un hepatocito humano o un hepatocito primario humano, una célula HepG2.2.15 o HepG2-hNTCP. Como se ha discutido, las meganucleasas divulgadas en la presente se pueden administrar como una proteína purificada o como ARN o ADN que codifica la meganucleasa. En una modalidad, las proteínas meganucleasas o vectores de ARNm o de ADN que codifican meganucleasas, se administran a células blanco (por ejemplo, células en el hígado) a través de inyección directamente al tejido blanco. Alternativamente, la proteína meganucleasa, ARNm, ADN o

células que expresan meganucleasas se pueden administrar sistémicamente a través del sistema circulatorio.

En algunas modalidades, las proteínas meganucleasas, o el ADN/ARNm que codifica la meganucleasa, se acoplan a un péptido que penetra la célula o a un ligando blanco para facilitar la captación celular. Los ejemplos de péptidos penetrantes celulares conocidos en la materia incluyen poliarginina (Jearawiriyapaisarn, *et al.* (2008) *Mol Ther.* 16:1624-9), péptido TAT del virus del VIH (Hudecz *et al.* (2005), *Med. Res. Rev.* 25: 679-736), MPG (Simeoni, *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2717–2724), Pep-1 (Deshayes *et al.* (2004) *Biochemistry* 43: 7698–7706, y HSV-1 VP-22 (Deshayes *et al.* (2005) *Cell Mol Life Sci.* 62:1839-49. En una modalidad alternativa, las proteínas meganucleasas o ADN/ARNm que codifica meganucleasas, se acoplan covalentemente o no covalentemente a un anticuerpo que reconoce un receptor de superficie celular específico expresado en células blanco de manera que la proteína meganucleasa/ADN/ARNm se une a y se internaliza por las células blanco. Alternativamente, la proteína meganucleasa/ADN/ARNm se pueden acoplar covalentemente o no covalentemente al ligando natural (o una porción del ligando natural) para dicho receptor de superficie celular. (McCall, *et al.* (2014) *Tissue Barriers.* 2(4):e944449; Dinda, *et al.* (2013) *Curr Pharm Biotechnol.* 14:1264-74; Kang, *et al.* (2014) *Curr Pharm Biotechnol.* 15(3):220-30; Qian *et al.* (2014), *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 10(11):1491-508).

En algunas modalidades, las proteínas meganucleasas, o el ADN/ARNm que codifica las meganucleasas, se encapsulan en hidrogeles biodegradables para su inyección o implantación en la región deseada del hígado (por ejemplo, cerca de las células endoteliales sinusoidales hepáticas o células endoteliales hematopoyéticas, o células progenitoras que se diferencian en las mismas). Los hidrogeles pueden proporcionar liberación sostenida y ajustable de la carga terapéutica a la región deseada del tejido blanco sin la necesidad de inyecciones frecuentes y se pueden diseñar materiales sensibles a los estímulos (por ejemplo, hidrogeles sensibles a la temperatura y al pH) para liberar la carga en respuesta a claves ambientales o aplicadas externamente (Kang Derwent *et al.* (2008), *Trans Am Ophthalmol Soc.* 106:206-214).

En algunas modalidades, las proteínas meganucleasas o ADN/ARNm que codifica meganucleasas, se acoplan covalentemente o, preferiblemente, no covalente a una nanopartícula o se encapsulan dentro de dicha nanopartícula utilizando métodos conocidos en la técnica (Sharma *et al.* (2014) *Biomed Res Int.* 2014). Una nanopartícula es un sistema de administración a nanoescala cuya escala de longitud es de <1 μm , preferiblemente, <100 nm. Dichas nanopartículas pueden diseñarse utilizando un núcleo compuesto de metal, lípido (referido como una nanopartícula lipídica), polímero o macromolécula biológica y múltiples copias de las proteínas meganucleasas, ARNm o ADN pueden unirse a o encapsularse con el núcleo de nanopartícula. Esto incrementa el número de copias de la proteína/ARNm/ADN que se administra a cada célula y, de esta forma, incrementa la expresión intracelular de cada meganucleasa para incrementar al máximo la probabilidad de que las secuencias de reconocimiento blanco se cortarán. La superficie de dichas nanopartículas se puede modificar

adicionalmente con polímeros o lípidos (por ejemplo, quitosano, polímeros catiónicos o lípidos catiónicos) para formar una nanopartícula núcleo-corteza cuya superficie confiere funcionalidades adicionales para mejorar la administración celular y la absorción de la carga útil (Jian *et al.* (2012) Biomaterials. 33(30): 7621-30). Además, las nanopartículas se pueden acoplar ventajosamente a moléculas blanco para dirigir la nanopartícula al tipo celular apropiado y/o aumentar la probabilidad de captación celular. Ejemplos de dichas moléculas dirigidas incluyen anticuerpos específicos para los receptores de superficie celular y los ligandos naturales (o porciones de los ligandos naturales) para receptores de superficie celular.

En algunas modalidades, las proteínas meganucleasas o ADN/ARNm que codifica las meganucleasas están encapsulados dentro de liposomas o formando complejos usando lípidos catiónicos (véase, por ejemplo, LIPOFECTAMINE, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA; Zuris *et al.* (2015) Nat Biotechnol. 33: 73-80; Mishra *et al.* (2011) J Drug Deliv. 2011:863734). Las formulaciones de liposoma y lipoplex pueden proteger la carga de degradación, mejorar la acumulación y la retención en el sitio blanco y facilitar la captación celular y la eficiencia de administración a través de fusión con y/o ruptura de las membranas celulares de las células blanco.

En algunas modalidades, las proteínas meganucleasas, o ADN/ARNm que codifica meganucleasas, se encapsulan dentro de andamiajes poliméricos (por ejemplo, PLGA) o se forman en complejos usando polímeros catiónicos (por ejemplo, PEI, PLL) (Tamboli *et al.* (2011) Ther Deliv. 2(4): 523-536). Los vehículos poliméricos se pueden diseñar para proporcionar tasas de liberación de fármacos ajustables mediante el control de la erosión del polímero y la difusión del fármaco, y altas eficiencias de encapsulación de medicamentos pueden ofrecer protección de la carga terapéutica hasta la administración intracelular a la población celular blanco deseada.

En algunas modalidades, las proteínas meganucleasas o ADN/ARNm que codifica meganucleasas diseñadas se combinan con moléculas anfifílicas que se auto-ensamblan en micelas (Tong *et al.* (2007) J Gene Med. 9(11): 956-66). Las micelas poliméricas pueden incluir una cubierta micelar formada con un polímero hidrófilo (por ejemplo, polietilenglicol) que puede prevenir la agregación, el enmascaramiento de las interacciones de carga y reducir las interacciones no específicas.

En algunas modalidades, las proteínas meganucleasas, o el ADN/ARNm que codifica las meganucleasas, se formulan en una emulsión o nanoemulsión (es decir, con un diámetro medio de partícula < 1 nm) para su administración y/o suministro a la célula blanco. El término “emulsión” se refiere, de modo no limitante, a cualquier dispersión o gotícula de aceite en agua, agua en aceite, agua en aceite en agua, o aceite en agua en aceite, que incluye estructuras lipídicas que se pueden formar como resultado de fuerzas hidrófobas que alejan los residuos apolares (por ejemplo, cadenas largas de hidrocarburos) del agua y acercan los grupos cabeza polares hacia el agua, cuando una fase inmiscible en agua se mezcla con una fase acuosa. Estas otras estructuras lipídicas incluyen, entre otros, vesículas lipídicas, micelas y fases laminares unilaminares, paucilamelares y multilamelares. Las emulsiones se

componen de una fase acuosa y una fase lipófila (que generalmente contiene un aceite y un solvente orgánico). Las emulsiones también contienen con frecuencia uno o más tensoactivos. Las formulaciones en nanoemulsión son bien conocidas, por ejemplo, las descritas en las patentes estadounidenses números 6,015,832, 6,506,803, 6,635,676, 6,559,189 y 7,767,216, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, las proteínas meganucleasas, o ADN/ARNm que codifica meganucleasas, están unidos covalentemente o no covalentemente asociados con conjugados poliméricos multifuncionales, dendrímeros de ADN y dendrímeros poliméricos (Mastorakos *et al.* (2015) *Nanoscale*. 7(9): 3845-56; Cheng *et al.* (2008) *J Pharm Sci*. 97(1): 123-43). La generación de dendrímeros puede controlar la capacidad de carga útil y el tamaño, y puede proporcionar una alta capacidad de carga útil de fármacos. Además, la presentación de múltiples grupos superficiales puede aprovecharse para mejorar la estabilidad, reducir las interacciones no específicas y potenciar la especificidad de la orientación hacia las células y la liberación del fármaco.

En algunas modalidades, los polinucleótidos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente se introducen en una célula utilizando un virus recombinante (es decir, un vector viral recombinante). Tales virus recombinantes son conocidos en la técnica e incluyen retrovirus recombinantes, lentivirus recombinantes, adenovirus recombinantes y virus adenoasociados (AAV, por sus siglas en inglés) recombinantes (revisado en Vannucci *et al.* (2013 *New Microbiol*. 36:1-22). Los AAV recombinantes pueden tener cualquier serotipo que permita la transducción del virus en un tipo de célula blanco y la expresión del gen de la meganucleasa en la célula blanco. Por ejemplo, en algunas modalidades, los AAV recombinantes tienen un serotipo (es decir, cápside) de AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 y AAV12. En algunas modalidades, los vectores virales se inyectan directamente en tejidos blanco (por ejemplo, tejido del hígado). En modalidades alternativas, los vectores virales se administran sistémicamente a través del sistema circulatorio. En la técnica se conocen diferentes AAV que tienden a localizarse en diferentes tejidos (Wang *et al.*, *Expert Opin Drug Deliv* 11(3). 2014). En tejidos blanco del hígado, la transducción efectiva de hepatocitos se ha mostrado, por ejemplo, con los serotipos 2, 8 y 9 de AAV (Sands (2011), *Methods Mol. Biol.* 807:141-157). En algunas modalidades, el serotipo de AAV es AAV2. En algunas modalidades, el serotipo de AAV es AAV8. En algunas modalidades, el serotipo de AAV es AAV9. Los AAV también pueden ser auto-complementarios, lo que significa que no requieren síntesis de ADN bicatenario en la célula hospedera (McCarty *et al.* (2001) *Gene Ther.* 8:1248-54). Los polinucleótidos administrados por los AAV recombinantes pueden incluir repeticiones terminales invertidas izquierda (5') y derecha (3') como parte del genoma viral. En algunas modalidades, los virus recombinantes se inyectan directamente en los tejidos blanco. En modalidades alternativas, los virus recombinantes se administran de forma sistémica a través del sistema circulatorio.

En una modalidad, un virus recombinante utilizado para la introducción del gen de la meganucleasa es un virus recombinante autolimitante. Un virus autolimitante puede tener un tiempo de

persistencia limitado en una célula u organismo debido a la presencia de una secuencia de reconocimiento para una meganucleasa modificada dentro del genoma viral. Por lo tanto, un virus recombinante autolimitante puede ser diseñado para proporcionar una secuencia codificante de un promotor, una meganucleasa diseñada descrita en la presente y un sitio de reconocimiento de meganucleasa dentro de las ITR. El virus recombinante autolimitante administra el gen de la meganucleasa en una célula, tejido u organismo, de manera que la meganucleasa se expresa y es capaz de cortar el genoma de la célula en una secuencia de reconocimiento endógena dentro del genoma. La meganucleasa administrada también encontrará su sitio blanco dentro del genoma viral recombinante autolimitante y cortará el genoma viral recombinante en este sitio blanco. Una vez cortados, los extremos 5' y 3' del genoma viral estarán expuestos y serán degradados por exonucleasas, lo que resultará en la inactivación del virus y el cese de la producción de la meganucleasa.

Si un polinucleótido que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente se administra a una célula mediante un virus recombinante (por ejemplo, un AAV), la secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa modificada puede estar enlazada operativamente a un promotor. En algunas modalidades, este puede ser un promotor viral tal como promotores endógenos del virus recombinante (por ejemplo, el LTR de un lentivirus) o los promotores tempranos de citomegalovirus o del virus SV40 bien conocidos. En modalidades particulares, la secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa modificada está enlazada operativamente a un promotor que impulsa la expresión génica de manera preferencial en las células blanco (por ejemplo, células hepáticas). Ejemplos de promotores específicos del hígado incluyen, sin limitación, promotor de antitripsina alfa-1 humana, promotor específico del hígado híbrido (región de control del *locus* hepático del gen ApoE (ApoE-HCR) y un promotor de antitripsina alfa-1 específico de hígado), promotor de globulina fijadora de tiroxina (TGB) humana y un promotor de apolipoproteína A-II.

En modalidades particulares, el vector viral comprende un casete que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente. El vector viral también podría comprender dos o más casetes, en donde al menos un primer casete comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente, y en donde al menos un segundo casete comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada que tiene especificidad para una secuencia de reconocimiento de HBV distinta de la secuencia de reconocimiento HBV 11-12. En algunas modalidades, el vector viral comprende un casete que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico policistrónico, en donde el promotor conduce la expresión de la secuencia de ácido nucleico policistrónico para generar un ARNm policistrónico, tal como un ARNm policistrónico que codifica una meganucleasa diseñada, descrita en la presente en una célula blanco.

En algunas modalidades, las meganucleasas diseñadas descritas en la presente, o polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica

una meganucleasa diseñada descrita en la presente, se encapsulan en nanopartículas lipídicas y se introducen en una célula.

Algunas nanopartículas lipídicas contempladas para usarse comprenden al menos un lípido catiónico, al menos un lípido no catiónico y al menos un lípido conjugado. En ejemplos más particulares, las nanopartículas lipídicas pueden comprender de aproximadamente 50 % molar a aproximadamente 85 % molar de un lípido catiónico, de aproximadamente 13 % molar a aproximadamente 49.5 % molar de un lípido no catiónico y de aproximadamente 0.5 % molar a aproximadamente 10 % molar de un conjugado lipídico y se producen de tal manera que tienen una morfología no laminar (es decir, no es bicapa). En otros ejemplos particulares, las nanopartículas lipídicas pueden comprender de aproximadamente 40 % molar a aproximadamente 85 % molar de un lípido catiónico, de aproximadamente 13 % molar a aproximadamente 49.5 % molar de un lípido no catiónico y de aproximadamente 0.5 % molar a aproximadamente 10 % molar de un conjugado lipídico y se producen de tal manera que tienen una morfología no laminar (es decir, no es bicapa).

Los lípidos catiónicos pueden incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: palmitoil-oleoil-nor-arginina (PONA), MPDACA, GUADACA, ((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato) (MC3), LenMC3, CP-LenMC3, γ -LenMC3, CP- γ -LenMC3, MC3MC, MC2MC, MC3 Éter, MC4 Éter, MC3 Amida, Pan-MC3, Pan-MC4 y Pan MC5, 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA; "XTC2"), 2,2-dilinoileil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C3-DMA), 2,2-dilinoileil-4-(4-dimetilaminobutil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C4-DMA), 2,2-dilinoileil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (DLin-K6-DMA), 2,2-dilinoileil-4-N-metilpiperazino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MPZ), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 1,2-dilinoileilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoileiloxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoileiloxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-dilinoileil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoileil-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoileil-2-linoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), sal de cloruro de 1,2-dilinoileiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloruro de 1,2-dilinoileil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoileiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), 3-(N,N-dilinoileilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodiol (DOAP), 1,2-dilinoileiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetilaminopropano (DSDMA), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietil amonio (DMRIE), trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermine-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano

(CLinDMA), 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil-1-(cis,cis-9',1-2'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N' -dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 1,2-N,N' -dilinoilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLincarbDAP) o mezclas de los mismos. Los lípidos catiónicos también pueden ser DLinDMA, DLin-K-C2-DMA ("XTC2"), MC3, LenMC3, CP-LenMC3, γ -LenMC3, CP- γ -LenMC3, MC3MC, MC2MC, éter de MC3, éter de MC4, amida de MC3, Pan-MC3, Pan-MC4, Pan MC5 o mezclas de los mismos.

En varias modalidades, el lípido catiónico puede comprender de aproximadamente 50 % molar a aproximadamente 90 % molar, de aproximadamente 50 % molar a aproximadamente 85 % molar, de aproximadamente 50 % molar a aproximadamente 80 % molar, de aproximadamente 50 % molar a aproximadamente 75 % molar, de aproximadamente 50 % molar a aproximadamente 70 % molar, de aproximadamente 50 % molar a aproximadamente 65 % molar, o de aproximadamente 50 % molar a aproximadamente 60 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En otras modalidades, el lípido catiónico puede comprender de aproximadamente 40 % molar a aproximadamente 90 % molar, de aproximadamente 40 % molar a aproximadamente 85 % molar, de aproximadamente 40 % molar a aproximadamente 80 % molar, de aproximadamente 40 % molar a aproximadamente 75 % molar, de aproximadamente 40 % molar a aproximadamente 70 % molar, de aproximadamente 40 % molar a aproximadamente 65 % molar, o de aproximadamente 40 % molar a aproximadamente 60 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

El lípido no catiónico puede comprender, por ejemplo, uno o más lípidos aniónicos y/o lípidos neutros. En modalidades particulares, el lípido no catiónico comprende uno de los siguientes componentes de lípido neutro: (1) colesterol o un derivado del mismo; (2) un fosfolípido; o (3) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo. Ejemplos de derivados de colesterol incluyen, pero no se limitan a, colestanol, colestanona, colestenona, coprostanol, colesteryl-2'-hidroxietil éter, colesteryl-4'-hidroxibutil éter y mezclas de los mismos. El fosfolípido puede ser un lípido neutro que incluye, pero no se limita a, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleoil-fosfatidilglicerol (POPG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), fosfatidilcolina de huevo (EPC) y mezclas de los mismos. En ciertas modalidades, el fosfolípido es DPPC, DSPC o mezclas de los mismos.

En algunas modalidades, el lípido no catiónico (por ejemplo, uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente 10 % molar a aproximadamente 60 % molar, de aproximadamente 15 % molar a aproximadamente 60 % molar, de aproximadamente 20 % molar a aproximadamente 60 % molar, de aproximadamente 25 % molar a aproximadamente 60 % molar, de aproximadamente 30 % molar a aproximadamente 60 % molar, de aproximadamente 10 % molar a

aproximadamente 55 % molar, de aproximadamente 15 % molar a aproximadamente 55 % molar, de aproximadamente 20 % molar a aproximadamente 55 % molar, de aproximadamente 25 % molar a aproximadamente 55 % molar, de aproximadamente 30 % molar a aproximadamente 55 % molar, de aproximadamente 13 % molar a aproximadamente 50 % molar, de aproximadamente 15 % molar a aproximadamente 50 % molar o de aproximadamente 20 % molar a aproximadamente 50 % molar del lípido total presente en la partícula. Cuando el lípido no catiónico es una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de colesterol, la mezcla puede comprender hasta aproximadamente 40, 50, o 60 % molar del lípido total presente en la partícula.

El lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas puede comprender, por ejemplo, uno o más de los siguientes: un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido, un conjugado de poliamida (ATTA)-lípido, conjugados catiónicos-polímero-lípido (CPL) o mezclas de los mismos. En una modalidad particular, las partículas de ácido nucleico-lípido comprenden ya sea un conjugado de PEG-lípido o un conjugado de ATTA-lípido. En ciertas modalidades, el conjugado de PEG-lípido o el conjugado de ATTA-lípido se utiliza junto con un CPL. El lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas puede comprender un PEG-lípido que incluye, por ejemplo, un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG-dialquinoxipropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, una PEG-ceramida (Cer) o mezclas de los mismos. El conjugado PEG-DAA puede ser PEG-di lauriloxipropilo (C12), un PEG-dimiristiloxipropilo (C14), un PEG-dipalmitiloxipropilo (C16), un PEG-diesteariloxipropilo (C18) o mezclas de los mismos.

Los conjugados de PEG-lípido adicionales adecuados para usarse incluyen, pero no se limitan a, mPEG2000-1,2-di-O-alkuil-sn3-carbamoilglicérico (PEG-C-DOMG). La síntesis de PEG-C-DOMG se describe en la Solicitud de PCT Núm. PCT/US08/88676. Otros conjugados de PEG-lípido adicionales adecuados para usarse incluyen, sin limitación, 1-[8'-(1,2-dimiristil-3-propanoxi)-carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil- ω -metil-poli(etilen glicol) (2KPEG-DMG). La síntesis de 2KPEG-DMG se describe en la patente estadounidense Núm. 7,404,969.

En algunos casos, el lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas (por ejemplo, conjugado de PEG-lípido) puede comprender de aproximadamente 0.1 % molar a aproximadamente 2 % molar, de aproximadamente 0.5 % molar a aproximadamente 2 % molar, de aproximadamente 1 % molar a aproximadamente 2 % molar, de aproximadamente 0.6 % molar a aproximadamente 1.9 % molar, de aproximadamente 0.7 % molar a aproximadamente 1.8 % molar, de aproximadamente 0.8 % molar a aproximadamente 1.7 % molar, de aproximadamente 1 % molar a aproximadamente 1.8 % molar, de aproximadamente 1.2 % molar a aproximadamente 1.8 % molar, de aproximadamente 1.2 % molar a aproximadamente 1.7 % molar, de aproximadamente 1.3 % molar a aproximadamente 1.6 % molar, de aproximadamente 1.4 % molar a aproximadamente 1.5 % molar o aproximadamente 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, o 2 % molar (o cualquier fracción de los mismos o intervalo comprendido entre los mismos) del lípido total presente en la partícula. Típicamente, en dichas instancias, la porción PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2,000 dáltones. En otros casos, el lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas (por ejemplo, conjugado de

PEG-lípido) puede comprender de aproximadamente 5.0 % molar a aproximadamente 10 % molar, de aproximadamente 5 % molar a aproximadamente 9 % molar, de aproximadamente 5 % molar a aproximadamente 8 % molar, de aproximadamente 6 % molar a aproximadamente 9 % molar, de aproximadamente 6 % molar a aproximadamente 8 % molar o aproximadamente 5 % molar, 6 % molar, 7 % molar, 8 % molar, 9 % molar o 10 % molar (o cualquier fracción de los mismos o intervalo comprendido entre los mismos) del lípido total presente en la partícula. Típicamente, en dichas instancias, la porción PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 750 dáltones.

En otras modalidades, la composición puede incluir liposomas anfotéricos, que contienen al menos un vehículo de carga positiva y al menos un vehículo de carga negativa, que difiere del vehículo positivo, y el punto isoeléctrico de los liposomas está entre 4 y 8. Este objetivo se logra debido al hecho de que los liposomas se preparan con una carga cambiante dependiente del pH.

Las estructuras liposomales con las propiedades deseadas se forman, por ejemplo, cuando la cantidad de vehículos de carga catiónica formadores de membrana o basados en membrana excede aquélla de los vehículos de carga aniónica a un pH bajo y la proporción se invierte a un pH más alto. Esto es el caso de cuando los componentes ionizables tienen un valor de pKa entre 4 y 9. Conforme el pH del medio cae, todos los vehículos de carga catiónica se cargan más y todos los vehículos de carga aniónica pierden su carga.

Los compuestos catiónicos útiles para liposomas anfotéricos incluyen aquellos compuestos catiónicos previamente descritos en la presente. Sin limitación, los compuestos fuertemente catiónicos pueden incluir, por ejemplo: DC-col 3-β-[N-(N',N'-dimetilmetano) carbamoil] colesterol, TC-col 3-β-[N-(N', N', N'-trimetilaminoetano) carbamoil] colesterol, BGSC bisguanidinio-espermidina-colesterol, BGTC bis-guadinio-tren-colesterol, DOTAP cloruro de (1,2-dioleoiloxipropil)-N,N,N-trimetilamonio, DOSPER (1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida, DOTMA (cloruro de 1,2-dioleoiloxipropil)-N,N,N-trimetilamonio) (Lipofectin®), DORIE bromuro de 1,2-dioleoiloxipropil)-3-dimetilhidroxietilamonio, DOSC (éster de colina de 1,2-dioleoil-3-succinil-sn-glicerilo), DOGSDSO (ornitina de disulfuro de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-succinil-2-hidroxietilo), DDAB bromuro de dimetildioctadecilamonio, DOGS ((C18)2GlySper3+) N,N-dioctadecilamido-glicol-espermina (Transfectam®) (C18)2Gly+ N,N-dioctadecilamido-glicina, CTAB bromuro de cetiltrimetilamonio, CpyC cloruro de cetilpiridinio, DOEPC 1,2-dioleoli-sn-glicero-3-etilfosfocolina u otra O-alkuil-fosfatidilcolina o etanolaminas, amidas de lisina, arginina u ornitina y fosfatidil etanolamina.

Ejemplos de compuestos débilmente catiónicos incluyen, sin limitación: His-Col (hemisuccinato de histaminil-colesterol), Mo-Col (hemisuccinato de morfina-N-etilamino-colesterol), o histidinil-PE.

Ejemplos de compuestos neutrales incluyen, sin limitación: colesterol, ceramidas, fosfatidil colinas, fosfatidil etanolaminas, lípidos de tetraéter, o diacil glicerol.

Compuestos aniónicos útiles para liposomas anfotéricos incluyen aquellos compuestos catiónicos previamente descritos en la presente. Sin limitación, ejemplos de compuestos débilmente aniónicos pueden incluir: CHEMS (hemisuccinato de colesterol), ácidos alquil carboxílicos con 8 a 25

átomos de carbono, o hemisuccinato de diacil glicerol. Compuestos débilmente aniónicos adicionales pueden incluir las amidas de ácido aspártico, o ácido glutámico y PE así como PS y sus amidas con glicina, alanina, glutamina, asparagina, serina, cisteína, treonina, tirosina, ácido glutámico, ácido aspártico u otros aminoácidos o ácidos aminodicarboxílicos. De acuerdo con el mismo principio, los ésteres de ácidos hidroxicarboxílicos o ácidos hidroxidicarboxílicos y PS también son compuestos débilmente aniónicos.

En algunas modalidades, los liposomas anfotéricos pueden contener un lípido conjugado, como los descritos anteriormente. Ejemplos particulares de lípidos conjugados útiles incluyen, sin limitación, fosfoatidiletanolamina y ácido fosfatídico modificados con PEG, conjugados de PEG-ceramida (por ejemplo, PEG-CerC14 o PEG-CerC20), dialquilaminas modificadas con PEG y 1,2-diaciloxipropan-3-aminas modificadas con PEG. Algunos ejemplos específicos son diacilgliceroles y dialquigliceroles modificados con PEG.

En algunas modalidades, los lípidos neutros pueden comprender de aproximadamente 10 % molar a aproximadamente 60 % molar, de aproximadamente 15 % molar a aproximadamente 60 % molar, de aproximadamente 20 % molar a aproximadamente 60 % molar, de aproximadamente 25 % molar a aproximadamente 60 % molar, de aproximadamente 30 % molar a aproximadamente 60 % molar, de aproximadamente 10 % molar a aproximadamente 55 % molar, de aproximadamente 15 % molar a aproximadamente 55 % molar, de aproximadamente 20 % molar a aproximadamente 55 % molar, de aproximadamente 25 % molar a aproximadamente 55 % molar, de aproximadamente 30 % molar a aproximadamente 55 % molar, de aproximadamente 13 % molar a aproximadamente 50 % molar, de aproximadamente 15 % molar a aproximadamente 50 % molar o de aproximadamente 20 % molar a aproximadamente 50 % molar del lípido total presente en la partícula.

En algunos casos, el lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas (por ejemplo, conjugado de PEG-lípido) puede comprender de aproximadamente 0.1 % molar a aproximadamente 2 % molar, de aproximadamente 0.5 % molar a aproximadamente 2 % molar, de aproximadamente 1 % molar a aproximadamente 2 % molar, de aproximadamente 0.6 % molar a aproximadamente 1.9 % molar, de aproximadamente 0.7 % molar a aproximadamente 1.8 % molar, de aproximadamente 0.8 % molar a aproximadamente 1.7 % molar, de aproximadamente 1 % molar a aproximadamente 1.8 % molar, de aproximadamente 1.2 % molar a aproximadamente 1.8 % molar, de aproximadamente 1.2 % molar a aproximadamente 1.7 % molar, de aproximadamente 1.3 % molar a aproximadamente 1.6 % molar, de aproximadamente 1.4 % molar a aproximadamente 1.5 % molar o aproximadamente 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, o 2 % molar (o cualquier fracción de los mismos o intervalo comprendido entre los mismos) del lípido total presente en la partícula. Típicamente, en dichas instancias, la porción PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2,000 dáltones. En otros casos, el lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas (por ejemplo, conjugado de PEG-lípido) puede comprender de aproximadamente 5.0 % molar a aproximadamente 10 % molar, de aproximadamente 5 % molar a aproximadamente 9 % molar, de aproximadamente 5 % molar a

aproximadamente 8 % molar, de aproximadamente 6 % molar a aproximadamente 9 % molar, de aproximadamente 6 % molar a aproximadamente 8 % molar o aproximadamente 5 % molar, 6 % molar, 7 % molar, 8 % molar, 9 % molar o 10 % molar (o cualquier fracción de los mismos o intervalo comprendido entre los mismos) del lípido total presente en la partícula. Típicamente, en dichas instancias, la porción PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 750 dáltones.

Considerando la cantidad total de lípidos neutrales y conjugados, el balance restante del liposoma anfotérico puede comprender una mezcla de compuestos catiónicos y compuestos aniónicos formulados en varias proporciones. La proporción de lípido catiónico a aniónico pueden seleccionarse con el fin de lograr las propiedades deseadas de encapsulación de ácido nucleico, potencial zeta, pKa, u otra propiedad fisicoquímica que es al menos en parte dependiente de la presencia de componentes lipídicos cargados.

En algunas modalidades, las nanopartículas de lípido tienen una composición que específicamente intensifica la administración y captación en el hígado y específicamente dentro de los hepatocitos.

Se proporcionan métodos y composiciones para administrar una meganucleasa descrita en la presente al hígado de un sujeto infectado con HBV. En una modalidad, los hepatocitos nativos que han sido removidos del mamífero pueden ser transducidos con un vector que codifica la meganucleasa diseñada. Alternativamente, los hepatocitos nativos del sujeto con infección por HBV pueden ser transducidos *ex vivo* con un vector adenoviral (es decir, un vector AAV) que codifica la meganucleasa diseñada y/o una molécula que estimula la regeneración del hígado, tal como una hepatotoxina. Preferiblemente, la hepatotoxina es uPA y se ha modificado para inhibir su secreción del hepatocito una vez expresada por el vector viral. En otra modalidad, el vector codifica tPA, el cual puede simular la regeneración del hepatocito *de novo*. Los hepatocitos transducidos que se han removido del mamífero luego pueden regresarse al mamífero, en donde se proporcionan condiciones que pueden conducir a la expresión de la meganucleasa diseñada. Típicamente, los hepatocitos transducidos se pueden regresar al paciente a través de infusión mediante el bazo o la vasculatura portal y la administración puede ser individual o múltiple durante un período de 1 a 5 o más días.

Administración

En un aspecto *in vivo* de los métodos descritos en la presente, se construye un virus retroviral, de pseudotipo o adenoviral asociado (es decir, un AAV), el cual codifica la meganucleasa diseñada y se administra al sujeto. La administración de un vector que codifica la meganucleasa diseñada puede ocurrir con la administración de un vector adenoviral que codifica una hepatotoxina con secreción deficiente o que codifica tPA, que estimula la regeneración de hepatocitos sin actuar como una hepatotoxina.

En varias modalidades de los métodos y composiciones descritos en la presente, como las meganucleasas diseñadas descritas, los polinucleótidos que codifican las mismas, los virus recombinantes que comprenden dichos polinucleótidos, o las nanopartículas lipídicas que contienen

dichos polinucleótidos, se pueden administrar mediante cualquier vía de administración adecuada conocida en la técnica. Tales vías de administración pueden incluir, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intrahepática, transmucosal, transdérmica, intraarterial y sublingual. En algunas modalidades, las proteínas meganucleasas diseñadas, los polinucleótidos que codifican las mismas, los virus recombinantes que comprenden dichos polinucleótidos, o las nanopartículas lipídicas que comprenden dichos polinucleótidos, se administran a las células blanco (por ejemplo, células hepáticas) mediante inyección directamente en el tejido blanco (por ejemplo, tejido hepático). Otros métodos de administración adecuados posibles pueden ser determinados fácilmente por el médico tratante según sea necesario.

En algunas modalidades, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una meganucleasa diseñada descrita en la presente o un polinucleótido que codifica la misma, a un sujeto que la necesita para el tratamiento de una infección por HBV o una enfermedad asociada con una infección por HBV. Esta administración se puede llevar a cabo hasta que el sAg ya no sea detectable en el suero o plasma del sujeto. En algunas modalidades, después de una o más administraciones de la una o más meganucleasas diseñadas, polinucleótidos que codifican estas meganucleasas diseñadas, nanopartículas lipídicas o virus recombinantes que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican estas meganucleasas diseñadas, como se describe en la presente, opcionalmente con uno o más agentes terapéuticos adicionales, descritos en la presente, el sujeto no exhibe síntomas de la enfermedad asociada con la infección por HBV en ausencia de tratamiento antiviral. En algunas modalidades, después de una o más administraciones de la una o más meganucleasas diseñadas, polinucleótidos que codifican estas meganucleasas diseñadas, o vectores que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican estas meganucleasas diseñadas, como se describe en la presente, opcionalmente con uno o más agentes terapéuticos adicionales, descritos en la presente, sAg ya no es detectable en el suero o plasma del sujeto, en ausencia de tratamiento antiviral.

En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente, en donde la secuencia de ácido nucleico codificante se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{10} cg/kg a aproximadamente 1×10^{14} cg/kg (por ejemplo, aproximadamente 1×10^{10} cg/kg, aproximadamente 1×10^{11} cg/kg, aproximadamente 1×10^{12} cg/kg, aproximadamente 1×10^{13} cg/kg, o aproximadamente 1×10^{14} cg/kg). En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente, en donde la secuencia de ácido nucleico codificante se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{10} cg/kg, aproximadamente 1×10^{11} cg/kg, aproximadamente 1×10^{12} cg/kg, aproximadamente 1×10^{13} cg/kg, o aproximadamente 1×10^{14} cg/kg. En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente, en donde

la secuencia se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{10} cg/kg a aproximadamente 1×10^{11} cg/kg, de aproximadamente 1×10^{11} cg/kg a aproximadamente 1×10^{12} cg/kg, de aproximadamente 1×10^{12} cg/kg a aproximadamente 1×10^{13} cg/kg, o de aproximadamente 1×10^{13} cg/kg a aproximadamente 1×10^{14} cg/kg. Se debe entender que estas dosis se pueden referir a la administración de un polinucleótido único que comprende una secuencia de ácido nucleico única que codifica una meganucleasa diseñada única descrita en la presente o, alternativamente, pueden referirse a un polinucleótido único que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una primera meganucleasa diseñada descrita en la presente y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda meganucleasa diseñada descrita en la presente o una que se une y, en algunas modalidades, escinde, una secuencia de reconocimiento dentro del genoma de HBV distinta de HBV 11-12, en donde cada una de las dos secuencias de ácido nucleico codificantes se administra a la dosis indicada.

En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una formulación de nanopartículas lipídicas que comprende un ARNm que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente. En algunas de estas modalidades, la dosis del ARNm es de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg. En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una formulación de nanopartículas lipídicas que comprende un ARNm que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente, en donde la dosis del ARNm es de aproximadamente 0.1 mg/kg, aproximadamente 0.25 mg/kg, aproximadamente 0.5 mg/kg, aproximadamente 0.75 mg/kg, aproximadamente 1.0 mg/kg, aproximadamente 1.5 mg/kg, aproximadamente 2.0 mg/kg, aproximadamente 2.5 mg/kg, o aproximadamente 3.0 mg/kg. En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una formulación de nanopartículas lipídicas que comprende un ARNm que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente, en donde la dosis del ARNm es de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 0.25 mg/kg, de aproximadamente 0.25 mg/kg a aproximadamente 0.5 mg/kg, de aproximadamente 0.5 mg/kg a aproximadamente 0.75 mg/kg, de aproximadamente 0.75 mg/kg a aproximadamente 1.0 mg/kg, de aproximadamente 1.0 mg/kg a aproximadamente 1.5 mg/kg, de aproximadamente 1.5 mg/kg a aproximadamente 2.0 mg/kg, de aproximadamente 2.0 mg/kg a aproximadamente 2.5 mg/kg, o de aproximadamente 2.5 mg/kg a aproximadamente 3.0 mg/kg.

Según corresponda, la dosis o frecuencia de administración de la meganucleasa diseñada o del polinucleótido que la codifica puede ajustarse a lo largo del tratamiento, con base en el criterio del médico que la administra. Las dosis adecuadas dependerán, entre otros factores, de las características específicas de cualquier AAV elegido (por ejemplo, serotipo, etc.), de cualquier nanopartícula lipídica elegida, de la vía de administración y del sujeto en tratamiento (es decir, edad, peso, sexo y condición general del sujeto), así como del modo de administración. De esta forma, la dosis apropiada puede variar de paciente a paciente. La cantidad eficaz apropiada puede ser determinada fácilmente por un técnico en la materia o el médico tratante. El tratamiento con la dosis puede ser administrado en una

sola ocasión o, si se requieren múltiples dosis, se puede seguir un esquema de dosis múltiples. Además, al sujeto se le pueden administrar tantas dosis como sea apropiado. Un técnico en la materia fácilmente puede determinar un número apropiado de dosis. La dosis puede necesitar ser ajustada para tener en cuenta una vía de administración alternativa o equilibrar el beneficio terapéutico con cualquier efecto secundario.

2.4 Composiciones farmacéuticas

En algunas modalidades, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polinucleótido descrito en la presente que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa diseñada descrita en la presente. Tales polinucleótidos pueden ser, por ejemplo, ARNm o ADN, como se describe en la presente. En algunos ejemplos, el polinucleótido en la composición farmacéutica puede estar compuesto por una nanopartícula lipídica o por un virus recombinante (por ejemplo, un AAV recombinante). Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden ser útiles para tratar a un sujeto que tiene HBV, reducir el nivel o proliferación de HBV, reducir al menos un síntoma de una enfermedad asociada con la infección por HBV o tratar una enfermedad asociada con la infección por HBV.

Las composiciones farmacéuticas se pueden diseñar o seleccionar de acuerdo con el genotipo de la cepa de HBV blanco. Como se describe en detalle en la presente, las meganucleasas descritas en la presente se han diseñado para reconocer y escindir una secuencia de reconocimiento en genotipos específicos de HBV. Las meganucleasas HBV 11-12 divulgadas en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 5 y 6), reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 que se encuentra al menos en el genoma de los genotipos A, B, C, D, E, F y G de HBV. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden administrar a un sujeto que tiene cualquier genotipo de HBV que comprende una secuencia de reconocimiento establecida en SEQ ID NO: 3.

Dichas composiciones farmacéuticas se pueden preparar de acuerdo con técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Remington, The Science And Practice of Pharmacy (21^a ed., Filadelfia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2005). En la fabricación de una formulación farmacéutica de acuerdo con la divulgación, las meganucleasas diseñadas descritas en la presente, los polinucleótidos que las codifican, o las células que las expresan, se suelen mezclar con un excipiente farmacéuticamente aceptable, y la composición resultante se administra a un sujeto. El vehículo debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente en la formulación y no debe ser perjudicial para el sujeto. El vehículo puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y se puede formular con el compuesto como una formulación de dosis unitaria.

En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente además pueden comprender uno o más agentes adicionales o moléculas biológicas útiles en el tratamiento de una enfermedad en el sujeto. Asimismo, el (los) agente(s) adicional(es) y/o la(s) molécula(s) biológica(s)

se puede(n) co-administrar como una composición separada.

Dado que las meganucleasas diseñadas divulgadas en la presente pueden tener una especificidad mejorada (es decir, aumentada) que da como resultado un corte fuera del blanco reducido y una eficiencia mejorada (es decir, aumentada) de escisión y formación de indel, particularmente en células que comprenden una copia integrada del genoma de HBV, en comparación con la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1, en algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente que comprenden meganucleasas diseñadas optimizadas, secuencias de ácido nucleico que codifican las mismas o células que expresan las mismas, también tienen una eficacia mejorada (es decir, aumentada) en el tratamiento de la infección por HBV, reduciendo el nivel o proliferación de HBV, reduciendo al menos un síntoma de una enfermedad asociada con la infección por HBV o tratando una enfermedad asociada con la infección por HBV en un sujeto, en comparación con la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1.

En modalidades particulares, las composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente pueden incluir combinaciones de las meganucleasas diseñadas descritas en la presente (o ácidos nucleicos que codifican meganucleasas diseñadas o células que expresan meganucleasas diseñadas). En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas pueden incluir al menos dos meganucleasas diseñadas (o ácidos nucleicos que codifican meganucleasas diseñadas o células que expresan meganucleasas diseñadas), en donde al menos una primera meganucleasa diseñada es una descrita en la presente que se une y escinde la secuencia de reconocimiento HBV 11-12, y en donde al menos una segunda meganucleasa diseñada se une y escinde una segunda secuencia de reconocimiento en el genoma de HBV distinta de la secuencia de reconocimiento HBV 11-12, de modo que una única composición farmacéutica es ampliamente útil para el tratamiento de una amplia gama de genotipos y/o aislados de genotipo de HBV en un sujeto.

Del mismo modo, en otras modalidades, las composiciones farmacéuticas pueden incluir ARNm policistrónicos (o constructos de ADN recombinante o vectores virales que tienen casetes que, cuando se expresan, producen ARNm policistrónicos) que codifican múltiples meganucleasas diseñadas descritas en la presente. En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas pueden incluir ARNm policistrónicos (o constructos de ADN recombinante o vectores virales que tienen casetes que, cuando se expresan, producen ARNm policistrónicos) que codifican al menos dos meganucleasas diseñadas, en donde al menos una primera meganucleasa diseñada es una descrita en la presente que se une y escinde la secuencia de reconocimiento HBV 11-12, y en donde al menos una segunda meganucleasa diseñada se une y escinde una segunda secuencia de reconocimiento en el genoma de HBV distinta de la secuencia de reconocimiento HBV 11-12. Estas composiciones farmacéuticas también son ampliamente útiles para el tratamiento de una amplia gama de genotipos y/o aislados de genotipo de HBV en un sujeto. En cualquiera de los casos, estas composiciones farmacéuticas pueden ser útiles como tratamiento único cuando el genotipo o aislado de HBV específico es conocido o desconocido en

el sujeto.

Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que comprenden múltiples meganucleasas diseñadas diferentes (que incluyen al menos una de las meganucleasas diseñadas descritas en la presente) o que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican múltiples meganucleasas diseñadas diferentes (que incluyen al menos una de las meganucleasas diseñadas descritas en la presente) que se dirigen a secuencias de reconocimiento dentro del genoma de HBV, se pueden administrar a un paciente infectado con múltiples genotipos de HBV, o infectado con genotipos desconocidos de HBV. Por consiguiente, proporcionar composiciones farmacéuticas con múltiples meganucleasas diseñadas diferentes o que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican múltiples meganucleasas diseñadas diferentes produce una opción flexible para el tratamiento y control de la infección por HBV donde los recursos no permiten una genotipificación precisa de HBV y donde se desean soluciones de tratamiento rápidas y amplias.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden incluir una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier meganucleasa diseñada descrita en la presente, o cualquier polinucleótido descrito en la presente que codifique cualquier meganucleasa diseñada descrita en la presente. Por ejemplo, en algunas modalidades, la composición farmacéutica descrita en la presente puede incluir los polinucleótidos descritos en la presente a cualquier dosis (por ejemplo, cg/kg de una secuencia de ácido nucleico codificante o mg/kg de ARNm) descrita en la presente.

En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas pueden comprender además uno o más agentes adicionales útiles en el tratamiento de una infección por HBV o una enfermedad asociada con la infección por HBV en el sujeto.

La presente divulgación también proporciona meganucleasas diseñadas descritas en la presente (o ácidos nucleicos que las codifican, o células que expresan las meganucleasas diseñadas) para su uso como medicamento. La presente divulgación proporciona además el uso de una meganucleasa diseñada descrita en la presente (o un ácido nucleico que codifica la misma o células que expresan una meganucleasa diseñada) en la fabricación de un medicamento para tratar una infección por HBV, para reducir el nivel o proliferación de HBV, reducir los síntomas asociados con una enfermedad asociada con la infección por HBV o tratar una enfermedad asociada con la infección por HBV.

2.5 Variantes de meganucleasas diseñadas

Las modalidades de la divulgación abarcan las meganucleasas diseñadas aquí descritas y sus variantes. Otras modalidades de la divulgación abarcan polinucleótidos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica las meganucleasas descritas en el presente y variantes de dichos polinucleótidos.

Como se utiliza en la presente, se entiende por “variantes” secuencias sustancialmente similares. Un polipéptido “variante” se refiere a un polipéptido derivado del polipéptido “nativo” mediante la delección o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos de la proteína nativa y/o

la sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la proteína nativa. Como se utiliza en la presente, un polinucleótido o polipéptido “nativo” comprende una secuencia parental de la cual se derivan las variantes. Los polipéptidos variantes incluidos en las modalidades son biológicamente activos. Es decir, continúan poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa; es decir, la capacidad de reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 (SEQ ID NO: 3) dentro del genoma de un virus de la hepatitis B, y en algunas modalidades, exhiben al menos una propiedad mejorada sobre las meganucleasas HBV diseñadas descritas previamente (por ejemplo, la meganucleasa HBV 11-12L.1090QQ Enlazador1), tal como especificidad mejorada (es decir, aumentada) y eficiencia mejorada (es decir, aumentada) de escisión y formación de indel. Tales variantes pueden surgir, por ejemplo, de la manipulación genética realizada por seres humanos. Variantes biológicamente activas de un polipéptido nativo de las modalidades (por ejemplo, SEQ ID NO: 5 y 6), o variantes biológicamente activas de las subunidades de unión al medio sitio de reconocimiento descritas en la presente, tendrán al menos aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99%, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del polipéptido nativo, subunidad nativa, región HVR1 nativa y/o región HVR2 nativa, de acuerdo con lo determinado por programas de alineamiento de secuencias y parámetros descritos en otra parte de la presente modalidad. Una variante biológicamente activa de un polipéptido o subunidad de las modalidades puede diferir de ese polipéptido o subunidad en tan solo aproximadamente 1-40 residuos de aminoácidos, tan solo aproximadamente 1-20, tan solo aproximadamente 1-10, tan solo aproximadamente 5, tan solo 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

Los polipéptidos de las modalidades pueden ser modificados de varias formas, incluyendo sustituciones, deleciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencias de aminoácidos se pueden preparar mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para la mutagénesis y las alteraciones de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel *et al.* (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; Patentes estadounidense Núm. 4.873.192; Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nueva York) y las referencias citadas en la misma. Se puede encontrar orientación sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff *et al.* (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), incorporada en la presente por referencia. Las sustituciones conservativas, como intercambiar un aminoácido por otro con propiedades similares,

pueden ser óptimas.

En algunas modalidades, las meganucleasas diseñadas descritas en la presente pueden comprender variantes de las regiones HVR1 y HVR2 descritas en la presente. Las regiones parentales de HVR pueden comprender, por ejemplo, los residuos 24 a 79 o los residuos 204 a 259 de los meganucleasas diseñadas ejemplificadas. Por tanto, las HVR variantes pueden comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o más, de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 24 a 79 o residuos 204 a 259 de las meganucleasas diseñadas ejemplificadas en este documento, tales que las regiones variantes de HVR mantienen la actividad biológica de la meganucleasa diseñada (es decir, uniéndose y escindiendo la secuencia de reconocimiento). Además, en algunas modalidades de la divulgación, una región HVR1 variante o región HVR2 variante puede comprender residuos correspondientes a los residuos de aminoácidos que se encuentran en posiciones específicas dentro de la HVR original. En este contexto, "correspondiente a" significa que un residuo aminoacídico en la HVR variante es el mismo residuo aminoacídico (es decir, un residuo idéntico separado) presente en la secuencia HVR original en la misma posición relativa (es decir, en relación con los aminoácidos restantes en la secuencia original). A modo de ejemplo, si una secuencia de HVR original comprende un residuo de serina en la posición 26, una HVR variante que "comprende un residuo correspondiente a" residuo 26 también comprenderá una serina en una posición que es relativa (es decir, correspondiente) a la posición parental 26.

En modalidades particulares, las meganucleasas diseñadas descritas en la presente comprenden una HVR1 que tiene al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o más de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 204 a 259 de las SEQ ID NOs: 5 o 6.

En ciertas modalidades, las meganucleasas descritas en la presente comprenden una región HVR2 que tiene al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % de identidad de secuencia respecto a una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 24 a 79 de la SEQ ID NO: 5 o 6.

Se ha identificado previamente una cantidad sustancial de modificaciones de aminoácidos al dominio de reconocimiento de ADN de la meganucleasa I-Crel de tipo silvestre (por ejemplo, US 8,021,867) que, de forma individual o combinada, dan como resultado meganucleasas diseñadas con

especificidades alteradas en bases individuales dentro del medio sitio de secuencia de reconocimiento de ADN, de modo que las meganucleasas diseñadas racionalmente resultantes tengan especificidades de medio sitio diferentes de la enzima de tipo silvestre. La Tabla 1 proporciona las posibles sustituciones que se pueden realizar en un monómero o subunidad de meganucleasa diseñada para mejorar la especificidad basada en la base presente en cada posición del medio sitio de reconocimiento (-1 a -9) de un sitio de reconocimiento.

Tabla 1.

Posición.	Base favorecida en la cadena sentido										
	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/ T	A/C/G /T
-1	Y75 L75* C75* Y139* C46* A46*	R70* H75* R75* H46* K46* R46*	K70 E70* E75* E46* D46*	Q70* C70 L70 Y75* Q75* H75* H139 Q46* H46*				T46*			G70 A70 S70 G46*
-2	Q70 T44* A44* V44* I44* L44* N44*	E70 D70 K44* R44*	H70 D44* E44*	Q44*	C44*						
-3	Q68 C24* I24*	E68 F68 K24* R24*	R68	M68 C68 L68 F68		H68		Y68	K68		
-4	A26* Q77	E77 K26*	R77 E26*					S77 Q26*			S26*
-5		E42	R42			K28*	C28* Q42				M66 K66
-6	Q40 C28*	E40 R28*	R40	C40 I40	A40 A79						S40 S28*

	Base favorecida en la cadena sentido										
Posición.	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
5				V40 C79 I79 V79 Q28*	A28* H28*						
10	-7	N30* Q38	E38 K30* R30*	K38 R38 E30*	I38 L38		C38				H38 N38 Q30*
15	-8	F33 Y33	E33 D33	F33 H33	L33 V33 I33 F33 C33	R32*	R33				
20	-9		E32	R32 K32	L32 V32 A32 C32			D32 I32			S32 N32 H32 Q32 T32

Las entradas en negritas son residuos de contacto de tipo silvestre y no constituyen “modificaciones” como se usa en la presente. Un asterisco indica que el residuo hace contacto con la base en la cadena antisentido.

Se pueden realizar determinadas modificaciones en un monómero o subunidad de meganucleasa diseñada para regular la actividad y/o afinidad de unión al ADN. Por ejemplo, un monómero o subunidad de meganucleasa diseñada descrito en la presente pueden contener G, S o A en un residuo correspondiente a la posición 19 de I-Crel o la posición 199 de la SEQ ID NO: 5 o 6 (WO 2009/001159), Y, R, K, o D en un residuo que corresponde a la posición 66 de I-Crel o a la posición 246 de la SEQ ID NO: 5 o 6, y/o E, Q, o K en un residuo que corresponde a la posición 80 de I-Crel o la posición 260 de la SEQ ID NO: 5 o 6 (Patente de los Estados Unidos Núm. 8,021,867).

Para polinucleótidos, una “variante” comprende una delección y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios dentro del polinucleótido nativo. Un técnico en la materia reconocerá que las variantes de los ácidos nucleicos de las modalidades serán construidas de manera que el marco de lectura abierto es mantenido. Para los polinucleótidos, las variantes conservativas incluyen aquellas

secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos de las modalidades. Los polinucleótidos variantes incluyen polinucleótidos sintéticos derivados, como aquellos generados, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, pero que aún codifican una nucleasa recombinante de las modalidades descritas. En general, las variantes de un polinucleótido particular de las modalidades tendrán al menos aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % o más de identidad de secuencia respecto a aquel polinucleótido particular, según determinado por programas de alineamiento de secuencia y parámetros aquí descritos. Las variantes de un polinucleótido particular de las modalidades (es decir, el polinucleótido de referencia) también se pueden evaluar a través de la comparación del porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por un polinucleótido variante y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia.

Las deleciones, inserciones y sustituciones de las secuencias de proteína aquí abarcadas no se espera que produzcan cambios radicales en las características del polipéptido. Sin embargo, cuando es difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, deleción o inserción antes de hacer eso, un técnico en la materia apreciará que el efecto será evaluado al clasificar el polipéptido por actividad pretendida. Por ejemplo, las variantes de una meganucleasa diseñada se analizarían por su capacidad para unirse y escindir preferentemente la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 dentro del genoma de un virus de la hepatitis B.

2.6 Terapia de combinación para HBV

En determinadas modalidades, se proporciona un método para tratar una infección por HBV o una enfermedad asociada con la infección por HBV en un humano que tiene o está en riesgo de tener la infección, que comprende administrar al humano una cantidad terapéuticamente eficaz de una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más (por ejemplo, los agentes se combinan o coadministran con uno, dos, tres, cuatro, uno o dos, uno a tres o uno a cuatro) agentes terapéuticos adicionales. En una modalidad, se proporciona un método para tratar una infección por HBV o una enfermedad asociada con una infección por HBV en un humano que tiene o está en riesgo de tener la infección, que comprende administrar al humano una cantidad terapéuticamente eficaz de una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, uno o dos, uno a tres o uno a cuatro) agentes terapéuticos adicionales.

En determinadas modalidades, la presente divulgación proporciona un método para tratar una infección por HBV o una enfermedad asociada con la infección por HBV, que comprende administrar a

un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, uno o dos, uno a tres o uno a cuatro) agentes terapéuticos adicionales que son adecuados para tratar una infección por HBV o una enfermedad asociada con la infección por HBV.

En determinadas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina con uno, dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos adicionales. En ciertas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina con dos agentes terapéuticos adicionales. En otras modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina con tres agentes terapéuticos adicionales. En modalidades adicionales, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina con cuatro agentes terapéuticos adicionales. Los uno, dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos adicionales pueden ser diferentes agentes terapéuticos seleccionados de la misma clase de agentes terapéuticos, y/o se pueden seleccionar de diferentes clases de agentes terapéuticos.

Administración de terapia de combinación para HBV

En ciertas modalidades, cuando una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina con uno o más agentes terapéuticos adicionales como se describió anteriormente, los componentes de la composición se administran como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones.

La coadministración de una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, con uno o más agentes terapéuticos adicionales generalmente se refiere a la administración simultánea o secuencial de una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, y uno o más agentes terapéuticos adicionales, de modo que las cantidades terapéuticamente eficaces de cada agente están presentes en el cuerpo del paciente.

La coadministración incluye la administración de dosis unitarias de los compuestos descritos en la presente antes o después de la administración de dosis unitarias de uno o más agentes terapéuticos adicionales. La meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se puede administrar dentro de los segundos, minutos u horas de la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, en algunas modalidades, una dosis unitaria de una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se administra primero, seguido en segundos o minutos por la administración de una dosis unitaria de uno o más agentes terapéuticos adicionales. De manera alternativa, en otras modalidades, una dosis unitaria de uno o más agentes terapéuticos adicionales se administra primero, seguido de la administración de una dosis unitaria de una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, en segundos o minutos. En algunas modalidades, una dosis unitaria de una

meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se administra primero, seguido, después de un período de horas (por ejemplo, 1-12 horas), de la administración de una dosis unitaria de uno o más agentes terapéuticos adicionales. En otras modalidades, una dosis unitaria de uno o más agentes terapéuticos adicionales se administra primero, seguido, después de un período de horas (por ejemplo, 1-12 horas), de la administración de una dosis unitaria de una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma.

En ciertas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina con uno o más agentes terapéuticos adicionales en una forma de dosificación unitaria para la administración simultánea a un paciente.

Terapia de combinación para HBV

Las meganucleasas diseñadas descritas en la presente, o los ácidos nucleicos que codifican las mismas, se pueden combinar o coadministrar con uno, dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de fármacos de combinación para el HBV, vacunas contra el HBV, inhibidores de la ADN polimerasa del HBV, inmunomoduladores, moduladores del receptor tipo toll (TLR), ligandos del receptor de interferón alfa, inhibidores de hialuronidasa, inhibidores de antígenos del HBV (por ejemplo, inhibidores del antígeno del núcleo del HBV (HBcAg), inhibidores del antígeno de superficie del HBV (HBsAg), inhibidores de HBx, inhibidores del antígeno E del HBV), anticuerpos contra antígenos del HBV, ácidos nucleicos inhibidores dirigidos al HBV (por ejemplo, oligonucleótido antisentido, ARN interferente pequeño (ARNip), interferencia de ARN dirigida por ADN (ddRNAi)), inhibidores de la secreción o ensamblaje de HBsAg, inhibidores de entrada viral del HBV, inhibidores de puntos de control inmunitario, inhibidores de la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4), inhibidores de ciclofilina, moduladores de endonucleasa, inhibidores de la ribonucleótido reductasa, inhibidores del ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc), agonistas del receptor X farnesoide (FXR), agonistas de STING, anticuerpos anti-HBV, antagonistas de quimiocinas CCR2, agonistas de timosina, citocinas, moduladores de nucleoproteínas, estimuladores del gen 1 inducible por ácido retinoico, estimuladores de NOD2, inhibidores de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), inhibidores de la vía de la indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), inhibidores de PD-1, inhibidores de PD-L1, timosina alfa-1 recombinante, inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton (BTK), inhibidores de KDM, inhibidores de la replicación del HBV, inhibidores de arginasa, terapia génica y terapia celular, editores génicos, terapia celular, terapia de células TCR-T y otros fármacos contra el HBV.

En ciertas modalidades, las meganucleasas diseñadas descritas en la presente, o los ácidos nucleicos que codifican las mismas, se pueden usar o combinar con uno o más de un agente quimioterapéutico, un inmunomodulador, un agente inmunoterapéutico, un anticuerpo terapéutico, una vacuna terapéutica, un anticuerpo biespecífico y una proteína terapéutica "similar a anticuerpo" (tal como DARPs®, anticuerpos similares a TCR anti-pMHC, DARTs®, Duobodies®, BiTes®, XmAbs®, TandAbs®, derivados de Fab), un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), modificadores génicos o

editores génicos dirigidos al HBV (por ejemplo, CRISPR-Cas (por ejemplo, Cas9, Cas12, Cascade, Cas13), nucleasas con dedos de zinc, endonucleasas *homing* (por ejemplo, meganucleasas variantes de I-Crel diseñadas), nucleasas sintéticas, TALEN, terapias celulares (por ejemplo, células T, células NK, macrófagos que tienen un receptor de antígeno quimérico (CAR)) y TCR-T (un receptor de células T modificado genéticamente) o cualquier combinación de los mismos.

En algunas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente se combina con una o más nucleasas diseñadas adicionales, que se unen y escinden una segunda secuencia de reconocimiento distinta de la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 en el genoma de HBV. Por ejemplo, una, dos, tres o más nucleasas diseñadas adicionales (por ejemplo, una, dos, tres o más meganucleasas diseñadas) que se unen y escinden una secuencia de reconocimiento distinta de HBV 11-12 se pueden combinar con las meganucleasas diseñadas divulgadas en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 5 o 6). La una o más nucleasas diseñadas adicionales pueden unirse y escindir una secuencia de reconocimiento que se encuentra en cualquier ubicación dentro del genoma de HBV que incluye una o más secuencias codificantes de genes de HBV o secuencias no codificantes. Por ejemplo, la una o más nucleasas diseñadas adicionales pueden unirse y escindir una secuencia de reconocimiento dentro de una secuencia genómica del HBV que incluye, pero no se limita a, el gen S, que codifica la proteína principal del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg); secuencias corriente arriba del gen S, que codifican el dominio pre-S; gen C, que codifica el antígeno central de la hepatitis B (HBcAg); la región P, que codifica la transcriptasa inversa viral; el gen X, que codifica la proteína viral HBx; y dentro de una región pre-central, que codifica el gen HBeAg. En algunas modalidades, la una o más nucleasas diseñadas adicionales se unen y escinden una secuencia de reconocimiento descrita en PCT/US2017/056638. En algunas modalidades, la una o más nucleasas adicionales son meganucleasas derivadas de I-Crel diseñadas, tal como las descritas en PCT/US2017/056638 o una variante de las meganucleasas diseñadas descritas en la presente, en donde la una o más meganucleasas diseñadas adicionales se unen y escinden una secuencia de reconocimiento distinta de HBV 11-12 (SEQ ID NO: 3).

En ciertas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina opcionalmente o se coadministra con uno, dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, inhibidores de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), modulador de apolipoproteína A1, inhibidores de arginasa, inhibidores del atenuador de linfocitos B y T, inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton (BTK), antagonista de quimiocinas CCR2, inhibidores de CD137, inhibidores de CD160, inhibidores de CD305, agonista y modulador de CD4, compuestos dirigidos al antígeno central de la hepatitis B (HBcAg), moduladores alostéricos de la proteína central, inhibidores del ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc), inhibidores de ciclofilina, inhibidores de la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4), inhibidor de ADN polimerasa, moduladores de endonucleasa, modificadores epigenéticos, agonistas del receptor X farnesoide (FXR), inhibidores de la ADN polimerasa del HBV, inhibidores de la replicación del HBV, inhibidores de ARNasa del HBV,

inhibidores de entrada viral del HBV, inhibidores de HBx, modulador de la proteína grande de envoltura de la hepatitis B, estimulador de la proteína grande de envoltura de la hepatitis B, modulador de proteína estructural de la hepatitis B, inhibidores del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), inhibidores de la secreción o ensamblaje del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), inhibidores del antígeno E del virus de la hepatitis B, inhibidores de la replicación del virus de la hepatitis B, inhibidor de la proteína estructural del virus de la hepatitis, inhibidor de la transcriptasa inversa del VIH-1, inhibidor de hialuronidasa, inhibidores de proteínas de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), agonista de IL-2, agonista de IL-7, inmunomoduladores, inhibidores de indoleamina-2, inhibidores de la ribonucleótido reductasa, ligando de interleucina-2, inhibidores de ipi4, inhibidores de lisina desmetilasa, inhibidores de histona desmetilasa, inhibidores de KDM1, inhibidores de KDM5, inhibidores del miembro 1 de la subfamilia G del receptor tipo lectina de células asesinas naturales, inhibidores del gen 3 de activación de linfocitos, activadores del receptor beta de linfotóxina, moduladores de Axl, moduladores de B7-H3, moduladores de B7-H4, moduladores de CD160, moduladores de CD161, moduladores de CD27, moduladores de CD47, moduladores de CD70, moduladores de GITR, moduladores de HVEM, moduladores de ICOS, moduladores de Mer, moduladores de NKG2A, moduladores de NKG2D, moduladores de OX40, moduladores de SIRPalpha, moduladores de TIGIT, moduladores de Tim-4, moduladores de Tyro, inhibidores del polipéptido cotransportador de taurocolato dependiente de sodio (NTCP), inhibidores del receptor 2B4 de células asesinas naturales, estimulador del gen NOD2, inhibidor de nucleoproteína, moduladores de nucleoproteínas, agonista del receptor OX-40, inhibidores de PD-1, inhibidores de PD-L1, inhibidor de peptidilprolil isomerasa, inhibidores de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K), estimulador del gen 1 inducible por ácido retinoico, inhibidor de transcriptasa inversa, inhibidor de ribonucleasa, inhibidor de ARN/ADN polimerasa, inhibidor del gen SLC10A1, miméticos de SMAC, inhibidor de tirosina cinasa Src, agonistas del estimulador de genes de interferón (STING), estimuladores de NOD1, inhibidor de la glucoproteína CD28 de superficie de células T, modulador de la glucoproteína de superficie de células T CD8, agonista de timosina, ligando de timosina alfa 1, inhibidores de Tim-3, agonistas de TLR-3, agonistas de TLR-7, agonistas de TLR-9, estimulador del gen TLR9, moduladores del receptor tipo toll (TLR), inhibidor de la ribonucleótido reductasa viral y combinaciones de los mismos.

Fármacos antivirales inhibidores del HBV

En varias modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina o coadministra con uno o más agentes antivirales. En algunas modalidades, el uno o más agentes antivirales se seleccionan del grupo que consiste en lamivudina (LAM), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudina (LdT), tenofovir disoproxil fumarato (TDF), tenofovir disoproxil fumarato y emtricitabina (TRUVADA®), tenofovir alafenamida (TAF o VEMLIDY®) y ledipasvir y sofosbuvir (HARVONI®). En ciertas modalidades, la meganucleasa diseñada, o el ácido nucleico que codifica la misma se combinan con formas de acción prolongada de fármacos anti-HBV. Las formas ilustrativas de los fármacos de acción prolongada contra el HBV que se

pueden combinar incluyen entecavir (depósito subcutáneo), implantes (dispositivos) de tenofovir (TFD y TAF) de acción prolongada o depósito subcutáneo. Un ejemplo de entecavir de acción prolongada se describe en Henry, *et al.*, Eur J Pharm Sci. 2019 Aug 1;136:104958.

5 Otros fármacos contra el HBV

Ejemplos de otros fármacos para el tratamiento de una infección por HBV o enfermedades asociadas con la infección por HBV incluyen alfa-hidroxi-tropolonas, amdoxovir, antroquinonol, nucleósidos de beta-hidroxicitosina, ARB-199, CCC-0975, ccc-R08, elvucitabina, ezetimiba, ciclosporina A, gentiopirina (gentiopirósido), HH-003, hepalátida, JNJ-56136379, nitazoxanida, birinapant, NJK14047, NOV-205 (molixan, BAM-205), oligótido, mivotilato, ferón, GST-HG-131, levamisol, Ka Shu Ning, alloferón, WS-007, Y-101 (Ti Fen Tai), rSIFN-co, PEG-IIFNm, KW-3, BP-Inter-014, ácido oleanólico, HepB-nRNA, cTP-5 (rTP-5), HSK-II-2, HEISCO-106-1, HEISCO-106, Hepbarna, IBPB-006IA, Hepuyinfe, DasKloster 0014-01, ISA-204, Jiangantai (Ganxikang), MIV-210, OB-AI-004, PF-06, picrósido, DasKloster-0039, hepulantai, IMB-2613, TCM-800B, glutatión reducido, RO-6864018, RG-7834, QL-007, sofosbuvir, ledipasvir, UB-551 y ZH-2N, y los compuestos divulgados en US20150210682 (Roche), US 2016/0122344 (Roche), WO2015173164, WO2016023877, US2015252057A (Roche), WO16128335A1 (Roche), WO16120186A1 (Roche), US2016237090A (Roche), WO16107833A1 (Roche), WO16107832A1 (Roche), US2016176899A (Roche), WO16102438A1 (Roche), WO16012470A1 (Roche), US2016220586A (Roche) y US2015031687A (Roche).

20 Vacunas contra el HBV

Las vacunas contra el HBV incluyen vacunas profilácticas y terapéuticas. Ejemplos de vacunas profilácticas contra el HBV incluyen Vaxelis, Hexaxim, Heplisav, Mosquirix, vacuna DTwP-HBV, Bio-Hep-B, D/T/P/HBV/M (LBVP-0101; LBVW-0101), vacuna DTwP-Hepb-Hib-IPV, Heberpenta L, DTwP-HepB-Hib, V-419, CVI-HBV-001, Tetrabhay, vacuna profiláctica contra hepatitis B (Advax Super D), Hepatrol-07, GSK-223192A, ENGERIX B®, vacuna recombinante contra hepatitis B (intramuscular, Kangtai Biological Products), vacuna recombinante contra hepatitis B (levadura *Hansenula polymorpha*, intramuscular, Hualan Biological Engineering), vacuna recombinante de antígeno de superficie de la hepatitis B, Bimmugen, CARG-101, Euforavac, Eutravac, Infanrix-DTaP-IPV-Hep B, HBAI-20, Infanrix-DTaP-IPV-Hep B-Hib, Pentabio Vaksin DTP-HB-Hib, Comvac 4, Twinrix, Euvax-B, Tritanrix HB, Infanrix Hep B, Comvac, vacuna DTP-Hib-HBV, vacuna DTP-HBV, Yi Tai, Heberbiovac HB, Trivac HB, GerVax, vacuna DTwP-Hep B-Hib, Bilive, Hepavax-Gene, SUPERVAX, Comvac5, Shanvac-B, Hebsulin, Recombivax HB, Revac B mcf, Revac B+, Fendrix, DTwP-HepB-Hib, DNA-001, Shan5, Shan6, vacuna rhHBsAG, vacuna pentavalente HBI, LBVD, Infanrix HeXa, YS-HBV-001 y vacuna DTaP-rHB-Hib.

35 Ejemplos de vacunas terapéuticas contra el HBV incluyen el complejo HBsAG-HBIG, ARB-1598, Bio-Hep-B, NASVAC, abi-HB (intravenoso), ABX-203, Tetrabhay, GX-110E, GS-4774, vacuna peptídica (epsilonPA-44), Hepatrol-07, NASVAC (NASTERAP), IMP-321, BEVAC, Revac B mcf, Revac B+, MGN-1333, KW-2, CVI-HBV-002, AltraHepB, VGX-6200, FP-02, FP-02.2 (HepTcell), NU-500, HBVax, vacuna

de antígeno/im/TriGrid, vacuna adyuvada con Mega-CD40L, HepB-v, RG7944 (INO-1800), vacuna terapéutica recombinante basada en VLP (infección por HBV, VLP Biotech), AdTG-17909, AdTG-17910, AdTG-18202, ChronVac-B, TG-1050, VVX-001, GSK-3528869A (ChAd155-hli-HBV + MVA-HBV +Hbc-HBs/AS01B-4), VBI-2601, VTP-300 (cebado con ChAdOx1-Sli-HBV-CPmut-TPA-Ssh y refuerzo con MVA-Sli-HBV-CPmut-TPA-Ssh), MVA-BN y Lm HBV. Las vacunas contra el arnavirus del HBV se describen, *por ejemplo*, en WO2017076988 y WO2017198726.

Inhibidores de la ADN polimerasa del HBV

Ejemplos de inhibidores de la ADN polimerasa del HBV incluyen adefovir (HEPSERA®), emtricitabina (EMTRIVA®), tenofovir disoproxil fumarato (VIREAD®), tenofovir alafenamida, tenofovir, tenofovir disoproxil, tenofovir alafenamida fumarato, tenofovir alafenamida hemifumarato, tenofovir dipivoxilo, tenofovir dipivoxil fumarato, tenofovir octadeciloxietil éster, CMX-157, tenofovir exalidex, besifovir, entecavir (BARACLUDE®), entecavir maleato, telbivudina (TYZEKA®), filocilovir, pradefovir, clevudina, ribavirina, lamivudina (EPIVIR-HBV®), fosfazida, famciclovir, fusolina, metacavir, SNC-019754, FMCA, AGX-1009, AR-II-04-26, HIP-1302, tenofovir disoproxil aspartato, tenofovir disoproxil orotato, y HS-10234.

Inmunomoduladores

Ejemplos de inmunomoduladores incluyen rintatolimod, clorhidrato de imidol, ingaron, dermaVir, plaquenil (hidroxicloroquina), proleucina, hidroxiurea, micofenolato de mofetilo (MPA) y su derivado de éster micofenolato de mofetilo (MMF), JNJ-440, WF-10, AB-452, ribavirina, IL-12, INO-9112, polímero de polietilenimina (PEI), Gepon, VGV-1, MOR-22, CRV-431, JNJ-0535, TG-1050, ABI-H2158, BMS-936559, GS-9688, RO-7011785, RG-7854, RO-6871765, AIC-649 e IR-103.

Agonistas del receptor tipo Toll (TLR)

En varias modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina con un agonista de un receptor tipo toll (TLR), por ejemplo, un agonista de TLR1 (ID del gen del NCBI: 7096), TLR2 (ID del gen del NCBI: 7097), TLR3 (ID del gen del NCBI: 7098), TLR4 (ID del gen del NCBI: 7099), TLR5 (ID del gen del NCBI: 7100), TLR6 (ID del gen del NCBI: 10333), TLR7 (ID del gen del NCBI: 51284), TLR8 (ID del gen del NCBI: 51311), TLR9 (ID del gen del NCBI: 54106) y/o TLR10 (ID del gen del NCBI: 81793), TLR11, TLR12 y TLR13. Los ejemplos de moduladores de TLR3 incluyen rintatolimod, poli-ICLC, RIBOXXON®, Apoxsim, RIBOXXIM®, IPH-33, MCT-465, MCT-475 y ND-1.1.

Ejemplos de agonistas de TLR7 que se pueden coadministrar incluyen, sin limitación, AL-034, DSP-0509, GS-9620 (vesatolimod), LHC-165, TMX-101 (imiquimod), GSK-2245035, resiquimod, DSR-6434, DSP-3025, IMO-4200, MCT-465, MEDI-9197, 3M-051, SB-9922, 3M-052, Limtop, TMX-30X, TMX-202, RG-7863, RG-7854, RG-7795 y los compuestos divulgados en US20100143301 (Gilead Sciences), US20110098248 (Gilead Sciences), US20090047249 (Gilead Sciences), US20140045849 (Janssen), US20140073642 (Janssen), WO2014/056953 (Janssen), WO2014/076221 (Janssen), WO2014/128189 (Janssen), US20140350031 (Janssen), WO2014/023813 (Janssen), US20080234251

(Array Biopharma), US20080306050 (Array Biopharma), US20100029585 (Ventirx Pharma), US20110092485 (Ventirx Pharma), US20110118235 (Ventirx Pharma), US20120082658 (Ventirx Pharma), US20120219615 (Ventirx Pharma), US20140066432 (Ventirx Pharma), US20140088085 (Ventirx Pharma), US20140275167 (Novira Therapeutics) y US20130251673 (Novira Therapeutics).

Un agonista de TLR7/TLR8 que se puede administrar conjuntamente es NKTR-262, telratolimod y BDB-001.

Ejemplos de agonistas de TLR8 que se pueden coadministrar incluyen, sin limitación, E-6887, IMO-4200, IMO-8400, IMO-9200, MCT-465, MEDI-9197, motolimod, resiquimod, selgantolimod (GS-9688), VTX-1463, VTX-763, 3M-051, 3M-052, ZG-170607 y los compuestos divulgados en US20140045849 (Janssen), US20140073642 (Janssen), WO2014/056953 (Janssen), WO2014/076221 (Janssen), WO2014/128189 (Janssen), US20140350031 (Janssen), WO2014/023813 (Janssen), US20080234251 (Array Biopharma), US20080306050 (Array Biopharma), US20100029585 (Ventirx Pharma), US20110092485 (Ventirx Pharma), US20110118235 (Ventirx Pharma), US20120082658 (Ventirx Pharma), US20120219615 (Ventirx Pharma), US20140066432 (Ventirx Pharma), US20140088085 (Ventirx Pharma), US20140275167 (Novira Therapeutics), US20130251673 (Novira Therapeutics), Patente de los Estados Unidos Núm. 9670205 (Gilead Sciences, Inc.), US20160289229 (Gilead Sciences, Inc.), WO2017/048727 (Gilead Sciences, Inc.), US20180065938 (Gilead Sciences, Inc.) y US20180086755 (Gilead Sciences, Inc.).

Ejemplos de agonistas de TLR9 que se pueden coadministrar incluyen, sin limitación, AST-008, cobitolimod, CMP-001, IMO-2055, IMO-2125, IMO-3100, IMO-8400, IR-103, IMO-9200, agatolimod, DIMS-9054, DV-1079, DV-1179, AZD-1419, lefitolimod (MGN-1703), CYT-003, CYT-003-QbG10, tilsotolimod y PUL-042.

Ejemplos de moduladores de TLR7, TLR8 y TLR9 incluyen los compuestos divulgados en WO2017047769 (Teika Seiyaku), WO2015014815 (Janssen), WO2018045150 (Gilead Sciences Inc), WO2018045144 (Gilead Sciences Inc), WO2015162075 (Roche), WO2017034986 (University of Kansas), WO2018095426 (Jiangsu Hengrui Medicine Co Ltd), WO2016091698 (Roche), WO2016075661 (GlaxoSmithKline Biologicals), WO2016180743 (Roche), WO2018089695 (Dynavax Technologies), WO2016055553 (Roche), WO2015168279 (Novartis), WO2016107536 (Medshine Discovery), WO2018086593 (Livo (Shanghai) Pharmaceutical), WO2017106607 (Merck), WO2017061532 (Sumitomo Dainippon Pharma), WO2016023511 (Chia Tai Tianqing Pharmaceutical), WO2017076346 (Chia Tai Tianqing Pharmaceutical), WO2017046112 (Roche), WO2018078149 (Roche), WO2017040233 (3M Co), WO2016141092 (Gilead Sciences), WO2018049089 (BristolMyers Squibb), WO2015057655 (Eisai Co Ltd), WO2017001307 (Roche), WO2018005586 (BristolMyers Squibb), WO201704023 (3M Co), WO2017163264 (Council of Scientific and Industrial Research (India)), WO2018046460 (GlaxoSmithKline Biologicals), WO2018047081 (Novartis), WO2016142250 (Roche), WO2015168269 (Novartis), WO201804163 (Roche), WO2018038877 (3M Co), WO2015057659 (Eisai Co Ltd), WO2017202704 (Roche), WO2018026620 (BristolMyers Squibb), WO2016029077 (Janus

Biotherapeutics), WO201803143 (Merck), WO2016096778 (Roche), WO2017190669 (Shanghai De Novo Pharmatech), US09884866 (University of Minnesota), WO2017219931 (Sichuan KelunBiotech Biopharmaceutical), WO2018002319 (Janssen Sciences), WO2017216054 (Roche), WO2017202703 (Roche), WO2017184735 (IFM Therapeutics), WO2017184746 (IFM Therapeutics), WO2015088045 (Takeda Pharmaceutical), WO2017038909 (Takeda Pharmaceutical), WO2015095780 (University of Kansas) y WO2015023958 (University of Kansas).

En ciertas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se coadministra con un agonista de TLR7, TLR8 o TLR9.

Ligandos de receptor de interferón alfa

Ejemplos de ligandos del receptor de interferón alfa incluyen interferón alfa-2b (INTRON A®), interferón alfa-2a pegilado (PEGASYS®), interferón alfa-1b pegilado, interferón alfa 1b (HAPGEN®), Veldona, Infradure, Roferon-A, interferón alfa-2a YPEG (YPEG-rhIFNalpha-2a), P-1101, Algeron, Alfaron, Ingaron (interferón gamma), rSIFN-co (interferón recombinante supercompuesto), interferón alfa-2b Ypeg (YPEG-rhIFNalpha-2b), MOR-22, peginterferón alfa-2b (PEG-INTRON®), Bioferon, Novaferon, Inmutag (Inferon), MULTIFERON®, interferón alfa-n1 (HUMOFERON®), interferón beta-1a (AVONEX®), Shaferon, interferón alfa-2b (Axxo), Alfaferone, interferón alfa-2b (BioGeneric Pharma), interferón alfa-2 (CJ), Laferonum, VIPEG, BLAUFERON-A, BLAUFERON-B, Intermax Alpha, Realdiron, Lanstion, Pegaferon, PDferon-B PDferon-B, interferón alfa-2b (IFN, Laboratorios Bioprofarma), alfainterferona 2b, Kalferon, Pegnano, Feronsure, PegiHep, interferón alfa 2b (Zydus-Cadila), interferón alfa 2a, Optipeg A, Realfa 2B, Reliferon, interferón alfa-2b (Amega), interferón alfa-2b (Virchow), ropeginterferón alfa-2b, rHSA-IFN alfa-2a (proteína de fusión de albúmina sérica humana recombinante e interferón alfa 2a), PEG-IFN-alfa, rHSA-IFN alfa 2b, interferón alfa humano recombinante-(1b, 2a, 2b), peginterferón alfa-2b (Amega), peginterferón alfa-2a, Reaferon-EC, Proquiferon, Uniferon, Urifron, interferón alfa-2b (Changchun Institute of Biological Products), Anterferon, Shanferon, Layfferon, Shang Sheng Lei Tai, INTEFEN, SINOGEN, Fukangtai, Pegstat, rHSA-IFN alfa-2b, SFR-9216 e Interapo (Interapa).

Inhibidores de hialuronidasa

Ejemplos de inhibidores de hialuronidasa incluyen astodrimmer.

Inhibidores de antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg)

Ejemplos de inhibidores de HBsAg incluyen AK-074, HBF-0259, PBHBV-001, PBHBV-2-15, PBHBV-2-1, REP-9AC, REP-9C, REP-9, REP-2139, REP-2139-Ca, REP-2055, REP-2163, REP-2165, REP-2053, REP-2031, REP-006 y REP-9AC'.

Ejemplos de inhibidores de secreción de HBsAg incluyen BM601, GST-HG-131 y AB-452.

Inhibidores de proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (ipi4)

Ejemplos de inhibidores de proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (ipi4) incluyen AGEN-2041, AGEN-1884, ipilimumab, belatacept, PSI-001, PRS-010, Probody mAbs, tremelimumab y JHL-1155.

Inhibidores de ciclofilina

Ejemplos de inhibidores de ciclofilina incluyen CPI-431-32, EDP-494, OCB-030, SCY-635, NVP-015, NVP-018, NVP-019, STG-175 y los compuestos divulgados en US8513184 (Gilead Sciences),
 5 US20140030221 (Gilead Sciences), US20130344030 (Gilead Sciences) y US20130344029 (Gilead Sciences).

Inhibidores de entrada viral de HBV

Ejemplos de inhibidores de entrada viral de HBV incluyen Myrcludex B.

Oligonucleótidos antisentido dirigidos a ARNm viral

10 Ejemplos de oligonucleótido antisentido dirigido a ARNm viral incluyen ISIS-HBVRx, IONIS-HBVRx, IONIS-HBV-LRx, IONIS-GSK6-LRx, GSK-3389404 y RG-6004.

ARN de Interferencia pequeño (ARNip) y ddARNi.

Ejemplos de ARNip incluyen TKM-HBV (TKM-HepB), ALN-HBV, SR-008, HepB-nRNA, ARC-520, ARC-521, ARB-1740, ARB-1467, AB-729, DCR-HBVS, RG-6084 (PD-L1), RG-6217, ALN-HBV-02,
 15 JNJ-3989 (ARO-HBV), STSG-0002, ALG-010133, ALG-ASO, LUNAR-HBV y DCR-HBVS (DCR-S219).

Ejemplos de ARN de interferencia dirigido a ADN (ddARNi) incluyen BB-HB-331.

Moduladores de endonucleasa

Ejemplos de moduladores de endonucleasa incluyen PGN-514.

Inhibidores de ribonucleótido reductasa

20 Ejemplos de inhibidores de ribonucleótido reductasa incluyen Trimidox.

Inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósidos

Ejemplos de inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósidos (NNRTI) incluyen los compuestos divulgados en WO2018118826 (Merck), WO2018080903 (Merck), WO2018119013 (Merck),
 25 WO2017100108 (Idenix), WO2017027434 (Merck), WO2017007701 (Merck) y WO2008005555 (Gilead).

Inhibidores de replicación de HBV

Ejemplos de inhibidores de replicación del virus de la hepatitis B incluyen GP-31502, isotiafludina, IQP-HBV, RM-5038 y Xingantie.

Inhibidores de ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc)

30 Ejemplos de inhibidores de ADNccc incluyen BSBI-25, ccc-R08 y CHR-101.

Agonista de receptor X Farnesoide

Ejemplos de agonistas de receptor X farnesoide incluyen, por ejemplo, EYP-001, GS-9674, EDP-305, MET-409, Tropifexor, AKN-083, RDX-023, BWD-100, LMB-763, INV-3, NTX-023-1, EP-024297 y GS-8670.

35 Anticuerpos anti-HBV

En varias modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina o coadministra con uno o más anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno de HBV, incluido un péptido de HBV presentado en una molécula

(pMHC) del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Ejemplos de anticuerpos de HBV que se dirigen a los antígenos de superficie del virus de la hepatitis B que se pueden combinar o coadministrar incluyen lenvirovimab (GC-1102), XTL-17, XTL-19, KN-003, IV Hepabulin SN y terapia de anticuerpos monoclonales completamente humanos (infección por virus de la hepatitis B, Humabs BioMed). Se describen anticuerpos dirigidos a la proteína X del HBV (HBx) que se pueden combinar o coadministrar, por ejemplo, en Korniyev, *et al.*, *J Virol.* 30 de julio de 2019;93(16).pii: e00248-19.

Ejemplos de anticuerpos de HBV, que incluyen anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales, que se pueden combinar o coadministrar incluyen Zutectra, Shang Sheng Gan Di, Uman Big (Hepatitis B Hyperimmune), Omri-Hep-B, Nabi-HB, Hepatect CP, HepaGam B, igantibe, Niuliva, CT-P24, inmunoglobulina de hepatitis B (intravenosa, pH4, infección por HBV, Shanghai RAAS Blood Products) y Fovepta (BT-088).

Ejemplos de anticuerpos monoclonales de HBV completamente humanos que se pueden combinar o coadministrar incluyen HBC-34.

Se describen anticuerpos contra complejos de péptido viral del HBV/complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I (pMHC) que se pueden combinar o coadministrar, por ejemplo, en Sastry, *et al.*, *J Virol.* Marzo de 2011;85(5):1935-42 y en WO2011062562.

Antagonistas de CCR2 de quimiocinas

Ejemplos de antagonistas de CCR2 de quimiocinas incluyen propagermanio.

Agonistas de timosina

Ejemplos de agonistas de timosina incluyen timalfasina y timosina alfa 1 recombinante (GeneScience).

Citocinas

Ejemplos de citocinas incluyen IL-7 recombinante, CYT-107, interleucina-2 (IL-2, Immunex), interleucina-2 humana recombinante (Shenzhen Neptunus), IL-15, IL-21, IL-24 y celmolectina.

Agonistas de interleucina

En ciertas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina con un agonista de interleucina, tal como agonistas de IL-2, IL-7, IL-15, IL-10, IL-12. Ejemplos de agonistas de IL-2 incluyen proleucina (aldesleucina, IL-2); IL-2 pegilada (por ejemplo, NKTR-214), variantes modificadas de IL-2 (por ejemplo, THOR-707), bempegaldesleucina, AIC-284, ALKS-4230, CUI-101 y Neo-2/15. Ejemplos de agonistas de IL-15 incluyen ALT-803, NKTR-255, hetIL-15, proteína de fusión interleucina-15/Fc, AM-0015, NIZ-985, SO-C101, IL-15 Synthorin (IL-15 pegilada), P-22339 y una proteína de fusión IL-15-PD-1 N-809. Ejemplos de IL-7 incluyen CYT-107.

Moduladores de nucleoproteínas

Los moduladores de nucleoproteínas pueden ser inhibidores de proteínas centrales o de la cápside del HBV. Ejemplos de moduladores de nucleoproteínas incluyen GS-4882, AB-423, AT-130, ALG-001075, ALG-001024, ALG-000184, EDP-514, GLS4, NVR-1221, NVR-3778, AL-3778, BAY 41-

4109, mesilato de morfotiadina, ARB-168786, ARB-880, ARB-1820, GST-HG-141, JNJ-379, JNJ-632, RG-7907, GST-HG-141, HEC-72702, KL-060332, AB-506, ABI-H0731, ABI-H3733, JNJ-440, ABI-H2158, CB-HBV-001 y DVR-23.

5 Ejemplos de inhibidores de la cápside incluyen los compuestos divulgados en US20140275167 (Novira Therapeutics), US20130251673 (Novira Therapeutics), US20140343032 (Roche), WO2014037480 (Roche), US20130267517 (Roche), WO2014131847 (Janssen), WO2014033176 (Janssen), WO2014033170 (Janssen), WO2014033167 (Janssen), WO2015/059212 (Janssen), WO2015118057(Janssen), WO2015011281 (Janssen), WO2014184365 (Janssen), WO2014184350 (Janssen), WO2014161888 (Janssen), WO2013096744 (Novira), US20150225355 (Novira),
10 US20140178337 (Novira), US20150315159 (Novira), US20150197533 (Novira), US20150274652 (Novira), US20150259324, (Novira), US20150132258 (Novira), US9181288 (Novira), WO2014184350 (Janssen), WO2013144129 (Roche), WO2017198744(Roche), US 20170334882(Novira), US 20170334898 (Roche), WO2017202798(Roche), WO2017214395(Enanta), WO2018001944 (Roche),
15 WO2018001952(Roche), WO2018005881(Novira), WO2018005883(Novira), WO2018011100(Roche), WO2018011160(Roche), WO2018011162(Roche), WO2018011163(Roche), WO2018036941(Roche), WO2018043747(Kyoto Univ), US20180065929 (Janssen), WO2016168619 (Indiana University), WO2016195982 (The Penn State Foundation), WO2017001655 (Janssen), WO2017048950 (Assembly Biosciences), WO2017048954 (Assembly Biosciences), WO2017048962 (Assembly Biosciences),
20 US20170121328 (Novira), US20170121329 (Novira).

Ejemplos de inhibidores de la transcripción incluyen los compuestos divulgados en WO2017013046 (Roche), WO2017016960 (Roche), WO2017017042 (Roche), WO2017017043 (Roche), WO2017061466 (Toyoma Chemicals), WO2016177655 (Roche), WO2016161268 (Enanta). WO2017001853 (Redex Pharma), WO2017211791 (Roche), WO2017216685 (Novartis),
25 WO2017216686 (Novartis), WO2018019297 (Ginkgo Pharma), WO2018022282 (Newave Pharma), US20180030053 (Novartis), WO2018045911 (Zhejiang Pharma).

Activadores inmunitarios innatos

En algunas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina o coadministra con uno o más activadores inmunitarios
30 innatos. En diversas modalidades, el uno o más activadores inmunitarios innatos comprenden un agonista de un receptor seleccionado del grupo que consiste en tirosina cinasa 3 relacionada con fms (FLT3), estimulador del receptor de genes de interferón (STING), DExD/H-box helicasa 58 (DDX58; también conocido como RIG-I), dominio de oligomerización de unión a nucleótidos que contiene 2 (NOD2). En algunas modalidades, los métodos implican la coadministración de GS-3583 y/o GS-9992.

Agonistas de STING, moduladores de RIG-I y NOD2

35 En algunas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina o coadministra con un agonista del interacto 1 de cGAMP estimulador de la respuesta de interferón (STING o STING1; ID del gen del NCBI: 340061). En algunas

modalidades, el agonista o activador del receptor STING/STING1 se selecciona del grupo que consiste en ADU-S100 (MIW-815), SB-11285, MK-1454, SR-8291, AdvCA0848, STINGVAX, GSK-532, SYN-STING, MSA-1, SR-8291, ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (DMXAA), GAMP cíclico (cGAMP) y di-AMP cíclico. Ejemplos de agonistas de STING que se pueden combinar o coadministrar incluyen los compuestos divulgados en WO 2018065360 (Biolog Life Science Institute Forschungslabor und Biochemica-Vertrieb GmbH, Alemania), WO 2018009466 (Aduro Biotech), WO 2017186711 (InvivoGen), WO 2017161349 (Immune Sensor), WO 2017106740 (Aduro Biotech), US 20170158724 (Glaxo Smithkline), WO 2017075477 (Aduro Biotech), US 20170044206 (Merck), WO 2014179760 (University of California), WO2018098203 (Janssen), WO2018118665 (Merck), WO2018118664 (Merck), WO2018100558 (Takeda), WO2018067423 (Merck), WO2018060323 (Boehringer).

En algunas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina o coadministra con una DExD/H-box helicasa 58 (DDX58; también conocido como gen inducible por ácido retinoico 1 (RIG-I), RIG1, RIGI, RLR-1, SGMRT2; ID del gen del NCBI: 23586). Agonistas de RIG-I ilustrativos que se pueden combinar o coadministrar incluyen inarigivir soproxil (SB-9200, GS-9992), SB-40, SB-44, ORI-7246, ORI-9350, ORI-7537, ORI-9020, ORI-9198, ORI-7170 y RGT-100.

En algunas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina o coadministra con una proteína 2 que contiene un dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2; ID del gen del NCBI: 64127), tal como inarigivir soproxil (SB-9200, GS-9992) e IR-103.

Inhibidores de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)

Ejemplos de inhibidores de PI3K incluyen idelalisib, ACP-319, AZD-8186, AZD-8835, buparlisib, CDZ-173, CLR-457, pictilisib, neratinib, rigosertib, rigosertib sódico, EN-3342, TGR-1202, alpelisib, duvelisib, IPI-549, UCB-5857, taselisib, XL-765, gedatolisib, ME-401, VS-5584, copanlisib, CAI orotato, perifosina, RG-7666, GSK-2636771, DS-7423, panulisib, GSK-2269557, GSK-2126458, CUDC-907, PQR-309, INCB-40093, pilaralisib, BAY-1082439, mesilato de puquitinib, SAR-245409, AMG-319, RP-6530, ZSTK-474, MLN-1117, SF-1126, RV-1729, sonolisib, LY-3023414, SAR-260301, TAK-117, HMPL-689, tenalisib, voxalisib, y CLR-1401.

Moduladores de puntos de control inmunitario

En varias modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con uno o más bloqueadores o inhibidores de proteínas o receptores de puntos de control inmunitarios inhibidores y/o con uno o más estimuladores, activadores o agonistas de una o más proteínas o receptores de puntos de control inmunitarios estimuladores. El bloqueo o la inhibición de los puntos de control inmunitarios inhibidores puede regular positivamente la activación de células T o células NK y prevenir el escape inmunitario de las células infectadas. La activación o estimulación de puntos de control inmunitario estimuladores puede aumentar el efecto de los inhibidores de puntos de control inmunitario en terapias infecciosas. En diversas

modalidades, las proteínas o receptores de puntos de control inmunitario regulan las respuestas de células T (por ejemplo, revisado en Xu, *et al.*, *J Exp Clin Cancer Res.* (2018) 37:110). En diversas modalidades, las proteínas o receptores de puntos de control inmunitario regulan las respuestas de células NK (por ejemplo, revisado en Davis, *et al.*, *Semin Immunol.* (2017) 31:64–75 y Chiossone, *et al.*, *Nat Rev Immunol.* (2018) 18(11):671-688).

Los ejemplos de proteínas o receptores de puntos de control inmunitario incluyen, sin limitación, CD27 (ID del gen del NCBI: 939); CD70 (ID del gen del NCBI: 970); CD40 (ID del gen del NCBI: 958); CD40LG (ID del gen del NCBI: 959); CD47 (ID del gen del NCBI: 961); CD48 (SLAMF2; ID del gen del NCBI: 962); proteína 2 que contiene dominio transmembrana e inmunoglobulina (TMIGD2, CD28H; ID del gen del NCBI: 126259); CD84 (LY9B, SLAMF5; ID del gen del NCBI: 8832); CD96 (ID del gen del NCBI: 10225); CD160 (ID del gen del NCBI: 11126); MS4A1 (CD20; ID del gen del NCBI: 931); CD244 (SLAMF4; ID del gen del NCBI: 51744); CD276 (B7H3; ID del gen del NCBI: 80381); inhibidor 1 de la activación de células T que contiene dominio V-set (VTCN1, B7H4; ID del gen del NCBI: 79679); receptor inmunorregulador V-set (VSIR, B7H5, VISTA; ID del gen del NCBI: 64115); miembro 11 de superfamilia de inmunoglobulinas (IGSF11, VSIG3; ID del gen del NCBI: 152404); ligando 1 del receptor 3 de citotoxicidad de células asesinas naturales (NCR3LG1, B7H6; ID del gen del NCBI: 374383); proteína 2 asociada a LTR de HERV-H (HHLA2, B7H7; ID del gen del NCBI: 11148); coestimulador de células T inducible (ICOS, CD278; ID del gen del NCBI: 29851); ligando coestimulador de células T inducible (ICOSLG, B7H2; ID del gen del NCBI: 23308); miembro 4 de superfamilia del receptor de TNF (TNFRSF4, OX40; ID del gen del NCBI: 7293); miembro 4 de superfamilia de TNF (TNFSF4, OX40L; ID del gen del NCBI: 7292); TNFRSF8 (CD30; ID del gen del NCBI: 943); TNFSF8 (CD30L; ID del gen del NCBI: 944); TNFRSF10A (CD261, DR4, TRAILR1; ID del gen del NCBI: 8797); TNFRSF9 (CD137; ID del gen del NCBI: 3604); TNFSF9 (CD137L; ID del gen del NCBI: 8744); TNFRSF10B (CD262, DR5, TRAILR2; ID del gen del NCBI: 8795); TNFRSF10 (TRAIL; ID del gen del NCBI: 8743); TNFRSF14 (HVEM, CD270; ID del gen del NCBI: 8764); TNFSF14 (HVEML, ID del gen del NCBI: 8740); CD272 (asociado a linfocitos B y T (BTLA); ID del gen del NCBI: 151888); TNFRSF17 (BCMA, CD269; ID del gen del NCBI: 608); TNFSF13B (BAFF; ID del gen del NCBI: 10673); TNFRSF18 (GITR; ID del gen del NCBI: 8784); TNFSF18 (GITRL; ID del gen del NCBI: 8995); secuencia A relacionada con el polipéptido MHC de clase I (MICA; ID del gen del NCBI: 100507436); secuencia B relacionada con el polipéptido del MHC de clase I (MICB; ID del gen del NCBI: 4277); CD274 (CD274, PDL1, PD-L1; ID del gen del NCBI: 29126); proteína de muerte celular programada 1 (PDCD1, PD1, PD-1; ID del gen del NCBI: 5133); proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4, CD152; ID del gen del NCBI: 1493); CD80 (B7-1; ID del gen del NCBI: 941); CD28 (ID del gen del NCBI: 940); molécula de adhesión celular de nectina 2 (NECTIN2, CD112; ID del gen del NCBI: 5819); CD226 (DNAM-1; ID del gen del NCBI: 10666); molécula de adhesión celular del receptor de poliovirus (PVR) (PVR, CD155; ID del gen del NCBI: 5817); proteína que contiene dominio de inmunoglobulina relacionado con PVR (PVRIG, CD112R; ID del gen del NCBI: 79037); inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT; ID del gen del NCBI:

201633); proteína 4 que contiene dominio de inmunoglobulina y mucina de células T (TIMD4; TIM4; ID del gen del NCBI: 91937); receptor celular 2 del virus de la hepatitis A (HAVCR2, TIMD3, TIM3; ID del gen del NCBI: 84868); galectina 9 (LGALS9; ID del gen del NCBI: 3965); activador de linfocitos 3 (LAG3, CD223; ID del gen del NCBI: 3902); miembro 1 de la familia de moléculas de activación linfocítica de señalización (SLAMF1, SLAM, CD150; ID del gen del NCBI: 6504); antígeno de linfocitos 9 (LY9, CD229, SLAMF3; ID del gen del NCBI: 4063); miembro 6 de la familia SLAM (SLAMF6, CD352; ID del gen del NCBI: 114836); miembro 7 de la familia SLAM (SLAMF7, CD319; ID del gen del NCBI: 57823); proteína 1 de unión a UL16 (ULBP1; ID del gen del NCBI: 80329); proteína 2 de unión a UL16 (ULBP2; ID del gen del NCBI: 80328); proteína 3 de unión a UL16 (ULBP3; ID del gen del NCBI: 79465); transcrito temprano de ácido retinoico 1E (RAET1E; ULBP4; ID del gen del NCBI: 135250); transcrito temprano de ácido retinoico 1G (RAET1G; ULBP5; ID del gen del NCBI: 353091); transcrito temprano de ácido retinoico 1L (RAET1L; ULBP6; ID del gen del NCBI: 154064); receptor C1 similar a lectina de células asesinas (KLRC1, NKG2A, CD159A; ID del gen del NCBI: 3821); receptor K1 similar a lectina de células asesinas (KLRK1, NKG2D, CD314; ID del gen del NCBI: 22914); receptor C2 similar a lectina de células asesinas (KLRC2, CD159c, NKG2C; ID del gen del NCBI: 3822); receptor C3 similar a lectina de células asesinas (KLRC3, NKG2E; ID del gen del NCBI: 3823); receptor C4 similar a lectina de células asesinas (KLRC4, NKG2F; ID del gen del NCBI: 8302); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios de Ig y cola citoplasmática larga 1 (KIR2DL1; ID del gen del NCBI: 3802); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios de Ig y cola citoplasmática larga 2 (KIR2DL2; ID del gen del NCBI: 3803); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios de Ig y cola citoplasmática larga 3 (KIR2DL3; ID del gen del NCBI: 3804); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, tres dominios de Ig y cola citoplasmática larga 1 (KIR3DL1, KIR, CD158E1; ID del gen del NCBI: 3811) (por ejemplo, lirilumab (IPH2102/BMS-986015), IPH-4102); y receptor D1 similar a lectina de células asesinas (KLRD1; ID del gen del NCBI: 3824).

En varias modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con uno o más bloqueadores o inhibidores de una o más proteínas o receptores de puntos de control inmunitarios inhibidores de células T. Las proteínas o receptores de puntos de control inmunitario inhibidores de células T ilustrativos incluyen, sin limitación, CD274 (CD274, PDL1, PD-L1); ligando 2 de muerte celular programada 1 (PD1, PD-L2, CD273); proteína de muerte celular programada 1 (PD1, PD-L1); proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4, CD152); CD276 (B7H3); inhibidor 1 de la activación de células T que contiene dominio V-set (VTCN1, B7H4); receptor inmunorregulador V-set (VSIR, B7H5, VISTA); miembro 11 de la superfamilia de inmunoglobulinas (IGSF11, VSIG3); TNFRSF14 (HVEM, CD270), TNFSF14 (HVEML); CD272 (asociado a linfocitos B y T (BTLA)); proteína que contiene dominio de inmunoglobulina relacionado con PVR (PVRIG, CD112R); inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT); activador de linfocitos 3 (LAG3, CD223); receptor celular 2 del virus de la hepatitis A (HAVCR2, TIMD3, TIM3); galectina 9 (LGALS9); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas,

tres dominios Ig y cola citoplasmática larga 1 (KIR, CD158E1); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios Ig y cola citoplasmática larga 1 (KIR2DL1); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios Ig y cola citoplasmática larga 2 (KIR2DL2); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios Ig y cola citoplasmática larga 3 (KIR2DL3); y receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, tres dominios Ig y cola citoplasmática larga 1 (KIR3DL1). En varias modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con uno o más agonistas o activadores de una o más proteínas o receptores de puntos de control inmunitarios estimuladores de células T.

Las proteínas o receptores de puntos de control inmunitario estimuladores de células T ilustrativos incluyen, sin limitación, CD27, CD70; CD40, CD40LG; coestimulador de células T inducible (ICOS, CD278); ligando coestimulador de células T inducible (ICOSLG, B7H2); miembro 4 de superfamilia del receptor de TNF (TNFRSF4, OX40); miembro 4 de superfamilia de TNF (TNFSF4, OX40L); TNFRSF9 (CD137), TNFSF9 (CD137L); TNFRSF18 (GITR), TNFSF18 (GITRL); CD80 (B7-1), CD28; molécula de adhesión celular de nectina 2 (NECTIN2, CD112); CD226 (DNAM-1); CD244 (2B4, SLAMF4); y molécula de adhesión celular del receptor de poliovirus (PVR) (PVR, CD155). Ver, por ejemplo, Xu, *et al.*, *J Exp Clin Cancer Res.* (2018) 37:110.

En varias modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con uno o más bloqueadores o inhibidores de una o más proteínas o receptores de puntos de control inmunitarios inhibidores de células NK. Las proteínas o receptores de puntos de control inmunitario inhibidores de células NK ilustrativos incluyen, sin limitación, receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, tres dominios de Ig y cola citoplasmática larga 1 (KIR, CD158E1); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios de Ig y cola citoplasmática larga 1 (KIR2DL1); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios de Ig y cola citoplasmática larga 2 (KIR2DL2); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios de Ig y cola citoplasmática larga 3 (KIR2DL3); receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas, tres dominios de Ig y cola citoplasmática larga 1 (KIR3DL1); receptor similar a lectina de células asesinas C1 (KLRC1, NKG2A, CD159A); y receptor similar a lectina de células asesinas D1 (KLRD1, CD94). En varias modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con uno o más agonistas o activadores de una o más proteínas o receptores de puntos de control inmunitarios estimuladores de células NK. Las proteínas o receptores de puntos de control inmunitario estimulantes de células NK ilustrativos incluyen, de modo no taxativo, CD16, CD226 (DNAM-1); CD244 (2B4, SLAMF4); receptor K1 similar a lectina de células asesinas (KLRK1, NKG2D, CD314); y miembro de la familia SLAM 7 (SLAMF7). Ver, por ejemplo, Davis, *et al.*, *Semin Immunol.* (2017) 31:64–75; Fang, *et al.*, *Semin Immunol.* (2017) 31:37-54; y Chiossone, *et al.*, *Nat Rev Immunol.* (2018) 18(11):671-688.

En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario comprenden un inhibidor proteico (por ejemplo, anticuerpo o fragmento del mismo, o mimético de anticuerpo) de PD-

L1 (CD274), PD-1 (PDCD1) o CTLA4. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario comprenden un inhibidor de molécula orgánica pequeña de PD-L1 (CD274), PD-1 (PDCD1) o CTLA4. En algunas modalidades, el inhibidor de molécula pequeña de CD274 o PDCD1 se selecciona del grupo que consiste en GS-4224, GS-4416, INCB086550 y MAX10181. En algunas modalidades, el inhibidor de molécula pequeña de CTLA4 comprende BPI-002.

Los ejemplos de inhibidores de CTLA4 que se pueden coadministrar incluyen, sin limitación, ipilimumab, tremelimumab, BMS-986218, AGEN1181, AGEN1884, BMS-986249, MK-1308, REGN-4659, ADU-1604, CS-1002, BCD-145, APL-509, JS-007, BA-3071, ONC-392, AGEN-2041, JHL-1155, KN-044, CG-0161, ATOR-1144, PBI-5D3H5, BPI-002, así como inhibidores multiespecíficos FPT-155 (CTLA4/PD-L1/CD28), PF-06936308 (PD-1/CTLA4), MGD-019 (PD-1/CTLA4), KN-046 (PD-1/CTLA4), MEDI-5752 (CTLA4/PD-1), XmAb-20717 (PD-1/CTLA4) y AK-104 (CTLA4/PD-1).

Ejemplos de inhibidores de PD-L1 (CD274) o PD-1 (PDCD1) que se pueden coadministrar incluyen, sin limitación, pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab, pidilizumab, AMP-224, MEDI0680 (AMP-514), spartalizumab, atezolizumab, avelumab, durvalumab, ALN-PDL, BMS-936559, CK-301, PF-06801591, BGB-108, BGB-A317 (tislelizumab), GLS-010 (WBP-3055), AK-103 (HX-008), GB-226, AK-105, CS-1003, HLX-10, MGA-012, BI-754091, PDR-001, AGEN-2034, JS-001 (toripalimab), JNJ-63723283, genolimzumab (CBT-501), LZM-009, BCD-100, LY-3300054, SHR-1201, SHR-1210 (camrelizumab), Sym-021, ABBV-181, PD1-PIK, BAT-1306, RO-6084 (oligonucleótido antisentido de PD-L1), STI-1110, GX-P2, RG-7446, mDX-400, (MSB0010718C), CX-072, CBT-502, TSR-042 (dostarlimab), MSB-2311, JTX-4014, BGB-A333, SHR-1316, CS-1001 (WBP-3155), MEDI-0680, envafolelimab (KN-035), KD-033, KY-1003, IBI-308 (sintilimab), HLX-20, KL-A167, STI-A1014, STI-A1015 (IMC-001), BCD-135, FAZ-053, TQB-2450, MDX1105-01, MSB-0010718C, GS-4224, GS-4416, INCB086550, MAX10181, así como inhibidores multiespecíficos FPT-155 (CTLA4/PD-L1/CD28), PF-06936308 (PD-1/CTLA4), MGD-013 (PD-1/LAG-3), FS-118 (LAG-3/PD-L1), MGD-019 (PD-1/CTLA4), KN-046 (PD-1/CTLA4), MEDI-5752 (CTLA4/PD-1), RO-7121661 (PD-1/TIM-3), XmAb-20717 (PD-1/CTLA4), AK-104 (CTLA4/PD-1), M7824 (PD-L1/dominio EC de TGF β), CA-170 (PD-L1/VISTA), CDX-527 (CD27/PD-L1), LY-3415244 (TIM3/PDL1), GNS-1480 (antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico; inhibidor del ligando 1 de muerte celular programada), M-7824 (proteína de fusión bifuncional PD-L1/TGF- β) e INBRX-105 (4-1BB/PDL1).

Ejemplos de inhibidores de PD-1 incluyen los compuestos divulgados en WO2017112730 (Incyte Corp), WO2017087777 (Incyte Corp), WO2017017624, WO2014151634 (BristolMyers Squibb Co), WO201317322 (BristolMyers Squibb Co), WO2018119286 (Incyte Corp), WO2018119266 (Incyte Corp), WO2018119263 (Incyte Corp), WO2018119236 (Incyte Corp), WO2018119221 (Incyte Corp), WO2018118848 (BristolMyers Squibb Co), WO20161266460 (BristolMyers Squibb Co), WO2017087678 (BristolMyers Squibb Co), WO2016149351 (BristolMyers Squibb Co), WO2015033299 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2015179615 (Eisai Co Ltd; Eisai Research Institute), WO2017066227 (BristolMyers Squibb Co), WO2016142886 (Aurigene Discovery Technologies Ltd),

WO2016142852 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2016142835 (Aurigene Discovery Technologies Ltd; Individual), WO2016142833 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2018085750 (BristolMyers Squibb Co), WO2015033303 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2017205464 (Incyte Corp), WO2016019232 (3M Co; Individual; Texas A&M University System) y WO2015160641 (BristolMyers Squibb Co), WO2017079669 (Incyte Corp), WO2015033301 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2015034820 (BristolMyers Squibb Co), WO2018073754 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2016077518 (BristolMyers Squibb Co), WO2016057624 (BristolMyers Squibb Co), WO2018044783 (Incyte Corp), WO2016100608 (BristolMyers Squibb Co), WO2016100285 (BristolMyers Squibb Co), WO2016039749 (BristolMyers Squibb Co), WO2015019284 (Cambridge Enterprise Ltd), WO2016142894 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2015134605 (BristolMyers Squibb Co), WO2018051255 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2018051254 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2017222976 (Incyte Corp), WO2017070089 (Incyte Corp), WO2018044963 (BristolMyers Squibb Co), WO2013144704 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2018013789 (Incyte Corp), WO2017176608 (BristolMyers Squibb Co), WO2018009505 (BristolMyers Squibb Co), WO2011161699 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2015119944 (Incyte Corp; Merck Sharp & Dohme Corp), WO2017192961 (Incyte Corp), WO2017106634 (Incyte Corp), WO2013132317 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2012168944 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2015036927 (Aurigene Discovery Technologies Ltd), WO2015044900 (Aurigene Discovery Technologies Ltd) y WO2018026971 (Arising International).

En varias modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con anticuerpos anti-TIGIT, tal como BMS-986207, RG-6058 y AGEN-1307.

Agonistas o activadores de miembros de la superfamilia del receptor de TNF (TNFRSF)

En varias modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con un agonista de uno o más miembros de la superfamilia del receptor de TNF (TNFRSF), por ejemplo, un agonista de uno o más de TNFRSF1A (ID del gen del NCBI: 7132), TNFRSF1B (ID del gen del NCBI: 7133), TNFRSF4 (OX40, CD134; ID del gen del NCBI: 7293), TNFRSF5 (CD40; ID del gen del NCBI: 958), TNFRSF6 (FAS, ID del gen del NCBI: 355), TNFRSF7 (CD27, ID del gen del NCBI: 939), TNFRSF8 (CD30, ID del gen del NCBI: 943), TNFRSF9 (4-1BB, CD137, ID del gen del NCBI: 3604), TNFRSF10A (CD261, DR4, TRAILR1, ID del gen del NCBI: 8797), TNFRSF10B (CD262, DR5, TRAILR2, ID del gen del NCBI: 8795), TNFRSF10C (CD263, TRAILR3, ID del gen del NCBI: 8794), TNFRSF10D (CD264, TRAILR4, ID del gen del NCBI: 8793), TNFRSF11A (CD265, RANK, ID del gen del NCBI: 8792), TNFRSF11B (ID del gen del NCBI: 4982), TNFRSF12A (CD266, ID del gen del NCBI: 51330), TNFRSF13B (CD267, ID del gen del NCBI: 23495), TNFRSF13C (CD268, ID del gen del NCBI: 115650), TNFRSF16 (NGFR, CD271, ID del gen del NCBI: 4804), TNFRSF17 (BCMA, CD269, ID del gen del NCBI: 608), TNFRSF18 (GITR, CD357, ID del gen del NCBI: 8784), TNFRSF19 (ID del gen del NCBI: 55504), TNFRSF21 (CD358, DR6, ID del

gen del NCBI: 27242), y TNFRSF25 (DR3, ID del gen del NCBI: 8718).

Ejemplos de anticuerpos anti-TNFRSF4 (OX40) que se pueden coadministrar incluyen, sin limitación, MEDI6469, MEDI6383, MEDI0562 (tavolixizumab), MOXR0916, PF-04518600, RG-7888, GSK-3174998, INCAGN1949, BMS-986178, GBR-8383, ABBV-368, IBI-101 y los descritos en WO2016179517, WO2017096179, WO2017096182, WO2017096281 y WO2018089628.

Ejemplos de anticuerpos anti-TNFRSF5 (CD40) que se pueden coadministrar incluyen, sin limitación, RG7876, SEA-CD40, APX-005M y ABBV-428.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TNFRSF7 (CD27) varilumab (CDX-1127) se coadministra.

Ejemplos de anticuerpos anti-TNFRSF9 (4-1BB, CD137) que se pueden coadministrar incluyen, sin limitación, urelumab, utomilumab (PF-05082566), AGEN2373 y ADG-106.

Ejemplos de anticuerpos anti-TNFRSF18 (GITR) que se pueden coadministrar incluyen, sin limitación, MEDI1873, FPA-154, INCAGN-1876, TRX-518, BMS-986156, MK-1248, GWN-323 y los descritos en WO2017096179, WO2017096276, WO2017096189 y WO2018089628. En algunas modalidades, se coadministra un anticuerpo, o fragmento del mismo, que se dirige conjuntamente a TNFRSF4 (OX40) y TNFRSF18 (GITR). Estos anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO2017096179 y WO2018089628.

Inhibidores de indoleamina-pirrol-2,3-dioxigenasa (IDO1)

En varias modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con un inhibidor de indoleamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1; ID del gen del NCBI: 3620). Ejemplos de inhibidores de IDO1 incluyen, sin limitación, BLV-0801, epacadostat, resminostat, F-001287, GBV-1012, GBV-1028, GDC-0919, indoximod, NKTR-218, vacuna basada en NLG-919, PF-06840003, derivados de piranonaftoquinona (SN-35837), SBLK-200802, BMS-986205 y shIDO-ST, EOS-200271, KHK-2455, LY-3381916 y los compuestos divulgados en US20100015178 (Incyte), US2016137652 (Flexus Biosciences, Inc.), WO2014073738 (Flexus Biosciences, Inc.) y WO2015188085 (Flexus Biosciences, Inc.).

Inhibidores de LAG-3 y TIM-3

En ciertas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con un anticuerpo anti-TIM-3, tal como TSR-022, LY-3321367, MBG-453, INCAGN-2390.

En ciertas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con un anticuerpo anti LAG-3 (activación de linfocitos), tal como relatlimab (ONO-4482), LAG-525, MK-4280, REGN-3767, INCAGN2385.

Proteínas de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP)

Ejemplos de inhibidores de IAP incluyen APG-1387.

Timosina alfa-1 recombinante

Ejemplos de timosina alfa-1 recombinante incluyen NL-004 y timosina alfa-1 PEGilada.

Inhibidores de tirosina cinasa de Bruton (BTK)

Ejemplos de inhibidores de BTK incluyen ABBV-105, acalabrutinib (ACP-196), ARQ-531, BMS-986142, dasatinib, ibrutinib, GDC-0853, PRN-1008, SNS-062, ONO-4059, BGB-3111, ML-319, MSC-2364447, RDX-022, X-022, AC-058, RG-7845, spebrutinib, TAS-5315, TP-0158, TP-4207, HM-71224, KBP-7536, M-2951, TAK-020, AC-0025 y los compuestos divulgados en US20140330015 (Ono Pharmaceutical), US20130079327 (Ono Pharmaceutical) y US20130217880 (Ono Pharmaceutical).

Inhibidores de KDM

Ejemplos de inhibidores de KDM5 incluyen los compuestos divulgados en WO2016057924 (Genentech/Constellation Pharmaceuticals), US20140275092 (Genentech/Constellation Pharmaceuticals), US20140371195 (Epitherapeutics) y US20140371214 (Epitherapeutics), US20160102096 (Epitherapeutics), US20140194469 (Quantice), US20140171432, US20140213591 (Quantice), US20160039808 (Quantice), US20140275084 (Quantice) y WO2014164708 (Quantice).

Ejemplos de inhibidores de KDM1 incluyen los compuestos divulgados en US9186337B2 (Oryzon Genomics), GSK-2879552, RG-6016 y ORY-2001.

Inhibidores de arginasa

Ejemplos de inhibidores de arginasa incluyen CB-1158, C-201 y resminostat.

Acopladores biespecíficos y triespecíficos de células asesinas naturales (NK)

En varias modalidades, una meganucleasa diseñada en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con un acoplador biespecífico de células NK (BiKE) o un acoplador triespecífico de células NK (TriKE) (por ejemplo, que no tiene región Fc) o un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, que tiene región Fc) contra un receptor activador de células NK, por ejemplo, CD16A, receptores de lectina de tipo C (CD94/NKG2C, NKG2D, NKG2E/H y NKG2F), receptores de citotoxicidad natural (NKp30, NKp44 y NKp46), receptor similar a lectina de tipo C de células asesinas (NKp65, NKp80), receptor Fc FcγR (que media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), receptores de la familia SLAM (por ejemplo, 2B4, SLAMF6 y SLAMF7), receptores similares a inmunoglobulina de células asesinas (KIR) (KIR-2DS y KIR-3DS), DNAM-1 y CD137 (4-1BB). Según corresponda, las moléculas biespecíficas de unión anti-CD16 pueden o no tener región Fc. Acopladores de células NK biespecíficos ilustrativos que se pueden coadministrar se dirigen a CD16 y a uno o más antígenos asociados al HBV como se describe en la presente. Se describen BiKE y TriKE, por ejemplo, en Felices, *et al.*, *Methods Mol Biol.* (2016) 1441:333–346; Fang, *et al.*, *Semin Immunol.* (2017) 31:37-54.

Terapia génica y terapia celular

En ciertas modalidades, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, se combina con un régimen de terapia génica o celular. La terapia génica y la terapia celular incluyen, de modo no taxativo, la modificación genética para silenciar un gen; enfoques genéticos para matar directamente las células infectadas; la infusión de células inmunitarias diseñadas para reemplazar gran parte del propio sistema inmunitario del paciente para

mejorar la respuesta inmunitaria a las células infectadas, o activar el propio sistema inmunitario del paciente para matar las células infectadas, o encontrar y matar las células infectadas; y/o enfoques genéticos para modificar la actividad celular para alterar aún más la capacidad de respuesta inmunitaria endógena contra la infección.

Terapia de células CAR-T

La terapia celular CAR-T incluye una población de células efectoras inmunitarias diseñadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR incluye un dominio de unión a antígeno del HBV. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno es un dominio descrito en la presente. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno es distinto de un dominio descrito en la presente. En determinadas modalidades, el antígeno es HBsAg (es decir, HBsAg-CART). La célula efectora inmune es una célula T o una célula NK. En ciertas modalidades, la célula T es una célula T CD4+, una célula T CD8+, una célula NK o una combinación de las mismas. Las células pueden ser autólogas o alogénicas. Un ejemplo de un CART dirigido al HBV se describe en Cytotherapy. Mayo de 2018; 20 (5):697-705 doi: 10.1016/j.jcyt.2018.02.

Terapia de células TCR-T

La terapia de células TCR-T incluye células T que expresan receptores de células T específicos de HBV. Las células TCR-T están diseñadas para dirigirse a péptidos derivados de HBV presentes en la superficie de las células infectadas por virus. Un ejemplo de un TCR dirigido al HBV se describe en Wisskirchen, K. *et al. J Clin Invest.* 2019;129(7):2932-2945.

La terapia de células TCR-T incluye células T que expresan TCR específico del antígeno de superficie de HBV (HBsAg).

La terapia de células TCR-T incluye la terapia de TCR-T dirigida al tratamiento del HBV, como LTCR-H2-1.

En otra modalidad específica, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina con un inhibidor de la ADN polimerasa del HBV, uno o dos agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en inmunomoduladores, moduladores de TLR, inhibidores de HBsAg, inhibidores de la secreción o ensamblaje de HBsAg, vacunas terapéuticas contra el HBV, anticuerpos contra el HBV, incluidos anticuerpos contra el HBV dirigidos a los antígenos de superficie del virus de la hepatitis B y anticuerpos biespecíficos y proteínas terapéuticas “similares a anticuerpos” (tales como DARTs®, DUOBODIES®, BITES®, XmAbs®, TandAbs®, derivados de Fab o anticuerpos similares a TCR), inhibidores de ciclofilina, estimuladores del gen 1 inducible por ácido retinoico, estimuladores de receptores similares a RIG-I, inhibidores de PD-1, inhibidores de PD-L1, inhibidores de arginasa, inhibidores de PI3K, inhibidores de IDO y estimuladores de NOD2, y uno o dos agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de entrada viral del HBV, inhibidores de NTCP, inhibidores de HBx, inhibidores de ADNccc, anticuerpos contra el HBV dirigidos a los antígenos de superficie del virus de la hepatitis B, ARNip, agentes de terapia génica con miARN, ARNhp, inhibidores de KDM5 y moduladores de

nucleoproteínas (moduladores de la proteína del núcleo o de la cápside del HBV).

En otra modalidad específica, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina con al menos un segundo agente terapéutico adicional
 5 seleccionado del grupo que consiste en: Inhibidores de la ADN polimerasa del HBV, inmunomoduladores, moduladores de TLR, inhibidores de HBsAg, vacunas terapéuticas de HBV, anticuerpos contra HBV que incluyen anticuerpos contra HBV que se dirigen a los antígenos de superficie del virus de la hepatitis B y anticuerpos biespecíficos y proteínas terapéuticas "similares a anticuerpos" (tales como DARPins®, anticuerpos similares a TCR anti-pMHC, DARTs®,
 10 DUOBODIES®, BITES®, XmAbs®, TandAbs®, derivados de Fab o anticuerpos similares a TCR), inhibidores de ciclofilina, estimuladores del gen 1 inducible por ácido retinoico, estimuladores de receptores similares a RIG-I, inhibidores de PD-1, inhibidores de PD-L1, inhibidores de arginasa, inhibidores de PI3K, inhibidores de IDO y estimuladores de NOD2.

En otra modalidad específica, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido
 15 nucleico que codifica la misma, se combina con al menos un segundo agente terapéutico adicional seleccionado del grupo que consiste en: Inhibidores de la ADN polimerasa del HBV, inhibidores de la entrada viral del HBV, inhibidores de NTCP, inhibidores de HBx, inhibidores de ADNccc, anticuerpos contra HBV dirigidos a los antígenos de superficie del virus de la hepatitis B, ARNip, agentes de terapia génica de miARN, ARNhp, inhibidores de KDM5 y moduladores de nucleoproteínas (inhibidores de la
 20 proteína central o de la cápside del HBV).

En una modalidad particular, una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, se combina con compuestos tales como los divulgados en la publicación de los Estados Unidos Núm. 2010/0143301 (Gilead Sciences), publicación de los Estados Unidos Núm. 2011/0098248 (Gilead Sciences), publicación de los Estados Unidos Núm. 2009/0047249 (Gilead
 25 Sciences), patente de los Estados Unidos Núm. 8722054 (Gilead Sciences), publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0045849 (Janssen), publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0073642 (Janssen), WO2014/056953 (Janssen), WO2014/076221 (Janssen), WO2014/128189 (Janssen), publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0350031 (Janssen), WO2014/023813 (Janssen), publicación de los Estados Unidos Núm. 2008/0234251 (Array Biopharma), publicación de los Estados
 30 Unidos Núm. 2008/0306050 (Array Biopharma), publicación de los Estados Unidos Núm. 2010/0029585 (Ventirx Pharma), publicación de los Estados Unidos Núm. 2011/0092485 (Ventirx Pharma), US2011/0118235 (Ventirx Pharma), publicación de los Estados Unidos Núm. 2012/0082658 (Ventirx Pharma), publicación de los Estados Unidos Núm. 2012/0219615 (Ventirx Pharma), publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0066432 (Ventirx Pharma) y publicación de los Estados Unidos Núm.
 35 2014/0088085 (Ventirx Pharma), publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0275167 (Novira Therapeutics), publicación de los Estados Unidos Núm. 2013/0251673 (Novira Therapeutics), patente de los Estados Unidos Núm. 8513184 (Gilead Sciences), publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0030221 (Gilead Sciences), publicación de los Estados Unidos Núm. 2013/0344030 (Gilead

Sciences), publicación de los Estados Unidos Núm. 2013/0344029 (Gilead Sciences), US20140275167 (Novira Therapeutics), US20130251673 (Novira Therapeutics), publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0343032 (Roche), WO2014037480 (Roche), publicación de los Estados Unidos Núm. 2013/0267517 (Roche), WO2014131847 (Janssen), WO2014033176 (Janssen), WO2014033170 (Janssen), WO2014033167 (Janssen), WO2015/059212 (Janssen), WO2015118057 (Janssen), WO2015011281 (Janssen), WO2014184365 (Janssen), WO2014184350 (Janssen), WO2014161888 (Janssen), WO2013096744 (Novira), US20150225355 (Novira), US20140178337 (Novira), US20150315159 (Novira), US20150197533 (Novira), US20150274652 (Novira), US20150259324 (Novira), US20150132258 (Novira), US9181288 (Novira), WO2014184350 (Janssen), WO2013144129 (Roche), US20100015178 (Incyte), US2016137652 (Flexus Biosciences, Inc.), WO2014073738 (Flexus Biosciences, Inc.), WO2015188085 (Flexus Biosciences, Inc.), publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0330015 (Ono Pharmaceutical), publicación de los Estados Unidos Núm. 2013/0079327 (Ono Pharmaceutical), publicación de los Estados Unidos Núm. 2013/0217880 (Ono Pharmaceutical), WO2016057924 (Genentech/Constellation Pharmaceuticals), US20140275092 (Genentech/Constellation Pharmaceuticals), US20140371195 (Epitherapeutics) y US20140371214 (Epitherapeutics), US20160102096 (Epitherapeutics), US20140194469 (Quanticel), US20140171432, US20140213591 (Quanticel), US20160039808 (Quanticel), US20140275084 (Quanticel), WO2014164708 (Quanticel), US9186337B2 (Oryzon Genomics) y otros fármacos para tratar el HBV, y combinaciones de los mismos.

En una modalidad, se proporcionan kits que comprenden una meganucleasa diseñada descrita en la presente, o un ácido nucleico que codifica la misma, en combinación con uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, uno o dos, o uno a tres, o uno a cuatro) agentes terapéuticos adicionales.

25 **Ejemplos**

Las modalidades de la divulgación además se ilustran mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos. Los técnicos en la materia reconocerán o podrán determinar mediante experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a las sustancias y procedimientos específicos descritos en la presente. Dichos equivalentes pretenden ser abarcados en el alcance de las reivindicaciones que siguen a los ejemplos.

30 **Ejemplo 1**

Evaluación de nuevos enlazadores polipeptídicos y combinaciones de sustitución de subunidades en meganucleasas HBV 11-12

1. Métodos

35 Este estudio se diseñó para evaluar variantes de la meganucleasa HBV 11-12L.1090 (SEQ ID NO: 13), que se unen y escinden la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 (SEQ ID NO: 3) y comprende dos subunidades de I-Crel modificadas unidas entre sí por un enlazador polipeptídico, denominado Enlazador1 (SEQ ID NO: 16). Las variantes incluidas en este estudio comprendieron un

enlazador novedoso seleccionado de Enlazador1923 (SEQ ID NO: 15), Enlazador1766 (SEQ ID NO: 42), Enlazador1771 (SEQ ID NO: 43), Enlazador1808 (SEQ ID NO: 44), y Enlazador1814 (SEQ ID NO: 45). Cada uno de estos nuevos enlazadores se desarrolló para usarse potencialmente con meganucleasas de cadena sencilla derivadas de I-Crel tal como HBV 11-12L.1090. De manera similar al Enlazador1 en la meganucleasa HBV 11-12L.1090 parental, el extremo N-terminal de cada enlazador novedoso se unió a la subunidad N-terminal en el residuo D correspondiente a la posición 153 de I-Crel de tipo silvestre, y el extremo C-terminal de cada enlazador novedoso se unió a la subunidad C-terminal en el residuo Y correspondiente a la posición 5 de I-Crel de tipo silvestre. Algunas variantes que comprenden estos enlazadores novedosos también comprendieron diferentes combinaciones de modificaciones de aminoácidos en las subunidades N-terminal y C-terminal que se incorporaron, en principio, para trabajar en concierto con las estructuras enlazadoras novedosas. Estas modificaciones de aminoácidos se clasificaron en grupos como se muestra en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2. Agrupaciones de modificación de subunidades

Grupo de mutaciones	Mutaciones dentro de la Subunidad 1 (N-terminal)	Mutaciones dentro de la Subunidad 2 (C-terminal)
1	K96A	K57Y, E61T
2	Q99A, K100D	
3	H37Y	W53F
1 + 2	K96A, Q99A, K100D	K57Y, E61T
1 + 3	H37Y, K96A	W53F, K57Y, E61T
2 + 3	H37Y, Q99A, K100D	W53F
1 + 2 + 3	H37Y, K96A, Q99A, K100D	W53F, K57Y, E61T

Las variantes de meganucleasa HBV 11-12L.1090 preparadas para este experimento se muestran en la Tabla 3 más adelante:

Tabla 3.

Nucleasa andamiaje	de	Enlazador	Modificaciones subunidades	de	SEQ ID NO:
HBV 11-12L.1090		Enlazador1	Ninguno		13
HBV 11-12L.1090		Enlazador1923	Ninguno		46
HBV 11-12L.1090		Enlazador1923	Grupo 1		47
HBV 11-12L.1090		Enlazador1923	Grupo 2		48
HBV 11-12L.1090		Enlazador1923	Grupo 3		49
HBV 11-12L.1090		Enlazador1923	Grupo 1+2		5
HBV 11-12L.1090		Enlazador1923	Grupo 1+3		50
HBV 11-12L.1090		Enlazador1923	Grupo 2+3		51
HBV 11-12L.1090		Enlazador1923	Grupo 1+2+3		52
HBV 11-12L.1090		Enlazador1766	Ninguno		53
HBV 11-12L.1090		Enlazador1766	Grupo 1+2		54

5	HBV 11-12L.1090	Enlazador1766	Grupo 1+2+3	55
	HBV 11-12L.1090	Enlazador1771	Ninguno	56
	HBV 11-12L.1090	Enlazador1771	Grupo 1+2	57
	HBV 11-12L.1090	Enlazador1771	Grupo 1+2+3	58
	HBV 11-12L.1090	Enlazador1808	Ninguno	59
	HBV 11-12L.1090	Enlazador1808	Grupo 1+2	60
	HBV 11-12L.1090	Enlazador1808	Grupo 1+2+3	61
	HBV 11-12L.1090	Enlazador1814	Ninguno	62
	HBV 11-12L.1090	Enlazador1814	Grupo 1+2	63
	HBV 11-12L.1090	Enlazador1814	Grupo 1+2+3	64

Se evaluó la actividad de la meganucleasa HBV 11-12L.1090 y cada variante de meganucleasa utilizando un ensayo indicador de células CHO descrito previamente (ver, WO 2012/167192, que se incorpora como referencia en su totalidad). Para realizar los ensayos, se generaron líneas de células reporteras CHO que llevaban un casete de expresión génica del Gen de la Proteína Fluorescente Verde (GFP) no funcional integrado en el genoma de las células. El gen GFP en cada línea celular fue interrumpido por un par de secuencias de reconocimiento de manera que el corte intracelular de cualquiera de las secuencias de reconocimiento por una meganucleasa estimularía un evento de recombinación homóloga que resultaría en un gen GFP funcional. En las líneas celulares CHO reporteras desarrolladas para este estudio, una secuencia de reconocimiento insertada en el gen GFP fue la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 humana. La segunda secuencia de reconocimiento insertada en el gen GFP fue una secuencia de reconocimiento CHO-23/24, que es reconocida y escindida por una meganucleasa de control llamada "CHO-23/24".

Se transfectaron células reporteras CHO con ARNm que codifica clones individuales aislados de las selecciones de las dos bibliotecas de meganucleasas que contienen las dos bibliotecas de enlazadores. En uno de los 96 pocillos, las células reporteras CHO se transfectaron también con ARNm que codifica la meganucleasa CHO-23/24. En cada ensayo, se transfectaron 5e4 células reporteras CHO con 90 ng de ARNm en una placa de 96 pocillos utilizando Lipofectamine® MessengerMax (ThermoFisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células CHO transfectadas se evaluaron mediante citometría de flujo a los 2 días después de la transfección para determinar el porcentaje de células GFP-positivas en comparación con un control negativo no transfectado. Los datos obtenidos en cada punto de tiempo se normalizaron respecto al % de células positivas para GFP observadas utilizando la meganucleasa CHO-23/24 para determinar una "puntuación de actividad", y los datos normalizados del punto de tiempo más temprano se restaron de los del punto de tiempo más tardío para determinar una "puntuación de toxicidad". Las puntuaciones de actividad y toxicidad posteriormente se sumaron para determinar un "índice de actividad", que posteriormente se normalizó al índice de actividad de la meganucleasa CHO-23/24 para comparar los datos entre las líneas celulares ("índice de actividad normalizado").

2. Resultados

Los resultados de actividad de cada variante de meganucleasa, con los diversos enlazadores y combinaciones de modificaciones de subunidades, se muestran en las Figuras 4A-4E. Cada variante HBV 11-12L.1090 se evaluó a una baja concentración de ARNm (2.5 ng) debido al alto nivel de actividad de la meganucleasa original. Se observó que la incorporación de los diferentes enlazadores solos tuvo diversos grados de efecto sobre la actividad de la meganucleasa, y que varias combinaciones de modificaciones de subunidades también dieron como resultado diferentes niveles de actividad de meganucleasa.

Para las variantes de HBV 11-12L.1090, se observó que el reemplazo del Enlazador1 original con cualquiera de los cinco enlazadores novedosos, en ausencia de cualquier modificación de subunidad, dio como resultado una disminución significativa en la actividad de meganucleasa (Figuras 4A a 4E). Al incorporar Enlazador1923 (Figura 4A), se observó que la adición de las modificaciones de la subunidad del Grupo 1 mejoró la actividad a un nivel superior al de la nucleasa original que tiene Enlazador1. La adición de las modificaciones de la subunidad del Grupo 2 también mejoró la actividad en menor grado, mientras que la adición de las modificaciones de la subunidad del Grupo 3 suprimió sustancialmente la actividad. La incorporación de las modificaciones de subunidades del Grupo 1 y 2 (1+2) juntas produjo el nivel más alto de actividad de meganucleasa, mientras que con las combinaciones del Grupo 1 y 3 (1 +3) y los Grupos 1, 2 y 3 (1+2+3) produjo un nivel de actividad ligeramente menor. En comparación, la adición de la combinación del Grupo 2 y 3 (2+3) mostró actividad suprimida, lo que sugiere que en ausencia de las modificaciones del Grupo 1, las modificaciones del Grupo 3 actúan para suprimir la actividad.

Para los enlazadores novedosos restantes utilizados con HBV 11-12L.1090, las únicas variantes probadas fueron enlazador novedoso sin modificaciones, una combinación de las modificaciones del Grupo 1 y 2 (1+2) y una combinación de las modificaciones del Grupo 1, 2 y 3 (1+2+3). De manera similar a Enlazador1923, todos los enlazadores restantes también exhibieron una actividad de meganucleasa reducida con respecto al enlazador original cuando no se incorporan modificaciones de subunidades (Figuras 4B a 4E). También similar a Enlazador1923, la adición de la combinación de modificaciones del Grupo 1 y 2 (1+2) mejoró la actividad a niveles cercanos (ligeramente más altos o más bajos, o comparables a) la actividad de la meganucleasa original. La combinación de modificaciones del Grupo 1, 2 y 3 produjo cambios variables en la actividad dependiendo del enlazador, con poco cambio observado con Enlazador1766 y reducciones de varios grados para Enlazador1771, Enlazador1808 y Enlazador1814.

3. Conclusiones

Se observó en estos estudios que la actividad de la meganucleasa HBV 11-12L.1090 podría modularse mediante el uso de enlazadores novedosos y diversas combinaciones de modificaciones de aminoácidos dentro de las subunidades N-terminal y C-terminal. Se observó que la incorporación de Enlazador1923 con una combinación de las modificaciones de la subunidad del Grupo 1 y del Grupo 2

(1+2) produjo la mayor actividad general. Además, las modificaciones combinadas del Grupo 1 y 2 (1+2) aumentaron la actividad frente a ninguna modificación para casi todas las combinaciones de enlazadores probadas. En general, la incorporación de las modificaciones del Grupo 3 suprimió la actividad, ya sea sola o en combinación con otras modificaciones del grupo. En función de su actividad, la variante HBV 11-12L.1090 que comprende Enlazador1923 y las modificaciones del Grupo 1+2 se seleccionaron para una evaluación adicional.

Ejemplo 2

Generación de indeles en la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 por meganucleasas HBV 11-12 que tienen secuencias enlazadoras optimizadas en células HepG2-sAg después de la electroporación con ARNm de HBV 11-12

1. Métodos

Las meganucleasas HBV11-12 son dímeros enlazados. El Enlazador1923 (SEQ ID NO: 15) se diseñó para mejorar las meganucleasas HBV descritas anteriormente, que contenían el enlazador anterior (Enlazador1) (SEQ ID NO: 16). Además, los aminoácidos dentro de la estructura de la nucleasa se modificaron para interactuar electrostáticamente con el nuevo enlazador. La subunidad N-terminal se modificó para incluir A en la posición 96, A en la posición 99 y D en la posición 100. La subunidad C-terminal se modificó para incluir Y en una posición correspondiente a la posición 57 de SEQ ID NO: 1 (es decir, la posición 237 de la SEQ ID NO: 5 o 6), y T en una posición correspondiente a la posición 61 de SEQ ID NO: 1 (es decir, la posición 241 de la SEQ ID NO: 5 o 6). Las meganucleasas diseñadas que incluyen estas modificaciones se indican con "(1/2)" (es decir, que tienen modificaciones en la primera y segunda subunidades). El vector de ARNp original utilizado como molde para la transcripción *in vitro* de ARNm (pRNA6) contenía una UTR HBA2 5', una UTR WPRE 3' y una única señal de localización nuclear 5' de SV40 (NLS; SEQ ID NO: 17).

El vector pRNA6 se modificó para usar regiones no traducidas (UTR) optimizadas para la expresión hepática (UTR ALB 5', secuencia establecida en SEQ ID NO: 18; y una UTR 3' SNRPB, que tiene una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 19), una NLS de SV40 adicional (SEQ ID NO: 65) en el extremo 3' para facilitar la importación nuclear, y una secuencia de Kozak más fuerte (SEQ ID NO: 21). Estas modificaciones generaron el vector pRNA8. Junto con el vector pRNA8, el uso de codones de aminoácidos de meganucleasa se modificó para lograr el máximo empobrecimiento de uridina (MAX) para reducir las respuestas inmunes y aumentar la expresión. Las meganucleasas evaluadas en este estudio son HBV11-12L.1090 pRNA8 MAX Enlazador1923(1/2) (SEQ ID NO: 5) y una meganucleasa generada previamente, HBV11-12L.1090 pRNA6 Enlazador1 (SEQ ID NO: 13) descrita en la Publicación de solicitud de patente Internacional Núm. WO 2021/113765. Este estudio se realizó para evaluar la eficacia de las modificaciones descritas dentro de las meganucleasas HBV11-12 para causar inserciones y/o deleciones (indeles) en su secuencia de reconocimiento prevista (es decir, la secuencia de reconocimiento HBV11-12). La formación de indel se detectó en estos experimentos mediante análisis de PCR digital.

Para evaluar la eficiencia de edición de las meganucleasas HBV11-12 mencionadas anteriormente para escindir una secuencia de hepatitis B integrada, utilizamos una línea celular HepG2 diseñada (HepG2-sAg) que contiene una única integración de una secuencia de HBV parcial. 1e6 células HepG2-sAg se electroporaron usando el sistema Lonza Amaxa 4D con 100 ng, 10 ng o 1 ng de ARNm que codifica las meganucleasas HBV11-12L.1090 pRNA6 Enlazador1 y HBV11-12L.1090 pRNA8 MAX Enlazador1923(1/2). Se incluyeron 100 ng de ARNm de mCherry como un control de transfección. Las células se recolectaron a los tres y seis días posteriores a la transfección para la extracción de ADN genómico y se evaluó la eficiencia de transfección utilizando un citómetro de flujo Beckman Coulter CytoFlex S. La eficiencia de transfección superó el 90%. El ADN genómico se preparó utilizando el kit Macherey Nagel NucleoSpin Blood QuickPure.

Se utilizó PCR digital de gotas para determinar la frecuencia de indeles blanco en el sitio de unión HBV 11-12 usando los cebadores F1 y R1 y la sonda P1 para generar un amplicón que rodea el sitio de unión, así como los cebadores F2 y R2 y la sonda P2 para generar un amplicón de referencia. Las amplificaciones se multiplexaron en una reacción de 20 µL que contenía ddPCR Supermix 1x para sondas (sin dUTP, BioRad), 250 nM de cada sonda, 900 nM de cada cebador, 5 U de HindIII-HF y ~50 ng de ADN celular. Las gotas se generaron utilizando un generador de gotas QX100 (BioRad). Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: 1 ciclo de 95 °C (rampa de 2 °C/s) durante 10 minutos, 45 ciclos de 94 °C (rampa de 2 °C/s) durante 10 segundos, 59.2 °C (rampa de 2 °C/s) durante 30 segundos, 72 °C (rampa de 2 °C/s) durante 1.5 minutos, 1 ciclo de 98 °C durante 10 minutos, 4 °C de mantenimiento. Las gotas se analizaron utilizando un lector de gotas QX200 (BioRad) y el *software* de análisis QuantaSoft (BioRad) se utilizó para adquirir y analizar los datos. Las frecuencias de indel se calcularon dividiendo el número de gotas positivas para la sonda del sitio de unión por el número de gotas positivas para la sonda de referencia. Las secuencias de los cebadores y las sondas utilizadas en este estudio se proporcionan en la Tabla a continuación.

Tabla 4. Secuencias de cebadores y sondas del Ejemplo 2

Identificador de cebador	SEQ ID NO:
P1: [5'- TGCCGATCCATACTGCGGAACT-3']	22
F1: [5'- GGTCTGTGCCAAGTGTTTG -3']	23
R1: [5'- GCTGCGAGCAAAACAAG -3']	24
P2: [5'- CCCGCCTGTAACACG-3']	25
F2: [5'- CATCAGGATTCCTAGGACC-3']	26
R2: [5'- AGTCCACCACGAGTCTA-3']	27

2. Resultados

HBV11-12L.1090 pRNA6 Enlazador1 y HBV11-12L.1090 pRNA8 MAX Enlazador1923 (1/2) se evaluaron para determinar la actividad en el blanco en células HepG2-sAg. En combinación, Enlazador1923 (1/2) y el vector pRNA8 con uso de codón MAX mejora enormemente la eficacia en células HepG2-sAg a los 2 días después de la transfección (Figura 5A). Para el día 6, HBV 11-12L.1090

pRNA8 MAX Enlazador1923 (1/2) logró la saturación a la dosis de 10 ng con 78 % de edición en el blanco en comparación con 33% de edición con el constructo anterior (Figura 5B). HBV11-12L.1090 MAX Enlazador1923 (1/2) muestra una edición equivalente o aumentada en el blanco en todas las dosis en ambos puntos de tiempo.

3. Conclusiones

Estos datos demuestran que Enlazador1923 y las modificaciones asociadas en la estructura principal de meganucleasa, en combinación con el vector pRNA8 y el empobrecimiento máximo de uridina, dan lugar a mayores tasas de edición de la secuencia de hepatitis B integrada en comparación con la meganucleasa diseñada HBV11-12L.1090 Enlazador1 descrita anteriormente usando pRNA6.

Ejemplo 3

Generación de indeles en la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 por meganucleasas HBV 11-12 que tienen secuencias enlazadoras optimizadas en células HepG2-sAg después de la electroporación con ARNm de HBV 11-12

1. Métodos

Se realizaron estudios para evaluar la eficacia de las modificaciones estructurales a la meganucleasa diseñada HBV 11-12L.1090 descrita en los Ejemplos 1 y 2 para generar indeles en su secuencia de reconocimiento prevista (es decir, la secuencia de reconocimiento HBV 11-12). Este estudio incluye las mismas meganucleasas que el Ejemplo 2, HBV11-12L.1090 pRNA6 Enlazador1 y HBV11-12L.1090 pRNA8 MAX Enlazador1923 (1/2) con la adición de una meganucleasa usando el vector pRNA8 con uso de codón MAX con Enlazador1, HBV11-12L.1090 pRNA8 MAX Enlazador1 para evaluar específicamente la eficiencia de edición de Enlazador1923 (y las modificaciones de subunidad acompañantes) en comparación con Enlazador 1.

Para evaluar la eficiencia de edición de una meganucleasa HBV11-12 a una secuencia de hepatitis B integrada, se electroporaron 1e6 células HepG2-sAg usando el sistema Lonza Amaxa 4D con 100 ng o 10 ng de ARNm que codifica la meganucleasa diseñada HBV11-12 L.1090 pRNA6 Enlazador1, HBV11-12 L.1090 MAX Enlazador1 o HBV11-12 L.1090 MAX Enlazador1923 (1/2) o un control de mCherry. Las células se recolectaron a los dos y seis días posteriores a la transfección para la extracción de ADN genómico y se evaluó la eficiencia de transfección utilizando un citómetro de flujo Beckman Coulter CytoFlex S. La eficiencia de transfección superó el 90%. El ADN genómico se preparó utilizando el kit MagMax DNA Multi-Sample Ultra 2.0 con KingFisher Apex. La PCR digital de gotas se realizó de acuerdo con el Ejemplo 2.

2. Resultados

Las meganucleasas HBV11-12L.1090 pRNA6 Enlazador1, HBV11-12L.1090 pRNA8 MAX Enlazador1, HBV11-12L.1090 pRNA8 MAX Enlazador1923(1/2) se evaluaron para determinar la actividad en el blanco en células HepG2-sAg. El vector pRNA8 con uso de codón MAX en combinación con Enlazador1 o Enlazador1923 mejoró la eficacia en células HepG2-sAg. Para el día 6 a la dosis de 10 ng, HBV 11-12L.1090 MAX Enlazador1923 (1/2) (denotado como "HBV 11-12L.1090

MAX2.0/Enlazador (1/2)") logró 88 % de edición en el blanco en comparación con 51 % de edición logrado por HBV11-12L.1090 pRNA6 Enlazador1 (denotado como "HBV 11-12L.1090 MAX1.0 Enlazador1") y 69 % de edición por HBV 11-12L.1090 MAX que comprendía Enlazador1 y sin modificaciones de subunidades (denotado como "HBV 11-12L.1090 MAX 2.0 Enlazador1") (Figura 6).

3. Conclusiones

Estos datos demuestran que las modificaciones del vector pRNA8 con el uso de codón MAX junto con Enlazador1923 aumentan las tasas de edición de una secuencia de hepatitis B integrada por la meganucleasa HBV11-12L.1090 en comparación con la meganucleasa diseñada descrita anteriormente, HBV11-12L.1090 pRNA6 Enlazador1, y que Enlazador1923 y los cambios asociados a la estructura principal de meganucleasa aumentan aún más la edición.

Ejemplo 4

Generación de indeles en la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 e inhibición del antígeno de superficie de HBV por meganucleasas HBV 11-12 que tienen secuencias enlazadoras optimizadas y modificaciones estructurales adicionales en células HepG2-sAg

1. Métodos

Se realizó una sustitución de aminoácidos de glutamina (Q) a ácido glutámico (E) en la subunidad C-terminal en una posición correspondiente a la posición 80 de I-Cre para determinar si se podía mejorar la especificidad de la meganucleasa HBV11-12L.1090. Posteriormente, se hará referencia a las variantes generadas a partir de esta sustitución como que tienen un "QQ" para indicar la presencia de una Q en cada subunidad en una posición correspondiente a la posición 80 de I-Cre1, o que tienen un "QE" para indicar la modificación en la subunidad C-terminal a una E en una posición correspondiente a la posición 80 de I-Cre1 (es decir, en la posición 260 de SEQ ID NO: 5 o 6). Este estudio investigó cómo esta sustitución puede afectar la formación de indel y la inhibición del antígeno de superficie de HBV (HBsAg) de la meganucleasa HBV11-12L.1090 que comprende Enlazador1 o Enlazador1923 y las modificaciones (1/2). Por lo tanto, las variantes evaluadas en este estudio se denominan HBV11-12L.1090QQ Enlazador1 (SEQ ID NO: 13), HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2) (SEQ ID NO: 5), HBV11-12L.1090QE Enlazador1 (SEQ ID NO: 14), y HBV11-12L.1090QE Enlazador1923(1/2) (SEQ ID NO: 6). Todas las meganucleasas en este estudio utilizaron el vector pRNA8 con uso de codón MAX. HBsAg es uno de los principales componentes virales de la envoltura para HBV infeccioso que se puede derivar de ADNccc o integraciones de ADN de HBV en el genoma. La reducción sostenida de HBsAg es un criterio de valoración clínico importante para el tratamiento de la enfermedad por HBV. Las células HepG2-sAg diseñadas tienen una única integración de un genoma parcial de HBV que contiene el ORF de HBsAg, que da como resultado la expresión y secreción de HBsAg.

Las células HepG2-sAg se electroporaron de acuerdo con el Ejemplo 2 con 100 ng, 10 ng o 1 ng de ARNm que codifica las cuatro variantes de meganucleasa, HBV11-12L.1090QQ Enlazador1, HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2), HBV11-12L.1090QE Enlazador1 y HBV11-12L.1090QE

Enlazador1923(1/2) o un control de mCherry. Las células y el sobrenadante se recolectaron el día 2, 6 y 9 después de la electroporación. La eficiencia de transfección se evaluó al 98 %. El ADN genómico se aisló de las células utilizando el kit MagMax DNA Multi-Sample Ultra 2.0 con KingFisher Apex. Este experimento se realizó por duplicado para aumentar la fuerza en el estudio.

Para evaluar el porcentaje de formación de indel, se realizó una PCR digital de gotas en un enfoque similar al Ejemplo 2 con variaciones en los cebadores, sondas y condiciones de ciclo utilizadas. Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: 1 ciclo de 95 °C (rampa de 0.2 °C/s) durante 10 minutos, 45 ciclos de 94 °C (rampa de 0.2 °C/s) durante 10 segundos, 61.1 °C (rampa de 0.2 °C/s) durante 30 segundos, 72 °C (rampa de 0.2 °C/s) durante 2 minutos, 1 ciclo de 98 °C durante 10 minutos, 4 °C de mantenimiento. Las secuencias de los cebadores y las sondas utilizadas en este estudio se proporcionan en la Tabla a continuación.

Tabla 5. Secuencias de cebadores y sondas para el Ejemplo 4

Identificador de cebador	SEQ ID NO:
P1: [5'-TGCCGATCCATACTGCGGAACT-3']	22
F1: [5'- GGTCTGTGCCAAGTGTTTG -3']	23
R1: [5'- GTATATTTCCGCGAGAGGAC -3']	28
P2: [5'- CTTGGCCCCCAATACCACATCATC-3']	29
F2: [5'- GGATGGAAATTGCACCTGTATTC -3']	30
R2: [5'- GGGTTTAAATGTATACCCAGAGAC -3']	31

Para evaluar la reducción de HBsAg secretado en los sobrenadantes celulares, se utilizó un inmunoensayo de quimioluminiscencia específico de HBsAg (CLIA) de AutoBio de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La luminiscencia se leyó utilizando un lector de microplacas SpectraMax i3x. La cantidad de HBsAg (UI/mL) se calculó con base en una curva de calibración en tiempo real.

2. Resultados

Las variantes QQ y QE se evaluaron para determinar la formación de indel y la reducción de HBsAg con Enlazador1 o Enlazador1923 y las modificaciones de subunidad (1/2) en tres dosis diferentes que se muestran en la Figura 7A a Figura 7F. Los indeles promedio en el día 9 después de la transfección aumentaron de 46 % con Enlazador1 a 65 % con Enlazador1923 (1/2) a la dosis de 1 ng con la variante QQ (Figura 7A). Usando las mismas condiciones, se observó un aumento del 8 % al 16.5 % de indeles promedio para la variante QE (Figura 7A). Se observó una tendencia similar con las dosis más altas de 10 ng y 100 ng como se muestra en la Figura 7C y Figura 7E. De acuerdo con los resultados de indel, las meganucleasas con el enlazador 1923 (1/2) demostraron niveles más altos de inhibición de HBsAg en las variantes QQ y QE como se muestra en la Figura 7B a la dosis de 1 ng. La reducción máxima de HBsAg del 90 % se logró el día 9 después de la transfección utilizando 10 ng de ARNm para variantes QQ y QE utilizando Enlazador1923 (1/2) (Figura 7D). A una dosis de saturación, todas las meganucleasas se desempeñaron de manera similar en la reducción de HBsAg como se muestra en la

Figura 7F.

3. Conclusiones

El uso de Enlazador1923 con las modificaciones de subunidad (1/2) mejoró la edición y la inhibición de HBsAg en todas las dosis y puntos de tiempo para ambas variantes. La variante QE es menos potente que la variante QQ en la creación de indeles a dosis medias-bajas; sin embargo, a dosis altas se logra una potencia comparable, especialmente en variantes que contienen Enlazador1923(1/2). La inhibición de HBsAg es equivalente en ambas variantes con Enlazador1923 (1/2) en dosis medias-altas.

Ejemplo 5

Generación de indeles en la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 e inhibición de sAg de HBV por meganucleasas HBV 11-12 en células HepG2-sAg

1. Métodos

La EC_{50} y la EC_{90} son medidas utilizadas para cuantificar el 50 % de la concentración eficaz máxima y el 90 % de la concentración eficaz máxima de un fármaco particular o, como se describe en la presente, una meganucleasa. El propósito de este estudio fue determinar EC_{50} y EC_{90} de las meganucleasas HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) y HBV11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2). Ambas meganucleasas evaluadas en este estudio utilizan pRNA8 y el uso de codones MAX. Las células HepG2-sAg se electroporaron de acuerdo con el Ejemplo 2 con una curva de dosis-respuesta de 20 puntos o 16 puntos con diluciones en serie 1:2 de ARNm que codifica HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) o HBV11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2), respectivamente. Las células y el sobrenadante se recolectaron el día 2 después de la transfección. La eficiencia de transfección se evaluó al 97 %. El ADN genómico se aisló utilizando el kit Macherey Nagel NucleoSpin Blood QuickPure. El porcentaje de formación de indel se evaluó de acuerdo con el protocolo de PCR digital en gotas utilizado en el Ejemplo 4. Los niveles de HBsAg se cuantificaron de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 4. Las muestras de HBsAg analizadas con CLIA se procesaron por duplicado en la misma placa. Las concentraciones EC_{50} y EC_{90} se calcularon a partir de estas curvas de dosis-respuesta utilizando el modelo Find ECAnything de GraphPad Prism con F restringido a 50 y 90, respectivamente.

2. Resultados

Las variantes QQ y QE con Enlazador1923 con las modificaciones de subunidad (1/2) se evaluaron para la edición en el blanco en el sitio de reconocimiento HBV 11-12 y la reducción de HBsAg resultante en el medio celular. El porcentaje de formación de indel aumentó de una manera dependiente de la dosis para ambas variantes. Ambas variantes lograron un porcentaje máximo de formación de indel del 70 %, sin embargo, la variante QE requirió una dosis más alta de ARNm para lograr los mismos resultados (100-200 ng en comparación con 10 ng) (Figura 8A). Para el porcentaje de formación de indel, se calculó que la variante QQ tenía una EC_{50} de 0.26 ng y EC_{90} de 4.93 ng de ARNm y se calculó que la variante QE tenía una EC_{50} de 2.3 ng y EC_{90} de 23.93 ng de ARNm. Los niveles de HBsAg disminuyeron de manera dependiente de la dosis a dosis bajas de ARNm y posteriormente alcanzaron

una meseta a 10 ng de ARNm para ambas variantes probadas (Figura 8B). Para el porcentaje de inhibición de HBsAg, se calculó que la variante QQ tenía una EC_{50} de 0.49 ng y una EC_{90} de 7.723 ng de ARNm y se calculó que la variante QE tenía una EC_{50} de 1.17 ng y una EC_{90} de 7.89 ng de ARNm.

3. Conclusiones

La reducción máxima equivalente de HBsAg se logra con las variantes QQ y QE utilizando Enlazador1923 con las modificaciones de subunidad (1/2) a la misma dosis. Ambas variantes alcanzan un pico comparable en la edición en el blanco en células HepG2-sAg a altas dosis de ARNm. La variante QE es menos potente que la variante QQ; con la EC_{50} y EC_{90} de formación de indel para la variante QE que es aproximadamente 10 veces y 5 veces más alta, respectivamente, que la variante QQ.

Ejemplo 6

Análisis de efectos fuera del blanco de meganucleasas HBV 11-12 en células Hep3B.

1. Métodos

En estos estudios, se utilizó un ensayo de captura de oligo para identificar el corte fuera del blanco inducido por las meganucleasas HBV11-12L.1090QQ MAX Enlazador1923 (1/2) y HBV11-12L.1090QE MAX Enlazador1923 (1/2). El corte fuera del blanco se evaluó en células Hep3B, una línea celular de HCC con múltiples integraciones de hepatitis B.

De manera similar a GUIDE-seq, el ensayo de oligo-captura identifica posibles sitios fuera del blanco producidos por las meganucleasas HBV 11-12 mediante la captura de un oligonucleótido en sitios de ruptura dentro del ADN genómico de la célula. GUIDE-seq se desarrolló para las rupturas de ADN generadas por CRISPR-Cas9 y hay algunas modificaciones clave en la química y el análisis con el fin de aplicar esta técnica a las nucleasas de la presente. A diferencia de CRISPR-Cas9, las meganucleasas diseñadas divulgadas en la presente, generan una saliente 3' de cuatro pares de bases. Para adaptarse a esta diferencia, los oligonucleótidos utilizados en la oligo-captura tienen salientes aleatorias de cuatro pares de bases que podrían ser compatibles con las salientes generadas con la meganucleasa HBV 11-12. Se observa una mayor frecuencia de inserción debido a la mayor eficiencia de ligar extremos cohesivos en comparación con extremos romos. Las células se transfectaron con 2000 ng de ARNm que codifica la nucleasa y 250 ng de los oligonucleótidos de ADN bicatenario. Después de dos días, el ADN genómico de estas células se aisló y sonizó para fragmentar el ADN a tamaños más pequeños. Se ligó un adaptador de oligonucleótido al ADN fragmentado y se utilizó PCR para amplificar cualquier fragmento de ADN que contenga un adaptador en un extremo y el oligonucleótido capturado en el otro extremo. El ADN amplificado se purificó y las bibliotecas de secuenciación se prepararon usando kits comerciales estándar.

Las bibliotecas de secuenciación se analizaron en una Illumina MiSeq usando kits V2 2x150. Los datos se filtraron y analizaron para detectar sitios válidos donde ocurrió la captura de un oligonucleótido y se predice un sitio potencial fuera del blanco. Una vez más, el protocolo necesitaba adaptarse de la búsqueda PAM utilizada para CRISPR-cas9 a la búsqueda para la meganucleasa HBV 11-12. El *software* desarrollado comprueba cada secuencia para asegurarse de que haya un adaptador

y oligo capturado flanqueando la secuencia para verificar que sea una lectura válida. El *software* también comprueba si hay duplicados de PCR y elimina lecturas idénticas para ayudar a reducir el sesgo de PCR. Las lecturas de secuencia se alinean con un genoma de referencia y las secuencias agrupadas dentro de ventanas de mil pares de bases se escanean en busca de un sitio potencial de meganucleasa HBV 11-12.

Cada meganucleasa HBV 11-12 es un dímero enlazado. Cada monómero reconoce un medio sitio de nueve pares de bases con un espaciador de cuatro pares de bases en el centro entre los dos medios sitios. El *software* busca la coincidencia de secuencia más cercana para cada medio sitio sin brechas permitidas. Las cuatro pares de bases centrales no se consideran en la selección del efecto fuera del blanco porque las meganucleasas HBV 11-12 generalmente pueden tolerar una mayor cantidad de degeneración en estas posiciones en el sitio blanco. El *software* genera una lista de posibles sitios fuera del blanco con el número de desajustes de bases en los medios sitios combinados, pero sin contar los desajustes de cuatro pares de bases en el medio. El *software* no elimina ningún efecto fuera del blanco basado en un filtro de desajuste arbitrario, a diferencia de CRISPR-Cas9 que elimina cualquier efecto fuera del blanco identificado con más de seis desajustes de pares de bases. En cambio, el ruido de fondo generado a partir de la captura aleatoria del oligo en puntos frágiles o puntos calientes dentro del genoma se puede reducir de dos maneras. En primer lugar, una muestra simulada no tratada también se analiza mediante captura de oligo y las ventanas correspondientes a sitios de integración sin la nucleasa presente se pueden restar de las muestras que contienen nucleasa. Ejecutar el ensayo por triplicado y eliminar cualquier sitio que no se repita en al menos dos de las tres repeticiones es una manera de eliminar empíricamente el ruido de integración aleatoria.

Aunque el recuento de lecturas no se correlaciona directamente con la frecuencia de escisión en un sitio en particular, generalmente puede resaltar efectos fuera del blanco que son potencialmente más preocupantes o más válidos porque ocurren con más frecuencia. En la Figura 9 se muestra una manera de visualizar gráficamente los datos de oligo-captura como una medida de la cantidad de sitios potencialmente válidos fuera del blanco. Cada fuera de blanco generado por una nucleasa particular se grafica en función del número de lecturas de secuencia únicas alineadas en ese lugar. El número de desajustes de pares de bases entre el supuesto sitio fuera del blanco y el sitio previsto se indica mediante una escala de colores, donde los colores más oscuros indican sitios que son más similares al sitio blanco previsto (encerrados en un círculo punteado). Para una meganucleasa con alta especificidad, el sitio previsto debe tener el recuento de lecturas más alto. Las mejores meganucleasas eliminan tanto los sitios con mayor recuento (a la derecha del gráfico) como los sitios con alta similitud (puntos de color más oscuro).

2. Resultados

En la Figura 9, se compararon HBV11-12L.1090QQ MAX Enlazador1923 (1/2) y HBV11-12L.1090QE MAX Enlazador1923 (1/2) en la línea celular Hep3B por triplicado. En tanto que el número de lecturas alineadas en el sitio deseado no se puede comparar entre muestras como una medida de

la actividad total en el sitio deseado, se puede comparar la distancia entre los puntos que indican el sitio deseado (puntos en círculo) y los puntos que indican sitios fuera del blanco. La distancia mucho mayor entre el sitio deseado y los sitios fuera del blanco para HBV11-12L.1090QE MAX Enlazador1923 (1/2) en comparación con HBV11-12L.1090QQ MAX Enlazador1923 (1/2) indica un gran aumento en la especificidad de la enzima y una gran disminución en la escisión de sitios fuera del blanco, tanto en el número de sitios como en el porcentaje de escisión. En todos los casos, el sitio blanco previsto fue el que se recuperó con mayor frecuencia. HBV11-12L.1090QE MAX Enlazador1923 (1/2) exhibió un posible sitio fuera del blanco por encima del fondo en comparación con dos sitios con HBV11-12L.1090QQ MAX Enlazador1923 (1/2).

3. Conclusiones

Aunque la meganucleasa HBV11-12L.1090QE MAX Enlazador1923 (1/2) exhibió una EC_{50} y EC_{90} más altas de formación de indel (como se describe en el Ejemplo 5) que HBV11-12L.1090QQ MAX Enlazador1923 (1/2), estos estudios demuestran que la sustitución de Q a E en la posición 260 de la subunidad C-terminal (correspondiente a la posición 80 de I-Crel) confirió una mayor especificidad para el sitio de reconocimiento HBV11-12 en comparación con HBV11-12L.1090QQ MAX Enlazador1923(1/2). Por lo tanto, el equilibrio entre la actividad en el blanco y la especificidad observado con la meganucleasa HBV11-12L.1090QE MAX Enlazador1923 (1/2) lo hace adecuado para una evaluación adicional.

Ejemplo 7

HBV 11-12 Datos de especificidad de meganucleasa diseñada

1. Métodos

Para evaluar más a fondo la edición fuera del blanco, se administró ARNm que codifica la meganucleasa HBV11-12L.1090QQ Enlazador1, HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) o HBV11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2) a células HepG2-sAg mediante electroporación y a hepatocitos humanos primarios crioconservados sin tratamiento previo (PHH) mediante transfección con Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher). Las dosis de ARNm probadas para los efectos fuera del blanco en células HepG2-sAg fueron una curva de dosis limitada de 100 ng, 10 ng y 1 ng, así como la EC_{50} y EC_{90} para las variantes con Enlazador1923 con las modificaciones de la subunidad (1/2). Las dosis de ARNm probadas en PHH fueron 500 ng, 50 ng y 5 ng. Las células HepG2-sAg se recolectaron a los dos días y seis días posteriores a la transfección y los PHH se recolectaron seis días posteriores a la transfección. La eficiencia de transfección se evaluó en células HepG2-sAg usando un citómetro Beckman Coulter CytoFlex S. La eficiencia de transfección superó el 90%. El ADN genómico de ambos tipos de células se preparó utilizando el kit Macherey Nagel NucleoSpin Blood QuickPure.

Se realizó un panel múltiplex de secuenciación de amplicones dirigidos (MTA) en células HepG2-sAg recolectadas y células PHH para evaluar y confirmar si se produjo edición fuera del blanco en sitios genómicos identificados en un ensayo de captura de oligo realizado por triplicado en las células HepG2-sAg electroporadas con ARNm (como se describe en el Ejemplo 6) y en sitios genómicos

identificados a través de una búsqueda *in silico* que identificó 4 o menos desajustes de pares de bases. La secuenciación MTA permite una cuantificación altamente sensible de la actividad de edición fuera del blanco en relación con las células transfectadas simuladas. El ensayo MTA amplifica múltiples

5 secuencias blanco en una sola reacción utilizando los paneles personalizados de amplicones rhAmpSeq de Integrated DNA Technologies (IDT).

2. Resultados

La variante QQ con Enlazador1, la variante QQ con Enlazador1923 con las modificaciones de subunidad (1/2) (es decir, QQEnlazador1923 (1/2)) y la variante QE Enlazador1923 (1/2) se evaluaron

10 cada una en células HepG2-sAg y PHH sin tratamiento previo para la edición fuera del blanco utilizando el panel MTA descrito anteriormente. Todas las variantes lograron alrededor del 60 % de edición en el blanco en células HepG2-sAg con una dosis de 100 ng de ARNm (Figura 10A-10C). La variante QE mostrada en la Figura 10C mostró una gran disminución en los sitios fuera del blanco en comparación con la variante QQ Enlazador1 mostrada en la Figura 10A y QQ Enlazador1923(1/2) en la Figura 10B.

15 No aparecieron sitios fuera del blanco por encima del límite de detección (0.2 %) en células HepG2-sAg tratadas con QE Enlazador1923(1/2) (Figura 10C), mientras que las variantes QQ mostraron hasta 10 veces más edición fuera del blanco (0.2-2 %) (Figura 10A y 10B). Con una dosis de 100 ng de ARNm, el principal sitio fuera del blanco en todas las nucleasas (Chr. 17; Pos. 17242769) no mostró edición en la variante QEEnlazador1923 (1/2) y mostró 0.5 % y 2 % de edición en las variantes QQ Enlazador1 y

20 QQEnlazador1923 (1/2), respectivamente (Figura 10D).

Dentro de la curva de dosis limitada, no se observó ninguna edición en el sitio fuera del blanco principal (Chr. 17; Pos. 17242769) con la variante QE en comparación con el 2 % de edición a la dosis de 100 ng con la variante QQ Enlazador1923 (1/2) (Figura 11A). No se observó ninguna edición por encima del límite de detección con la variante QE con las dosis EC_{50} y EC_{90} en comparación con 0.6 %

25 de edición con la dosis EC_{90} con la variante QQ Enlazador1923 (1/2) (Figura 11B). En PHH sin tratamiento previo a la dosis de 500 ng, la variante QQ Enlazador 1923(1/2) mostró 0.7 % de edición en el sitio fuera del blanco principal, en tanto que la variante QE mostró 0.2 % de edición (Figura 11C). En particular, estas células PHH sin tratamiento previo no tienen ninguna integración de HBV y, por lo tanto, no tienen un posible sitio en el blanco para que la nucleasa se dirija.

3. Conclusiones

Estos datos demuestran que la meganucleasa HBV11-12L.1090QEEnlazador1923 (1/2) es una meganucleasa más específica que la meganucleasa QQ Enlazador1 o la meganucleasa QQEnlazador1923 (1/2).

Ejemplo 8

Generación de indeles en la secuencia de reconocimiento HBV 11-12 e inhibición de sAg de

35 HBV por meganucleasas HBV 11-12 en células HepG2 y Huh-1

1. Métodos

Todos los estudios anteriores han utilizado la línea celular HepG2-sAg diseñada que se

transdujo con un lentivirus que contiene una secuencia de HBV parcial. En este estudio, se evaluó la actividad de edición y la reducción de HBsAg de las meganucleasas HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) y HBV11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2) en células Huh-1, que contienen múltiples integraciones naturales de HBV. Huh-1 es una línea celular de carcinoma hepatocelular humano (HCC) derivada de tejido hepático de un adulto infectado con HBV. Se determinó empíricamente que esta línea celular contiene entre 6 y 7 integraciones de HBV y requiere la adición de 1 μ M de dexametasona (Abcam) para secretar niveles medibles de HBsAg en medios de cultivo celular.

Las células HepG2-sAg y Huh-1 se electroporaron en tándem como se describe en el Ejemplo 1 con 100 ng, 10 ng o 1 ng de ARNm que codifica la meganucleasa QQ Enlazador1923 (1/2) o QE Enlazador1923 (1/2) o 100 ng de mCherry. Las células y el sobrenadante se recolectaron el día 3 y 6 después de la electroporación. La eficiencia de transfección se evaluó a >90 % para ambas líneas celulares. El ADN genómico se aisló de las células utilizando el kit MagMax DNA Multi-Sample Ultra 2.0 con KingFisher Apex. Para evaluar la reducción de HBsAg secretado en los sobrenadantes celulares, se realizó un ensayo CLIA para HBsAg, como se describe en el Ejemplo 4. Se utilizó PCR digital de gotas para calcular el porcentaje de formación de indel.

Las integraciones de HBV en la línea celular Huh-1 contienen mutaciones en los sitios de unión de los cebadores y sondas de los ensayos ddPCR descritos anteriormente para la detección de indel en células HepG2-sAg. Por lo tanto, se diseñaron y validaron nuevos cebadores y sondas para la detección de indel en esta línea celular. No es necesario un nuevo diseño de sonda para el amplicón del sitio blanco debido a la secuencia conservada entre las líneas celulares en esa región. Para evaluar el porcentaje de formación de indel, se realizó una PCR digital de gotas en un enfoque similar al Ejemplo 2 con variaciones en los cebadores, sondas y condiciones de ciclo utilizadas. Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: 1 ciclo de 95 °C (rampa de 2 °C/s) durante 10 minutos, 45 ciclos de 95 °C (rampa de 1 °C/s) durante 10 segundos, 55 °C (rampa de 1 °C/s) durante 30 segundos, 72 °C (rampa de 0.2 °C/s) durante 2 minutos, 1 ciclo de 98 °C durante 10 minutos, 4 °C de mantenimiento. Las condiciones de los ciclos permanecen iguales entre los dos ensayos de tipo celular. Las secuencias para los cebadores y sondas utilizadas para el ensayo específico de células Huh-1 en este estudio se proporcionan en la Tabla a continuación.

Tabla 6. Secuencias de cebadores y sondas para el Ejemplo 8

Identificador de cebador	SEQ ID NO:
P1: [5'- CGATCCATACTGCGGAA -3']	32
F1: [5'- AGGTCTCTGCCAAGTGTTCGCTG -3']	33
R1: [5'- ACGGGACGTAGACAAAGGACGTC -3']	34
P2: [5'- TTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCC -3']	35
F2: [5'- CTCAGTTTACTAGTGCCATTTG -3']	36
R2: [5'- TTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCC -3']	37

2. Resultados

HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2) y HBV11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2) se evaluaron para determinar la eficiencia de edición e inactivación de HBsAg en células HepG2-sAg y Huh-1. A los 6 días después de la transfección, la meganucleasa QQ Enlazador1923 (1/2) (Figura 12A) y la meganucleasa QE Enlazador1923 (1/2) (Figura 13A) alcanzaron una mayor formación máxima de indel en células Huh-1 (99 % y 98 %, respectivamente) que la meganucleasa QQ Enlazador1923 (1/2) (Figura 12B) y la meganucleasa QE Enlazador1923 (1/2) (Figura 13B) en células HepG2-sAg (95 % y 89 %, respectivamente). Además, QQ Enlazador1923 (1/2) y QE Enlazador1923 (1/2) lograron niveles más altos de edición con dosis más bajas de ARNm (1 ng) en células Huh-1 (93% y 84 %, respectivamente) que las células HepG2-sAg (66 % y 33%, respectivamente). Los altos niveles de edición en células Huh-1 se correlacionan con una mayor reducción de HBsAg para las meganucleasas QQ Enlazador1923 (1/2) y QEEnlazador1923 (1/2). A los 6 días después de la transfección con 1 ng de ARNm, la meganucleasa QQ Enlazador1923 (1/2) (Figura 14A) y la meganucleasa QE Enlazador1923 (1/2) (Figura 15A) alcanzaron niveles más bajos de HBsAg en células Huh-1 (2 y 1 UI/mL) que la meganucleasa QQ Enlazador1923 (1/2) (Figura 14B) y la meganucleasa QE Enlazador1923 (1/2) (Figura 15B) en células HepG2-sAg (11 y 18 UI/mL).

3. Conclusiones

Estos datos demuestran que las meganucleasas QQ Enlazador1923(1/2) y QE Enlazador1923 (1/2) generan con éxito ediciones dentro de las células que contienen múltiples integraciones naturales de HBV.

Ejemplo 9

Cuantificación de HBsAg, HBeAg, ADN de HBV, ARN de HBV, ADNccc y viabilidad celular de células PHH infectadas con HBV transfectadas con meganucleasas HBV 11-12

1. Métodos

En este estudio, los criterios de valoración antivirales se determinaron en un intervalo de dosis para caracterizar la eficacia de HBV11-12L.1090QQEnlazador1923 (1/2) en células PHH infectadas con HBV. Se infectaron células PHH criopreservadas con HBV serotipo B (800 equivalentes de genoma/célula). 6e5 células se transfectaron el día 3 y 6 después de la infección por HBV con 0.1 o 1.0 µg de HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923(1/2) (MAX) usando el kit de transfección TransIT®-mRNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se probó un ARNip dirigido contra HBV a una dosis única como control positivo. El sobrenadante y las células se recolectaron para el análisis 6, 9, 12 y 15 días después de la infección. Se analizaron los niveles de ADN extracelular de HBV, ARNpg extracelular de HBV, HBsAg y HBeAg. La detección de ADNccc se midió mediante transferencia tipo *Southern* utilizando ADN aislado mediante el método de Hirt.

La viabilidad celular se evaluó mediante el kit de conteo celular Cell Counting Kit-8 (Biolite) de acuerdo con las instrucciones del fabricante después de la recolección de los sobrenadantes del cultivo celular. La absorbancia se midió usando un Spectra Max-M2 (SoftMax Pro 7.0.3). La viabilidad celular se calculó con la fórmula a continuación:

Porcentaje de viabilidad = (datos sin procesar de la muestra – PROM. de blanco) / (PROM. de control medio - PROM. de blanco) × 100.

El ADN extracelular de HBV se determinó mediante qPCR. En resumen, el ADN extracelular de HBV se aisló a partir de 100 µL de sobrenadante de cultivo celular usando el kit QIAamp® 96 DNA Blood (Qiagen-51162). El ADN se cuantificó mediante qPCR utilizando un conjunto cebador/sonda específico para HBV dirigido a la región de secuencia de HBsAg. Se utilizó una curva estándar de 10^7 – 10 copias de ADN plasmídico pAAV2-HBV1.3. La qPCR se realizó con una reacción de 10 µL que contenía Probes Master 1x (Roche-04914058001), 200 nM de sonda, 400 nM de un cebador directo e inverso, 2 µL de amortiguador AE (Tris-Cl 10 mM, EDTA 0.5 mM; pH 9.0) y 2 µL de estándar de muestra o plásmido. Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: 1 ciclo de 95 °C durante 10 minutos, 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. La qPCR se realizó utilizando un sistema de PCR 7900 Real-time PCR (versión de *software* SDS Automation Controller 2.4) o un sistema QuantStudio 6 Flex (versión de *software* QuantStudio Real-time PCR Software v1.3) El % de inhibición de ADN de HBV se calculó con la fórmula a continuación:

$$\% \text{ de inhibición de ADN de HBV} = (1 - \text{valor de muestra} / \text{valor PROM. del control de medio}) \times 100$$

Las secuencias para los cebadores utilizados para qPCR de ADN de HBV se proporcionan en la Tabla a continuación.

Tabla 7. Secuencias de cebadores para el Ejemplo 9

Identificador de cebador	SEQ ID NO:
F1: [5' GTGTCTGCGGCGTTTTATCA 3']	38
R1: [5' GACAAACGGGCAACATACCTT 3']	39

El ARN extracelular de HBV se determinó mediante RT-PCR. En resumen, el ARN extracelular se aisló a partir de 130 µL de sobrenadante celular usando el kit PureLink™ Pro 96 Viral RNA/DNA (Cat: **12280096A**). Se realizó una transcripción inversa rápida de ARN a ADNc utilizando el kit FastQuant cDNA RT (Cat: KR116-02). El ADNc de HBV se cuantificó mediante qPCR con sonda y cebadores específicos para HBV. La qPCR de ARN de HBV se realizó con una reacción de 10 µL que contenía Universal PCR Master Mix 1x, 200 nM de sonda, 400 nM de un cebador directo e inverso y 2 µL de estándar de muestra o plásmido. El porcentaje de inhibición de ARN de HBV se calculó con la misma fórmula que el ADN de HBV.

Se cuantificó HBsAg como se describe en el Ejemplo 4 usando un lector de microplacas SpectraMax iD3. El HBeAg se cuantificó usando un ELISA específico para HBeAg de AutoBio de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midió la luminiscencia usando un lector de microplacas SpectraMax iD3. El porcentaje de inhibición de HBeAg o HBsAg se calculó con la fórmula a continuación: Porcentaje de inhibición de HBeAg o HBsAg = (1- valor de muestra /valor PROM. del control de medio) × 100.

Se utilizó transferencia tipo *Southern* para cuantificar el porcentaje de inhibición de ADNccc en

las células. Para generar ADN de Hirt, las células se lisaron con amortiguador de lisis y SDS al 10 %. Se añadió una disolución de NaCl 5 M y los lisados se sometieron a 3 rondas de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. El ADN de Hirt se eluyó en amortiguador AE. El ADN de Hirt se separó en un gel de agarosa al 1.2 % y se transfirió a una membrana de nylon con carga positiva. Para la detección de ADNccc de HBV, la membrana se sondó con una sonda de ADN de HBV marcada con DIG. La hibridación se llevó a cabo en 10 mL del amortiguador de hibridación con una prehibridación de 1 hora a 60 °C y una hibridación durante la noche a 60 °C, seguido de 2×5 minutos de lavados con SSC 2×, SDS al 0.1 % a temperatura ambiente y 3×20 minutos de lavados con SSC 0.2×, SDS al 0.1 % a 60 °C. La membrana se incubó con amortiguador de bloqueo durante 50 min, seguido de 60 min de incubación con la disolución de anticuerpo. Después de equilibrar con el amortiguador de detección durante 10 min, las membranas se enjuagaron con CDP-star. El análisis se realizó con ImageQuant LAS 4010 a temperatura ambiente.

2. Resultados

Se determinó la eficacia de HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) para reducir los parámetros virales de PHH infectados con HBV a lo largo del tiempo en dos dosis. Se observó una reducción de 1 log en HBsAg (Figura 16A), ADN de HBV (Figura 16B) y ARN de HBV en ambos niveles de dosis (Figura 16C). Se observó una reducción de 1 log en HBeAg (Figura 16D) a la dosis alta. Se observó una respuesta dependiente de la dosis en HBsAg y HBeAg en todos los puntos temporales. Se observó una respuesta dependiente de la dosis de ADN y ARN de HBV a los 15 días después de la infección. Se observó una reducción de al menos 50 % en ADNccc en todas las condiciones (Figura 16E). La viabilidad celular a la dosis de 1 µg disminuyó a 75 % a los 12 días después de la transfección y 88 % a los 15 días después de la transfección, lo que indica cierta toxicidad para PHH con transfección de ARNm a la dosis alta (Figura 16F). Sin embargo, los PHH transfectados a la dosis baja demostraron poca pérdida de viabilidad concomitante con una actividad general equivalente o mayor en la reducción de cada uno de los parámetros virales.

3. Conclusiones

Estos datos demuestran que la meganucleasa HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) puede reducir cada uno de los parámetros virales probados. Es importante destacar que los niveles de ADNccc se redujeron significativamente, lo que resultó en altos niveles de eficacia antiviral en el contexto de PHH infectados con HBV.

Ejemplo 10

Cuantificación de HBsAg, HBeAg, ADN de HBV, ARN de HBV, ADNccc y viabilidad celular de células PHH infectadas con HBV transfectadas con meganucleasas HBV 11-12

1. Métodos

En este estudio, los criterios de valoración antivirales se determinaron en un intervalo de dosis para comparar la eficacia de HBV11-12L.1090QQ Enlazador1923 (1/2) y HBV11-12L.1090QE Enlazador1923 (1/2) en células PHH infectadas con HBV. Se infectaron células PHH criopreservadas

con HBV serotipo D (800 equivalentes de genoma/célula). 6e5 células se transfectaron el día 3 y 6 después de la infección por HBV con un amplio rango de dosis (1 µg – 0.001 µg) de las meganucleasas QQ y QE Enlazador1923 (1/2) usando el kit de transfección TransIT®-mRNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se probó un ARNip dirigido a HBV a una dosis única como control positivo. El tratamiento actual para el HBV incluye el uso de análogos de nucleósidos como Lamivudina (LAM). Se probó LAM a 6 nM (EC₅₀) en combinación con las nucleasas anteriores a dosis de 1 µg y 0.1 µg para evaluar la seguridad y los posibles efectos aditivos. LAM comenzó el día 1 después de la infección por HBV y se detuvo el día 6. El sobrenadante se recolectó para el análisis a los 3, 6, 9, 12 y 15 días después de la infección. Las células se recolectaron a los 9 y 15 días después de la infección. Se analizaron ADN de HBV extracelular, ARNpg de HBV extracelular, HBsAg, HBeAg y ADNccc como se describe en el Ejemplo 9. Además, la edición en el blanco en ADNccc se midió con NGS en ADN celular tratado con exonucleasa. Para cuantificar los indeles en el blanco en las células PHH, el ADN total se extrajo y se trató con exonucleasa T5 (NEB) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se utilizó PCR para amplificar la región del sitio blanco de la nucleasa, y se utilizó NGS para cuantificar los indeles. Las secuencias para los cebadores utilizados para la edición en el blanco de ADNccc se proporcionan en la Tabla a continuación:

Tabla 8. Secuencias de cebadores y sondas para el Ejemplo 10

Identificador de cebador	SEQ ID NO:
F1: [5'- GCCAGGTCTGTGCCAAGTGTGTTG -3']	40
R1: [5'- CAGGATCCAGTTGGCAGCAC -3']	41

La inactivación total se calculó con la fórmula: Inactivación total = (% de ADNccc restante en comparación con control sin tratamiento cuantificado mediante transferencia tipo *Southern* x % de indeles en ADNccc mediante NGS) + (% de Disminución en ADNccc en comparación con control sin tratamiento).

2. Resultados

Las meganucleasas QQ y QE Enlazador1923(1/2) se evaluaron en PHH infectados con HBV para determinar la eficacia y seguridad en combinación con un análogo de nucleósido, LAM. Se observó una alta toxicidad mediante el ensayo de viabilidad celular CCK-8 en la dosis de 1 µg y, por lo tanto, dicha dosis se excluyó de todos los análisis de los parámetros virales posteriores (Figura 17A). A los 15 días después de la infección por HBV, se observó una reducción aproximada del 80 % en el ADN extracelular de HBV (Figura 17B), ARN extracelular de HBV (Figura 17C), HBsAg (Figura 17D) y HBeAg (Figura 17E) a 0.3 µg de ARNm para ambas nucleasas probadas. Ambas meganucleasas mostraron disminuciones dependientes de la dosis en ADNccc y lograron una reducción aproximada del 62 % en ADNccc a los 15 días después de la infección (Figura 17F). También hubo un aumento dependiente de la dosis en la edición de ADNccc que alcanzó ~30 % a la dosis alta para las nucleasas QQ y QE (Figura 18A). La combinación de la reducción de ADNccc y la inactivación de ADNccc mediante edición alcanzó

el 73% de inactivación para las nucleasas QQ y QE (Figura 18B). La adición de LAM no afectó la viabilidad celular (Figura 19). Las meganucleasas QQ y QE Enlazador1923(1/2) lograron reducciones sostenidas en todos los parámetros virales hasta 15 días después de la infección por HBV con o sin la adición de LAM (Figura 20A-Figura 20D).

3. Conclusiones

Estos datos sugieren que ciertos tratamientos con análogos de nucleósidos se pueden combinar eficazmente con las meganucleasas HBV11-12 divulgadas sin afectar la viabilidad celular. Además, tanto las meganucleasas QQ como QE Enlazador1923 (1/2) pueden reducir los niveles de ADNccc, editar el ADNccc restante y generar grandes reducciones en varios parámetros virales de la infección por HBV.

Información sobre el listado de secuencias

SEQ ID NO: 1

MNTKYNKEFLLYLAGFVDGSGSIIAQIKPNQSYKFKHQLSLAFQVTQKTQRRWFLDKLVDEIGVG YVRDRGS
VSDYILSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIWRLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 2

LAGLIDADG

SEQ ID NO: 3

TGCCGATCCATACTGCGGAAC

SEQ ID NO: 4

AGTTCCGCAGTATGGATCGGCA

SEQ ID NO: 5

MNTKYNKEFLLYLAGFVSDGSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVG YVYDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIQLNKESNNNASTQRPSRVNNFPYSGYNKEFLLYLAGFVDGSGSIFASIRPRQHAKFK
HDLELCFNVRQKTQRRWFLDYLVDTIGVG YVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 6

MNTKYNKEFLLYLAGFVSDGSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVG YVYDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIQLNKESNNNASTQRPSRVNNFPYSGYNKEFLLYLAGFVDGSGSIFASIRPRQHAKFK
HDLELCFNVRQKTQRRWFLDYLVDTIGVG YVIDWRGASTYKLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 7

KEFLLYLAGFVDGSGSIFASIRPRQHAKFKHDLELCFNVRQKTQRRWFLDYLVDTIGVG YVIDWRGASTYKL
SQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRA

VLD

SEQ ID NO: 8

KEFLLYLAGFVDGDSIFASIRPRQHAKFKHDLELCFNVRQKTQRRWFLDYLVDTIGVGYVIDWRGASTYKL
 5 SEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRA
 VLD

SEQ ID NO: 9

KEFLLYLAGFVDSGDSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVYDNGSVSVYSL
 10 SQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRA
 VLD

SEQ ID NO: 10

KEFLLYLAGFVDSGDSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVYDNGSVSVYSL
 SQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRA
 VLD

SEQ ID NO: 11

15 ATGAACACCAAGTACAACAAGGAGTTCCTGCTGTACCTGGCCGGCTTCGTGGACAGCGACGGCAGCATCAAC
 GCCAGCATCAGCCCCGCCAGAGCTTCAAGTTCAAGCACGGCCTGAAGCTGCGCTTCGAGGTGGGCCAGAAG
 ACCCAGCACCGCTGGTTCCTGGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGCGTGGGCTACGTGTACGACAACGGCAGC
 GTGAGCGTGTACAGCCTGAGCCAGATCAAGCCCCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGGCC
 20 CTGAAGGCCGACCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGAC
 AAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACC
 AGCGAGACCGTGCGCGCCGTGCTGGACAGCCTGCCCGGCATCCAGCTGAACAAGGAGAGCAACAACAACGCC
 AGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACGTGAACAACCTCCCCCTACAGCGGCTACAACAAGGAGTTCCTGCTGTAC
 CTGGCCGGCTTCGTGGACGGCGACGGCAGCATCTTCGCCAGCATCCGCCCCGCCAGCACGCCAAGTTC AAG
 25 CACGACCTGGAGCTGTGCTTCAACGTGCGCCAGAAGACCCAGCGCCGCTGGTTCCTGGACTACCTGGTGGAC
 ACCATCGGCGTGGGCTACGTGATCGACTGGCGCGCGCCAGCACCTACAAGCTGAGCCAGATCAAGCCCCTG
 CACAACCTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGAAGCTGAAGCAGAAGCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGATC
 ATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATC
 GCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGTGCGCGCCGTTCCTAGACAGCCTGAGC
 30 GAGAAGAAGAAAAGCAGCCCC

SEQ ID NO: 12

ATGAACACCAAGTACAACAAGGAGTTCCTGCTGTACCTGGCCGGCTTCGTGGACAGCGACGGCAGCATCAAC
 GCCAGCATCAGCCCCGCCAGAGCTTCAAGTTCAAGCACGGCCTGAAGCTGCGCTTCGAGGTGGGCCAGAAG
 ACCCAGCACCGCTGGTTCCTGGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGCGTGGGCTACGTGTACGACAACGGCAGC
 35 GTGAGCGTGTACAGCCTGAGCCAGATCAAGCCCCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGGCC
 CTGAAGGCCGACCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGAC
 AAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACC
 AGCGAGACCGTGCGCGCCGTGCTGGACAGCCTGCCCGGCATCCAGCTGAACAAGGAGAGCAACAACAACGCC

AGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACGTGAACAACCTCCCCTACAGCGGCTACAACAAGGAGTTCCTGCTGTAC
 CTGGCCGGCTTCGTGGACGGCGACGGCAGCATCTTCGCCAGCATCCGCCCCGCCAGCACGCCAAGTTCAAG
 CACGACCTGGAGCTGTGCTTCAACGTGCGCCAGAAGACCCAGCGCCGCTGGTTCCTGGACTACCTGGTGGAC
 5 ACCATCGGCGTGGGCTACGTGATCGACTGGCGCGGCGCCAGCACCTACAAGCTGAGCGAGATCAAGCCCCTG
 CACAACCTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGAAGCTGAAGCAGAAGCAGGCCAACCTGGTGTGAAGATC
 ATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATC
 GCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGTGCGCGCCGTTCTAGACAGCCTGAGC
 GAGAAGAAGAAAAGCAGCCCC

10 SEQ ID NO: 13

MNTKYNKEFLLYLAGFVDSGDSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFCLKLVDEIGVGIVYDNGS
 VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
 SETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDSIFA
 SIRPRQHAKFKHDLELCFNVRQKTQRRWFCLKLVDEIGVGIVYDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKL
 15 KQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 14

MNTKYNKEFLLYLAGFVDSGDSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFCLKLVDEIGVGIVYDNGS
 VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
 SETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDSIFA
 20 SIRPRQHAKFKHDLELCFNVRQKTQRRWFCLKLVDEIGVGIVYDWRGASTYKLSEIKPLHNFLTQLQPFLKL
 KQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 15

SLPGIQLNKESNNNASTQRPSRVNVPYSG

SEQ ID NO: 16

25 SLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGSGISEALRAGAGSGTG

SEQ ID NO: 17

MAPKKKRKVH

SEQ ID NO: 18

AATTATTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCTAGCTTTTCTCTTCTGTCAACCC
 30 CACACGCCTTTGCCAC

SEQ ID NO: 19

ACTCATCTTGGCCCTCCTCAGCTCCCTGCCTGTTTCCCGTAAGGCTGTACATAGTCCTTTTATCTCCTTGTG
 GCCTATGAACTGGTTTATAATAAACTCTTAAGAGAACATTA

SEQ ID NO: 20

35 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 21

GCCACCATGG

SEQ ID NO: 22
TGCCGATCCATACTGCGGAACT

SEQ ID NO: 23
5 GGTCTGTGCCAAGTGTTTG

SEQ ID NO: 24
GCTGCGAGCAAAACAAG

SEQ ID NO: 25
CCCGCCTGTAACACG

SEQ ID NO: 26
10 CATCAGGATTCCTAGGACC

SEQ ID NO: 27
AGTCCACCACGAGTCTA

SEQ ID NO: 28
15 GTATATTTCCGCGAGAGGAC

SEQ ID NO: 29
CTTGGCCCCCAATACCACATCATC

SEQ ID NO: 30
GGATGGAAATTGCACCTGTATTC

SEQ ID NO: 31
20 GGGTTTAAATGTATACCCAGAGAC

SEQ ID NO: 32
CGATCCATACTGCGGAA

SEQ ID NO: 33
25 AGGTCTCTGCCAAGTGTTTGCTG

SEQ ID NO: 34
ACGGGACGTAGACAAAGGACGTC

SEQ ID NO: 35
TTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCC

SEQ ID NO: 36
30 CTCAGTTTACTAGTGCCATTTG

SEQ ID NO: 37
TTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCC

SEQ ID NO: 38
35 GTGTCTGCGGCGTTTTATCA

SEQ ID NO: 39
GACAAACGGGCAACATACCTT

SEQ ID NO: 40

GCCAGGTCTGTGCCAAGTGTGTTG

SEQ ID NO: 41

CAGGATCCAGTTGGCAGCAC

5 SEQ ID NO: 42

SLPGIGVQVHRNNNASTQRP SRNVNFPYKG

SEQ ID NO: 43

SLPGVRLHCPLNNNASTQRP SRNVNFPQG

SEQ ID NO: 44

10 SLPGIRLSQGANNNASTQRP SRNVNFPPLG

SEQ ID NO: 45

SLPGARPGGVSNNASTQRP SRNVNFPYSG

SEQ ID NO: 46

15 MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DGSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIQLNKESNNNASTQRP SRNVNFPYSGYNKEFLLYLAGFVDGDGSI FASIRPRQHAKFK
HDLELCFNVRQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 47

20 MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DGSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLALKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIQLNKESNNNASTQRP SRNVNFPYSGYNKEFLLYLAGFVDGDGSI FASIRPRQHAKFK
HDLELCFNVRQKTQRRWFLDYLDVTIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

25 SEQ ID NO: 48

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DGSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKADQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIQLNKESNNNASTQRP SRNVNFPYSGYNKEFLLYLAGFVDGDGSI FASIRPRQHAKFK
HDLELCFNVRQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

30 SEQ ID NO: 49

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DGSINASISPRQSFKFKYGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIQLNKESNNNASTQRP SRNVNFPYSGYNKEFLLYLAGFVDGDGSI FASIRPRQHAKFK
35 HDLELCFNVRQKTQRRFFLDKLVDEIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 50

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DGSINASISPRQSFKFKYGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVDNGS

MNTKYNKEFLLYLAGFVDSGSI NASISPRQSFKFKYGLKLRFEV GQKTQHRWFLDKLVDEIGVG YVYDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKADQANLVLKII EQLP SAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIQLNKESNNNASTQRPSRVNNFPYSGYNKEFLLYLAGFVDGDGSI FASIRPRQHAKFK
HDLELCFNVRQKTQRRFFLDKLVDEIGVG YVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

MNTKYNKEFLLYLAGFVDSGSINASISPRQSFKFKYGLKLRFEVVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYYVDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIQLNKESNNASTQRPSRVNNFPYSGYNKEFLLYLAGFVDGDSIFASIRPRQHAKFK
HDELELCFNVRQKTQRRFFLDYLVDTIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

MNTKYNKEFLLYLAGFVDSGSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWF LDKLVDEIGVG YVYDNGS
VSVYLSLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIGVQVHRNNASTQRPSRVNNFPYKGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIRPRQHAKFK
HDLELCFNVRQKTQRRWF LDKLVDEIGVG YVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DGSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEV GQKTQHRWFLDKLVDEIGVG YVYDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKII EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIGVQVHRN NNASTQRPSRNVNNFPYK GYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIRPRQHAKFK
HDLELCFNVRQKTQRRWFLDYLVDTIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEOLPSAKESPDKFLEVCTWVDOIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DGSINASISPRQSFKFKYGLKLRFEV GQKTQHRWFLDKLVDEIGVG YVYDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKII EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIGVQVHRN NASTQRPSRNVNNFPYK GYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIRPRQHAKFK
HDLELCFNVRQKTQRRFFLDYLVDTIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEOLPSAKESPDKFLEVCTWVDOIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

MNTKYNKEFLLYLAGFVDSGSIASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGIVYDNGS
VSVYLSLOIKPLHNFLTOLPFLKLKOKOANLVLKIIIEOLPSAKESPDKFLEVCTWVDOIAALNDSKTRKTT

SETVRAVLDSLPGVRLHCPLNNASTQRP SRNVNFPQGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIRPRQHAKFKH
DLELCFNVRQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII
EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

5 SEQ ID NO: 57

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DG SINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKII EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGVRLHCPLNNASTQRP SRNVNFPQGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIRPRQHAKFKH
DLELCFNVRQKTQRRWFLDYLVD TIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII
EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

10

SEQ ID NO: 58

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DG SINASISPRQSFKFKYGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKII EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGVRLHCPLNNASTQRP SRNVNFPQGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIRPRQHAKFKH
DLELCFNVRQKTQRRFFLDYLVD TIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII
EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

15

SEQ ID NO: 59

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DG SINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIRLSQGANNASTQRP SRNVNFP LGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIRPRQHAKFKH
DLELCFNVRQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII
EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

20

SEQ ID NO: 60

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DG SINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKII EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIRLSQGANNASTQRP SRNVNFP LGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIRPRQHAKFKH
DLELCFNVRQKTQRRWFLDYLVD TIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII
EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

25

SEQ ID NO: 61

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DG SINASISPRQSFKFKYGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKII EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGIRLSQGANNASTQRP SRNVNFP LGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIRPRQHAKFKH
DLELCFNVRQKTQRRFFLDYLVD TIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII
EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

30

SEQ ID NO: 62

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DG SINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGYVDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGARPGGVSNNA STQRP SRNVNFP YSGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIRPRQHAKFKH

35

SEQ ID NO: 63

5 MNTKYNKEFLLYLAGFVDSGDSINASISPRQSFKFKHGLKLRFEVQGQKTQHRWFLDKLVDEIGVGIVYDNGS
VSVYLSLQIKPLHNFLTQLQPFLALKADQANLVLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGARPGGVSNNASTQRPSRVNNFPYSGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIRPRQHAKFK
HDLELCFNVRQKTQRRWFLDYLVDTIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKI
IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

10 SEQ ID NO: 64

MNTKYNKEFLLYLAGFVDS DGSINASISPRQSFKFKYGLKLRFEV GQKTQHRWF LDKLVDEIGVG YVYDNGS
VSVYSLSQIKPLHNFLTQLQPF LALKADQANLVLKII EQLP SAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTT
SETVRAVLDSLPGARPGGVSNNNASTQRPSRNVNNFPYSGYNKEFLLYLAGFVDGDGSI FASIRPRQHAKFK
HDLELCFNVRQKTQRRFFLDYLVDTIGVGYVIDWRGASTYKLSQIKPLHNFLTQLQPF LKLKQKQANLVLKI
IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

15 IEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 65

PKKKRKV

SEQ ID NO: 66

[illegible]

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 67

5 AATTATTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCTAGCTTTTCTCTTCTGTCAACCC
 CACACGCCTTTGCCACCATGGCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTGCATATGAACACCAAGTACAACAAGGAGT
 TCCTGCTGTACCTGGCCGGCTTCGTGGACAGCGACGGCAGCATCAACGCCAGCATCAGCCCCCGCCAGAGCT
 TCAAGTTCAAGCACGGCCTGAAGCTGCGCTTCGAGGTGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCTGGTTTCCTGGACA
 AGCTGGTGGACGAGATCGGCGTGGGCTACGTGTACGACAACGGCAGCGTGAGCGTGTACAGCCTGAGCCAGA
 TCAAGCCCCGTGCACAACTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGGCCCTGAAGGCCGACCAGGCCAACCTGG
 10 TGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGG
 TGGACCAGATCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGTGCGCGCCGTGCTGG
 ACAGCCTGCCCGGCATCCAGCTGAACAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACG
 TGAACAACCTCCCTACAGCGGCTACAACAAGGAGTTTCCTGCTGTACCTGGCCGGCTTCGTGGACGGCGACG
 GCAGCATCTTCGCCAGCATCCGCCCCCGCCAGCACGCCAAGTTCAAGCACGACCTGGAGCTGTGCTTCAACG
 15 TGCGCCAGAAGACCCAGCGCCGCTGGTTTCCTGGACTACCTGGTGGACACCATCGGCGTGGGCTACGTGATCG
 ACTGGCGCGGCGCCAGCACCTACAAGCTGAGCCAGATCAAGCCCCCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTGCAGC
 CCTTCCTGAAGCTGAAGCAGAAGCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGG
 AGAGCCCCGACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCC
 GCAAGACCACCAGCGAGACCGTGCGCGCCGTTCCTAGACAGCCTGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCCCCCA
 20 AGAAGAAGCGCAAGGTGTGATGAGGTACCAGCGGCCGCACTCATCTTGGCCCTCCTCAGCTCCCTGCCTGTT
 TCCCGTAAGGCTGTACATAGTCCTTTTATCTCCTTGTGGCCTATGAACTGGTTTATAATAAACTCTTAAGA
 GAACATTAGGCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAA

25 SEQ ID NO: 68

AATTATTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCTAGCTTTTCTCTTCTGTCAACCC
 CACACGCCTTTGCCACCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTGATGAACACCAAGTACAACAAGGAGTTTCCTGCTGT
 ACCTGGCCGGCTTCGTGGACAGCGACGGCAGCATCAACGCCAGCATCAGCCCCCGCCAGAGCTTCAAGTTCA
 AGCACGGCCTGAAGCTGCGCTTCGAGGTGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCTGGTTTCCTGGACAAGCTGGTGG
 30 ACGAGATCGGCGTGGGCTACGTGTACGACAACGGCAGCGTGAGCGTGTACAGCCTGAGCCAGATCAAGCCCC
 TGCACAACTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGGCCCTGAAGGCCGACCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGA
 TCATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGTTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGA
 TCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGTGCGCGCCGTGCTGGACAGCCTGC
 CCGGCATCCAGCTGAACAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACGTGAACAACCT
 35 TCCCCTACAGCGGCTACAACAAGGAGTTTCCTGCTGTACCTGGCCGGCTTCGTGGACGGCGACGGCAGCATCT
 TCGCCAGCATCCGCCCCCGCCAGCACGCCAAGTTCAAGCACGACCTGGAGCTGTGCTTCAACGTGCGCCAGA
 AGACCCAGCGCCGCTGGTTTCCTGGACTACCTGGTGGACACCATCGGCGTGGGCTACGTGATCGACTGGCGCG
 GCGCCAGCACCTACAAGCTGAGCCAGATCAAGCCCCCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGA

AGCTGAAGCAGAAGCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCG
 ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCA
 CCAGCGAGACCGTGCGCGCCGTTCTAGACAGCCTGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCATGGCCCCCAAGA
 5 AGAAGCGCAAGGTGCATTGATGAGGTACCAGCGGCCGCACTCATCTTGGCCCTCCTCAGCTCCCTGCCTGTT
 TCCCCGTAAGGCTGTACATAGTCCTTTTATCTCCTTGTGGCCTATGAACTGGTTTATAATAAACTCTTAAGA
 GAACATTAGGCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 69

AATTATTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCTAGCTTTTCTCTTCTGTCAACCC
 CACACGCCTTTGCCACCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTGATGAACACCAAGTACAACAAGGAGTTCCTGCTGT
 ACCTGGCCGGCTTCGTGGACAGCGACGGCAGCATCAACGCCAGCATCAGCCCCGCCAGAGCTTCAAGTTCA
 AGCACGGCCTGAAGCTGCGCTTCGAGGTGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCTGGTTCCTGGACAAGCTGGTGG
 15 ACGAGATCGGCGTGGGCTACGTGTACGACAACGGCAGCGTGAGCGTGTACAGCCTGAGCCAGATCAAGCCCC
 TGCACAACCTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGGCCCTGAAGGCCGACCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGA
 TCATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGTTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGA
 TCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACAGCGAGACCGTGCGCGCCGTGCTGGACAGCCTGC
 CCGGCATCCAGCTGAACAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACGTGAACAAC
 20 TCCCCCTACAGCGGCTACAACAAGGAGTTTCCTGCTGTACCTGGCCGGCTTCGTGGACGGCGACGGCAGCATCT
 TCGCCAGCATCCGCCCCCGCCAGCACGCCAAGTTCAAGCACGACCTGGAGCTGTGCTTCAACGTGCGCCAGA
 AGACCCAGCGCCGCTGGTTCCTGGACTACCTGGTGGACACCATCGGCGTGGGCTACGTGATCGACTGGCGCG
 GCGCCAGCACCTACAAGCTGAGCCAGATCAAGCCCCTGCACAACCTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGA
 AGCTGAAGCAGAAGCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCG
 25 ACAAGTTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCA
 CCAGCGAGACCGTGCGCGCCGTTCTAGACAGCCTGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCCAAGAAGAAGC
 GCAAGGTGTGATGAGGTACCAGCGGCCGCACTCATCTTGGCCCTCCTCAGCTCCCTGCCTGTTTCCCCGTAAG
 GCTGTACATAGTCCTTTTATCTCCTTGTGGCCTATGAACTGGTTTATAATAAACTCTTAAGAGAACATTAG
 GCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 30 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAA

SEQ ID NO: 70

AATTATTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCTAGCTTTTCTCTTCTGTCAACCC
 CACACGCCTTTGCCACCATGGCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTGCATATGAACACCAAGTACAACAAGGAGT
 35 TCCTGCTGTACCTGGCCGGCTTCGTGGACAGCGACGGCAGCATCAACGCCAGCATCAGCCCCGCCAGAGCT
 TCAAGTTCAAGCACGGCCTGAAGCTGCGCTTCGAGGTGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCTGGTTCCTGGACA
 AGCTGGTGGACGAGATCGGCGTGGGCTACGTGTACGACAACGGCAGCGTGAGCGTGTACAGCCTGAGCCAGA
 TCAAGCCCCTGCACAACCTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGGCCCTGAAGGCCGACCAGGCCAACCTGG

[illegible]

SEQ ID NO: 72

AATTATTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCTAGCTTTTCTCTTCTGTCAACCC
 CACACGCCTTTGCCACCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTGATGAACACCAAGTACAACAAGGAGTTCCTGCTGT
 5 ACCTGGCCGGCTTCGTGGACAGCGACGGCAGCATCAACGCCAGCATCAGCCCCGCCAGAGCTTCAAGTTCA
 AGCACGGCCTGAAGCTGCGCTTCGAGGTGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCTGGTTTCCTGGACAAGCTGGTGG
 ACGAGATCGGCGTGGGCTACGTGTACGACAACGGCAGCGTGAGCGTGTACAGCCTGAGCCAGATCAAGCCCC
 TGCACAACTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGGCCCTGAAGGCCGACCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGA
 TCATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGTTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGA
 10 TCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGTGCGCGCCGTGCTGGACAGCCTGC
 CCGGCATCCAGCTGAACAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACGTGAACAAC
 TCCCCCTACAGCGGCTACAACAAGGAGTTTCCTGCTGTACCTGGCCGGCTTCGTGGACGGCGACGGCAGCATCT
 TCGCCAGCATCCGCCCCCGCCAGCACGCCAAGTTCAAGCACGACCTGGAGCTGTGCTTCAACGTGCGCCAGA
 AGACCCAGCGCCGCTGGTTTCCTGGACTACCTGGTGGACACCATCGGCGTGGGCTACGTGATCGACTGGCGCG
 15 GCGCCAGCACCTACAAGCTGAGCGAGATCAAGCCCCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGA
 AGCTGAAGCAGAAGCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCG
 ACAAGTTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCA
 CCAGCGAGACCGTGCGCGCCGTTCTAGACAGCCTGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCATGGCCCCCAAGA
 AGAAGCGCAAGGTGCATTGATGAGGTACCAGCGGCCGCACTCATCTTGGCCCTCCTCAGCTCCCTGCCTGTT
 20 TCCCGTAAGGCTGTACATAGTCCTTTTATCTCCTTGTGGCCTATGAACTGGTTTATAATAAACTCTTAAGA
 GAACATTAGGCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 73

AATTATTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCTAGCTTTTCTCTTCTGTCAACCC
 CACACGCCTTTGCCACCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTGATGAACACCAAGTACAACAAGGAGTTCCTGCTGT
 25 ACCTGGCCGGCTTCGTGGACAGCGACGGCAGCATCAACGCCAGCATCAGCCCCGCCAGAGCTTCAAGTTCA
 AGCACGGCCTGAAGCTGCGCTTCGAGGTGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCTGGTTTCCTGGACAAGCTGGTGG
 ACGAGATCGGCGTGGGCTACGTGTACGACAACGGCAGCGTGAGCGTGTACAGCCTGAGCCAGATCAAGCCCC
 30 TGCACAACTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGGCCCTGAAGGCCGACCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGA
 TCATCGAGCAGCTGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGTTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGA
 TCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGTGCGCGCCGTGCTGGACAGCCTGC
 CCGGCATCCAGCTGAACAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACGTGAACAAC
 TCCCCCTACAGCGGCTACAACAAGGAGTTTCCTGCTGTACCTGGCCGGCTTCGTGGACGGCGACGGCAGCATCT
 35 TCGCCAGCATCCGCCCCCGCCAGCACGCCAAGTTCAAGCACGACCTGGAGCTGTGCTTCAACGTGCGCCAGA
 AGACCCAGCGCCGCTGGTTTCCTGGACTACCTGGTGGACACCATCGGCGTGGGCTACGTGATCGACTGGCGCG
 GCGCCAGCACCTACAAGCTGAGCGAGATCAAGCCCCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTGCAGCCCTTCCTGA
 AGCTGAAGCAGAAGCAGGCCAACCTGGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCG

ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCCCTGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCA
 CCAGCGAGACCGTGC CGCCGTTCTAGACAGCCTGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCCCCCAAGAAGAAGC
 GCAAGGTGTGATGAGGTACCAGCGGCCGCACTCATCTTGGCCCTCCTCAGCTCCCTGCCTGTTTCCCGTAAG
 5 GCTGTACATAGTCCTTTTATCTCCTTGTGGCCTATGAACTGGTTTATAATAAACTCTTAAGAGAACATTAG
 GCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAA

SEQ ID NO: 74

10 AAUUAUUGGUUAAAGAAGUAUAUUAUGUGCUAAUUUCCCUCCGUUUGUCCUAGCUUUUCUCUUCUGUCAACCC
 CACACGCCUUUGCCACCAUGGCCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGUGCAUAUGAACACCAAGUACAACAAGGAGU
 UCCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACAGCGACGGCAGCAUCAACGCCAGCAUCAGCCCCCGCCAGAGCU
 UCAAGUUCAAGCACGGCCUGAAGCUGCGCUUCGAGGUGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCUGGUUCCUGGACA
 AGCUGGUGGACGAGAUCGGCGUGGGCUACGUGUACGACAACGGCAGCGUGAGCGUGUACAGCCUGAGCCAGA
 15 UCAAGCCCCUGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGCCCUUCCUGGCCUGAAGGCCGACCAGGCCAACCUGG
 UGCUGAAGAUCAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGUCCUGGAGGUGUGCACCUGGG
 UGGACCAGAU CGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUGCUGG
 ACAGCCUGCCCGGCAUCCAGCUGAACAAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACG
 UGAACAACUCCCCUACAGCGGCUACAACAAGGAGUUCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACGGCGACG
 20 GCAGCAUCUUCGCCAGCAUCCGCCCCCGCCAGCACGCCAAGUUCAAGCACGACCUGGAGCUGUGCUUCAACG
 UGCGCCAGAAGACCCAGCGCCGCUUGGUUCCUGGACUACCUGGUGGACACCAUCGGCGUGGGCUACGUGAUCG
 ACUGGCGCGGCCAGCACCUACAAGCUGAGCCAGAUCAAGCCCCUGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGC
 CCUCCUGAAGCUGAAGCAGAAGCAGGCCAACCUGGUGCUGAAGAUCAUUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGG
 AGAGCCCCGACAAGUCCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGAU CGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCC
 25 GCAAGACCACGAGACCGUGCGCGCCGUUCUAGACAGCCUGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCAUGG
 CCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGUGCAUUGAUGAGGUACCAGCGGCCGCACUCAUCUUGGCCCUCCUCAGCUCC
 CUGCCUGUUUCCCGUAAGGCUGUACAUAGUCCUUUAUCUCCUUGUGGCCUAUGAAACUGGUUUUAUAUAAA
 CUCUUAAGAGAACAUAUAGGCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 30 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 75

AAUUAUUGGUUAAAGAAGUAUAUUAUGUGCUAAUUUCCCUCCGUUUGUCCUAGCUUUUCUCUUCUGUCAACCC
 CACACGCCUUUGCCACCAUGGCCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGUGCAUAUGAACACCAAGUACAACAAGGAGU
 UCCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACAGCGACGGCAGCAUCAACGCCAGCAUCAGCCCCCGCCAGAGCU
 35 UCAAGUUCAAGCACGGCCUGAAGCUGCGCUUCGAGGUGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCUGGUUCCUGGACA
 AGCUGGUGGACGAGAUCGGCGUGGGCUACGUGUACGACAACGGCAGCGUGAGCGUGUACAGCCUGAGCCAGA
 UCAAGCCCCUGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGCCCUUCCUGGCCUGAAGGCCGACCAGGCCAACCUGG
 UGCUGAAGAUCAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGUCCUGGAGGUGUGCACCUGGG

UGGACCAGAU CGCCGCC CUGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUGCUGG
 ACAGCCUGCCCGGCAUCCAGCUGAACAAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACG
 UGAACAACU UCCCCUACAGCGGCUACAACAAGGAGU UCCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACGGCGACG
 5 GCAGCAUCU UCGCCAGCAUCCGCCCCCGCCAGCACGCCAAGUUCAAGCACGACCUGGAGCUGUGCUUCAACG
 UGCGCCAGAAGACCCAGCGCCGCUUGGUUCCUGGACUACCUGGUGGACACCAUCGGCGUGGGCUACGUGAUCG
 ACUGGCGCGGCGCCAGCACCUACAAGCUGAGCCAGAUAAGCCCCUGCACAACU UCCUGACCCAGCUGCAGC
 CCU UCCUGAAGCUGAAGCAGAAGCAGGCCAACCUGGUGCUGAAGAUAUCGAGCAGCUGCCAGCGCCAAGG
 AGAGCCCCGACAAGU UCCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGAUCGCCGCC CUGAACGACAGCAAGACCC
 10 GCAAGACCACCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUUCUAGACAGCCUGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCCCCCA
 AGAAGAAGCGCAAGGUGUGAUGAGGUACCAGCGGCCGCACUCAUCUUGGCCCUCCUCAGCUCCUGCCUGUU
 UCCCGUAAGGCUGUACAUAUAGUCCUUUAUCUCCUUGUGGCCUAUGAAACUGGUUUUAUAUAAACUCUUAAGA
 GAACAUUAGGCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 15 AAAAAAAAAAAAA
SEQ ID NO: 76
 AAUUAUUGGUUAAAGAAGUAUAUUAUGUGCUAAUUUCCCUCCGUUUGUCCUAGCUUUUCUCUUCUGUCAACCC
 CACACGCCUUUGCCACCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGUGAUGAACACCAAGUACAACAAGGAGU UCCUGCUGU
 ACCUGGCCGGCUUCGUGGACAGCGACGGCAGCAUCAACGCCAGCAUCAGCCCCCGCCAGAGCUUCAAGUUCA
 20 AGCACGGCCUGAAGCUGCGCUUCGAGGUGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCUGGUUCCUGGACAAGCUGGUGG
 ACGAGAUCGGCGUGGGCUACGUGUACGACAACGGCAGCGUGAGCGUGUACAGCCUGAGCCAGAUAAGCCCC
 UGCACAACU UCCUGACCCAGCUGCAGCCCU UCCUGGCCCU GAAGGCCGACCAGGCCAACCUGGUGCUGAAGA
 UCAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGU UCCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGA
 UCGCCGCCCU GAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUGCUGGACAGCCUGC
 25 CCGGCAUCCAGCUGAACAAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACGUGAACAAACU
 UCCCCUACAGCGGCUACAACAAGGAGU UCCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACGGCGACGGCAGCAUCU
 UCGCCAGCAUCCGCCCCCGCCAGCACGCCAAGUUCAAGCACGACCUGGAGCUGUGCUUCAACGUGCGCCAGA
 AGACCCAGCGCCGCUUGGUUCCUGGACUACCUGGUGGACACCAUCGGCGUGGGCUACGUGAUCGACUGGCGCG
 GCGCCAGCACCUACAAGCUGAGCCAGAUAAGCCCCUGCACAACU UCCUGACCCAGCUGCAGCCCU UCCUGA
 30 AGCUGAAGCAGAAGCAGGCCAACCUGGUGCUGAAGAUAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCG
 ACAAGU UCCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGAUCGCCGCCCU GAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCA
 CCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUUCUAGACAGCCUGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCAUGGCCCCCAAGA
 AGAAGCGCAAGGUGCAUUGAUGAGGUACCAGCGGCCGCACUCAUCUUGGCCCUCCUCAGCUCCCUUGCCUGUU
 UCCCGUAAGGCUGUACAUAUAGUCCUUUAUCUCCUUGUGGCCUAUGAAACUGGUUUUAUAUAAACUCUUAAGA
 35 GAACAUUAGGCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAA
SEQ ID NO: 77

AAUUAUUGGUUAAAGAAGUAUAUUAUAGUGCUAAUUUCCCUCCGUUUGUCCUAGCUUUUCUCUUCUGUCAACCC
 CACACGCCUUUGCCACCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGUGAUGAACACCAAGUACAACAAGGAGUCCUGCUGU
 ACCUGGCCGGCUUCGUGGACAGCGACGGCAGCAUCAACGCCAGCAUCAGCCCCGCCAGAGCUUCAAGUUCA
 5 AGCACGGCCUGAAGCUGCGCUUCGAGGUGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCUGGUUCCUGGACAAGCUGGUGG
 ACGAGAUCGGCGUGGGCUACGUGUACGACAACGGCAGCGUGAGCGUGUACAGCCUGAGCCAGAUAAGCCCC
 UGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGCCCUUCCUGGGCCUGAAGGCCGACCAGGCCAACCUGGUGCUGAAGA
 UCAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGUUCCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGA
 UCGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUGCUGGACAGCCUGC
 10 CCGGCAUCCAGCUGAACAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACGUGAACAACU
 UCCCCUACAGCGGCUACAACAAGGAGUUCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACGGCGACGGCAGCAUCU
 UCGCCAGCAUCCGCCCCGCCAGCACGCCAAGUUCAAGCACGACCUGGAGCUGUGCUUCAACGUGCGCCAGA
 AGACCCAGCGCCGUGGUUCCUGGACUACCUGGUGGACACCAUCGGCGUGGGCUACGUGAUCGACUGGCGCG
 GCGCCAGCACCUACAAGCUGAGCCAGAUAAGCCCCUGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGCCCUUCCUGA
 15 AGCUGAAGCAGAAGCAGGCCAACCUGGUGCUGAAGAUAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCG
 ACAAGUUCCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGAUCGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCA
 CCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUUCUAGACAGCCUGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCCCCCAAGAAGAAGC
 GCAAGGUGUGAUGAGGUACCAGCGGCCGCACUCAUCUUGGCCCUCCUCAGCUCCCUGCCUGUUUCCCGUAAG
 GCUGUACAUAUAGUCCUUUUUAUCUCCUUGUGGCCUAUGAAACUGGUUUUAUAAUAAACUCUUAAGAGAACAUAUAG
 20 GCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAA

SEQ ID NO: 78

AAUUAUUGGUUAAAGAAGUAUAUUAUAGUGCUAAUUUCCCUCCGUUUGUCCUAGCUUUUCUCUUCUGUCAACCC
 25 CACACGCCUUUGCCACCAUGGCCCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGUGCAUAUGAACACCAAGUACAACAAGGAGU
 UCCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACAGCGACGGCAGCAUCAACGCCAGCAUCAGCCCCGCCAGAGCU
 UCAAGUUCAAGCACGGCCUGAAGCUGCGCUUCGAGGUGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCUGGUUCCUGGACA
 AGCUGGUGGACGAGAUCGGCGUGGGCUACGUGUACGACAACGGCAGCGUGAGCGUGUACAGCCUGAGCCAGA
 UCAAGCCCCUGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGCCCUUCCUGGCCUGAAGGCCGACCAGGCCAACCUGG
 30 UGCUGAAGAUAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGUUCCUGGAGGUGUGCACCUGGG
 UGGACCAGAUCGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUGCUGG
 ACAGCCUGCCCGGCAUCCAGCUGAACAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACG
 UGAACAACUCCCCUACAGCGGCUACAACAAGGAGUUCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACGGCGACG
 GCAGCAUCUUGCCAGCAUCCGCCCCGCCAGCACGCCAAGUUCAAGCACGACCUGGAGCUGUGCUUCAACG
 35 UGCGCCAGAAGACCCAGCGCCGUGGUUCCUGGACUACCUGGUGGACACCAUCGGCGUGGGCUACGUGAUCG
 ACUGGCGCGGCCAGCACCUACAAGCUGAGCGAGAUAAGCCCCUGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGC
 CCUCCUGAAGCUGAAGCAGAAGCAGGCCAACCUGGUGCUGAAGAUAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGG
 AGAGCCCCGACAAGUUCCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGAUCGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCC

GCAAGACCACCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUUCUAGACAGCCUGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCAUGG
 CCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGUGCAUUGAUGAGGUACCAGCGGCCGCACUCAUCUUGGCCCUCCUCAGCUCC
 CUGCCUGUUUCCCCGUAAGGCUGUACAUAUAGUCCUUUAUCUCCUUGUGGCCUAUGAAACUGGUUUUAUAAUAAA
 5 CUCUUAAGAGAACAUAUAGGCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 79

AAUUAUUGGUUAAAGAAGUAUAUUAUAGUGCUAAUUUCCCUCCGUUUGUCCUAGCUUUUCUCUUCUGUCAACCC
 10 CACACGCCUUUGCCACCAUGGCCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGUGCAUAUGAACACCAAGUACAACAAGGAGU
 UCCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACAGCGACGGCAGCAUCAACGCCAGCAUCAGCCCCCGCCAGAGCU
 UCAAGUUCAAGCACGGCCUGAAGCUGCGCUUCGAGGUGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCUGGUUCCUGGACA
 AGCUGGUGGACGAGAUCGGCGUGGGCUACGUGUACGACAACGGCAGCGUGAGCGUGUACAGCCUGAGCCAGA
 UCAAGCCCCUGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGCCCUUCCUGGCCUGAAGGCCGACCAGGCCAACCGG
 15 UGCUGAAGAUCAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGUCCUGGAGGUGUGCACCUGGG
 UGGACCAGAUUCGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUGCUGG
 ACAGCCUGCCCCGGCAUCCAGCUGAACAAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACG
 UGAACAACUCCCCUACAGCGGCUACAACAAGGAGUUCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACGGCGACG
 GCAGCAUCUUCGCCAGCAUCCGCCCCCGCCAGCACGCCAAGUUCAAGCACGACCUGGAGCUGUGCUUCAACG
 20 UGCGCCAGAAGACCCAGCGCCGCUUGGUUCCUGGACUACCUGGUGGACACCAUCGGCGUGGGCUACGUGAUCG
 ACUGGCGCGGCGCCAGCACCUACAAGCUGAGCGAGAUAAGCCCCUGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGC
 CCUCCUGAAGCUGAAGCAGAAGCAGGCCAACCGUGGUGCUGAAGAUCAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGG
 AGAGCCCCGACAAGUCCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGAUCCGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCC
 GCAAGACCACCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUUCUAGACAGCCUGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCCCCCA
 25 AGAAGAAGCGCAAGGUGUGAUGAGGUACCAGCGGCCGCACUCAUCUUGGCCCUCCUCAGCUCCUUGCCUGUU
 UCCCGUAAGGCUGUACAUAUAGUCCUUUAUCUCCUUGUGGCCUAUGAAACUGGUUUUAUAAUAAACUCUUAAGA
 GAACAUUAGGCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 80

AAUUAUUGGUUAAAGAAGUAUAUUAUAGUGCUAAUUUCCCUCCGUUUGUCCUAGCUUUUCUCUUCUGUCAACCC
 CACACGCCUUUGCCACCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGUGAUGAACACCAAGUACAACAAGGAGUUCUGCUGU
 ACCUGGCCGGCUUCGUGGACAGCGACGGCAGCAUCAACGCCAGCAUCAGCCCCCGCCAGAGCUUCAAGUUCA
 AGCACGGCCUGAAGCUGCGCUUCGAGGUGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCUGGUUCCUGGACAAGCUGGUGG
 35 ACGAGAUCGGCGUGGGCUACGUGUACGACAACGGCAGCGUGAGCGUGUACAGCCUGAGCCAGAUCAAGCCCC
 UGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGCCCUUCCUGGCCUGAAGGCCGACCAGGCCAACCGUGGUGCUGAAGA
 UCAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGUCCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGA
 UCGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUGCUGGACAGCCUGC

CCGGCAUCCAGCUGAACAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACGUGAACAACU
UCCCCUACAGCGGCUACAACAAGGAGUUCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACGGCGACGGCAGCAUCU
UCGCCAGCAUCCGCCCCCGCCAGCACGCCAAGUUCAAGCACGACCUGGAGCUGUGCUUCAACGUGCGCCAGA
5 AGACCCAGCGCCGCUGGUUCCUGGACUACCUGGUGGACACCAUCGGCGUGGGCUACGUGAUCGACUGGCGCG
GCGCCAGCACCUACAAGCUGAGCGGAGAUAAGCCCCUGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGCCCUUCCUGA
AGCUGAAGCAGAAGCAGGCCAACCUGGUGCUGAAGAUAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCG
ACAAGUUCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGAUCCGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCA
CCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUUCUAGACAGCCUGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCAUGGCCCCCAAGA
10 AGAAGCGCAAGGUGCAUUGAUGAGGUACCAGCGGCCGCACUCAUCUUGGCCCUCCUCAGCUCCCUGCCUGUU
UCCCGUAAGGCUGUACAUAGUCCUUUAUCUCCUUGUGGCCUAUGAAACUGGUUUUAUAAUAAACUCUUAAGA
GAACAUUAGGCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAA

15 SEQ ID NO: 81

AAUUAUUGGUUAAAGAAGUAUAUUAUGUCUAAUUAUCCCUCCGUUUGUCCUAGCUUUUCUCUUCUGUCAACCC
CACACGCCUUUGCCACCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGUGAUGAACACCAAGUACAACAAGGAGUUCUGCUGU
ACCUGGCCGGCUUCGUGGACAGCGACGGCAGCAUCAACGCCAGCAUCAGCCCCCGCCAGAGCUUCAAGUUA
AGCACGGCCUGAAGCUGCGCUUCGAGGUGGGCCAGAAGACCCAGCACCGCUGGUUCCUGGACAAGCUGGUGG
20 ACGAGAUCGGCGUGGGCUACGUGUACGACAACGGCAGCGUGAGCGUGUACAGCCUGAGCCAGAUAAGCCCC
UGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGCCCUUCCUGGCCUGAAGGCCGACCAGGCCAACCUGGUGCUGAAGA
UCAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCGACAAGUUCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGA
UCGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCACCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUGCUGGACAGCCUGC
CCGGCAUCCAGCUGAACAAGGAGAGCAACAACAACGCCAGCACCCAGCGCCCCAGCCGCAACGUGAACAACU
25 UCCCCUACAGCGGCUACAACAAGGAGUUCUGCUGUACCUGGCCGGCUUCGUGGACGGCGACGGCAGCAUCU
UCGCCAGCAUCCGCCCCCGCCAGCACGCCAAGUUCAAGCACGACCUGGAGCUGUGCUUCAACGUGCGCCAGA
AGACCCAGCGCCGCUGGUUCCUGGACUACCUGGUGGACACCAUCGGCGUGGGCUACGUGAUCGACUGGCGCG
GCGCCAGCACCUACAAGCUGAGCGGAGAUAAGCCCCUGCACAACUCCUGACCCAGCUGCAGCCCUUCCUGA
AGCUGAAGCAGAAGCAGGCCAACCUGGUGCUGAAGAUAUCGAGCAGCUGCCCAGCGCCAAGGAGAGCCCCG
30 ACAAGUUCUGGAGGUGUGCACCUGGGUGGACCAGAUCGCCGCCUGAACGACAGCAAGACCCGCAAGACCA
CCAGCGAGACCGUGCGCGCCGUUCUAGACAGCCUGAGCGAGAAGAAGAAAAGCAGCCCCCCAAGAAGAAGC
GCAAGGUGUGAUGAGGUACCAGCGGCCGCACUCAUCUUGGCCCUCCUCAGCUCCCUGCCUGUUUCCCGUAAG
GCUGUACAUAGUCCUUUAUCUCCUUGUGGCCUAUGAAACUGGUUUUAUAAUAAACUCUUAAGAGAACAUUAG
GCGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
35 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAA

SEQ ID NO: 82

AAUUAUUGGUUAAAGAAGUAUAUUAUGUCUAAUUAUCCCUCCGUUUGUCCUAGCUUUUCUCUUCUGUCAACCC

CACACGCCUUUGCCAC

SEQ ID NO: 83

ACUCAUCUUGGCCCUCUCAGCUCUCCUGCCUGUUUCCCGUAAGGCUGUACAUAGUCCUUUUUAUCUCCUUGUG

5 GCCUAUGAAACUGGUUUUAUAUAAACUCUUAAGAGAACAUUA

SEQ ID NO: 84

GCCACCAUGG

10

15

20

25

30

35