



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020008568-5 A2



(22) Data do Depósito: 09/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 06/10/2020

(54) **Título:** MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE GENE DE PROTEÍNA CONTENDO SH2 INDUTÍVEL POR CITOQUINA (CISH)

(51) **Int. Cl.:** A61K 35/17; C07K 14/47; C07K 14/715; C12N 15/90; C12N 15/113.

(30) **Prioridade Unionista:** 08/08/2018 US 62/716,002; 09/11/2017 US 62/583,724.

(71) **Depositante(es):** SANGAMO THERAPEUTICS, INC..

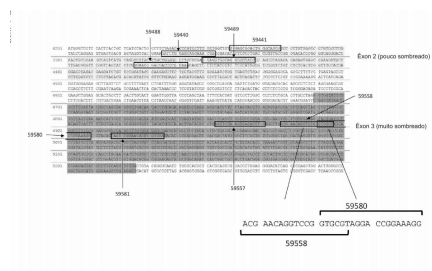
(72) **Inventor(es):** ANTHONY CONWAY; GARY K. LEE.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018060038 de 09/11/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/094725 de 16/05/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 29/04/2020

(57) **Resumo:** A presente divulgação é no campo da manipulação genética de genoma, particularmente modificação genética direcionada de um gene CISH.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE GENE DE PROTEÍNA CONTENDO
SH2 INDUTÍVEL POR CITOQUINA (*CISH*)".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] O presente pedido reivindica o benefício do Pedido U.S. Provisório No. 62/583.724, depositado em 9 de novembro de 2017 e o pedido provisório U.S. No. 62/716.002, depositado em 8 de agosto de 2018, cujas divulgações são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

CAMPO TÉCNICO

[002] A presente divulgação pertence ao campo da manipulação genética de genoma, particularmente modificação direcionada de um gene de proteína contendo SH2 indutível por citocina (*CISH* ou *CIS*).

FUNDAMENTOS

[003] As células se comunicam entre si por contato direto ou liberando "mensagens" moleculares no espaço extracelular para coordenar a proliferação, migração, diferenciação e afetar as mudanças na expressão gênica nas células alvo que expressam os complexos apropriados de receptores da superfície celular. Para muitas citocinas e fatores de crescimento, a ligação ao receptor inicia a transdução de sinal dentro das células alvo pela via de sinalização JAK/STAT. *Vide*, por exemplo, Aaronson, *et al.* (2002) *Science* 296 (5573): 1653-5; Rawlings *et al.* (2004) *J Cell Sci* 117 (Pt 8): 1281-3; e Jatiani *et al.* (2010) *Genes Cancer* 1 (10): 979-93. Na ausência de ligando, a extremidade citoplasmática do receptor está associada a membros inativos da família Janus tirosina quinase (JAK1-3 ou Tyk2). A ligação ao ligando induz a formação de um complexo receptor entre duas ou mais subunidades do receptor, aproximando as proteínas JAK, permitindo a ativação via trans-fosforilação. As JAKs ativadas podem então fosforilar resíduos de tirosina no domínio citoplasmático

do receptor para criar um sítio de ligação para um dos transdutores de sinal e ativadores das proteínas de transcrição (STAT).

[004] Existem sete proteínas STAT em mamíferos, STAT1-4, STAT5a, STAT5b e STAT6. Dentro da estrutura de cada proteína STAT existe um domínio de homologia-2 Src (SH2) (*Vide Sadowski et al (1986) Mol Cell Biol 6 (12): 4396-408*) que direciona a ligação ao sítio contendo fosfotirosina no receptor onde a proteína STAT pode ela própria ser tirosina fosforilada por JAK quinase. Uma vez fosforiladas, as proteínas STAT formam homo- ou heterodímeros e são transportadas para o núcleo, onde se ligam ao DNA e estimulam a transcrição de genes próximos. Como a via JAK/STAT desempenha um papel fundamental na regulação do crescimento, proliferação celular e resposta imune, a desregulação desse sistema pode contribuir para o desenvolvimento de câncer ou doença inflamatória.

[005] A ativação STAT induz rapidamente a expressão de um conjunto de genes que codificam o supressor da sinalização de citocinas (SOCS) e a família de proteínas intracelulares contendo o domínio SH2 induzido por citocinas (*CISH*). *Vide*, por exemplo, Palmer, *et al.* (2009) 30 (12): 592-602; Yoshimura *et al.* (2007) *Nat Rev Immunol* 7 (6): 454-65; Trengove *et al.* (2013) *Am J Clin Exp Immunol* 2 (1): 1-29. As proteínas SOCS/C1SH contêm um domínio N-terminal de sequência e função variável, seguido por um domínio SH2 e um domínio SOCS C-terminal que direciona a montagem de um complexo E3 de ubiquitina ligase que marca as proteínas alvo com ubiquitina, marcando-as para degradação via proteassoma. As proteínas SOCS/*CISH* inibem a sinalização JAK/STAT competindo com STAT pela ligação ao sítio da fosfotirosina no receptor, inibindo assim a ativação de STAT, e direcionando a deposição de ubiquitina em várias proteínas, aumentando sua rotatividade. Assim, as proteínas SOCS/*CISH* estabelecem um loop clássico de retorno negativo para

modular a sinalização de citocinas e fator de crescimento e melhorar a degradação do sinal quando o ligando não estiver mais presente. Algumas proteínas SOCS têm atividades adicionais, como inibição direta das JAKs e aumento da rotatividade de outras proteínas SOCS, contribuindo com maior complexidade para a regulação da transdução do sinal do receptor. *Vide Kershaw et al. (2013) Biochem Soc Trans. 41 (4): 1042-7.*

[006] *CISH* (também conhecida como CIS) foi a primeira proteína SOCS identificada como um gene rapidamente induzido (dentro de 30 min) após a ligação do ligando no receptor da eritropoietina (EPO) (EPOR). *Vide Yoshimura, et al. (1995) EMBOJ 14 (12): 2816-26.* A expressão de *CISH* também foi induzida por interleucina-2 (IL-2), IL-3 e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) nos tipos celulares apropriados. Análise de imunoprecipitação demonstrou que a proteína *CISH* se ligava de forma estável à cadeia beta da IL-3R e a EPOR, mas apenas após a ligação do ligando, sugerindo a necessidade de fosforilação do receptor em tirosina. A superexpressão da proteína *CISH* suprimiu o crescimento celular, indicando que *CISH* teve um efeito negativo na transdução de sinal. Posteriormente, a expressão de *CISH* demonstrou ser dependente da ativação de STATS, e vários sítios de ligação a STAT5 foram encontrados na região promotora de *CISH*. *Vide Matsumoto, et al. (1997) Blood 89 (9): 3148-54.* Além disso, o *CISH* inibiu a ativação do STATS dependente de EPO e a atividade suprimida de outros receptores dependentes do STATS, indicando que o *CISH* é um modulador de retorno para o STATS.

[007] Uma grande variedade de receptores dependentes de STAT5 induz a expressão de *CISH*, incluindo (mas não limitado a) hormônio do crescimento (GH), prolactina (PRL), trombopoietina (TPO), leptina, IL-2, IL-5 e IL-9. *Vide Bhattacharya et al. (2001) Am J*

Respir Cell Mol Biol 24 (3): 312-6. Foi demonstrado que *CISH* liga e inibe a sinalização do receptor GH (GHR), o receptor PRL e cadeia beta do receptor IL-2 e promove a internalização e desativação de GHR. Vide Ram, *et al.* (1999) *Biol Chem* 274 (50): 35553-61; Endo *et al.* (2003) *J Biochem* 133 (1): 109-13; Aman *et al.* (1999) *J. Biol Chem* 274 (42): 30266-72; Landsman *et al.* (2005) *J. Biol Chem* 280 (45): 37471-80. A expressão do mRNA de *CISH* é encontrada em vários tecidos (fígado, rim, estômago, pulmão, ovário e músculo esquelético). Vide Palmer *et al.* (2009) 30 (12): 592-602; Anderson *et al.* (2009) 138 (3): 537-44; Clasen *et al.* (2013) *J. Lipid Res* 54 (7): 1988-97. Apesar de seu aparente envolvimento no aparelho de sinalização de um grande número de citocinas e fatores de crescimento importantes, os camundongos knockout *CISH* apresentam defeitos mínimos (exceto alterações sutis na resposta imune). Vide Palmer *et al.* (2009) *Trends Immunol* 30 (12): 592-602; Trengove *et al.* (2013) *Am J Clin Exp Immunol* 2 (1): 1-29. Isso pode ser devido à atividade compensatória das outras proteínas da família SOCS. Foi observado um efeito de *CISH* na biologia de genes alvo putativos em camundongos transgênicos que expressam constitutivamente *CISH* acionado a partir do promotor de beta-actina. Esses camundongos tinham reduzido peso corporal, defeitos no desenvolvimento das glândulas mamárias e número reduzido de células T gama/delta, células naturais assassinas (NK) e células NKT, um fenótipo que se assemelhava a camundongos deficientes em Stat5a e/ou Stat5b. Vide Matsumoto *et al.* (1999) *Mol Cell Biol* 19 (9): 6396-407.

[008] Uma vez que *CISH* influencia potencialmente a sinalização por muitas citocinas e fatores de crescimento, não é de surpreender que a atividade e as variantes de *CISH* tenham sido associadas a doenças infecciosas e câncer. Vários estudos mostraram maior suscetibilidade a vários agentes infecciosos em indivíduos portadores

de certos polimorfismos *CISH*, incluindo malária, leptospirose, vírus da hepatite B e tuberculose. *Vide Khor et al. (2010) N Engl J Med* 362 (22): 2092-101; Esteves *et al. (2014) PLoS One* 9 (9): e108534; Hu *et al. (2014) PLoS One* 9 (6): e100826; Tong *et al. (2012) Immunogenetics* 64 (4): 261-5; Ji *et al. (2014) Infect Genet Evol* 28: 240-4; Sun *et al. (2014) PLoS* 9 (3): e92020. Um alelo de risco comum a todos os estudos (rs414171, -292 desde o início da transcrição) exibiu níveis mais baixos de expressão de *CISH* nas células mononucleares do sangue periférico em comparação com o alelo alternativo. *Vide Khor e Sun, supra*. No câncer de mama, os níveis de expressão de *CISH* foram elevados em carcinomas de mama e linhagens celulares de câncer em comparação com tecidos normais, levando à especulação de que o *CISH* possa contribuir para a tumorigênese por sua capacidade de ativar a quinase regulada por sinal extracelular (ERK). *Raccurt et al. (2003) Br. J. Cancer* 89 (3): 524-32. As variantes de *CISH* também estão associadas a características de produção de leite em gado leiteiro. *Vide Arun et al. (2015) Front Genet* 6: 342.

[009] Embora as células T não utilizem a via clássica de sinalização JAK/STAT ao responder à estimulação por meio do receptor de células T (TCR), a expressão de *CISH* é induzida rapidamente (dentro de 30 min) quando as células T são ativadas pelo anticorpo para CD3. *Vide Ji, supra; Chen et al. (2003) Int Immunol* 15 (3): 403-9; Palmer *et al. (2015) J Exp Med* 212 (12): 2095-113; Yang *et al. (2013) Nat Immunol* 14 (7): 732-40. A STAT5 é rapidamente fosforilada após estimulação de TCR, provavelmente pela proteína tirosina quinase específica de linfócitos associada a TCR (Lck). *Vide Welte et al. (1999) Science* 283 (5399): 222-5. A expressão de IL-2 também é induzida por estimulação de TCR, mas com cinética muito lenta para explicar a indução de *CISH*. *Vide Yang, et al., Supra; Li et*

al. (2000) *J Exp Med* 191 (6): 985-94. *In vivo*, a expressão de *CISH* foi baixa nas células T antigênicas puras, mas aumentou progressivamente nas células T CD8⁺ de memória central experimentada por antígeno e memória efetora (TEM) coletadas após a vacinação. *Vide Sallusto et al.* (1999) *Nature* 401 (6754): 708-12.

[0010] O papel de *CISH* na capacidade de resposta das células T também foi examinado. A expressão transgênica de *CISH in vivo* a partir do promotor de CD4 gerou camundongos com expressão constitutiva no compartimento de células T auxiliares de CD4⁺. *Vide Li e outros, supra.* As subpopulações de células T em circulação não foram afetadas, mas em vez da responsividade suprimida esperada, as células T CD4⁺ exibiram proliferação aumentada induzida por TCR e expressão de citocinas e aumento da sobrevivência *in vitro*. As populações circulantes de células T também eram normais em camundongos knock-out *CISH*, mas novamente uma resposta aumentada (proliferação e produção de citocinas) à estimulação de TCR foi observada *in vitro* nos subgrupos de células T CD4⁺ e CD8⁺. *Vide Palmer e Yang, supra.* A base molecular para a ação de *CISH* também não é clara, pois a capacidade de resposta reforçada das células T CD4⁺ em camundongos transgênicos atribuída a uma interação entre *CISH* e proteína quinase C teta, enquanto a inibição da atividade das células T CD8 por *CISH* foi atribuída à degradação aumentada da fosfolipase C-gama 1.

[0011] Uma consequência do aumento da atividade das células T em camundongos com deficiência de *CISH* foi uma resposta durável e mais agressiva das células T CD8 específicas do antígeno transferidas adotivamente a tumores estabelecidos em um modelo de melanoma. *Vide, Palmer, supra.* Além disso, a redução da expressão de *CISH* em células T humanas aumentou a funcionalidade de TCRs co-transduzidos específicos de tumores. Esses dados sugerem que aliviar

parte da atividade de retorno negativo que modera a sinalização de TCR pode produzir reatividade imunológica mais potente a um tumor. No entanto, o aumento da atividade antimelanoma em um modelo de camundongo foi associado a uma maior autoimunidade ocular. Da mesma forma, embora não houvesse grandes defeitos de desenvolvimento na outra linhagem de camundongos com deficiência de *C/SH*, a doença pulmonar espontânea se desenvolveu em animais mais velhos (> 6 meses), aparentemente causada pelo desenvolvimento aprimorado dos subconjuntos de células T TH2 e TH9 CD4. Esses estudos ilustram os desafios comuns da imunomodulação; muita supressão deixa o paciente vulnerável a infecções e desenvolvimento de tumores, e muita estimulação pode levar a autoimunidade ou doença inflamatória crônica.

[0012] Fatores de transcrição recombinantes compreendendo os domínios de ligação ao DNA das proteínas dos dedos de zinco ("ZFPs") ou domínios efetores de TAL ("TALEs") e nucleases manipuladas geneticamente, incluindo nucleases de dedo de zinco ("ZFNs"), TALENs, sistemas de nuclease CRISPR/Cas, e endonucleases de homing, todas manipuladas geneticamente para se ligar especificamente aos sítios de DNA alvo têm a capacidade de regular a expressão gênica de genes endógenos e são úteis na manipulação genética do genoma, terapia genética e tratamento de distúrbios como câncer e inflamação. *Vide*, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 9.877.988; 9.394.545; 9.150.847; 9.206.404; 9.045.763; 9.005.973; 8.956.828; 8.936.936; 8.945.868; 8.871.905; 8.586.526; 8.563.314; 8.329.986; 8.399.218; 6.534.261; 6.599.692; 6.503.717; 6.689.558; 7.067.317; 7.262.054; 7.888.121; 7.972.854; 7.914.796; 7.951.925; 8.110.379; 8.409.861; Publicações de Patente U.S. Nos. 2003/0232410; 2005/0208489; 2005/0026157; 2005/0064474; 2006/0063231; 2008/0159996; 2010/0218264;

2012/0017290; 2011/0265198; 2013/0137104; 2013/0122591; 2013/0177983; 2013/0177960; e 2015/0056705, cujas divulgações são incorporadas por referência na sua totalidade para todos os fins. Além disso, nucleases direcionadas estão sendo desenvolvidas com base no sistema Argonaute (por exemplo, de *T. thermophilus*, conhecido como 'TtAgo', *Vide*, Swarts, *et al.* (2014) *Nature* 507 (7491): 258-261), que também pode ter o potencial para usos na edição de genoma e terapia genética.

[0013] A terapia genética mediada por nuclease pode ser usada para manipular geneticamente uma célula para ter um ou mais genes inativados e/ou para fazer com que essa célula expresse um produto que não foi produzido anteriormente nessa célula (por exemplo, via inserção de transgene e/ou via correção de uma sequência endógena). Exemplos de usos da inserção de transgene incluem a inserção de um ou mais genes que codificam uma ou mais novas proteínas terapêuticas, inserção de uma sequência de codificação que codifica uma proteína que está ausente na célula ou no indivíduo, inserção de um gene de tipo selvagem em um célula contendo uma sequência de gene mutada e/ou inserção de uma sequência que codifica um ácido nucleico estrutural como shRNA ou siRNA. Exemplos de aplicações úteis de 'correção' de uma sequência de gene endógena incluem alterações de mutações genéticas associadas a doenças, alterações em sequências que codificam sítios de emenda, alterações em sequências reguladoras e alterações direcionadas de sequências que codificam características estruturais de uma proteína. Os construtos de transgene podem ser inseridos por reparo direcionado por homologia (HDR) ou por captura de extremidade durante processos conduzidos por junção de extremidade não homóloga (NHEJ). *Vide*, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 9.045.763; 9.005.973; 7.888.121; e 8.703.489.

[0014] Os ensaios clínicos usando esses fatores de transcrição e nucleases manipuladas geneticamente mostraram que essas moléculas são capazes de tratar várias condições, incluindo câncer, HIV e/ou doenças do sangue (como hemoglobinopatias e/ou hemofilias). *Vide*, por exemplo, Yu, *et al.* (2006) *FASEB J.* 20: 479-481; Tebas *et al.* (2014) *New Eng J Med* 370 (10): 901. Assim, essas abordagens podem ser usadas para o tratamento de doenças.

[0015] No entanto, permanece a necessidade de métodos e composições adicionais para correção do gene *CISH* e entrega de doadores para tratamento e/ou prevenção de câncer, distúrbios inflamatórios e outras doenças nas quais a regulação *CISH* é desejada.

SUMÁRIO

[0016] A presente invenção descreve composições e métodos para uso em terapia genética e manipulada geneticamente de genoma. Especificamente, os métodos e composições descritos se referem à modificação genômica mediada por nuclease (por exemplo, uma ou mais inserções e/ou deleções) de um gene *CISH* endógeno (mutante ou selvagem). As modificações genômicas podem compreender inserções e/ou deleções ("indels") que inativam o gene alvo (por exemplo, via NHEJ após a clivagem do gene pela nuclease); inserção direcionada de um transgene (doador) incluindo uma sequência de codificação de proteínas, por exemplo, uma proteína que está faltando ou é deficiente em um indivíduo com câncer ou condição inflamatória e/ou inserção direcionada de um doador corretivo (por exemplo, uma sequência que restaura a funcionalidade *CISH* em uma célula com um gene mutante), um receptor de antígeno quimérico (CAR) e/ou um ou mais componentes ou reguladores de, ou proteínas de fusão que compreendem um complexo HLA (por exemplo, fusão B2M-HLA-E ou B2M-HLA-G proteína). As modificações genéticas e/ou

células compreendendo essas modificações podem ser usadas em métodos *ex vivo* ou *in vivo*.

[0017] Em certos aspectos, é aqui fornecida uma célula geneticamente modificada que compreende uma modificação genômica no éxon 2 ou éxon 3 de um gene *CISH* endógeno. Também são fornecidas populações dessas células geneticamente modificadas. A modificação genômica pode compreender uma ou mais inserções e/ou deleções (indels) e/ou integração de um ou mais transgenes no gene *CISH* (por exemplo, um transgene codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR), um fator imunomodulador (por exemplo, PD1, CTLA-4, etc.), um receptor de células T manipulado geneticamente ou exógeno (TCR) (por exemplo, um receptor de células T acoplado a um anticorpo (ACTR)). Em certos aspectos, o gene *CISH* é modificado após a clivagem por uma nuclease (por exemplo, uma ou mais nucleases de dedo de zinco, um ou mais sistemas TALENs e/ou um ou mais sistemas de nuclease CRISPR/Cas). Em certas modalidades, a nuclease compreende um domínio de ligação ao DNA que se liga a um sítio alvo, conforme mostrado na Tabela 2, por exemplo, uma nuclease de dedo de zinco compreendendo uma proteína de dedo de zinco compreendendo 4, 5 ou 6 domínios de dedo de zinco compreendendo uma hélice de reconhecimento, como as proteínas de dedo de zinco compreendendo as regiões de hélice de reconhecimento das proteínas designadas SBS# 59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581 ou SBS#59580. Também são fornecidas células geneticamente modificadas (e populações de tais células) descendentes de qualquer uma das células aqui descritas. Em algumas modalidades, a célula é selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula-tronco hematopoiética, uma célula efetora T e uma célula reguladora T.

[0018] Em outros aspectos, é aqui fornecida uma proteína de dedo de zinco compreendendo 6 domínios de dedo de zinco, cada um compreendendo uma região de hélice de reconhecimento, em que a proteína de dedo de zinco compreende as regiões de hélice de reconhecimento das proteínas designadas SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581 ou SBS#59580. Também são fornecidas proteínas de fusão compreendendo qualquer uma das proteínas de dedo de zinco aqui descritas, incluindo fusões da proteína de dedo de zinco com um domínio de clivagem do tipo selvagem ou manipulada geneticamente ou meio domínio de clivagem. Também são fornecidos um ou mais polinucleotídeos que codificam um ou mais dos ZFPs e/ou proteínas de fusão aqui descritas. Células isoladas (por exemplo, células T efetoras, células reguladoras T e/ou células-tronco hematopoiéticas) compreendendo uma ou mais das proteínas (por exemplo, ZFPs ou proteínas de fusão) e/ou um ou mais dos polinucleotídeos que codificam essas proteínas também são fornecidos. Também são fornecidos kits compreendendo uma ou mais das proteínas, um ou mais dos polinucleotídeos e/ou uma ou mais células isoladas aqui descritas.

[0019] Em outros aspectos, a invenção fornece um método para gerar uma célula geneticamente modificada como aqui descrito, o método compreendendo a introdução, na célula, de um ou mais polinucleotídeos que codificam uma ou mais nucleases compreendendo um domínio de ligação ao DNA que se liga ao alvo sítio no éxon 2 ou éxon 3 do gene *CISH*, em que a nuclease se liga e cliva o gene *CISH*, modificando geneticamente a célula. Em certas modalidades, a célula geneticamente modificada compreende um transgene que é integrado ao gene *CISH* e expresso na célula. Também é fornecido um método de fornecer uma proteína a um

indivíduo em necessidade, o método compreendendo a administração de uma célula geneticamente modificada, conforme descrito aqui, em que a célula expressa o transgene (por exemplo, CAR, fator de imunomodulação e/ou ACTR, etc.) no indivíduo.

[0020] Em um aspecto, aqui divulgado, são métodos e composições para modificação direcionada de um gene *CISH* usando uma ou mais nucleases. Nucleases, por exemplo, meganucleases manipuladas geneticamente, nucleases de dedo de zinco (ZFNs) (o termo "a ZFN" inclui um par de ZFNs), nucleases TALE (TALENs, incluindo fusões de domínios efetores TALE com domínios nuclease de endonucleases de restrição e/ou de meganucleases (como megaTALEs e TALENs compactos) (o termo "a TALEN" inclui um par de TALENs), o sistema Ttgo e/ou os sistemas de nuclease CRISPR/Cas são usados para clivar o DNA em um locus do gene *CISH* na célula. O gene *CISH* pode ser inativado após a clivagem (por exemplo, por inserções e/ou deleções ("indels")) e/ou por inserção direcionada de um transgene doador. O transgene de doador pode ser via reparo direcionado por homologia (HDR) ou mecanismos de reparo não-homologia (por exemplo,, Captura de doadores do NHEJ). As nucleases aqui descritas podem induzir uma quebra de filamento duplo (DSB) ou de filamento simples (nick) no DNA alvo. Em algumas modalidades, duas nickases são usadas para criar um DSB através da introdução de dois cortes. Em alguns casos, a nickase é uma ZFN, enquanto em outros, a nickase é uma nickase TALEN ou CRISPR/Cas. Qualquer uma das nucleases aqui descritas (por exemplo, ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas etc.) pode ter como alvo um intron e/ou um éxon (por exemplo, éxon 2 ou 3) de um gene *CISH* (incluindo sequências que se sobrepõem a íntrons e éxons), por exemplo, as sequências alvo mostradas na Tabela 2, incluindo, por exemplo, um sítio alvo compreendendo 9 a 20 ou mais (9, 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais) contíguos ou não. aminoácidos contíguos das sequências mostradas na Tabela 2.

[0021] Em um aspecto, aqui descrito é uma proteína de dedo de zinco de ocorrência não natural (ZFP) que se liga a um sítio alvo em um gene *CISH* em um genoma, em que a ZFP compreende um ou mais domínios de ligação de dedo de zinco manipulados geneticamente. Em uma modalidade, a ZFP é uma nuclease de dedo de zinco (ZFN) que cliva uma região genômica alvo de interesse, em que a ZFN compreende um ou mais domínios de ligação de dedo de zinco manipulados geneticamente e um domínio de clivagem ou meio domínio de clivagem de nuclease. Os domínios de clivagem e meios domínios de clivagem podem ser obtidos, por exemplo, a partir de várias endonucleases de restrição e/ou endonucleases de homing e podem ser do tipo selvagem ou manipuladas geneticamente (mutantes). Em uma modalidade, os meios domínios de clivagem são derivados de uma endonuclease de restrição do Tipo IIS (por exemplo, *FokI*). Em certas modalidades, o domínio do dedo de zinco uma proteína de dedo de zinco com os domínios de hélice de reconhecimento ordenados como mostrado em uma única linha da Tabela 1. Nucleases compreendendo essas proteínas de dedo de zinco podem incluir qualquer sequência de ligação (por exemplo, ligá-la ao domínio de clivagem) e qualquer domínio de clivagem (por exemplo, um mutante de dimerização, como um mutante ELD; um domínio *FokI* com mutação em um ou mais de 416, 422, 447, 448 e/ou 525; e/ou mutantes de domínio catalítico que resultam na funcionalidade da nickase). *Vide*, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 8.703.489; 9.200.266; 8.623.618; e 7.914.796; e Publicação de Patente U.S. No. 2018/0087072. Em certas modalidades, a ZFP da ZFN se liga a um sítio alvo de 9 a 18 ou mais nucleotídeos dentro da sequência mostrada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 40-47).

[0022] Em outro aspecto, aqui descrito, é uma Proteína Efetora do Tipo Ativador Transcricionais (TALE) que se liga ao sítio alvo (por exemplo, um sítio alvo compreendendo pelo menos 9 ou 12 (por exemplo, 9 a 20 ou mais) nucleotídeos de uma sequência alvo como mostrado na Tabela 2, SEQ ID NO: 40-47) em um gene *CISH* em um genoma, em que a TALE compreende um ou mais domínios de ligação de TALE manipulados geneticamente. Em uma modalidade, a TALE é uma nuclease (TALEN) que cliva uma região genômica alvo de interesse, em que a TALEN compreende um ou mais domínios de ligação de DNA de TALE manipuladas geneticamente e um domínio de clivagem de nuclease ou meio domínio de clivagem. Os domínios de clivagem e meios domínios de clivagem podem ser obtidos, por exemplo, a partir de várias endonucleases de restrição e/ou endonucleases de homing (meganuclease). Em uma modalidade, os meios domínios de clivagem são derivados de uma endonuclease de restrição do Tipo IIS (por exemplo, *FokI*). Em outras modalidades, o domínio de clivagem é derivado de uma meganuclease, cujo domínio de meganuclease também pode exibir funcionalidade de ligação ao DNA.

[0023] Em outro aspecto, aqui descrito é um sistema CRISPR/Cas que se liga ao sítio alvo em um gene *CISH* em um genoma, em que o sistema CRISPR/Cas compreende um ou mais RNA guia único manipulado geneticamente ou um equivalente funcional, bem como uma nuclease Cas9. Em certas modalidades, o RNA guia único (sgRNA) se liga a uma sequência compreendendo 9, 12 ou mais nucleotídeos contíguos de um sítio alvo, como mostrado na Tabela 2 (SEQ ID NO: 40-47).

[0024] As nucleases (por exemplo, ZFN, sistema CRISPR/Cas, Ttgo e/ou TALEN), conforme descrito neste documento, podem se ligar e/ou clivar a região de interesse em uma região de codificação ou

não codificação dentro ou adjacente ao gene *CISH*, como, por exemplo, uma sequência líder, sequência de trailer ou íntron ou dentro de uma região não transcrita, a montante ou a jusante da região de codificação.

[0025] Em outro aspecto, aqui descrito é um polinucleotídeo que codifica uma ou mais nucleases (por exemplo, ZFNs, sistemas CRISPR/Cas, Ttago e/ou TALENs aqui descritos). O polinucleotídeo pode ser, por exemplo, mRNA. Em alguns aspectos, o mRNA pode ser quimicamente modificado (*Vide*, por exemplo, Kormann, *et al.* (2011) *Nature Biotechnology* 29 (2): 154-157).

[0026] Em outro aspecto, aqui descrito é um vetor de expressão de ZFN, CRISPR/Cas, Ttago e/ou TALEN compreendendo um polinucleotídeo, codificando uma ou mais nucleases (por exemplo, ZFNs, sistemas CRISPR/Cas, Ttago e/ou TALENs) como aqui descrito, operacionalmente ligado a um promotor. Em uma modalidade, o vetor de expressão é um vetor viral (por exemplo, um vetor de AAV). Em um aspecto, o vetor viral exibe tropismo específico de tecido.

[0027] Em outro aspecto, aqui descrito é uma célula hospedeira compreendendo uma ou mais nucleases (por exemplo, sistemas ZFN, CRISPR/Cas, Ttago e/ou TALEN).

[0028] Em outro aspecto, são fornecidas composições farmacêuticas compreendendo um vetor de expressão como aqui descrito. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica pode compreender mais de um vetor de expressão. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende um primeiro vetor de expressão compreendendo um primeiro polinucleotídeo e um segundo vetor de expressão compreendendo um segundo polinucleotídeo. Em algumas modalidades, o primeiro polinucleotídeo e o segundo polinucleotídeo são diferentes. Em algumas modalidades,

o primeiro polinucleotídeo e o segundo polinucleotídeo são substancialmente os mesmos. A composição farmacêutica pode ainda compreender uma sequência doadora (por exemplo, um transgene que codifica uma proteína que falta ou é deficiente em uma doença ou distúrbio como um LSD ou uma hemofilia). Em algumas modalidades, a sequência doadora está associada a um vetor de expressão.

[0029] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreendendo um domínio de ligação ao DNA de *CISH* (por exemplo, proteína de dedo de zinco ou TALE ou sgRNA ou meganuclease) e um domínio de clivagem de tipo selvagem ou manipulada geneticamente ou meio domínio de clivagem são fornecidos.

[0030] As nucleases aqui descritas podem se ligar e/ou clivar um gene *CISH* dentro da região codificadora do gene ou em uma sequência não codificadora dentro ou adjacente ao gene, tal como, por exemplo, uma sequência líder, sequência trailer ou íntron, ou dentro de uma região não transcrita, a montante ou a jusante da região de codificação. Em certas modalidades, as nucleases se ligam a um sítio alvo de 9 a 20 ou mais nucleotídeos nas sequências de *CISH* mostradas na Tabela 2.

[0031] Em outro aspecto, aqui descrito são composições compreendendo uma ou mais das nucleases (por exemplo, sistemas ZFNs, TALENs, TtAgo e/ou CRISPR/Cas) descritas aqui, incluindo uma nuclease compreendendo uma molécula de ligação ao DNA (por exemplo, ZFP, TALE, sgRNA, etc.) e um domínio de nuclease (clivagem). Em certas modalidades, a composição compreende uma ou mais nucleases em combinação com um excipiente farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição compreende dois ou mais conjuntos (pares) de nucleases, cada conjunto com diferentes especificidades. Em outros aspectos, a

composição compreende diferentes tipos de nucleases. Em algumas modalidades, a composição compreende polinucleotídeos que codificam nucleases de *CISH*, enquanto em outras modalidades, a composição compreende proteínas de nuclease específicas de *CISH*. Em ainda outras modalidades, a composição compreende uma ou mais moléculas doadoras, por exemplo, doadores que codificam uma proteína (s) *CISH* funcional, incluindo qualquer fragmento funcional da mesma. Em modalidades preferidas, o doador compreende uma sequência que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) e/ou outra proteína (s) imunomoduladora, como um gene de receptor de célula T (TCR) manipulado geneticamente ou exógeno, um gene que codifica uma sequência ACTR, um gene beta-2-microglobulina (B2M) e/ou uma proteína de fusão compreendendo B2M e um HLA-E e/ou HLA-G. Em outros aspectos, o doador compreende uma sequência corretiva que é integrada a um gene *CISH* mutante em uma célula, de modo que a célula expresse *CISH* funcional.

[0032] Em outro aspecto, aqui descrito é um polinucleotídeo que codifica uma ou mais nucleases ou componentes de nuclease (por exemplo, domínios ZFNs, TALENs, TtAgo ou nuclease do sistema CRISPR/Cas) aqui descritos. O polinucleotídeo pode ser, por exemplo, mRNA ou DNA. Em alguns aspectos, o mRNA pode ser quimicamente modificado (*Vide*, por exemplo, Kormann, *et al.* (2011) *Nature Biotechnology* 29 (2): 154-157). Em outros aspectos, o mRNA pode compreender um limite ARCA (*Vide* Patentes U.S. Nos. 7.074.596; e 8.153.773). Em outras modalidades, o mRNA pode compreender uma mistura de nucleotídeos não modificados e modificados (*Vide* Publicação de Patente U.S. No. 2012/0195936). Em outro aspecto, aqui descrito é um vetor de expressão de nuclease compreendendo um polinucleotídeo que codifica um ou mais sistemas ZFNs, TALENs, TtAgo ou CRISPR/Cas aqui descritos, operacionalmente ligado a um

promotor. Em uma modalidade, o vetor de expressão é um vetor viral, por exemplo, um vetor de AAV.

[0033] Em outro aspecto, aqui descrito é uma célula hospedeira compreendendo uma ou mais nucleases, um ou mais vetores de expressão de nuclease e/ou um ou mais doadores, como aqui descrito. Em certas modalidades, a célula hospedeira compreende uma inserção e/ou exclusão que inativa um gene *CISH*, por exemplo, inativação por NHEJ (indels) após a clivagem pela nuclease ou inativação pela inserção de uma ou mais sequências exógenas (por exemplo, transgenes) após a clivagem. Em certas modalidades, a célula hospedeira inclui uma versão mutante de um ou mais genes (por exemplo, gene *CISH*) de tal modo que a integração da sequência exógena mediada pela nuclease específica de *CISH* fornece uma versão funcional da proteína *CISH*. A célula hospedeira pode ser transformada de maneira estável ou transfectada transitoriamente ou uma combinação das mesmas com um ou mais vetores de expressão de nuclease. Em uma modalidade, a célula hospedeira é uma célula efetora T, uma célula reguladora T ou uma célula célula-tronco, por exemplo, uma célula-tronco hematopoiética ou uma célula-tronco pluripotente induzida. Em outras modalidades, os um ou mais vetores de expressão de nuclease expressam uma ou mais nucleases na célula hospedeira. Em outra modalidade, a célula hospedeira pode ainda compreender uma sequência doadora de polinucleotídeo exógeno (por exemplo, codificando uma proteína *CISH*). Em qualquer uma das modalidades aqui descritas, a célula hospedeira pode compreender uma célula embrionária, por exemplo, um ou mais embriões de células de camundongo, rato, coelho ou outro mamífero (por exemplo, um primata não humano). Em algumas modalidades, a célula hospedeira compreende um tecido. Também são descritas células ou linhagens celulares descendentes das células aqui

descritas, incluindo células pluripotentes, totipotentes, multipotentes ou diferenciadas compreendendo uma modificação (por exemplo, sequência doadora integrada) em um gene *CISH* endógeno (por exemplo, éxon 2 ou 3 de um gene *CISH* endógeno). Em certas modalidades, aqui descritas são células diferenciadas, como aqui descritas, compreendendo uma modificação (por exemplo, sequência doadora integrada) em um gene *CISH* endógeno (por exemplo, éxon 2 ou éxon 3 de um *CISH* endógeno), cujas células diferenciadas descendem de uma célula-tronco como aqui descrita.

[0034] Em outro aspecto, aqui descrito, é um método para clivar um gene *CISH* em uma célula, o método compreendendo: (a) introduzir, na célula, um ou mais polinucleotídeos que codificam uma ou mais nucleases que têm como alvo um ou mais genes *CISH* sob condições tais que as nucleases são expressas e os um ou mais genes *CISH* são clivados. Em certas modalidades, após a clivagem pela nuclease, uma sequência genômica no gene *CISH* alvo é clivada, por exemplo, usando uma nuclease (ou vetor que codifica a nuclease) como descrito aqui e uma sequência "doadora" inserida no gene após a clivagem direcionada com o sistema ZFN, TALEN, TtAgo ou CRISPR/Cas, de modo que a sequência doadora seja expressa na célula. A sequência doadora pode codificar uma proteína *CISH* funcional. Em algumas modalidades, a sequência doadora compreende uma sequência do gene *CISH* parcial. Em modalidades preferidas, o doador compreende uma molécula imunomoduladora, como um receptor de antígeno quimérico (CAR). Além disso, a sequência doadora pode estar presente no sistema de entrega da nuclease (por exemplo, vetor não viral, LNP ou vetor viral), presente em um mecanismo de entrega separado (por exemplo, nuclease entregue na forma de mRNA como polinucleotídeo nu ou via entrega e doador de LNP entregue usando o vetor viral como AAV) ou,

alternativamente, pode ser introduzido na célula usando um mecanismo de entrega de ácido nucleico separado e/ou diferente. A inserção de uma sequência nucleotídica doadora no locus *CISH* pode resultar na expressão do transgene sob controle dos elementos de controle genético de *CISH* endógeno, respectivamente. Em alguns aspectos, a inserção do transgene de interesse resulta na expressão de uma sequência proteica exógena intacta e não possui aminoácidos codificados em *CISH*. Em outros aspectos, a proteína exógena expressa é uma proteína de fusão e compreende aminoácidos codificados pelo transgene e pelo gene *CISH*. Em alguns casos, as sequências de *CISH* estarão presentes na porção amino (N)-terminal da proteína exógena, enquanto em outros, as sequências de *CISH* estarão presentes na porção carboxi (C)-terminal da proteína exógena. Em outros casos, as sequências de *CISH* estarão presentes nas porções N e C-terminais da proteína exógena. O doador também pode ser uma sequência "corretiva" que é integrada a um gene *CISH* endógeno mutante que não expressa a proteína *CISH* (ou expressa em níveis abaixo dos níveis normais do tipo selvagem), de modo que a expressão de *CISH* seja restaurada.

[0035] Em algumas modalidades, a invenção descreve métodos e composições que podem ser usados para expressar um transgene sob o controle do promotor *CISH in vivo*. Em alguns aspectos, o transgene pode codificar uma proteína terapêutica de interesse. O transgene pode codificar uma proteína de modo que os métodos da invenção possam ser utilizados para substituição de proteínas. Em alguns aspectos, o transgene codifica uma proteína que modula a capacidade de resposta das células T e trata e/ou previne um câncer ou uma condição imune relacionada.

[0036] Em algumas modalidades, o alvo da nuclease e/ou o sítio de clivagem está em um éxon do gene *CISH*, tal que um transgene

(por exemplo, CAR, TCRs de tipo selvagem e manipulados geneticamente como ACTRs) é integrado a uma região exônica de *CISH*, por exemplo, no éxon 2 ou no éxon 3. O transgene pode estar sob o controle de outro promotor endógeno ou exógeno de interesse *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*, cujo promotor exógeno direciona a expressão do transgene. Assim, as células geneticamente modificadas aqui compreendendo um transgene expresso (de um promotor endógeno ou exógeno) podem ser usadas em métodos *in vitro* para produção de uma proteína (do transgene) em uma cultura celular (cuja proteína pode ser isolada) ou *ex vivo* (terapia celular) para fornecer uma proteína a um indivíduo em necessidade (por exemplo, um CAR para um indivíduo com câncer ou fornecer uma proteína que é aberrante ou não expressa no indivíduo).

[0037] Em outro aspecto, é descrito um método para modificar um gene endógeno, compreendendo a administração à célula de um ou mais polinucleotídeos que codificam uma ou mais nucleases (por exemplo, ZFNs, TALENs, TtAgo, sistema CRISPR/Cas) na presença de uma ou mais sequência doadoraes que codificam uma proteína *CISH*, de modo que o doador seja integrado ao gene endógeno direcionado pela nuclease. A integração de uma ou mais molécula (s) doadora ocorre através do reparo direcionado à homologia (HDR) ou pelo reparo associado à união não homóloga (NHEJ). Em certas modalidades, um ou mais pares de nucleases são empregues, cujas nucleases podem ser codificadas pelo mesmo ou diferentes ácidos nucleicos.

[0038] Em ainda outro aspecto, é aqui fornecida uma célula (por exemplo, célula T efetora, célula T reguladora ou célula-tronco) compreendendo um gene *CISH* geneticamente modificado. Em certas modalidades, uma célula geneticamente modificada compreende uma modificação genética dentro do éxon 2 e/ou éxon 3 do gene *CISH*, por

exemplo, uma modificação feita por uma nuclease. Em certas modalidades, o gene *CISH* geneticamente modificado compreende uma ou mais inserções e/ou deleções (conhecidas como indels) após a clivagem por uma nuclease direcionada para um sítio alvo de 9 a 20 pares de bases de uma sequência, como mostrado na Tabela 2 no *CISH* gene em que o gene é inativado após a clivagem pela nuclease. As modificações genéticas podem estar no sítio (s) alvo e/ou no sítio (s) de clivagem e/ou dentro de 1-50 pares de bases da borda do sítio alvo. Em outras modalidades, a modificação compreende a inserção de uma sequência exógena, por exemplo, um transgene (por exemplo, CAR, fator de imunomodulação, TCR manipulado geneticamente ou exógeno ou um ACTR etc.), após a clivagem por uma nuclease, como descrito aqui. Em certas modalidades, a célula é feita pelos métodos aqui descritos. Em outras modalidades preferidas, o transgene é integrado a um éxon de *CISH* (por exemplo, éxon 2 ou 3, incluindo mas não limitado a 5-10 pares de bases de uma sequência de 9 a 20 nucleotídeos das sequências, como mostrado na Tabela 2). As células compreendendo o transgene integrado podem expressar o transgene de um promotor endógeno (por exemplo, o promotor *CISH*, respectivamente) ou, alternativamente, o transgene pode incluir elementos reguladores e de controle, tais como promotores exógenos que dirigem a expressão do transgene. Em certas modalidades, as células compreendendo um transgene não incluem nenhuma sequência de vetor viral integrada no genoma. As células geneticamente modificadas, como aqui descritas, podem ser usadas para usos *in vitro*, como produção de proteínas (a partir de um transgene integrado) e/ou para o fornecimento de modelos celulares ou animais com genes *CISH* alterados, incluindo o rastreamento de moléculas para uso em tratamento de câncer ou uma doença inflamatória. Além disso, as células geneticamente modificadas, como

aqui descritas, podem ser usadas para usos *in vivo*, incluindo, entre outros, o fornecimento de uma proteína a um indivíduo em necessidade através da provisão da célula (terapia celular *ex vivo*).

[0039] Em qualquer um dos métodos e composições aqui descritos, as células podem ser qualquer célula eucariótica. Em certas modalidades, as células são células T efectoras, células T reguladoras ou células-tronco. Em outras modalidades, as células são derivadas do paciente, por exemplo, células-tronco CD34+ autólogas (hematopoiéticas) (por exemplo, mobilizadas em pacientes da medula óssea no sangue periférico através da administração do fator estimulador de colônias de granulócitos (GCSF)). As células CD34+ podem ser colhidas, purificadas, cultivadas e as nucleases e/ou doador *CISH* (por exemplo, um doador de vetor adenoviral) introduzidos na célula por qualquer método adequado.

[0040] Em alguns aspectos, as células-tronco ou células maduras podem ser usadas para terapia celular, por exemplo, para um transplante de células T usando células maduras. Em outras modalidades, as células para uso no transplante de células T contêm outra modificação genética de interesse. Em um aspecto, as células T contêm um receptor de antígeno quimérico (CAR) inserido específico para um marcador de câncer. Em um aspecto adicional, o CAR inserido é específico para a característica do marcador CD19 de malignidades de células B. Em algumas modalidades, as células T compreendem um CAR específico para uma doença autoimune. Em algumas modalidades, as células T são células T reguladoras e compreendem um CAR útil para a prevenção da rejeição de transplantes.

[0041] Em outro aspecto, os métodos e composições da invenção fornecem o uso de composições (nucleases, composições farmacêuticas, polinucleotídeos, vetores de expressão, células,

linhagens de células e/ou animais como animais transgênicos), como aqui descrito, por exemplo, para uso no tratamento de um câncer como malignidades de células B (por exemplo, leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), linfoma não-Hodgkin de células B (B-NHL), leucemia linfocítica crônica (LLC) e linfoma de Hodgkin (Wang, *et al.* (2017) *J. Hematol Oncol* 10 (1): 53) ou para o tratamento de doenças inflamatórias (por exemplo, colite, *Vide* Blat, *et al.* (2014) *Mol Ther* 22 (5): 1018-1028). Em certas modalidades, essas composições são usadas na triagem de bibliotecas de medicamentos e/ou outras composições terapêuticas (isto é, anticorpos, RNAs estruturais, etc.) para uso no tratamento de um câncer ou um distúrbio inflamatório. Tais triagens podem começar no nível celular com linhagens de células manipuladas geneticamente ou células primárias e podem progredir até o nível de tratamento de um animal completo (por exemplo, terapia veterinária ou humana). Assim, em certos aspectos, aqui descrito, é um método de tratamento e/ou prevenção de câncer ou um inflamatório em um indivíduo em necessidade do mesmo, o método compreendendo a administração de uma ou mais nucleases, polinucleotídeos e/ou células, como aqui descrito ao indivíduo. Os métodos podem ser *ex vivo* ou *in vivo*. Em certas modalidades, uma célula como aqui descrita (por exemplo, uma célula compreendendo um transgene integrado em um gene *CISH*) é administrada ao indivíduo. Em qualquer um dos métodos aqui descritos, a célula pode ser uma célula-tronco derivada do indivíduo (célula-tronco derivada do paciente).

[0042] Em qualquer uma das composições e métodos aqui descritos, as nucleases são introduzidas na forma de mRNA e/ou usando um ou mais vetores não virais, LNP ou vetores virais. Em certas modalidades, as nucleases são introduzidas na forma de mRNA. Em outras modalidades, o transgene é introduzido usando um

vetor viral, por exemplo, um vetor adenoassociado (AAV) incluindo AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV 8.2, AAV9, AAV rh10, AAV2/8, AAV2/5 e AAV2/6, ou via um vetor lentiviral ou lentiviral com defeito de integração, e a nuclease (s) é introduzida na forma de mRNA. Em ainda outras modalidades, a nuclease (s) e os doadores são ambos introduzidos usando um ou mais vetores virais ou não virais. A nuclease e doador podem ser transportados no mesmo vetor, em vetores diferentes do mesmo tipo ou em vetores diferentes de tipos diferentes. Em certas modalidades, a nuclease (s) é introduzida na forma de mRNA (por exemplo, por eletroporação) e o doador é introduzido usando um AAV (por exemplo, AAV2/6), lentivírus ou lentivírus com defeito de integração. Em certas modalidades, o doador é introduzido como DNA de filamento simples.

[0043] A nuclease (s) e doadores podem ser introduzidos simultaneamente ou em ordem. Quando introduzido sequencialmente, qualquer período de tempo (por exemplo, segundos a horas) pode decorrer entre a administração das nucleases e doadores. Em certas modalidades, os doadores são introduzidos e após 12-36 horas (ou a qualquer momento entre elas), a nuclease (s) é introduzida na célula. Em certas modalidades, as células modificadas são incubadas por horas a dias (ou a qualquer momento entre isto) e depois são divididas em alíquotas e congeladas.

[0044] Qualquer célula pode ser modificada usando as composições e métodos da invenção, incluindo mas não se limitando a células procarióticas ou eucarióticas, como bactérias, insetos, leveduras, peixes, mamíferos (incluindo mamíferos não humanos) e células vegetais. Em certas modalidades, a célula é uma célula imune, por exemplo, uma célula T (por exemplo, CD4+, CD3+, CD8+, etc.), uma célula dendrítica, uma célula B ou semelhante. Em outras modalidades, a célula é uma célula-tronco pluripotente, totipotente ou

multipotente, por exemplo, uma célula-tronco pluripotente induzida (iPSC), células-tronco hematopoiéticas (por exemplo, CD34+), uma célula-tronco embrionária ou semelhante. Em qualquer um dos métodos ou composições aqui descritos, a célula contendo o transgene que codifica *CISH* pode ser uma célula-tronco ou progenitora. Os tipos específicos de células-tronco que podem ser utilizados com os métodos e composições da invenção incluem células-tronco embrionárias (ESC), células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) e células-tronco hematopoiéticas (por exemplo, células CD34+). Os iPSCs podem ser derivados de amostras de pacientes e/ou de controles normais, em que o iPSC derivado do paciente pode ser alterado para a sequência gênica do tipo selvagem ou normal no gene de interesse, ou células normais podem ser alteradas para o alelo de doença conhecido no gene de interesse. Da mesma forma, as células-tronco hematopoiéticas podem ser isoladas de um paciente ou de um doador. Essas células são então manipuladas geneticamente para expressar proteínas funcionais, como CARs, expandidas e depois reintroduzidas no paciente. Em certas modalidades, a célula é uma célula-tronco hematopoiética derivada do paciente. Em outras modalidades, a célula é um COS, CHO (por exemplo, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (por exemplo, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T) e células perC6.

[0045] Assim, são descritos aqui métodos e composições para modular a expressão do gene *CISH*, incluindo a inativação de *CISH* com ou sem expressão de uma sequência exógena (como um CAR). As composições e métodos podem ser para uso *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* e compreendem a administração de um fator de transcrição artificial ou nuclease que inclui um domínio de ligação ao DNA

direcionado ao gene *CISH*, opcionalmente no caso de uma nuclease com um doador que é integrado ao gene *CISH* após a clivagem pela nuclease. Em certas modalidades, a célula está em um câncer ou uma doença inflamatória. Em outras modalidades, a célula é modificada em qualquer um dos métodos aqui descritos, e a célula modificada é administrada a um indivíduo em necessidade da mesma (por exemplo, um indivíduo com câncer ou um distúrbio inflamatório). Células geneticamente modificadas (por exemplo, células-tronco, células precursoras, células T, células musculares, etc.) compreendendo um gene *CISH* geneticamente modificado (por exemplo, uma sequência exógena) também são fornecidas, incluindo células feitas pelos métodos aqui descritos. Essas células podem ser usadas para fornecer proteína (s) terapêutica (s) a um indivíduo com câncer ou doença inflamatória, por exemplo, administrando a célula (s) a um indivíduo em necessidade da mesma ou, alternativamente, isolando a proteína produzida pela célula e administrar a proteína ao indivíduo em necessidade da mesma (terapia de reposição enzimática).

[0046] Um kit, compreendendo os ácidos nucleicos, proteínas e/ou células da invenção, também é fornecido. O kit pode compreender ácidos nucleicos que codificam as nucleases (por exemplo, moléculas de RNA ou genes de codificação do sistema ZFN, TALEN, TtAgo ou CRISPR/Cas contidos em um vetor de expressão adequado) ou alíquotas das proteínas da nuclease, moléculas doadoras, modificadores de dureza adequados, células, instruções para executar os métodos da invenção e similares.

[0047] Estes e outros aspectos serão facilmente aparentes para o especialista na técnica à luz da divulgação como um todo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0048] A Figura 1 mostra a sequência parcial incluindo os éxons 2 e 3 (sombreados) de um gene *CISH* (SEQ ID NO: 48) e também

mostra sítios alvo de nuclease exemplares (encaixotados) no gene.

[0049] As Figuras 2A a 2D mostram a análise FACS de células T submetidas a tratamento nas condições indicadas. A Figura 2A ("Simulado") mostra resultados em que as células não foram tratadas com os reagentes de nuclease, mas tratadas da mesma maneira que as outras células. A Figura 2B ("somente AAV") mostra resultados em que as células receberam apenas o doador de AAV-GFP. A Figura 2C ("somente ZFNs") mostra resultados em que as células receberam apenas as nucleases direcionadas a *CISH* (administradas como mRNA); e A Figura 2D ("ZFNs + AAV") mostra resultados em que as células foram submetidas a tratamento com o doador de AAV-GFP e as ZFNs direcionadas a *CISH*. Como mostrado, pelo menos 75% das células tratadas com as nucleases e o doador expressaram GFP em comparação com todas as outras condições de tratamento nas quais se expressou pouca (apenas AAV) ou nenhuma (apenas simulado e ZFNs) GFP.

[0050] A Figura 3 mostra a análise FACS de células T efectoras submetidas a tratamento nas condições indicadas. "Doador sozinho" refere-se a células que receberam apenas o doador de AAV-hPGK-GFP e "ZFNs + Doador" referem-se a células submetidas a tratamento com o doador de AAV-hPGK-GFP e os ZFNs direcionados ao *CISH*. Como mostrado, ~ 72,6% das células tratadas com as nucleases e o doador expressaram GFP em comparação com as células tratadas apenas com doador de AAV que não expressaram nenhum GFP.

[0051] [0051] A Figura 4 é um gráfico que mostra os resultados da análise do genótipo Miseq de células T efectoras submetidas a tratamento nas condições indicadas. "Simulado" refere-se a células que não foram tratadas com os reagentes de nuclease, mas tratadas da mesma maneira que as outras células; "Doador de PGK-GFP" refere-se a células que receberam apenas o doador de AAV-hPGK-

GFP; "ZFNs" refere-se a células nas quais apenas as nucleases direcionadas a *CISH* foram administradas como mRNA; e "ZFNs + PGK-GFP Doador" referem-se a células submetidas a tratamento com o doador AAV-hPGK-GFP e as ZFNs direcionadas a *CISH*. Como mostrado, ~ 90% dos alelos são modificados em células tratadas com as nucleases (ZFNs e ZFNs + Doador), enquanto apenas as células tratadas com o doador de AAV e ZFNs produziram altos níveis (~ 45%) de integração direcionada (TI) do doador. O grupo tratado apenas com doador de AAV ou Simulado não apresentou níveis detectáveis de modificação do genoma.

[0052] A Figura 5 é um gráfico que mostra a análise do genótipo Miseq de células T efectoras submetidas a tratamento nas condições indicadas. "Simulado" refere-se a células que não foram tratadas com os reagentes de nuclease, mas tratadas da mesma maneira que as outras células e "ZFNs + Doador" refere-se a células submetidas a tratamento com ZFNs direcionadas para AAVS1 ou *CISH*, juntamente com um doador de AAV-GFP correspondente GFP. Como mostrado, ~50-60% dos alelos são modificados em células tratadas com as nucleases (ZFNs + Doador), enquanto o grupo Simulado não apresentou níveis detectáveis de modificação do genoma.

[0053] A Figura 6 é um gráfico que mostra os dados funcionais das células T efectoras, avaliados pela secreção imunoestimuladora de citocinas por meio da análise Luminex. "ZFNs + Doador" refere-se a células submetidas a tratamento com ZFNs direcionadas a AAVS1 ou *CISH*, juntamente com um doador de AAV-GFP correspondente. Como mostrado, a TI de um doador de transgene para *CISH* resulta em função imunoestimuladora aumentada (isto é, regulação positiva de TNF α) das células T efectoras em comparação com TI no locus de abrigo seguro genômico AAVS1, presumivelmente devido a nocaute da expressão de *CISH* em uma grande fração de células.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0054] São divulgadas aqui composições e métodos para modificação direcionada de um gene *CISH*, incluindo modificação via integração de uma proteína transgênica (por exemplo, CAR, TCR, ACTR e/ou qualquer outra proteína terapêutica) transgene para um gene de célula *CISH* (por exemplo, células T ou precursores de linfócitos, como células-tronco hematopoiéticas CD34+). Os métodos e composições podem ser utilizados para a modificação de uma célula efetora T (CD4+ ou CD8+) e células reguladoras T (CD4+, CD25+, CD127^{lo}, FOXP3+). As células são adequadas para infusão em pacientes, de modo que a subsequente diferenciação *in vivo* desses precursores em células que expressam as proteínas funcionais no indivíduo com câncer, distúrbio inflamatório, doença autoimune ou transplante seja fornecida pela célula, que as células podem tratar e/ou prevenir doenças no paciente receptor. As células geneticamente modificadas, conforme descrito aqui (por exemplo, indels e/ou transgenes no gene *CISH*) são adequadas para infusão em pacientes, de modo que a subsequente diferenciação *in vivo* dessas células-tronco em células que expressam a proteína *CISH* funcional trate e/ou previna doenças (por exemplo, câncer, distúrbios inflamatórios etc.) no paciente. Além disso, as células descritas aqui (populações de células ou linhagens de células) podem ser usadas *in vitro* para produzir células, linhagens de células ou modelos de animais para triagem e/ou produzir proteínas a partir do transgene integrado, cuja proteína pode ser isolada e usada para tratar um indivíduo.

[0055] A invenção contempla qualquer modificação genética em um gene *CISH*, incluindo, sem limitação, a integração de um doador que compreende a sequência que codifica qualquer proteína funcional, incluindo proteínas que tratam e/ou previnem câncer, distúrbios inflamatórios, doença autoimune ou transplante, ou servem como um

receptor para redirecionar uma célula T.

Geral

[0056] A prática dos métodos, bem como a preparação e uso das composições aqui divulgadas, emprega, salvo indicação em contrário, técnicas convencionais em biologia molecular, bioquímica, estrutura e análise de cromatina, química computacional, cultura celular, cultura de células, DNA recombinante e campos relacionados como estão dentro da habilidade da técnica. Essas técnicas são totalmente explicadas na literatura. *Vide*, por exemplo, Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 e terceira edição, 2001; Ausubel, *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 e atualizações periódicas; a série METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Terceira edição, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman e A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; e METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

Definições

[0057] Os termos "ácido nucleico", "polinucleotídeo" e "oligonucleotídeo" são usados de forma intercambiável e se referem a um polímero desoxirribonucleotídeo ou ribonucleotídeo, na conformação linear ou circular e na forma de filamento simples ou duplo. Para os fins da presente divulgação, esses termos não devem ser interpretados como limitativos em relação ao comprimento de um polímero. Os termos podem abranger análogos conhecidos de nucleotídeos naturais, bem como nucleotídeos que são modificados nas porções base, açúcar e/ou fosfato (por exemplo, estruturas

principais de fosforotioato). Em geral, um análogo de um nucleotídeo específico tem a mesma especificidade de emparelhamento de bases; isto é, um análogo de A irá emparelhar-se com T.

[0058] Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados de forma intercambiável para se referir a um polímero de resíduos de aminoácidos. O termo também se aplica a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais aminoácidos são análogos químicos ou derivados modificados dos correspondentes aminoácidos de ocorrência natural.

[0059] "Ligação" refere-se a uma interação não covalente específica de sequência entre macromoléculas (por exemplo, entre uma proteína e um ácido nucleico). Nem todos os componentes de uma interação de ligação precisam ser específicos da sequência (por exemplo, contatos com resíduos de fosfato em uma estrutura principal de DNA), desde que a interação como um todo seja específica da sequência. Tais interações são geralmente caracterizadas por uma constante de dissociação (K_d) de 10^{-6} M^{-1} ou inferior. "Afinidade" refere-se à força da ligação: maior afinidade de ligação sendo correlacionada com uma K_d mais baixa.

[0060] Um "domínio de ligação" é uma molécula que é capaz de se ligar de forma não covalente a outra molécula. Uma molécula de ligação pode se ligar, por exemplo, a uma molécula de DNA (uma proteína de ligação a DNA, como uma proteína de dedo de zinco ou uma proteína do domínio efetor de TAL ou um RNA guia único), uma molécula de RNA (uma proteína de ligação a RNA) e/ou uma molécula de proteína (uma proteína de ligação a proteína). No caso de uma molécula de ligação a proteína, ela pode se ligar a si mesma (para formar homodímeros, homotrímeros etc.) e/ou pode se ligar a uma ou mais moléculas de uma proteína ou proteínas diferentes. Uma molécula de ligação pode ter mais de um tipo de atividade de ligação.

Por exemplo, as proteínas dos dedos de zinco têm atividade de ligação ao DNA, ligação ao RNA e ligação à proteína. Assim, moléculas de ligação ao DNA, incluindo componentes de ligação ao DNA de nucleases artificiais e fatores de transcrição incluem, mas não estão limitados a, ZFPs, TALEs e sgRNAs.

[0061] Uma "proteína de ligação ao DNA do dedo de zinco" (ou domínio de ligação) é uma proteína, ou um domínio dentro de uma proteína maior, que liga o DNA de uma maneira específica de sequência através de um ou mais dedos de zinco, que são regiões da sequência de aminoácido dentro do domínio de ligação cuja estrutura é estabilizada através da coordenação de um íon de zinco. O termo proteína de ligação ao DNA de dedo de zinco é frequentemente abreviado como proteína de dedo de zinco ou ZFP. As nucleases artificiais e os fatores de transcrição podem incluir um domínio de ligação ao DNA da ZFP e um domínio funcional (domínio da nuclease para um ZFN ou domínio regulador da transcrição para ZFP-TF). O termo "nuclease de dedo de zinco" inclui um ZFN e um par de ZFNs (os membros do par são referidos como "esquerdo e direito" ou "primeiro e segundo" ou "par") que dimerizam para clivar o gene alvo.

[0062] Um "domínio de ligação ao DNA de TALE" ou "TALE" é um polipeptídeo compreendendo um ou mais domínios/unidades de repetição de TALE. Os domínios de repetição estão envolvidos na ligação de TALE à sua sequência de DNA alvo cognato. Uma única "unidade de repetição" (também chamada de "repetição") tem tipicamente 33-35 aminoácidos de comprimento e exibe pelo menos alguma homologia de sequência com outras sequências de repetição TALE dentro de uma proteína TALE que ocorre naturalmente. *Vide*, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 8.586.526 e 9.458.205. As nucleases artificiais e os fatores de transcrição podem incluir um domínio de ligação ao DNA de TALE e um domínio funcional (domínio

da nuclease para um TALEN ou domínio regulador da transcrição para TALEN-TF). O termo "TALEN" inclui um TALEN e um par de TALENs (os membros do par são referidos como "esquerdo e direito" ou "primeiro e segundo" ou "par") que dimerizam para clivar o gene alvo.

[0063] O dedo de zinco e os domínios de ligação de TALE podem ser "manipulados geneticamente" para se ligarem a uma sequência nucleotídica predeterminada, por exemplo, através da manipulação genética (alteração de um ou mais aminoácidos) da região da hélice de reconhecimento de um dedo de zinco ou proteína TALE que ocorre naturalmente. Portanto, proteínas de ligação ao DNA manipuladas geneticamente (dedos de zinco ou TALEs) são proteínas que não ocorrem naturalmente. Exemplos não limitativos de métodos para manipulação genética de proteínas de ligação ao DNA são projeto e seleção. Uma proteína de ligação ao DNA projetada é uma proteína que não ocorre na natureza cujo projeto/composição resulta principalmente de critérios racionais. Os critérios racionais para o projeto incluem a aplicação de regras de substituição e algoritmos computadorizados para o processamento de informações em um banco de dados que armazena informações de projetos ZFP e/ou TALE existentes e dados de ligação. *Vide*, por exemplo, as patentes U.S. Nos. 6.140.081; 6.453.242; 6.534.261; e 8.585.526; *Vide* também as Publicações Internacionais de Patentes Nos. WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536; e WO 03/016496.

[0064] Uma proteína de dedo de zinco "selecionada" ou TALE é uma proteína não encontrada na natureza cuja produção resulta principalmente de um processo empírico, como exibição de fagos, interceptação de interação ou seleção híbrida. *Vide*, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.200.759; 8.586.526; e Publicações de Patentes Internacionais Nos. WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO

00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; e WO 02/099084.

[0065] "TtAgo" é uma proteína Argonaute procariótica que acredita-se estar envolvida no silenciamento de genes. TtAgo é derivado da bactéria *Thermus thermophilus*. Vide, por exemplo, Swarts *et al.*, Ibid, G. Sheng *et al.* (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 652. Um "sistema TtAgo" é todos os componentes necessários, incluindo, por exemplo, DNAs guia para clivagem por uma enzima TtAgo.

[0066] "Recombinação" refere-se a um processo de troca de informações genéticas entre dois polinucleotídeos, incluindo, mas não limitado a, captura de doadores por junção de extremidade não homóloga (NHEJ) e recombinação homóloga. Para os fins desta divulgação, "recombinação homóloga (HR)" refere-se à forma especializada dessa troca que ocorre, por exemplo, durante o reparo de quebras de filamento duplo nas células por meio de mecanismos de reparo direcionados à homologia. Esse processo requer homologia da sequência de nucleotídeos, usa uma molécula "doadora" para moldar o reparo de uma molécula "alvo" (isto é, a que sofreu a quebra do filamento duplo) e é conhecida como "conversão de gene sem cruzamento" ou "conversão de gene de trato curto", porque leva à transferência de informações genéticas do doador para o alvo. Sem desejar estar vinculado a qualquer teoria em particular, essa transferência pode envolver a correção de incompatibilidade do DNA heteroduplex que se forma entre o alvo quebrado e o doador e/ou "recozimento de cadeia dependente de síntese", no qual o doador é usado para ressintetizar informações genéticas que se tornarão parte do alvo e/ou processos relacionados. Tal HR especializada resulta frequentemente em uma alteração da sequência da molécula alvo, de modo que parte ou toda a sequência do polinucleotídeo doador seja incorporada no polinucleotídeo alvo.

[0067] Nos métodos da divulgação, uma ou mais nucleases

direcionadas, como descrito aqui, criam uma quebra de filamento duplo (DSB) na sequência alvo (por exemplo, cromatina celular) em um sítio predeterminado. A DSB pode resultar em exclusões e/ou inserções por reparo direcionado à homologia ou por mecanismos de reparo não direcionados à homologia. As exclusões podem incluir qualquer número de pares de bases. Da mesma forma, as inserções podem incluir qualquer número de pares de bases, incluindo, por exemplo, integração de um polinucleotídeo "doador", tendo opcionalmente homologia com a sequência de nucleotídeos na região do intervalo. A sequência doadora pode ser fisicamente integrada ou, alternativamente, o polinucleotídeo do doador é usado como um modelo para reparo do intervalo via recombinação homóloga, resultando na introdução de toda ou parte da sequência de nucleotídeos como no doador na cromatina celular. Assim, uma primeira sequência na cromatina celular pode ser alterada e, em certas modalidades, pode ser convertida em uma sequência presente em um polinucleotídeo doador. Assim, o uso dos termos "substituir" ou "substituição" pode ser entendido como representando a substituição de uma sequência de nucleotídeos por outra (ou seja, substituição de uma sequência no sentido informacional) e não requer necessariamente a substituição física ou química de um polinucleotídeo por outro.

[0068] Em qualquer um dos métodos descritos neste documento, pares adicionais de sistemas de proteínas de dedos de zinco, TALENs, TtAgo ou CRISPR/Cas podem ser usados para clivagem de filamento duplo adicional de sítios alvo adicionais dentro da célula.

[0069] Qualquer um dos métodos aqui descritos pode ser usado para inserção de um doador de qualquer tamanho e/ou inativação parcial ou completa de uma ou mais sequências alvo em uma célula por integração direcionada da sequência doadora que interrompe a

expressão do gene (s) de interesse. Linhagens de células com genes parcialmente ou completamente inativados também são fornecidas.

[0070] Em qualquer um dos métodos aqui descritos, a sequência nucleotídica exógena (a "sequência doadora" ou "transgene") pode conter sequências que são homólogas, mas não idênticas, às sequências genômicas na região de interesse, estimulando assim a recombinação homóloga para inserir uma sequência não idêntica na região de interesse. Assim, em certas modalidades, porções da sequência doadora que são homólogas às sequências na região de interesse exibem entre cerca de 80 a 99% (ou qualquer número inteiro entre elas) da identidade de sequência da sequência genômica que é substituída. Em outras modalidades, a homologia entre o doador e a sequência genômica é superior a 99%, por exemplo, se apenas 1 nucleotídeo difere entre as sequências doadora e genômica de mais de 100 pares de bases contíguas. Em certos casos, uma porção não homóloga da sequência doadora pode conter sequências não presentes na região de interesse, de modo que novas sequências sejam introduzidas na região de interesse. Nesses casos, a sequência não homóloga é geralmente flanqueada por sequências de 50-1.000 pares de bases (ou qualquer valor integral entre elas) ou qualquer número de pares de bases maiores que 1.000, que são homólogos ou idênticos às sequências na região de interesse. Em outras modalidades, a sequência doadora não é homóloga à primeira sequência e é inserida no genoma por mecanismos de recombinação não homólogos.

[0071] "Clivagem" refere-se à quebra da estrutura principal covalente de uma molécula de DNA. A clivagem pode ser iniciada por uma variedade de métodos, incluindo, mas não se limitando a, hidrólise enzimática ou química de uma ligação fosfodiéster. Ambas a clivagem de filamento simples e a de filamento duplo são possíveis, e

a clivagem de filamento duplo pode ocorrer como resultado de dois eventos distintos de clivagem de filamento simples. A clivagem do DNA pode resultar na produção de extremidades cegas ou escalonadas. Em certas modalidades, os polipeptídeos de fusão são utilizados para a clivagem de DNA de filamento duplo direcionada.

[0072] Um "meio domínio de clivagem" é uma sequência polipeptídica que, em conjunto com um segundo polipeptídeo (idêntico ou diferente) forma um complexo com atividade de clivagem (de preferência atividade de clivagem de filamento duplo). Os termos "primeiro e segundo meio domínio de clivagem"; "+ e - meios domínios de clivagem" e "meios domínios de clivagem direito e esquerdo" são usados de forma intercambiável para se referir a pares de meios domínios de clivagem que dimerizam.

[0073] Um "meio domínio de clivagem manipulado geneticamente" é um meio domínio de clivagem que foi modificado para formar heterodímeros obrigatórios com outro meio domínio de clivagem (por exemplo, outro meio domínio de clivagem manipulado geneticamente). *Vide* também as Patentes U.S. Nos. 8.623.618; 7.888.121; 7.914.796; e 8.034.598, aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

[0074] O termo "sequência" refere-se a uma sequência de nucleotídeos de qualquer comprimento, que pode ser DNA ou RNA; pode ser linear, circular ou ramificado e pode ser de filamento simples ou duplo. O termo "sequência doadora" refere-se a uma sequência de nucleotídeos que é inserida em um genoma. Uma sequência doadora pode ter qualquer comprimento, por exemplo, entre 2 e 100.000.000 de nucleotídeos de comprimento (ou qualquer valor inteiro entre eles ou acima), de preferência entre cerca de 100 e 100.000 nucleotídeos de comprimento (ou qualquer número inteiro entre eles), mais preferivelmente entre cerca de 2000 e 20.000 nucleotídeos de comprimento (ou qualquer valor entre eles) e ainda mais preferível,

entre cerca de 5 e 15 kb (ou qualquer valor entre eles).

[0075] "Cromatina" é a estrutura de nucleoproteínas que compreende o genoma celular. A cromatina celular compreende ácido nucleico, principalmente DNA e proteína, incluindo histonas e proteínas cromossômicas não histonas. A maioria da cromatina celular eucariótica existe na forma de nucleossomos, em que um núcleo de nucleossomo compreende aproximadamente 150 pares de bases de DNA associados a um octâmero compreendendo dois de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4; e o DNA ligante (de comprimento variável dependendo do organismo) se estende entre os núcleos dos nucleossomos. Uma molécula de histona H1 é geralmente associada ao DNA ligante. Para os fins da presente divulgação, o termo "cromatina" deve abranger todos os tipos de nucleoproteínas celulares, tanto procarióticas quanto eucarióticas. Cromatina celular inclui cromatina cromossômica e epissomal.

[0076] Um "cromossomo" é um complexo de cromatina que compreende todo ou uma parte do genoma de uma célula. O genoma de uma célula é frequentemente caracterizado por seu cariótipo, que é a coleção de todos os cromossomos que compõem o genoma da célula. O genoma de uma célula pode compreender um ou mais cromossomos.

[0077] Um "epissoma" é um ácido nucleico replicador, complexo de nucleoproteínas ou outra estrutura que compreende um ácido nucleico que não faz parte do cariótipo cromossômico de uma célula. Exemplos de epissomas incluem plasmídeos e certos genomas virais.

[0078] Uma "região acessível" é um sítio na cromatina celular, no qual um sítio alvo presente no ácido nucleico pode ser ligado por uma molécula exógena que reconhece o sítio alvo. Sem desejar se vincular a nenhuma teoria em particular, acredita-se que uma região acessível é aquela que não é empacotada em uma estrutura nucleossômica. A

estrutura distinta de uma região acessível pode frequentemente ser detectada por sua sensibilidade a sondas químicas e enzimáticas, por exemplo, nucleases.

[0079] Um "sítio alvo" ou "sequência alvo" é uma sequência de ácido nucleico que define uma porção de um ácido nucleico ao qual uma molécula de ligação se ligará, desde que existam condições suficientes para a ligação. Os sítios alvo podem ter qualquer comprimento, por exemplo, 9 a 20 ou mais nucleotídeos e comprimento e os nucleotídeos ligados podem ser contíguos ou não contíguos.

[0080] Uma molécula "exógena" é uma molécula que normalmente não está presente em uma célula, mas pode ser introduzida na célula por um ou mais métodos genéticos, bioquímicos ou outros. A "presença normal na célula" é determinada em relação ao estágio de desenvolvimento específico e às condições ambientais da célula. Assim, por exemplo, uma molécula que está presente apenas durante o desenvolvimento embrionário do músculo é uma molécula exógena em relação a uma célula muscular adulta. Da mesma forma, uma molécula induzida por choque térmico é uma molécula exógena em relação a uma célula não chocada pelo calor. Uma molécula exógena pode compreender, por exemplo, uma versão funcional de uma molécula endógena com defeito ou uma versão com defeito de uma molécula endógena que funciona normalmente.

[0081] Uma molécula exógena pode ser, entre outras coisas, uma molécula pequena, tal como é gerada por um processo químico combinatório, ou uma macromolécula como uma proteína, ácido nucleico, carboidrato, lipídio, glicoproteína, lipoproteína, polissacarídeo, qualquer modificado derivado das moléculas acima, ou qualquer complexo compreendendo uma ou mais das moléculas acima. Os ácidos nucleicos incluem DNA e RNA, podem ser de

filamento simples ou duplo; pode ser linear, ramificado ou circular; e pode ter qualquer comprimento. Os ácidos nucleicos incluem aqueles capazes de formar duplexes, bem como ácidos nucleicos formadores de triplex. *Vide*, por exemplo, as patentes U.S. Nos. 5.176.996 e 5.422.251. As proteínas incluem, mas não estão limitadas a, proteínas de ligação ao DNA, fatores de transcrição, fatores de remodelação da cromatina, proteínas de ligação ao DNA metiladas, polimerases, metilases, desmetilases, acetilases, desacetilases, cinases, fosfatases, integrações, recombinases, ligases, topoisomerases, girase e helicases.

[0082] Uma molécula exógena pode ser o mesmo tipo de molécula que uma molécula endógena, por exemplo, uma proteína exógena ou ácido nucleico. Por exemplo, um ácido nucleico exógeno pode compreender um genoma viral infectante, um plasmídeo ou epissoma introduzido em uma célula ou um cromossomo que normalmente não está presente na célula. Os métodos para a introdução de moléculas exógenas nas células são conhecidos dos especialistas na técnica e incluem, entre outros, transferência mediada por lipídios (isto é, lipossomas, incluindo lipídios neutros e catiônicos), eletroporação, injeção direta, fusão celular, bombardeio de partículas, coprecipitado de fosfato de cálcio transferência mediada por DEAE-dextrano e transferência mediada por vetor viral. Uma molécula exógena também pode ser o mesmo tipo de molécula que uma molécula endógena, mas derivada de uma espécie diferente da qual a célula é derivada. Por exemplo, uma sequência de ácido nucleico humano pode ser introduzida em uma linhagem de células originalmente derivada de um camundongo ou hamster.

[0083] Por outro lado, uma molécula "endógena" é aquela que está normalmente presente em uma célula específica em um estágio de desenvolvimento específico sob condições ambientais específicas.

Por exemplo, um ácido nucleico endógeno pode compreender um cromossomo, o genoma de uma mitocôndria, cloroplasto ou outra organela ou um ácido nucleico episomal de ocorrência natural. Moléculas endógenas adicionais podem incluir proteínas, por exemplo, fatores de transcrição e enzimas.

[0084] Como aqui utilizado, o termo "produto de um ácido nucleico exógeno" inclui produtos polinucleotídicos e polipeptídicos, por exemplo, produtos de transcrição (polinucleotídeos como RNA) e produtos de tradução (polipeptídeos).

[0085] Uma molécula de "fusão" é uma molécula na qual duas ou mais moléculas de subunidades estão ligadas, de preferência covalentemente. As moléculas da subunidade podem ser do mesmo tipo químico de molécula ou podem ser diferentes tipos químicos de molécula. Exemplos do primeiro tipo de molécula de fusão incluem, mas não estão limitados a, proteínas de fusão (por exemplo, uma fusão entre um domínio de ligação ao DNA de ZFP ou TALE e um ou mais domínios de ativação) e ácidos nucleicos de fusão (por exemplo, um núcleo ácido que codifica a proteína de fusão descrita acima). Exemplos do segundo tipo de molécula de fusão incluem, mas não estão limitados a, uma fusão entre um ácido nucleico formador de triplex e um polipeptídeo e uma fusão entre um aglutinante de sulco menor e um ácido nucleico.

[0086] A expressão de uma proteína de fusão em uma célula pode resultar da entrega da proteína de fusão à célula ou da entrega de um polinucleotídeo que codifica a proteína de fusão para uma célula, em que o polinucleotídeo é transcrito e o transcrito é traduzido, para gerar a proteína de fusão. Trans-emenda, clivagem de polipeptídeos, e ligação de polipeptídeos também podem estar envolvidos na expressão de uma proteína em uma célula. Métodos para entrega de polinucleotídeo e polipeptídeo às células são apresentados em outras

partes desta divulgação.

[0087] Um "gene", para os fins da presente divulgação, inclui uma região de DNA que codifica um produto de gene (*Vide infra*), bem como todas as regiões de DNA que regulam a produção do produto de gene, se tais sequências reguladoras forem ou não adjacentes às sequências codificadoras e/ou transcritas. Por conseguinte, um gene inclui, mas não está limitado a, sequências promotoras, terminadores, sequências reguladoras de tradução, tais como sítios de ligação ao ribossomo e sítios de entrada interna ao ribossomo, intensificadores, silenciadores, isoladores, elementos de contorno, origens de replicação, sítios de fixação de matrizes e regiões de controle de locus.

[0088] "Expressão gênica" refere-se à conversão da informação, contida em um gene, em um produto genético. Um produto genético pode ser o produto transcricional direto de um gene (por exemplo, mRNA, tRNA, rRNA, RNA antissentido, ribozima, RNA estrutural ou qualquer outro tipo de RNA) ou uma proteína produzida pela tradução de um mRNA. Os produtos genéticos também incluem RNAs que são modificados por processos como capeamento, poliadenilação, metilação e edição e proteínas modificadas por, por exemplo, metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, ADP-ribosilação, miristilação e glicosilação.

[0089] "Modulação" da expressão gênica refere-se a uma mudança na atividade de um gene. A modulação da expressão pode incluir, mas não está limitada a, ativação e repressão genética. A edição do genoma (por exemplo, clivagem, alteração, inativação, mutação aleatória) pode ser usada para modular a expressão. A inativação gênica refere-se a qualquer redução na expressão gênica em comparação com uma célula que não inclui um sistema ZFP, TALE, TtAgo ou CRISPR/Cas, conforme descrito aqui. Assim, a

inativação de genes pode ser parcial ou completa.

[0090] Uma "região de interesse" é qualquer região da cromatina celular, como, por exemplo, um gene ou uma sequência não codificadora dentro ou adjacente a um gene, na qual é desejável ligar uma molécula exógena. A ligação pode ser para fins de clivagem de DNA direcionada e/ou recombinação direcionada. Uma região de interesse pode estar presente em um cromossomo, um epissoma, um genoma organelar (por exemplo, mitocondrial, cloroplasto) ou um genoma viral infectante, por exemplo. Uma região de interesse pode estar dentro da região de codificação de um gene, dentro de regiões não codificadoras transcritas, como, por exemplo, sequências líderes, sequências de trailer ou íntrons, ou dentro de regiões não transcritas, a montante ou a jusante da região de codificação. Uma região de interesse pode ser tão pequena quanto um único par de nucleotídeos ou até 2.000 pares de nucleotídeos de comprimento, ou qualquer valor integral de pares de nucleotídeos.

[0091] As células "eucarióticas" incluem, mas não estão limitadas a, células fúngicas (como levedura), células vegetais, células animais, células de mamífero e células humanas (por exemplo, células T), incluindo células-tronco (pluripotentes e multipotentes).

[0092] Uma "célula T efetora" (Teff) é uma célula T CD4⁺ ou CD8⁺ que age imediatamente para um estímulo. Essas células desempenham um papel central na imunidade mediada por células após diferenciação. As células T são ativadas após a estimulação por uma célula apresentadora de antígeno e diferenciam-se em células T efetoras que desempenham funções efetoras críticas, como a produção de moléculas e anticorpos citotóxicos. As células T efetoras migram para o sítio da inflamação (por exemplo, infecção) e produzem quimiocinas para recrutar células imunes adicionais.

[0093] Uma "célula T reguladora" (Treg) também é conhecida

como célula T supressora e é uma subpopulação de células T que modulam o sistema imunológico, mantêm a tolerância a autoantígenos e previnem doenças autoimunes. As Tregs são imunossupressores e geralmente suprimem ou regulam a indução e proliferação de células T efectoras. As Tregs são CD4+, CD25+, CD127lo e FOXP3+.

[0094] O termo "autólogo" refere-se a qualquer material derivado do mesmo indivíduo a quem mais tarde será reintroduzido.

[0095] O termo "alogênico" refere-se a qualquer material derivado de um indivíduo diferente da mesma espécie que o indivíduo a quem o material é introduzido. Dizem que dois ou mais indivíduos são alogênicos entre si quando os genes em um ou mais loci não são idênticos. Em alguns aspectos, o material alogênico de indivíduos da mesma espécie pode ser suficientemente diferente geneticamente para interagir antigênicamente.

[0096] Os termos "ligação operacional" e "operativamente ligado" (ou "operacionalmente ligado") são usados de forma intercambiável com referência a uma justaposição de dois ou mais componentes (como elementos de sequência), nos quais os componentes estão dispostos de modo que ambos os componentes funcionam normalmente e permitem a possibilidade de que pelo menos um dos componentes possa mediar uma função exercida em pelo menos um dos outros componentes. A título ilustrativo, uma sequência reguladora da transcrição, como um promotor, está operacionalmente ligada a uma sequência de codificação se a sequência reguladora da transcrição controlar o nível de transcrição da sequência codificadora em resposta à presença ou ausência de um ou mais fatores reguladores da transcrição. Uma sequência reguladora da transcrição geralmente é operacionalmente ligada em cis com uma sequência de codificação, mas não precisa ser diretamente adjacente a ela. Por exemplo, um intensificador é uma sequência reguladora da transcrição

que está operacionalmente ligada a uma sequência de codificação, mesmo que não sejam contíguas.

[0097] Com relação aos polipeptídeos de fusão, o termo "operacionalmente ligado" pode se referir ao fato de que cada um dos componentes desempenha a mesma função na ligação ao outro componente, como faria se não estivesse tão ligado. Por exemplo, com relação a um polipeptídeo de fusão no qual um domínio de ligação ao DNA de ZFP, TALE, TtAgo ou Cas é fundido a um domínio de ativação, o domínio de ligação ao DNA de ZFP, TALE, TtAgo ou Cas e o domínio de ativação estão em ligação operacional se, no polipeptídeo de fusão, a porção de domínio de ligação ao DNA de ZFP, TALE, TtAgo ou Cas for capaz de se ligar ao seu sítio alvo e/ou seu sítio de ligação, enquanto o domínio de ativação for capaz de regular positivamente a expressão gênica. Quando um polipeptídeo de fusão no qual um domínio de ligação ao DNA de ZFP, TALE, TtAgo ou Cas é fundido a um domínio de clivagem, o domínio de ligação ao DNA de ZFP, TALE, TtAgo ou Cas e o domínio de ligação de DNA e o domínio de clivagem estão em ligação operacional se, na fusão polipeptídeo, a porção de domínio de ligação ao DNA de ZFP, TALE, TtAgo ou Cas é capaz de se ligar ao seu sítio alvo e/ou seu sítio de ligação, enquanto o domínio de clivagem é capaz de clivar o DNA nas proximidades do sítio alvo.

[0098] Um "fragmento funcional" de uma proteína, polipeptídeo ou ácido nucleico é uma proteína, polipeptídeo ou ácido nucleico cuja sequência não é idêntica à proteína, polipeptídeo ou ácido nucleico de comprimento total, mas mantém a mesma função que a proteína de comprimento, polipeptídeo ou ácido nucleico. Um fragmento funcional pode possuir mais, menos ou o mesmo número de resíduos que a molécula nativa correspondente e/ou pode conter uma ou mais substituições de aminoácidos ou nucleotídeos. Os métodos para

determinar a função de um ácido nucleico (por exemplo, função de codificação, capacidade de hibridizar com outro ácido nucleico) são bem conhecidos na técnica. Da mesma forma, métodos para determinar a função da proteína são bem conhecidos. Por exemplo, a função de ligação ao DNA de um polipeptídeo pode ser determinada, por exemplo, por ensaios de ligação ao filtro, troca de mobilidade eletroforética ou imunoprecipitação. A clivagem do DNA pode ser testada por eletroforese em gel. *Vide* Ausubel, *et al.*, *Supra*. A capacidade de uma proteína interagir com outra proteína pode ser determinada, por exemplo, por coimunoprecipitação, ensaios com dois híbridos ou complementação, ambos genéticos e bioquímicos. *Vide*, por exemplo, Fields, *et al.* (1989) *Nature* 340: 245-246; Patente U.S. No. 5.585.245 e Publicação Internacional de Patente No. WO 98/44350.

[0099] Um "vetor" é capaz de transferir sequências de gene para as células alvo. Normalmente, "construto de vetor", "vetor de expressão" e "vetor de transferência de gene" significam qualquer construto de ácido nucleico capaz de direcionar a expressão de um gene de interesse e que pode transferir sequências de gene para as células alvo. Assim, o termo inclui veículos de clonagem e expressão, bem como vetores de integração.

[00100] Os termos "indivíduo" e "paciente" são usados de forma intercambiável e se referem a mamíferos, como pacientes humanos e primatas não humanos, bem como animais experimentais, como coelhos, cães, gatos, camundongos, ratos e outros animais. Por conseguinte, o termo "indivíduo" ou "paciente", tal como aqui utilizado, significa qualquer paciente mamífero ou indivíduo ao qual as nucleases, doadores e/ou células geneticamente modificadas da invenção podem ser administradas. Os indivíduos da presente invenção incluem aqueles com um distúrbio.

[00101] Uma "doença autoimune" é uma doença em que o sistema imunológico está atacando autoantígenos. Exemplos de uma doença autoimune incluem lúpus eritematoso discoide/lúpus eritematoso profundo/lúpus eritematoso chilblain/nefropatia por lúpus eritematoso tumidus, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado ao lúpus eritematoso discroide/lúpus eritematoso profundo/ lúpus eritematoso chilblain/nefropatia de lúpus eritematoso tumidus. Exemplos de autoantígenos associados ao lúpus eritematoso discoide/lúpus eritematoso profundo/lúpus eritematoso chiblain/nefropatia de lúpus eritematoso tumidus incluem, mas não estão limitados a, ANA.

[00102] Em uma modalidade, a doença autoimune é a doença de Hashimoto, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno associado à doença de Hashimoto. Exemplos de autoantígenos associados à doença de Hashimoto incluem, mas não estão limitados a, peroxidase da tireoide e tireoglobulina.

[00103] Em uma modalidade, a doença autoimune é encefalite por NMDAR e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à encefalite por NMDAR. Exemplos de autoantígenos associados à encefalite por NMDAR incluem, mas não estão limitados a, receptor anti-N-metil-D-aspartato (subunidade NR1).

[00104] Em uma modalidade, a doença autoimune é anemia hemolítica autoimune, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à anemia hemolítica autoimune. Exemplos de autoantígenos associados à anemia hemolítica autoimune incluem, mas não estão limitados a, antígenos do grupo sanguíneo Rh e antígeno I.

[00105] Em uma modalidade, a doença autoimune é o pênfigo vulgar, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma

variante ou fragmento do mesmo) associado ao pênfigo vulgar. Exemplos de autoantígenos associados ao pênfigo vulgar incluem, mas não estão limitados a, Dsgl/3.

[00106] Em uma modalidade, a doença autoimune é o penfigoide bolhoso e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado ao penfigoide bolhoso. Exemplos de autoantígenos associados ao penfigoide bolhoso incluem, mas não estão limitados a, BP 180 e BP230.

[00107] Em uma modalidade, a doença autoimune é a Miastenia Gravis, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à Miastenia Gravis. Exemplos de autoantígenos associados à miastenia gravis incluem, mas não estão limitados a, receptores pós-sinápticos nicotínicos de acetilcolina.

[00108] Em uma modalidade, a doença autoimune é a doença de Graves, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à doença de Graves. Exemplos de autoantígenos associados à doença de Graves incluem, mas não estão limitados a, receptores de tireotropina.

[00109] Em uma modalidade, a doença autoimune é a púrpura trombocitopênica idiopática (ITP) e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à púrpura trombocitopênica idiopática (ITP). Exemplos de autoantígenos associados à púrpura trombocitopênica idiopática incluem, mas não estão limitados a, integrina de plaquetas e GpIIb/IIIa.

[00110] Em uma modalidade, a doença autoimune é a síndrome de Goodpasture, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à síndrome de Goodpasture. Exemplos de autoantígenos associados à síndrome de

Goodpasture incluem, mas não estão limitados a, cadeia de colágeno alfa-3 (IV).

[00111] Em uma modalidade, a doença autoimune é a artrite reumatoide, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à artrite reumatoide. Exemplos de autoantígenos associados à artrite reumatoide incluem, mas não estão limitados a, fator reumatoide e calpastatina.

[00112] Em uma modalidade, a doença autoimune é a artrite idiopática juvenil e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associada à artrite idiopática juvenil. Exemplos de autoantígenos associados à artrite idiopática juvenil incluem, mas não estão limitados a, proteínas citrulinadas por RF.

[00113] Em uma modalidade, a doença autoimune é a esclerose múltipla, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à esclerose múltipla. Exemplos de autoantígenos associados à esclerose múltipla incluem, mas não estão limitados a, proteína básica de mielina (MBP), peptídeos de glicoproteína de oligodendrócitos de mielina (MOG) e alfa-beta-cristalina.

[00114] Em uma modalidade, a doença autoimune é doença celíaca, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à doença celíaca. Exemplos de autoantígenos associados à doença celíaca incluem, mas não estão limitados a, transglutaminase tecidual (TG2).

[00115] Em uma modalidade, a doença autoimune é anemia perniciosa, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à anemia perniciosa. Exemplos de autoantígenos associados à anemia perniciosa incluem, mas não estão limitados a, fator intrínseco das células parietais

gástricas.

[00116] Em uma modalidade, a doença autoimune é o vitiligo, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado ao vitiligo. Exemplos de autoantígenos associados ao vitiligo incluem, mas não estão limitados a, antígeno de 65 kDa.

[00117] Em uma modalidade, a doença autoimune é a doença de Behcet e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à doença de Behcet. Exemplos de autoantígenos associados à doença de Behcet incluem, mas não estão limitados a, fosfatidilserina, fosfoproteínas ribossômicas e anticorpo citoplasmático antineutrófilo.

[00118] Em uma modalidade, a doença autoimune é esclerodermia e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à esclerodermia. Exemplos de autoantígenos associados à esclerodermia incluem, mas não estão limitados a, Scl-70, U1-RNP.

[00119] Em uma modalidade, a doença autoimune é a psoríase, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à psoríase. Exemplos de autoantígenos associados à psoríase incluem, mas não estão limitados a, calpastatina.

[00120] Em uma modalidade, a doença autoimune é a colite ulcerosa (UC) e a doença de Crohn, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à doença de UC e Crohn. Exemplos de autoantígenos associados à doença de UC e Crohn incluem, mas não estão limitados a, ANA.

[00121] Em uma modalidade, a doença autoimune é a síndrome de Sjogren, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma

variante ou fragmento do mesmo) associado à síndrome de Sjogren. Exemplos de autoantígenos associados à síndrome de Sjogren incluem, mas não estão limitados a, SSA e anti-SSB.

[00122] Em uma modalidade, a doença autoimune é a granulomatose de Wegener e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à granulomatose de Wegener. Exemplos de autoantígenos associados à granulomatose de Wegener incluem, mas não estão limitados a, ANA e ANCA.

[00123] Em uma modalidade, a doença autoimune é polimiosite ou dermatomiosite, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à polimiosite ou dermatomiosite. Exemplos de autoantígenos associados à polimiosite ou dermatomiosite incluem, mas não estão limitados a, Jo-1.

[00124] Em uma modalidade, a doença autoimune é cirrose biliar primária e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à cirrose biliar primária. Exemplos de autoantígenos associados à cirrose biliar primária incluem, mas não estão limitados a, anticorpos antimitocondriais, gp210, p62, sp 100.

[00125] Em uma modalidade, a doença autoimune é a síndrome antifosfolípideo (APS), e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à síndrome antifosfolípideo. Exemplos de autoantígenos associados à síndrome antifosfolípideo incluem, mas não estão limitados a, anticorpos antifosfolípeos.

[00126] Em uma modalidade, a doença autoimune é uma doença mista do tecido conjuntivo (MCTD) e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à doença mista do tecido conjuntivo. Exemplos de autoantígenos

associados à doença mista do tecido conjuntivo incluem, mas não estão limitados a, UI-RNP, UI-70 kd snRNP.

[00127] Em uma modalidade, a doença autoimune é a síndrome de Miller Fisher, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à síndrome de Miller Fisher. Exemplos de autoantígenos associados à síndrome de Miller Fisher incluem, mas não estão limitados a, gangliosídeo GQIb.

[00128] Em uma modalidade, a doença autoimune é a síndrome de Guillain-Barre, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à síndrome de Guillain-Barre. Exemplos de autoantígenos associados à síndrome de Guillain-Barre incluem, mas não estão limitados a, GM1, asialo GM1 e GD1b.

[00129] Em uma modalidade, a doença autoimune é neuropatia axonal motora aguda, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à neuropatia axonal motora aguda. Exemplos de autoantígenos associados à neuropatia axonal motora aguda incluem, mas não estão limitados a, GM1.

[00130] Em uma modalidade, a doença autoimune é hepatite autoimune, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à hepatite autoimune. Exemplos de autoantígenos associados à hepatite autoimune incluem, mas não estão limitados a, anticorpos antinucleares (ANA) e anticorpos antimúsculo liso (ASMA), anticorpos anti-fígado-rim-microsoma-1 (ALKM-1) e anticorpo anticitosol-1 hepático (ALC-1).

[00131] Em uma modalidade, a doença autoimune é a dermatite herpetiforme, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à dermatite

herpetiforme. Exemplos de autoantígenos associados à dermatite herpetiforme incluem, mas não estão limitados a, anticorpos antiendomísiais IgA.

[00132] Em uma modalidade, a doença autoimune é a síndrome de Churg-Strauss, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à síndrome de Churg-Strauss. Exemplos de autoantígenos associados à síndrome de Churg-Strauss incluem, mas não estão limitados a, anticorpos de citoplasma antineutrófilos (ANCA).

[00133] Em uma modalidade, a doença autoimune é a poliangiíte microscópica e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à poliangiíte microscópica. Exemplos de autoantígenos associados à poliangiíte microscópica incluem, mas não estão limitados a, ANCA.

[00134] Em uma modalidade, a doença autoimune é a vasculite por ANCA e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à vasculite por ANCA. Exemplos de autoantígenos associados à vasculite por ANCA incluem, mas não estão limitados a, proteínas de grânulos de neutrófilos.

[00135] Em uma modalidade, a doença autoimune é febre reumática aguda, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à febre reumática aguda. Exemplos de autoantígenos associados à febre reumática aguda incluem, mas não estão limitados a, antígeno da parede celular estreptocócica.

[00136] Em uma modalidade, a doença autoimune é o diabetes tipo 1 (T1D), e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado ao T1D. Exemplos de autoantígenos associados à T1D incluem, entre outros, insulina (IAA), descarboxilase do ácido glutâmico (GAA ou GAD) e proteína tirosina

fosfatase (IA2 ou ICA512).

[00137] Em uma modalidade, a doença autoimune é a nefropatia membranosa, e o receptor quimérico compreende um autoantígeno (ou uma variante ou fragmento do mesmo) associado à nefropatia membranosa. Exemplos de autoantígenos associados à nefropatia membranosa incluem, mas não estão limitados a, PLA2R1 e THSD7A1.

[00138] "Stemness" refere-se à capacidade relativa de qualquer célula de agir de maneira semelhante a uma célula-tronco, isto é, o grau de toti-, pluri- ou oligopotência e autorrenovação expandida ou indefinida que qualquer célula-tronco em particular pode ter. Um "ACTR" é um Receptor de célula T acoplado a anticorpo que é um componente de célula T manipulado geneticamente capaz de se ligar a um anticorpo fornecido exogenamente. A ligação do anticorpo ao componente ACTR arma a célula T para interagir com o antígeno reconhecido pelo anticorpo e, quando esse antígeno é encontrado, o ACTR que compreende a célula T é acionado para interagir com o antígeno (*Vide*, a Publicação da Patente U.S. No. 2015/0139943).

Moléculas de Fusão

[00139] São descritas aqui composições, por exemplo, nucleases, que são úteis para a clivagem de um gene alvo selecionado (por exemplo, *C/SH*) em uma célula. Em certas modalidades, um ou mais componentes das moléculas de fusão (por exemplo, nucleases) ocorrem naturalmente. Em outras modalidades, um ou mais dos componentes das moléculas de fusão (por exemplo, nucleases) ocorrem de maneira não natural, isto é, manipulados geneticamente nas moléculas de ligação ao DNA e/ou domínio (s) de clivagem. Por exemplo, a porção de ligação ao DNA de uma nuclease de ocorrência natural pode ser alterada para se ligar a um sítio alvo selecionado (por exemplo, um único RNA guia de um sistema CRISPR/Cas ou uma

meganuclease que foi projetada para se ligar a um sítio diferente de o sítio de ligação cognato). Em outras modalidades, a nuclease compreende domínios de ligação a DNA heterólogo e de clivagem (por exemplo, nucleases de dedo de zinco; proteínas de ligação ao DNA do domínio TAL-efetor; domínios de ligação ao DNA de meganuclease com domínios de clivagem heterólogos). Assim, qualquer nuclease pode ser utilizada na prática da presente invenção, incluindo, mas não se limitando a, pelo menos uma ZFN, TALEN, meganuclease, nuclease CRISPR/Cas ou similar, que nucleases que clivam um gene alvo, cuja clivagem resulta em modificação genômica do gene alvo (por exemplo, inserções e/ou deleções no gene clivado).

[00140] Também aqui são descritos métodos para aumentar a especificidade da atividade de clivagem através da titulação independente dos parceiros de meio domínio da clivagem manipulado geneticamente de um complexo de nuclease. Em algumas modalidades, a razão dos dois parceiros (meios domínios de clivagem) é dada em 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8, 1:9, 1:10 ou 1:20, ou qualquer valor entre eles. Em outras modalidades, a razão dos dois parceiros é maior que 1:30. Em outras modalidades, os dois parceiros são implantados em uma razão escolhida para ser diferente de 1:1. Quando utilizados individualmente ou em combinação, os métodos e composições da invenção fornecem aumentos surpreendentes e inesperados na especificidade de direcionamento por meio de reduções na atividade de clivagem fora do alvo. As nucleases usadas nessas modalidades podem compreender ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas, CRISPR/dCas e TtAgo, ou qualquer combinação dos mesmos.

A. Moléculas de ligação ao DNA

[00141] As moléculas de fusão aqui descritas podem incluir qualquer molécula de ligação a DNA (também referida como domínio

de ligação a DNA), incluindo domínios de proteínas e/ou domínios de ligação a DNA de polinucleotídeo. Em certas modalidades, o domínio de ligação ao DNA se liga a uma sequência compreendendo 9 a 12 nucleotídeos contíguos das sequências mostradas na Tabela 2 (SEQ ID NO: 40-47).

[00142] Em certas modalidades, a composição e os métodos aqui descritos empregam um domínio de ligação ao DNA de meganuclease (endonuclease de homing) para ligação à molécula doadora e/ou ligação à região de interesse no genoma da célula. As meganucleases de ocorrência natural reconhecem os sítios de clivagem de 15 a 40 pares de bases e são geralmente agrupadas em quatro famílias: a família LAGLIDADG, a família GIY-YIG, a família box His-Cist e a família HNH. Exemplos de endonucleases de homing incluem I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-Csml, I-PanI, I-SceII, I-Ppol, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII e I-TevIII. Suas sequências de reconhecimento são conhecidas. *Vide* também as patentes U.S. Nos. 5.420.032 e 6.833.252; Belfort, *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon, *et al.* (1989) *Gene* 82:115-118; Perler, *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble, *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast, *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 e o catálogo New England Biolabs. Além disso, a especificidade de ligação ao DNA de meganucleases e endonucleases de homing pode ser modificada para ligar sítios alvo não naturais. *Vide*, por exemplo, Chevalier, *et al.* (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat, *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth, *et al.* (2006) *Nature* 441:656-659; Paques, *et al.* (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; e Publicação de Patente U.S. No. 2007/0117128. Os domínios de ligação ao DNA das meganucleases e endonucleases de homing podem ser alterados no contexto da nuclease como um todo (isto é, de modo que a nuclease inclua o

domínio de clivagem cognato) ou possa ser fundida a um domínio de clivagem heterólogo.

[00143] Em outras modalidades, o domínio de ligação ao DNA de uma ou mais das nucleases usadas nos métodos e composições aqui descritos compreende um domínio de ligação ao DNA efetor de TAL de ocorrência natural ou manipulado geneticamente (de não ocorrência natural). *Vide*, por exemplo, a Patente U.S. No. 8.586.526, incorporada por referência na sua totalidade aqui. Sabe-se que as bactérias patogênicas de plantas do gênero *Xanthomonas* causam muitas doenças em plantas importantes. A patogenicidade de *Xanthomonas* depende de um sistema de secreção conservada de tipo III (T3S) que injeta mais de 25 proteínas efetoras diferentes na célula da planta. Entre essas proteínas injetadas estão efetores do tipo ativador de transcrição (TAL) que imitam ativadores de transcrição de plantas e manipulam o transcriptoma da planta (*Vide* Kay, *et al.* (2007) *Science* 318: 648-651). Essas proteínas contêm um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ativação transcricional. Um dos efetores TAL mais bem caracterizados é o AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (*Vide* Bonas, *et al.* (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136 e Publicação de Patente Internacional No. WO 2010/079430). Os efetores de TAL contêm um domínio centralizado de repetições em tandem, cada repetição contendo aproximadamente 34 aminoácidos, que são essenciais para a especificidade de ligação ao DNA dessas proteínas. Além disso, eles contêm uma sequência de localização nuclear e um domínio de ativação transcricional ácido (para uma revisão, *Vide* Schornack S, *et al.* (2006) *J Plant Physiol* 163 (3): 256-272). Além disso, nas bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* foram encontrados dois genes, manipulados geneticamente brg11 e hpx17, que são homólogos da família AvrBs3 de *Xanthomonas* na cepa Gvar1 de *R. solanacearum* biovar 1 e na

cepa RS4000 de biovar 4 (*Vide* Heuer *et al.* (2007) *Appl and Envir Micro* 73 (13): 4379-4384). Esses genes são 98,9% idênticos na sequência nucleotídica um do outro, mas diferem por uma deleção de 1.575 pb no domínio de repetição da hpx17. No entanto, ambos os produtos gênicos têm menos de 40% de identidade de sequência com as proteínas da família AvrBs3 de *Xanthomonas*. *Vide*, por exemplo, a Patente U.S. No. 8.586.526, incorporada por referência na sua totalidade aqui.

[00144] A especificidade desses efetores TAL depende das sequências encontradas nas repetições em tandem. A sequência repetida compreende aproximadamente 102 pb e as repetições são tipicamente 91-100% homólogas uma com a outra (Bonas, *et al.*, *Ibid*). O polimorfismo das repetições geralmente está localizado nas posições 12 e 13 e parece haver uma correspondência individual entre a identidade dos diretórios hipervariáveis (RVD) nas posições 12 e 13 com a identidade dos nucleotídeos contíguos na sequência alvo do efector de TAL (*Vide* Moscou e Bogdanove, (2009) *Science* 326: 1501 e Boch, *et al.* (2009) *Science* 326: 1509-1512). Experimentalmente, o código natural para o reconhecimento de DNA desses efetores de TAL foi determinado de tal modo que uma sequência de HD nas posições 12 e 13 leva a uma ligação à citosina (C), o NG se liga a T, NI a A, C, G ou T, NN se liga a A ou G, e ING se liga a T. Essas repetições de ligação ao DNA foram reunidas em proteínas com novas combinações e números de repetições, para criar fatores de transcrição artificiais capazes de interagir com novas sequências e ativar a expressão de um gene repórter não endógeno em células vegetais (Boch, *et al.*, *ibid*). As proteínas TAL manipuladas geneticamente foram ligadas a um meio domínio de clivagem *FokI* para produzir uma fusão de nuclease de domínio efector de TAL (TALEN). *Vide*, por exemplo, Patente U.S. No. 8.586.526; Christian *et al.* (2010) *Genetics* 186 (2):

757-61 epub 10.1534/genetics.110.120717. Em certas modalidades, o domínio TALE compreende uma extremidade N e/ou extremidade C, conforme descrito na Patente U.S. No. 8.586.526.

[00145] Em certas modalidades, o domínio de ligação ao DNA de uma ou mais das nucleases usadas para clivagem *in vivo* e/ou clivagem direcionada do genoma de uma célula compreende uma proteína de dedo de zinco. De preferência, a proteína de dedo de zinco não ocorre naturalmente, pois é projetada para se ligar a um sítio alvo de escolha. *Vide*, por exemplo, *Vide*, por exemplo, Beerli, *et al.* (2002) *Nature Biotechnol.* 20: 135-141; Pabo *et al.* (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70: 313-340; Isalan *et al.* (2001) *Nature Biotechnol.* 19: 656-660; Segal *et al.* (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 632-637; Choo *et al.* (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 411-416; Patentes U.S. Nos. 6.453.242; 6.534.261; 6.599.692; 6.503.717; 6.689.558; 7.030.215; 6.794.136; 7.067.317; 7.262.054; 7.070.934; 7.361.635; 7.253.273; e Publicações de Patentes U.S. Nos. 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061, todos aqui incorporados por referência em sua totalidade.

[00146] Um domínio de ligação de dedo de zinco manipulado geneticamente pode ter uma nova especificidade de ligação, em comparação com uma proteína de dedo de zinco de ocorrência natural. Os métodos de manipulação genética incluem, entre outros, projeto racional e vários tipos de seleção. O projeto racional inclui, por exemplo, o uso de bancos de dados compreendendo sequências de nucleotídeos tripletos (ou quádruplos) e sequências individuais de aminoácidos de dedos de zinco, nas quais cada sequência de nucleotídeos tripla ou quádrupla está associada a uma ou mais sequências de aminoácidos de dedos de zinco que se ligam ao tripleto ou sequência quádrupla. *Vide*, por exemplo, as patentes U.S. Nos. 6.453.242 e 6.534.261, incorporadas por referência aqui em sua

totalidade.

[00147] Métodos de seleção exemplares, incluindo exibição de fagos e sistemas de dois híbridos, são divulgados nas Patentes US Nos. 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.410.248; 6.140.466; 6.200.759; e 6.242.568; bem como as Publicações Internacionais de Patentes Nos. WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197; e Patente GB No. 2.338.237. Além disso, a melhoria da especificidade de ligação para domínios de ligação de dedo de zinco foi descrita, por exemplo, na Publicação Internacional de Patente de Copropriedade No. WO 02/077227.

[00148] Além disso, como divulgado nesta e em outras referências, domínios de dedo de zinco e/ou proteínas de dedo de zinco com vários dedos podem ser ligados entre si usando quaisquer sequências de ligação adequadas, incluindo, por exemplo, ligantes de 5 ou mais aminoácidos de comprimento. *Vide* também as patentes U.S. Nos. 6.479.626; 6.903.185; e 7.153.949 para sequências de ligantes exemplares 6 ou mais aminoácidos de comprimento. As proteínas aqui descritas podem incluir qualquer combinação de ligantes adequados entre os dedos de zinco individuais da proteína.

[00149] Uma ZFP pode ser operacionalmente associada (ligada) a um ou mais domínios de nuclease (clivagem) para formar uma ZFN. O termo "uma ZFN" inclui um par de ZFNs que dimerizam para clivar o gene alvo. Métodos e composição os íons também podem ser usados para aumentar a especificidade de uma ZFN, incluindo um par de nucleases, para o seu alvo pretendido em relação a outros sítios de clivagem não intencionais, conhecidos como sítios fora do alvo (*Vide*, a Publicação de Patente U.S. 20180087072). Assim, as nucleases aqui descritas podem compreender mutações em uma ou mais de suas regiões da estrutura principal do domínio de ligação ao DNA e/ou uma ou mais mutações nos seus domínios de clivagem da nuclease.

Essas nucleases podem incluir mutações no aminoácido no domínio de ligação ao DNA de ZFP ('estrutura principal da ZFP') que podem interagir não especificamente com fosfatos na estrutura principal do DNA, mas não compreendem alterações nas hélices de reconhecimento do DNA. Assim, a invenção inclui mutações de resíduos de aminoácidos catiônicos na estrutura principal de ZFP que não são necessárias para a especificidade do alvo nucleotídico. Em algumas modalidades, essas mutações na estrutura principal de ZFP compreendem a mutação de um resíduo de aminoácido catiônico em um resíduo de aminoácido neutro ou aniônico. Em algumas modalidades, essas mutações na estrutura principal de ZFP compreendem a mutação de um resíduo de aminoácido polar em um resíduo de aminoácido neutro ou não polar. Em modalidades preferidas, as mutações são feitas na posição (-5), (-9) e/ou na posição (-14) em relação à hélice de ligação ao DNA. Em algumas modalidades, um dedo de zinco pode compreender uma ou mais mutações em (-5), (-9) e/ou (-14). Em outras modalidades, um ou mais dedos de zinco em uma proteína de dedo de zinco de vários dedos podem compreender mutações em (-5), (-9) e/ou (-14). Em algumas modalidades, os aminoácidos em (-5), (-9) e/ou (-14) (por exemplo, uma arginina (R) ou lisina (K)) são mutados para uma alanina (A), leucina (L), Ser (S), Asp (N), Glu (E), Tyr (Y) e/ou glutamina (Q).

[00150] Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao DNA (por exemplo, ZFP, TALE, sgRNA, etc.) tem como alvo um gene *CISH*. Em certas modalidades, o domínio de ligação ao DNA tem como alvo uma região exônica do gene *CISH*, por exemplo, éxon 2 ou éxon 3.

[00151] Seleção de sítios alvo (por exemplo, dentro de um íntron e/ou éxon de um gene *CISH*); ZFPs e métodos para o projeto e construção de proteínas de fusão (e polinucleotídeos que as codificam) são conhecidos dos especialistas na técnica e descritos em

detalhes nas Patentes U.S. Nos. 6.140.081; 5.789.538; 6.453.242; 6.534.261; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.200.759; e Publicações de Patentes Internacionais Nos. WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536; e WO 03/016496.

[00152] Além disso, conforme divulgado nestas e em outras referências, os domínios de dedo de zinco e/ou proteínas de dedo de zinco com vários dedos podem ser ligados entre si usando quaisquer sequências de ligação adequadas, incluindo, por exemplo, ligantes de 5 ou mais aminoácidos de comprimento. *Vide* também as patentes U.S. No. 6.479.626; 6.903.185; e 7.153.949 para sequências de ligantes exemplares 6 ou mais aminoácidos de comprimento. As proteínas aqui descritas podem incluir qualquer combinação de ligantes adequados entre os dedos de zinco individuais da proteína.

[00153] Em certas modalidades, a molécula de ligação ao DNA faz parte de um sistema de nuclease CRISPR/Cas. *Vide*, por exemplo, Patente U.S. No. 8.697.359 e Publicação de Patente U.S. No. 2015/0056705. O locus CRISPR (repetições palindrômicas curtas, regularmente espaçadas entre si), que codifica os componentes de RNA do sistema, e o locus cas (associado ao CRISPR), que codifica proteínas (Jansen, *et al.* (2002) *Mol. Microbiol.* 43: 1565-1575; Makarova, *et al.* (2002) *Nucleic Acids Res.* 30: 482-496; Makarova, *et al.* (2006). *Biol. Direct* 1:7; Haft, *et al.* (2005) *PLoS Comput. Biol.* 1:e60) formam as sequências gênicas do sistema de nuclease CRISPR/Cas. Os loci de CRISPR em hospedeiros microbianos contêm uma combinação de genes (Cas) associados a CRISPR, bem como elementos de RNA não codificadores capazes de programar a especificidade da clivagem de ácido nucleico mediada por CRISPR.

[00154] O CRISPR Tipo II é um dos sistemas mais bem

caracterizados e realiza a quebra de filamento duplo do DNA direcionado em quatro etapas sequenciais. Primeiro, dois RNA não codificadores, a matriz pré-crRNA e tracrRNA, são transcritos a partir do locus CRISPR. Segundo, o tracrRNA hibrida com as regiões repetidas do pré-crRNA e medeia o processamento do pré-crRNA em crRNAs maduros contendo sequências espaçadoras individuais. Em terceiro lugar, o complexo crRNA:tracrRNA maduro direciona Cas9 para o DNA alvo por meio de pareamento de base Watson-Crick entre o espaçador no crRNA e o protoespaçador no DNA alvo próximo ao motivo adjacente ao protoespaçador (PAM), um requisito adicional para o reconhecimento do alvo. Finalmente, Cas9 medeia a clivagem do DNA alvo para criar uma quebra de filamento duplo no protoespaçador. A atividade do sistema CRISPR/Cas compreende três etapas: (i) inserção de sequências de DNA alien no arranjo CRISPR para evitar ataques futuros, em um processo chamado 'adaptação', (ii) expressão das proteínas relevantes, bem como expressão e processamento da matriz, seguido por (iii) interferência mediada por RNA com o ácido nucleico alien. Assim, na célula bacteriana, vários das chamadas proteínas 'Cas' estão envolvidas com a função natural do sistema CRISPR/Cas e desempenham papel em funções como a inserção do DNA alien etc.

[00155] Em certas modalidades, a proteína Cas pode ser um "derivado funcional" de uma proteína Cas que ocorre naturalmente. Um "derivado funcional" de um polipeptídeo de sequência nativa é um composto que possui uma propriedade biológica qualitativa em comum com um polipeptídeo de sequência nativa. "Derivados funcionais" incluem, mas não estão limitados a, fragmentos de uma sequência nativa e derivados de um polipeptídeo de sequência nativa e seus fragmentos, desde que tenham uma atividade biológica em comum com um polipeptídeo de sequência nativa correspondente. Uma

atividade biológica aqui contemplada é a capacidade do derivado funcional de hidrolisar um substrato de DNA em fragmentos. O termo "derivado" abrange as variantes da sequência de aminoácidos do polipeptídeo, modificações covalentes e fusões da mesma. Os derivados adequados de um polipeptídeo Cas ou um fragmento do mesmo incluem, mas não estão limitados a, mutantes, fusões, modificações covalentes da proteína Cas ou um fragmento da mesma. A proteína Cas, que inclui a proteína Cas ou um fragmento da mesma, bem como derivados da proteína Cas ou um fragmento da mesma, pode ser obtida a partir de uma célula ou sintetizada quimicamente ou por uma combinação desses dois procedimentos. A célula pode ser uma célula que produz naturalmente proteína Cas ou uma célula que produz naturalmente proteína Cas e é geneticamente modificada para produzir a proteína Cas endógena em um nível de expressão mais alto ou produzir uma proteína Cas a partir de um ácido nucleico introduzido exogenamente, cujo ácido nucleico codifica um Cas que é igual ou diferente da Cas endógena. Em alguns casos, a célula não produz naturalmente proteína Cas e é geneticamente modificada para produzir uma proteína Cas. Em algumas modalidades, a proteína Cas é um ortólogo de Cas9 pequeno para entrega via um vetor de AAV (Ran, *et al.* (2015) *Nature* 510: 186).

[00156] Em algumas modalidades, a molécula de ligação ao DNA faz parte de um sistema TtAgo (*Vide Swarts et al., Ibid; Sheng et al., Ibid*). Nos eucariotos, o silenciamento de genes é mediado pela família de proteínas Argonaute (Ago). Nesse paradigma, Ago está ligado a pequenos RNAs (19-31 nt). Este complexo de silenciamento de proteína-RNA reconhece RNAs alvo via emparelhamento de base Watson-Crick entre o RNA pequeno e o alvo e cliva endonucleoliticamente o RNA alvo (Vogel (2014) *Science* 344: 972-973). Em contraste, as proteínas Ago procarióticas se ligam a

pequenos fragmentos de DNA de filamento simples e provavelmente funcionam para detectar e remover DNA alien (geralmente viral) (Yuan, *et al.* (2005) *Mol. Cell* 19, 405; Olovnikov, *et al.* (2013) *Mol. Cell* 51: 594; Swarts *et al.*, *Ibid*). Exemplos de proteínas Ago procarióticas incluem as de *Aquifex aeolicus*, *Rhodobacter sphaeroides* e *Thermus thermophilus*.

[00157] Uma das proteínas Ago procarióticas mais bem caracterizadas é a de *T. thermophilus* (TtAgo; Swarts, *et al.*, *Ibid*). O TtAgo se associa a fragmentos de DNA de filamento simples de 15 ou 13 a 25 nt com grupos fosfato 5'. Esse "DNA guia" ligado pelo TtAgo serve para direcionar o complexo proteína-DNA para ligar uma sequência de DNA complementar Watson-Crick em uma molécula de DNA de terceiros. Uma vez que a informação da sequência nesses DNAs guia permitiu a identificação do DNA alvo, o complexo de DNA guia – TtAgo cliva o DNA alvo. Esse mecanismo também é suportado pela estrutura do complexo de DNA guia - TtAgo, enquanto ligado ao seu DNA alvo (G. Sheng, *et al.*, *Ibid*). Atrás de *Rhodobacter sphaeroides* (RsAgo) tem propriedades semelhantes (Olovnikov, *et al.*, *Ibid*).

[00158] Os DNAs guia exógenos de sequência de DNA arbitrário podem ser carregados na proteína TtAgo (Swarts *et al.*, *Ibid*.). Como a especificidade da clivagem de TtAgo é direcionada pelo DNA guia, um complexo TtAgo-DNA formado com um DNA guia especificado pelo investigador exógeno direcionará, portanto, a clivagem do DNA alvo do TtAgo para um DNA alvo especificado pelo investigador complementar. Dessa maneira, pode-se criar uma quebra de filamento duplo direcionada no DNA. O uso do sistema de DNA TtAgo-guide (ou sistemas ortólogos de DNA guia - Ago de outros organismos) permite a clivagem direcionada do DNA genômico nas células. Essa clivagem pode ser de filamento simples ou duplo. Para a clivagem do DNA

genômico de mamíferos, seria preferível o uso de uma versão do códon TtAgo otimizada para expressão em células de mamíferos. Além disso, pode ser preferível tratar células com um complexo TtAgo-DNA formado *in vitro* onde a proteína TtAgo é fundida com um peptídeo que penetra nas células. Além disso, pode ser preferível usar uma versão da proteína TtAgo que foi alterada por mutagênese para melhorar a atividade a 37 graus Celsius. A clivagem de DNA mediada por Ago-RNA pode ser usada para afetar uma panóplia de resultados, incluindo knock-out de genes, adição de genes direcionados, correção de genes, exclusão de genes direcionados usando técnicas padrão na técnica para exploração de quebras de DNA.

[00159] Assim, a nuclease compreende uma molécula de ligação ao DNA que se liga especificamente a um sítio alvo em qualquer gene no qual se deseja inserir um doador (transgene).

B. Domínios de Clivagem

[00160] Qualquer domínio de clivagem adequado pode ser operacionalmente ligado a um domínio de ligação ao DNA para formar uma nuclease. Por exemplo, os domínios de ligação ao DNA de ZFP foram fundidos aos domínios da nuclease para criar ZFNs - uma entidade funcional que é capaz de reconhecer seu alvo de ácido nucleico pretendido através do seu domínio de ligação ao DNA manipulado geneticamente (ZFP) e fazer com que o DNA seja cortado próximo ao sítio de ligação de ZFP via atividade da nuclease, inclusive para uso na modificação do genoma em uma variedade de organismos. *Vide*, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 7.888.121; 8.623.618; 7.888.121; 7.914.796; e 8.034.598; e Publicação de Patente U.S. No. 2011/0201055. Da mesma forma, os domínios de ligação ao DNA da TALE foram fundidos aos domínios da nuclease para criar os TALENs. *Vide*, por exemplo, Patente U.S. No. 8.586.526.

[00161] Como observado acima, o domínio de clivagem pode ser

heterólogo ao domínio de ligação ao DNA, por exemplo, um domínio de ligação ao DNA do dedo de zinco e um domínio de clivagem a partir de uma nuclease ou domínio de ligação ao DNA de TALEN e um domínio de clivagem, ou domínio de ligação ao DNA de meganuclease e domínio de clivagem a partir de uma nuclease diferente. Domínios de clivagem heterólogos podem ser obtidos a partir de qualquer endonuclease ou exonuclease. Endonucleases exemplares das quais um domínio de clivagem pode ser derivado incluem, mas não estão limitadas a, endonucleases de restrição e endonucleases de homing. São conhecidas enzimas adicionais que clivam o DNA (por exemplo, Nuclease S1; nuclease de feijão-mungo; DNase I pancreática; nuclease microcócica; endonuclease HO de levedura. Uma ou mais dessas enzimas (ou fragmentos funcionais) podem ser usadas como fonte de domínios de clivagem e meio domínio de clivagem.

[00162] Da mesma forma, um meio domínio de clivagem pode ser derivado de qualquer nuclease ou porção da mesma, como estabelecido acima, que requer dimerização para a atividade de clivagem. Em geral, são necessárias duas proteínas de fusão para a clivagem se as proteínas de fusão compreenderem meios domínios de clivagem. Alternativamente, pode ser utilizada uma única proteína compreendendo dois meios domínios de clivagem. Os dois meios domínios de clivagem podem ser derivados da mesma endonuclease (ou seus fragmentos funcionais) ou cada meio domínio de clivagem pode ser derivado de uma endonuclease diferente (ou seus fragmentos funcionais). Além disso, os sítios alvo para as duas proteínas de fusão são preferivelmente dispostos, um em relação ao outro, de modo que a ligação das duas proteínas de fusão aos seus respectivos sítios alvo coloca os meios domínios de clivagem em uma orientação espacial um para o outro, permitindo que o meio domínio de clivagem forme um domínio de clivagem funcional, por exemplo,

por dimerização. Assim, em certas modalidades, as bordas próximas dos sítios alvo são separadas por 5-8 nucleotídeos ou por 15-18 nucleotídeos. No entanto, qualquer número integral de nucleotídeos ou pares de nucleotídeos pode intervir entre dois sítios alvo (por exemplo, de 2 a 50 pares de nucleotídeos ou mais). Em geral, o sítio da clivagem fica entre os sítios alvo.

[00163] As endonucleases de restrição (enzimas de restrição) estão presentes em muitas espécies e são capazes de ligação específica a sequências de DNA (em um sítio de reconhecimento) e clivagem de DNA no sítio de ligação ou próximo a ele. Certas enzimas de restrição (por exemplo, Tipo IIS) clivam o DNA em sítios removidos do sítio de reconhecimento e têm domínios de ligação e clivagem separáveis. Por exemplo, a enzima *FokI* do tipo IIS catalisa a clivagem de filamento duplo do DNA em 9 nucleotídeos do seu sítio de reconhecimento em um filamento e 13 nucleotídeos do seu sítio de reconhecimento no outro. *Vide*, por exemplo, as patentes U.S. Nos. 5.356.802; 5.436.150; e 5.487.994; assim como Li, *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4275-4279; Li *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2764-2768; Kim *et al.* (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 91: 883-887; Kim *et al.* (1994b) *J. Biol. Chem.* 269: 31,978-31,982. Assim, em uma modalidade, as proteínas de fusão compreendem o domínio de clivagem (ou meio domínio de clivagem) de pelo menos uma enzima de restrição Tipo IIS e um ou mais domínios de ligação de dedo de zinco, que podem ou não ser manipulados geneticamente.

[00164] Uma enzima de restrição do tipo IIS exemplar, cujo domínio de clivagem é separável do domínio de ligação, é *FokI*. Esta enzima específica é ativa como um dímero. Bitinaite *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10,570-10,575. Por conseguinte, para os fins da presente divulgação, a porção da enzima *FokI* usada nas proteínas de fusão divulgadas é considerada um meio domínio de clivagem. Assim,

para clivagem de filamento duplo direcionada e/ou substituição direcionada de sequências celulares usando fusões de dedo de zinco-*FokI*, duas proteínas de fusão, cada uma compreendendo um meio domínio de clivagem de *FokI*, podem ser usadas para reconstituir um domínio de clivagem cataliticamente ativo. Alternativamente, uma única molécula polipeptídica contendo um domínio de ligação ao dedo de zinco e dois meios domínios de clivagem *FokI* também podem ser utilizados. Parâmetros para clivagem direcionada e alteração de sequência direcionada usando fusões de dedo de zinco-*FokI* são fornecidos em outras partes desta divulgação.

[00165] Um domínio de clivagem ou meio domínio de clivagem pode ser qualquer porção de uma proteína que retenha a atividade de clivagem ou que retenha a capacidade de multimerizar (por exemplo, dimerizar) para formar um domínio de clivagem funcional.

[00166] As enzimas de restrição do tipo IIS exemplares são descritas na Publicação de Patente Internacional No. WO 07/014275, aqui incorporada na sua totalidade. Enzimas de restrição adicionais também contêm domínios de ligação e clivagem separáveis, e estes são contemplados pela presente divulgação. *Vide*, por exemplo, Roberts, *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31: 418-420.

[00167] Em certas modalidades, o domínio de clivagem compreende um ou mais meios domínios de clivagem manipulados geneticamente (também referidos como mutantes de domínio de dimerização) que minimizam ou impedem a homodimerização, como descrito, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 8.623.618; 7.888.121; 7.914.796; e 8.034.598; e Publicação de Patente U.S. No. 2011/0201055, cujas divulgações são todas incorporadas por referência em sua totalidade aqui. Os resíduos de aminoácidos nas posições 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537 e 538 da *FokI* são todos alvos para influenciar a

dimerização do meio domínio de clivagem de *FokI*.

[00168] Em certas modalidades, os meios domínios de clivagem manipulados geneticamente são derivados de *FokI* e compreendem uma ou mais mutações em um ou mais dos resíduos de aminoácidos 416, 422, 447, 448 e/ou 525 (*Vide*, por exemplo, Publicação de Patente U.S. 2018/0087072) numerado em relação a *FokI* de comprimento total do tipo selvagem, como mostrado abaixo:

Meio domínio de clivagem *FokI* do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1)

```
QLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFF
MKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPI
GQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFK
GNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRKFN
NGEINF
```

Essas mutações diminuem a interação inespecífica entre o domínio *FokI* e uma molécula de DNA. Em outras modalidades, os meios domínios de clivagem derivados de *FokI* compreendem uma mutação em um ou mais dos resíduos de aminoácidos 414-426, 443-450, 467-488, 501-502 e/ou 521-531. As mutações podem incluir mutações em resíduos encontrados em enzimas de restrição naturais homólogas a *FokI*. Em certas modalidades, as mutações são substituições, por exemplo, substituição do resíduo de tipo selvagem por um aminoácido diferente, por exemplo serina (S), por exemplo R416S ou K525S. Em uma modalidade preferida, a mutação nas posições 416, 422, 447, 448 e/ou 525 compreende a substituição de um aminoácido carregado positivamente por um aminoácido não carregado ou carregado negativamente. Em outra modalidade, o meio domínio de clivagem manipulado geneticamente compreende mutações nos resíduos de aminoácidos 499, 496 e 486, além das mutações em um ou mais resíduos de aminoácidos 416, 422, 447, 448 ou 525. Em uma modalidade preferida, a invenção fornece proteínas de fusão em que o

meio domínio de clivagem manipulado geneticamente compreende um polipeptídeo no qual o resíduo Gln (Q) do tipo selvagem na posição 486 é substituído por um resíduo Glu (E), o resíduo Ile (I) do tipo selvagem na posição 499 é substituído por um resíduo Leu (L) e o resíduo Asn (N) do tipo selvagem na posição 496 é substituído por um resíduo Asp (D) ou Glu (E) ("ELD" ou "ELE") além de um ou mais mutações nas posições 416, 422, 447, 448 ou 525.

[00169] Domínios de clivagem com mais de uma mutação podem ser usados, por exemplo, mutações nas posições 490 (E → K) e 538 (I → K) em um meio domínio de clivagem para produzir um meio domínio de clivagem manipulado geneticamente designado "E490K:I538K" e mutando posições 486 (Q → E) e 499 (I → L) em outro meio domínio de clivagem para produzir um meio domínio de clivagem manipulado geneticamente designado "Q486E:I499L"; mutações que substituem o resíduo Gln (Q) do tipo selvagem na posição 486 por um resíduo Glu (E), o resíduo Iso (I) do tipo selvagem na posição 499 por um resíduo Leu (L) e o resíduo Asn (N) do tipo selvagem na posição 496 com um resíduo Asp (D) ou Glu (E) (também conhecido como domínios "ELD" e "ELE", respectivamente); meio domínio de clivagem manipulado geneticamente que compreende mutações nas posições 490, 538 e 537 (numeradas em relação a *FokI* do tipo selvagem), por exemplo, mutações que substituem o resíduo Glu (E) do tipo selvagem na posição 490 por um resíduo Lys (K), o resíduo Iso (I) do tipo selvagem na posição 538 por um resíduo Lys (K), e o resíduo His (H) do tipo selvagem na posição 537 por um resíduo Lys (K) ou um resíduo Arg (R) (também conhecido como "domínios KKK" e "KKR", respectivamente); e/ou meio domínio de clivagem manipulado geneticamente que compreende mutações nas posições 490 e 537 (numeradas em relação a *FokI* do tipo selvagem), por exemplo, mutações que substituem o resíduo Glu (E) do tipo

selvagem na posição 490 por um resíduo Lys (K), e o resíduo His (H) do tipo selvagem na posição 537 por um resíduo Lys (K) ou um resíduo Arg (R) (também conhecido como domínios "KIK" e "KIR", respectivamente). *Vide*, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 7,914,796; 8.034.598; e 8.623.618, cujas divulgações são incorporadas por referência na sua totalidade para todos os fins. Em outras modalidades, o meio domínio de clivagem manipulado geneticamente compreende o "Sharkey" e/ou mutações "Sharkey" (*Vide* Guo, *et al.* (2010) *J. Mol. Biol.* 400 (1): 96-107).

[00170] Alternativamente, as nucleases podem ser montadas *in vivo* no sítio alvo do ácido nucleico usando a chamada tecnologia de "enzima dividida" (*Vide*, por exemplo, Publicação de Patente U.S. No. 2009/0068164). Os componentes de tais enzimas divididas podem ser expressos em construtos de expressão separados ou podem ser ligados em um quadro de leitura aberto, onde os componentes individuais são separados, por exemplo, por um peptídeo 2A autoclivável ou sequência IRES. Os componentes podem ser domínios de ligação de dedo de zinco individuais ou domínios de um domínio de ligação de ácido nucleico de meganuclease.

[00171] As nucleases podem ser rastreadas quanto à atividade antes do uso, por exemplo, em um sistema cromossômico à base de levedura, como descrito na Patente U.S. No. 8.563.314.

[00172] O sistema CRISPR/Cas relacionado a Cas9 compreende dois componentes não codificadores de RNA: tracrRNA e uma matriz de pré-crRNA contendo sequências guia de nuclease (espaçadores) intercaladas por repetições diretas idênticas (DRs). Para usar um sistema CRISPR/Cas para realizar a manipulação genética do genoma, ambas as funções desses RNAs devem estar presentes (*Vide* Cong, *et al.* (2013) *Scienceexpress* 1/10.1126/science 1231143). Em algumas modalidades, o tracrRNA e os pré-crRNAs são fornecidos

via construtos de expressão separados ou como RNAs separados. Em outras modalidades, um RNA quimérico é construído onde um crRNA maduro manipulado geneticamente (conferindo especificidade ao alvo) é fundido a um tracrRNA (fornecendo interação com o Cas9) para criar um híbrido quimérico de cr-RNA-tracrRNA (também denominado RNA guia único). (*Vide* Jinek, *et al.* (2012) *Science* 337: 816-821; Jinek, *et al.* (2013) *eLife* 2:e00471. DOI: 10.7554/eLife.00471 e Cong, *ibid*).

[00173] Em algumas modalidades, o sistema CRISPR-Cpf1 é usado. O sistema CRISPR-Cpf1, identificado em *Francisella* spp, é um sistema CRISPR-Cas de classe 2 que medeia a interferência robusta do DNA nas células humanas. Embora funcionalmente conservados, Cpf1 e Cas9 diferem em muitos aspectos, incluindo em seus RNAs guia e especificidade de substrato (*Vide* Fagerlund, *et al.* (2015) *Genom Bio* 16: 251). Uma grande diferença entre as proteínas Cas9 e Cpf1 é que Cpf1 não utiliza tracrRNA e, portanto, requer apenas um crRNA. Os crRNAs de FnCpf1 têm 42 a 44 nucleotídeos de comprimento (repetição de 19 nucleotídeos e espaçador de 23 a 25 nucleotídeos) e contêm um único stem-loop, que tolera alterações na sequência que retêm a estrutura secundária. Além disso, os crRNAs de Cpf1 são significativamente mais curtos que os sgRNAs manipulados geneticamente de ~100 nucleotídeos exigidos por Cas9, e os requisitos de PAM para FnCpf1 são 5'-TTN-3' e 5'-CTA-3' no filamento deslocado. Embora Cas9 e Cpf1 façam quebras de filamento duplo no DNA alvo, Cas9 usa seus domínios do tipo RuvC e HNH para fazer cortes cegos de extremidade na sequência semente do RNA guia, enquanto Cpf1 usa um domínio do tipo RuvC para produzir cortes escalonados fora da semente. Como Cpf1 faz cortes escalonados na região crítica de semente, NHEJ não interrompe o sítio alvo, garantindo assim que Cpf1 possa continuar cortando o mesmo sítio até que o evento de recombinação HDR desejado ocorra.

Assim, nos métodos e composições aqui descritos, entende-se que o termo "Cas" inclui as proteínas Cas9 e Cpf1. Assim, como aqui utilizado, um "sistema CRISPR/Cas" refere-se aos sistemas CRISPR/Cas e/ou CRISPR/Cpf1, incluindo sistemas de nuclease e/ou fator de transcrição.

Sítios Alvo

[00174] Como descrito em detalhes acima, os domínios de ligação ao DNA podem ser modificados para se ligarem a qualquer sequência de escolha. Um domínio de ligação a DNA manipulado geneticamente pode ter uma nova especificidade de ligação, em comparação com um domínio de ligação a DNA que ocorre naturalmente.

[00175] Em certas modalidades, a nuclease (s) tem como alvo um gene *CISH*, por exemplo, um íntron e/ou um éxon (por exemplo, éxon 2 ou 3) do gene. Em certas modalidades, a nuclease se liga a um sítio alvo de 9 a 20 ou mais nucleotídeos (contíguo ou não contíguo) dentro de uma sequência, como mostrado na Tabela 2.

[00176] Em certas modalidades, a nuclease visa a locais "abrigos seguros", como os genes *AAVS1*, *HPRT*, *ALB* e *CCR5* em células humanas e *Rosa26* em células murinas (*Vide*, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 7.888.121; 7.972.854; 7.914.796; 7.951.925; 8.110.379; 8.409.861; 8.586.526; Publicações de patentes U.S. Nos. 2003/0232410; 2005/0208489; 2005/0026157; 2006/0063231; 2008/0159996; 2010/00218264; 2012/0017290; 2011/0265198/0137104; 2013/0122591; 2013/0177983; e 2013/0177960) e o locus *Zp15* em plantas (*Vide* Patente U.S. No. 8.329.986).

[00177] Exemplos adicionais não limitativos de genes alvo adequados incluem um gene de beta (β) globina (*HBB*), um gene de gama (δ) globina (*HBG1*), um gene de linfoma de células B/leucemia 11A (*BCL11A*), um gene de fator 1 tipo Kruppel (*KLF1*), um gene

CCR5, um gene CXCR4, um gene PPP1R12C (AAVS1), um gene de hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT), um gene de albumina, um gene de fator VIII, um gene de fator IX, um gene de quinase 2 de repetição rico em leucina (LRRK2), um gene de Huntingtina (Htt), um gene de rodopsina (RHO), um gene Regulador de Condutância Transmembranar da Fibrose Cística (CFTR), um gene de proteína B surfactante (SFTPB), um gene de receptor de células T alfa (TRAC), um gene receptor de células T beta (TRBC), um gene de morte celular programada 1 (PD1), um gene de antígeno de T-linfócito citotóxico 4 (CTLA-4), um gene A de antígeno leucocitário humano (HLA), um gene HLA B, um gene HLA C, um gene HLA-DPA, um gene HLA-DQ, um gene HLA-DRA, um gene HLA-DRA, um gene LMP7, um transportador associado com gene 1 de Processamento de Antígeno (TAP), gene TAP2, um gene tapasin (TAPBP), um gene transativador do complexo de histocompatibilidade principal classe II (CIITA), um gene de distrofina (DMD), um gene receptor de glicocorticoide (GR), gene CISH, um gene RAG-1, um gene RFX5, um gene FAD2, um gene FAD3, um gene ZP15, um gene KASII, um gene MDH e/ou um gene EPSPS. Em alguns aspectos, a nuclease (s) se liga e/ou cliva um gene inibidor de ponto de verificação, por exemplo PD-1, CTLA4, receptores para a família B7 de ligandos inibidores, ou cliva um gene receptor ou ligando envolvido na sinalização através de LAG3, 2B4, BTLA, TIM3, A2aR e receptores de inibidor de assassinas (KIRs e receptores de lectina do tipo C), *Vide*, Pardoll (2012) *Nat Rev Cancer* 12 (4): 252, um gene de complexo HLA (classe I: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, B2M; classe II: HLA-DMA, HLA-DOA, HLA-DPA1, HLA-DQA, HLA-DRA, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-DPB1, HLA-DQB, HLA-DRB) ou TCR; e/ou um gene que codifica um produto envolvido no processo de carregamento de peptídeo e processamento de antígeno para os complexos HLA (por exemplo, TAP, tapasina,

calreticulina, calnexina, LMP2, LMP7 ou Erp57). *Vide*, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 8.956.828 e 8.945.868.

Doadores

[00178] Em certas modalidades, a presente divulgação refere-se à integração direcionada mediada por nuclease de uma sequência exógena (por exemplo, um transgene que codifica uma proteína terapêutica) no genoma de uma célula. Como observado acima, a inserção de uma sequência exógena (também chamada de "sequência doadora" ou "doador" ou "transgene"), por exemplo, para exclusão de uma região especificada e/ou correção de um gene mutante ou para expressão aumentada de um gene do tipo selvagem. Será prontamente aparente que a sequência doadora não é tipicamente idêntica à sequência genômica em que é colocada. Uma sequência doadora pode conter uma sequência não homóloga (por exemplo, um transgene) flanqueada por duas regiões de homologia para permitir HDR eficiente no sítio de interesse ou pode ser integrada através de mecanismos de reparo direcionados a não homologia. *Vide*, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 9.045.763; 9.005.973; e 7.888.121. Além disso, as sequências doadoras podem compreender uma molécula de vetor contendo sequências que não são homólogas à região de interesse na cromatina celular. Uma molécula doadora pode conter várias regiões descontínuas de homologia com o DNA celular. Além disso, para inserção direcionada de sequências que normalmente não estão presentes em uma região de interesse, as referidas sequências podem estar presentes em uma molécula de ácido nucleico doador e flanqueadas por regiões de homologia para sequenciar na região de interesse.

[00179] Como nas nucleases, os doadores podem ser introduzidos em qualquer forma. Em certas modalidades, os doadores podem ser introduzidos usando DNA e/ou vetores virais por métodos conhecidos

na técnica. *Vide*, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 9.005.973; 8.936.936; e 8.703.489. O doador pode ser introduzido na célula na forma de filamento duplo ou simples. O doador pode ser introduzido na célula na forma circular ou linear. Se introduzido na forma linear, as extremidades da sequência doadora podem ser protegidas (por exemplo, da degradação exonucleolítica) por métodos conhecidos dos versados na técnica. Por exemplo, um ou mais resíduos de didesoxinucleotídeo são adicionados ao terminal 3' de uma molécula linear e/ou oligonucleotídeos autocomplementares são ligados a uma ou ambas as extremidades. *Vide*, por exemplo, Chang, *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4959-4963; Nehls *et al.* (1996) *Science* 272: 886-889. Métodos adicionais para proteger polinucleotídeos exógenos da degradação incluem, mas não estão limitados a, adição de grupos amino terminais e o uso de ligações internucleotídicas modificadas, tais como, por exemplo, fosforotioatos, fosforamidatos e resíduos de O-metil ribose ou desoxirribose.

[00180] Em certas modalidades, o doador inclui sequências (por exemplo, sequências de codificação, também chamadas de transgenes) com mais de 1 kb de comprimento, por exemplo entre 2 e 200 kb, entre 2 e 10 kb (ou qualquer valor entre eles). O doador também pode incluir pelo menos um sítio alvo de nuclease. Em certas modalidades, o doador inclui pelo menos 2 sítios alvo, por exemplo, para um par de nucleases ZFNs, TALENs, TtAgo ou CRISPR/Cas. Tipicamente, os sítios alvo da nuclease estão fora das sequências de transgene, por exemplo, 5' e/ou 3' para as sequências de transgene, para clivagem do transgene. O sítio (s) de clivagem da nuclease pode ser para qualquer nuclease (s). Em certas modalidades, os sítios alvo da nuclease contidos no doador de filamento duplo são para a mesma nuclease usada para clivar o alvo endógeno no qual o doador clivado é integrado por métodos independentes da homologia.

[00181] O doador pode ser inserido para que sua expressão seja direcionada pelo promotor endógeno no sítio de integração, nome o promotor que dirige a expressão do gene endógeno no qual o doador é inserido. No entanto, será evidente que o doador pode compreender um promotor e/ou intensificador, por exemplo, um promotor constitutivo ou um promotor indutível ou específico para o tecido.

[00182] A molécula doadora pode ser inserida em um gene endógeno, de modo que todo ou parte do gene endógeno seja expresso. Em algumas modalidades, o transgene é integrado ao locus endógeno do gene *CISH* para corrigir uma versão mutante (por exemplo, em uma célula de um paciente que está faltando ou é deficiente em uma versão funcional do gene *CISH*), por exemplo, um transgene é integrado a um gene *CISH* endógeno, por exemplo, um exônico (por exemplo, éxon 2 ou éxon 3) de um gene *CISH*. Em outras modalidades, o transgene é integrado no locus endógeno de um gene *CISH*, de modo que uma proteína funcional seja expressa. Assim, o doador pode incluir qualquer sequência de codificação de proteínas que produza uma proteína funcional, incluindo, mas não se limitando a CARs, TCRs modificados ou exógenos (*Vide* Patente U.S. No. 8.956.828) e/ou ACTRs (Publicação de Patente U.S. No. 2017/0281682) e combinações dos mesmos.

[00183] Além disso, embora não sejam necessárias para a expressão, as sequências exógenas também podem incluir sequências reguladoras ou de transcrição ou tradução, por exemplo, promotores, intensificadores, isoladores, sítios internos de entrada do ribossomo, sequências que codificam peptídeos 2A e/ou sinais de poliadenilação. Além disso, sequências aceitadoras de emenda podem ser incluídas.

[00184] Os transgenes transportados nas sequências doadoras aqui descritas podem ser isolados de plasmídeos, células ou outras

fontes usando técnicas padrão conhecidas na área, como PCR. Os doadores para uso podem incluir diferentes tipos de topologia, incluindo superenrolamento circular, relaxado circular, linear e similares. Alternativamente, eles podem ser sintetizados quimicamente usando técnicas padrão de síntese de oligonucleotídeos. Além disso, os doadores podem ser metilados ou carecerem de metilação. Os doadores podem estar na forma de cromossomos artificiais de bactérias ou leveduras (BACs ou YACs).

[00185] Os polinucleotídeos doadores aqui descritos podem incluir uma ou mais bases não naturais e/ou estruturas principais. Em particular, a inserção de uma molécula doadora com citosinas metiladas pode ser realizada usando os métodos aqui descritos para alcançar um estado de quiescência transcricional em uma região de interesse.

[00186] O polinucleotídeo exógeno (doador) pode compreender qualquer sequência de interesse (sequência exógena). Sequências exógenas exemplares incluem, mas não estão limitadas a, qualquer sequência de codificação de polipeptídeo (por exemplo, cDNAs), sequências promotoras, sequências intensificadoras, marcadores de epítomos, genes marcadores, sítios de reconhecimento de enzimas de clivagem e vários tipos de construtos de expressão. Os genes marcadores incluem, entre outros, sequências que codificam proteínas que medeiam a resistência a antibióticos (por exemplo, resistência à ampicilina, resistência à neomicina, resistência a G418, resistência à puromicina), sequências que codificam proteínas coloridas ou fluorescentes ou luminescentes (por exemplo, proteína verde fluorescente, proteína verde fluorescente aprimorada, proteína vermelha fluorescente, luciferase) e proteínas que medeiam o crescimento celular aumentado e/ou a amplificação de genes (por exemplo, di-hidrofolato redutase). Os marcadores de epítopo incluem,

por exemplo, uma ou mais cópias de FLAG, His, myc, Tap, HA ou qualquer sequência de aminoácidos detectável.

[00187] Em algumas modalidades, o doador adicionalmente compreende um polinucleotídeo que codifica qualquer polipeptídeo cuja expressão na célula é desejada, incluindo, mas não se limitando a anticorpos, antígenos, enzimas, receptores (superfície celular ou receptores de antígeno nuclear ou quimérico (CARs)), hormônios, linfocinas, citocinas, polipeptídeos repórteres, fatores de crescimento e fragmentos funcionais de qualquer um dos itens acima. As sequências de codificação podem ser, por exemplo, cDNAs.

[00188] Em certas modalidades, as sequências exógenas podem compreender um gene marcador (descrito acima), permitindo a seleção de células que sofreram integração direcionada e uma sequência vinculada que codifica uma funcionalidade adicional. Exemplos não limitativos de genes marcadores incluem GFP, marcador (s) de seleção de drogas e similares.

[00189] Em certas modalidades, o transgene pode incluir, por exemplo, genes do tipo selvagem para substituir sequências endógenas mutadas. Por exemplo, uma sequência do gene *CISH* do tipo selvagem (ou outro funcional) pode ser inserida no genoma de uma célula-tronco na qual a cópia endógena do gene é mutada. O transgene pode ser inserido no locus endógeno ou, alternativamente, ser direcionado para um locus de abrigo seguro.

[00190] A construção de tais cassetes de expressão, seguindo os ensinamentos da presente especificação, utiliza metodologias bem conhecidas na técnica da biologia molecular (*Vide*, por exemplo, Ausubel ou Maniatis). Antes de usar o cassete de expressão para gerar um animal transgênico, a capacidade de resposta do cassete de expressão ao indutor de estresse associado a elementos de controle selecionados pode ser testada através da introdução do cassete de

expressão em uma linhagem de célula adequada (por exemplo, células primárias, células transformadas ou linhagens de células imortalizadas).

[00191] Além disso, embora não sejam necessárias para a expressão, sequências exógenas também podem ser sequências reguladoras da transcrição ou da tradução, por exemplo, promotores, intensificadores, isoladores, sítios internos de entrada do ribossomo, sequências que codificam peptídeos 2A e/ou sinais de poliadenilação. Além disso, os elementos de controle dos genes de interesse podem ser operacionalmente ligados aos genes repórter para criar genes quiméricos (por exemplo, cassetes de expressão repórter).

[00192] A inserção direcionada da sequência de ácido nucleico não codificadora também pode ser alcançada. Sequências que codificam RNAs antissentido, RNAi, shRNAs e micro RNAs (miRNAs) também podem ser usadas para inserções direcionadas.

[00193] Em modalidades adicionais, o ácido nucleico doador pode compreender sequências não codificadoras que são sítios alvo específicos para projetos de nuclease adicionais. Subsequentemente, nucleases adicionais podem ser expressas em células de modo que a molécula doadora original seja clivada e modificada pela inserção de outra molécula doadora de interesse. Dessa maneira, integrações reiterativas de moléculas doadoras podem ser geradas, permitindo o empilhamento de características em um determinado local de interesse ou em um local de abrigo seguro.

Células

[00194] Assim, são aqui fornecidas células geneticamente modificadas compreendendo um gene *CISH* geneticamente modificado. As células geneticamente modificadas podem ser modificadas em qualquer lugar dentro do gene *CISH*, incluindo regiões não codificadoras ou codificadoras, por exemplo, no éxon 2 e/ou éxon

3 do gene *CISH*. Em certas modalidades, a modificação compreende a integração de um transgene que expressa uma proteína funcional na célula, incluindo células (por exemplo, células T ou células-tronco) produzidas pelos métodos aqui descritos. O transgene é integrado de maneira direcionada ao genoma da célula usando uma ou mais nucleases. Em certas modalidades, o transgene é integrado a um gene *CISH*, por exemplo, em um paciente com câncer ou em um paciente com uma doença inflamatória. O transgene pode ser integrado a qualquer região intrônica e/ou exônica de *CISH*, por exemplo, éxon 2 ou éxon 3. Em certas modalidades, o transgene é integrado em ou dentro de 5 a 10 nucleotídeos em ambos os lados de um sítio alvo de pelo menos 9 pares de bases, como mostrado na Tabela 2. Assim, são fornecidas aqui células geneticamente modificadas compreendendo um transgene (que expressa uma proteína funcional) integrada no éxon 2 ou 3 de um gene *CISH*, bem como células descendentes dessas células que incluem a modificação genética.

[00195] Ao contrário da integração aleatória, a integração direcionada garante que o transgene seja integrado a um gene especificado. O transgene pode ser integrado em qualquer lugar do gene alvo. Em certas modalidades, o transgene é integrado no sítio de clivagem da nuclease ou próximo a ele, por exemplo, dentro de 1-300 (ou qualquer valor entre eles) pares de bases a montante ou a jusante do sítio de clivagem, mais preferivelmente dentro de 1-100 pares de bases (ou qualquer valor entre eles) de ambos os lados do sítio de clivagem, ainda mais preferivelmente dentro de 1 a 50 pares de bases (ou qualquer valor entre eles) de ambos os lados do sítio de clivagem. Em certas modalidades, a sequência integrada compreendendo o transgene não inclui nenhuma sequência de vetores (por exemplo, sequências de vetores virais).

[00196] Qualquer tipo de célula pode ser geneticamente modificado como descrito aqui para compreender um transgene, incluindo mas não limitado a células e linhagens de células. Outros exemplos não limitativos de células contendo transgene, como descrito aqui incluem células T (por exemplo, CD4+, CD3+, CD8+, etc.); células dendríticas; células B; células-tronco autólogas (por exemplo, derivadas do paciente) ou heterólogas, pluripotentes, totipotentes ou multipotentes (por exemplo, células CD34+, células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), células-tronco embrionárias ou semelhantes). Em certas modalidades, as células como aqui descritas são células CD34+ derivadas de um paciente. As células podem ser geneticamente modificadas em cultura ou, alternativamente, podem ser geneticamente modificadas *in vivo*, fornecendo as nucleases e/ou doadores, como aqui descrito para o indivíduo.

[00197] As células, como aqui descritas, são úteis no tratamento e/ou prevenção de câncer ou doença inflamatória em um indivíduo com o distúrbio, por exemplo, por terapias *ex vivo*. As células modificadas por nuclease podem ser expandidas e depois reintroduzidas no paciente usando técnicas padrão. *Vide*, por exemplo, Tebas, *et al.* (2014) *New Eng J Med* 370 (10): 901. No caso de células-tronco, após infusão no indivíduo, também ocorre diferenciação *in vivo* desses precursores em células que expressam a proteína *CISH* funcional. As composições farmacêuticas compreendendo as células como aqui descritas também são fornecidas. Além disso, as células podem ser criopreservadas antes da administração a um paciente.

[00198] As células e métodos *ex vivo*, conforme descrito aqui, fornecem tratamento e/ou prevenção de um distúrbio (por exemplo, câncer ou doença inflamatória) em um indivíduo (por exemplo, um indivíduo mamífero) e eliminam a necessidade de administração farmacêutica profilática contínua ou procedimentos de risco tais como

transplantes de medula óssea alogênica ou entrega gama-retroviral. Como tal, a invenção aqui descrita fornece uma maneira mais segura, econômica e econômica de tratar e/ou prevenir cânceres, doenças inflamatórias e outras condições nas quais a regulação imunológica é desejável.

Entrega

[00199] As nucleases, polinucleotídeos que codificam essas nucleases, polinucleotídeos doadores e composições compreendendo as proteínas e/ou polinucleotídeos aqui descritos podem ser entregues por qualquer meio adequado. Em certas modalidades, as nucleases e/ou doadores são entregues *in vivo*. Em outras modalidades, as nucleases e/ou doadores são entregues a células isoladas (por exemplo, células-tronco autólogas ou heterólogas) para o fornecimento de células modificadas úteis na entrega *ex vivo* aos pacientes (terapia celular).

[00200] Os métodos para administrar nucleases como aqui descrito são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 6.453.242; 6.503.717; 6.534.261; 6.599.692; 6.607.882; 6.689.558; 6.824.978; 6.933.113; 6.979.539; 7.013.219; e 7.163.824, cujas divulgações são todas incorporadas por referência aqui na sua totalidade.

[00201] Nucleases e/ou construtos doadores, conforme descrito neste documento, também podem ser entregues usando qualquer mecanismo de entrega de ácido nucleico, incluindo DNA e/ou RNA nus (por exemplo, mRNA) e vetores contendo sequências que codificam um ou mais dos componentes. Quaisquer sistemas vetoriais podem ser utilizados, incluindo, entre outros, vetores plasmídicos, minicírculos de DNA, vetores retrovirais, vetores lentivirais, vetores de adenovírus, vetores de poxvírus; vetores de herpesvírus e vetores de vírus adenoassociados, etc., e combinações dos mesmos. *Vide* também as patentes US 6.534.261; 6.607.882; 6.824.978; 6.933.113; 6.979.539;

7.013.219; e 7.163.824; e Publicação de Patente U.S. No. 2014/0335063, incorporada por referência aqui na sua totalidade. Além disso, será aparente que qualquer um desses sistemas pode compreender uma ou mais das sequências necessárias para o tratamento. Assim, quando uma ou mais nucleases e um construto doador forem introduzidas na célula, as nucleases e/ou polinucleotídeo doador podem ser transportados no mesmo sistema de entrega ou em diferentes mecanismos de entrega. Quando vários sistemas são utilizados, cada mecanismo de entrega pode compreender uma sequência que codifica uma ou várias nucleases e/ou construtos doadores (por exemplo, mRNA que codifica uma ou mais nucleases e/ou mRNA ou AAV transportando um ou mais construtos doadores).

[00202] Os métodos convencionais de transferência de genes baseados em vírus e não vírus convencionais podem ser usados para introduzir ácidos nucleicos que codificam nucleases e construtos doadores em células (por exemplo, células de mamíferos) e tecidos alvo. Os sistemas de entrega de vetores não virais incluem plasmídeos de DNA, minicírculos de DNA, ácido nucleico nu e ácido nucleico complexado com um veículo de entrega, como um lipossomo ou poloxâmero. Os sistemas de entrega de vetores virais incluem vírus de DNA e RNA, que possuem genomas epissomais ou integrados após a entrega na célula. Para uma revisão dos procedimentos de terapia gênica, *Vide* Anderson (1992) *Science* 256:808-813; Nabel & Felgner (1993) *TIBTECH* 11:211-217; Mitani & Caskey (1993) *TIBTECH* 11:162-166; Dillon (1993) *TIBTECH* 11:167-175; Miller (1992) *Nature* 357:455-460; Van Brunt (1988) *Biotechnology* 6(10):1149-1154; Vigne (1995) *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36; Kremer & Perricaudet (1995) *British Medical Bulletin* 51(1):31-44; Haddada, *et al.*, in *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler and Böhm (eds.) (1995); e Yu, *et al.* (1994) *Gene Therapy* 1:13-26.

[00203] Os métodos de entrega não viral de ácidos nucleicos incluem eletroporação, lipofecção, microinjeção, biolística, virossomas, lipossomas, imunolipossomas, polycation ou lipídio: conjugados de ácidos nucleicos, nanopartículas lipídicas (LNP), DNA nu, RNA nu, RNA limite, vírions artificiais e captação de DNA melhorada por agente. A sonoporação utilizando, por exemplo, o sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) também pode ser utilizada para a entrega de ácidos nucleicos.

[00204] Outros exemplos de sistemas de entrega de ácido nucleico incluem os fornecidos pela Amaxa Biosystems (Colônia, Alemanha), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) e Copernicus Therapeutics Inc. (*Vide*, por exemplo, US Patente No. 6.008.336). A lipofecção é descrita, por exemplo, nas patentes US 5.049.386; 4.946.787; e 4.897.355) e os reagentes de lipofecção são vendidos comercialmente (por exemplo, Transfectam® e Lipofectin®). Os lípidos catiônicos e neutros que são adequados para a lipofecção eficiente de reconhecimento de receptores de polinucleotídeos incluem os de Felgner, Publicações de Patentes Internacionais Nos. WO 91/17424, WO 91/16024. Em alguns aspectos, as nucleases são entregues como mRNAs e o transgene é entregue através de outras modalidades, como vetores virais, DNA de minicírculo, DNA de plasmídeo, DNA de filamento simples, DNA linear, DNA, lipossomas, nanopartículas e similares.

[00205] A preparação de complexos de lipídio:ácido nucleico, incluindo lipossomas direcionados, como complexos imunolipídicos, é bem conhecida por um especialista na técnica (*Vide*, por exemplo, Crystal (1995) *Science* 270:404-410; Blaese, *et al.* (1995) *Cancer Gene Ther.* 2:291-297; Behr, *et al.* (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:382-389; Remy, *et al.* (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:647-654; Gao, *et al.* (1995) *Gene Therapy* 2:710-722; Ahmad, *et al.* (1992) *Cancer Res.*

52:4817-4820; Patente U.S. Nos. 4.186.183; 4,217.344; 4.235.871; 4.261.975; 4.485.054; 4.501.728; 4.774.085; 4.837.028; e 4.946.787).

[00206] Métodos adicionais de entrega incluem o uso de empacotar os ácidos nucleicos a serem entregues nos veículos de entrega EnGeneIC (EDVs). Estes EDVs são entregues especificamente aos tecidos alvo usando anticorpos biespecíficos, onde um braço do anticorpo tem especificidade para o tecido alvo e o outro tem especificidade para o EDV. O anticorpo leva os EDVs à superfície da célula alvo e, em seguida, o EDV é trazido para a célula por endocitose. Uma vez na célula, o conteúdo é liberado (*Vide MacDiarmid et al. (2009) Nature Biotechnology 27 (7): 643*).

[00207] O uso de sistemas virais de RNA ou DNA para a entrega de ácidos nucleicos que codificam sistemas CRISPR/Cas modificados aproveita processos altamente evoluídos para direcionar um vírus para células específicas no corpo e tráfegar a carga viral para o núcleo. Os vetores virais podem ser administrados diretamente a indivíduos (*in vivo*) ou podem ser usados para tratar células *in vitro* e as células modificadas são administradas a indivíduos (*ex vivo*). Os sistemas convencionais com base em vírus para a entrega de sistemas CRISPR/Cas incluem, mas não estão limitados a, vetores de vírus retroviral, lentivírus, adenoviral, adenoassociado, vaccinia e vírus do herpes simplex para transferência de genes. A integração no genoma do hospedeiro é possível com os métodos de transferência de genes de retrovírus, lentivírus e vírus adenoassociados, geralmente resultando em expressão a longo prazo do transgene inserido. Além disso, foram observadas altas eficiências de transdução em muitos tipos de células e tecidos alvo diferentes.

[00208] O tropismo de um retrovírus pode ser alterado incorporando proteínas de envelope estranhas, expandindo a população alvo potencial das células alvo. Os vetores lentivirais são vetores retrovirais

que são capazes de transduzir ou infectar células que não se dividem e geralmente produzem altas titulações virais. A seleção de um sistema de transferência de genes retrovirais depende do tecido alvo. Os vetores retrovirais são compostos por repetições terminais longas de ação cis com capacidade de empacotamento para até 6-10 kb de sequência estranha. As LTRs mínimas de ação cis são suficientes para replicação e empacotamento dos vetores, que são então usados para integrar o gene terapêutico na célula alvo para fornecer expressão permanente do transgene. Os vetores retrovirais amplamente utilizados incluem aqueles baseados no vírus da leucemia murina (MuLV), vírus da leucemia do macaco gibão (GaLV), vírus da imunodeficiência símia (SIV), vírus da imunodeficiência humana (HIV) e combinações dos mesmos (*Vide*, por exemplo, Buchscher, *et al.* (1992) *J. Virol.* 66: 2731-2739; Johann, *et al.* (1992) *J. Virol.* 66: 1635-1640; Sommerfelt, *et al.* (1990) *Virol.* 176: 58-59; Wilson, *et.* (1989) *J. Virol.* 63: 2374-2378; Miller *et al.* (1991) *J. Virol.* 65: 2220-2224; Publicação de Patente Internacional No. WO 1994/026877).

[00209] Nas aplicações em que a expressão transitória é preferida, podem ser utilizados sistemas baseados em adenovirais. Os vetores baseados em adenovirais são capazes de uma eficiência de transdução muito alta em muitos tipos de células e não requerem divisão celular. Com tais vetores, altas titulações e altos níveis de expressão foram obtidos. Esse vetor pode ser produzido em grandes quantidades em um sistema relativamente simples. Os vetores de vírus adenoassociados ("AAV") também são usados para transduzir células com ácidos nucleicos alvo, por exemplo, na produção *in vitro* de ácidos nucleicos e peptídeos, e para procedimentos de terapia gênica *in vivo* e *ex vivo* (*Vide*, por exemplo, West *et al.* (1987) *Virology* 160: 38-47; Patente U.S. No. 4.797.368; Publicação de Patente Internacional No. WO 93/24641; Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:

793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin Invest.* 94: 1351. A construção de vetores de AAV recombinantes é descrita em várias publicações, incluindo a Patente U.S. No. 5.173.414; Tratschin *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 3251-3260; Tratschin *et al.* (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4: 2072-2081; Hermonat & Muzyczka (1984) *PNAS* 81: 6466-6470; e Samulski *et al.* (1989) *J. Virol.* 63: 03822-3828. O sorotipo de AAV pode ser usado, incluindo AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 e AAV8, AAV 8.2, AAV9 e AAV rh10 e AAV pseudotipado, como AAV2/8, AAV2/5 e AAV2/6.

[00210] Atualmente, pelo menos seis abordagens de vetores virais estão disponíveis para transferência de genes em ensaios clínicos, que utilizam abordagens que envolvem a complementação de vetores defeituosos por genes inseridos nas linhagens de células auxiliares para gerar o agente transdutor.

[00211] pLASN e MFG-S são exemplos de vetores retrovirais que foram utilizados em ensaios clínicos (Dunbar, *et al.* (1995) *Blood* 85: 3048-305; Kohn, *et al.* (1995) *Nat. Med.* 1: 1017-102; Malech *et al.* (1997) *PNAS* 94:22 12133-12138). PA317/pLASN foi o primeiro vetor terapêutico usado em um estudo de terapia genética. (Blaese *et al.* (1995) *Science* 270: 475-480 (1995)). Eficiências de transdução de 50% ou mais foram observadas para vetores empacotados MFG-S. (Ellem *et al.* (1997) *Immunol Immunother.* 44 (1): 10-20; Dranoff *et al.* (1997) *Hum. Gene Ther.* 1: 111-2.

[00212] Os vetores de vírus adenoassociados recombinantes (rAAV) são um sistema alternativo promissor de entrega de genes baseado no vírus adenoassociado a parvovírus com defeito e não patogênico do tipo 2. Todos os vetores são derivados de um plasmídeo que retém apenas as repetições terminais invertidas do par de bases de AAV 145 (bp) que flanqueiam o cassete de expressão do transgene. Transferência eficiente de genes e entrega estável de

transgene devido à integração nos genomas da célula transduzida são as principais características desse sistema vetorial. (Wagner *et al.* (1998) *Lancet* 351: 9117 1702-3; Kearns *et al.* (1996) *Gene Ther.* 9: 748-55). Outros sorotipos de AAV, incluindo AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 e AAVrh10, e todas as suas variantes, também podem ser utilizados de acordo com a presente invenção.

[00213] Os vetores adenovirais recombinantes deficientes em replicação (Ad) podem ser produzidos com alta titulação e infectar prontamente vários tipos diferentes de células. A maioria dos vetores de adenovírus é projetada de forma que um transgene substitua os genes Ad E1a, E1b e/ou E3; subsequentemente, o vetor defeituoso de replicação é propagado em células 293 humanas que fornecem função genética excluída em *trans*. Os vetores de anúncio podem transduzir vários tipos de tecidos *in vivo*, incluindo células diferenciadas e não divididas, como as encontradas no fígado, rim e músculo. Os vetores Ad convencionais têm uma grande capacidade de transporte. Um exemplo do uso de um vetor Ad em um ensaio clínico envolveu terapia polinucleotídica para imunização antitumoral com injeção intramuscular (Stermann, *et al.* (1998) *Hum. Gene Ther.* 7: 1083-9). Exemplos adicionais do uso de vetores de adenovírus para transferência de genes em ensaios clínicos incluem Rosenecker, *et al.* (1996) *Infection* 24: 1 5-10; Stermann *et al.* (1998) *Hum. Gene Ther.* 9 (7): 1083-1089; Welsh, *et al.* (1995) *Hum. Gene Ther.* 2: 205-18; Alvarez *et al.* (1997) *Hum. Gene Ther.* 5: 597-613; Topf *et al.* (1998) *Gene Ther.* 5: 507-513; Stermann *et al.* (1998) *Hum. Gene Ther.* 7: 1083-1089.

[00214] As células de empacotamento são usadas para formar partículas virais capazes de infectar uma célula hospedeira. Essas células incluem 293 células, que empacotam adenovírus, e células or2 ou células PA317, que empacotam retrovírus. Os vetores virais

utilizados na terapia gênica são geralmente gerados por uma linhagem de células produtora que empacota um vetor de ácido nucleico em uma partícula viral. Os vetores contêm tipicamente as sequências virais mínimas necessárias para empacotamento e subsequente integração em um hospedeiro (se aplicável), sendo outras sequências virais substituídas por um cassete de expressão que codifica a proteína a ser expressa. As funções virais ausentes são fornecidas *in trans* pela linhagem de células de empacotamento. Por exemplo, os vetores de AAV utilizados na terapia gênica tipicamente possuem apenas sequências de repetição terminal invertida (ITR) do genoma de AAV que são necessárias para empacotamento e integração no genoma do hospedeiro. O DNA viral é empacotado em uma linhagem de células, que contém um plasmídeo auxiliar que codifica os outros genes de AAV, como *rep* e *cap*, mas sem sequências de ITR. A linhagem de células também está infectada com adenovírus como auxiliar. O vírus auxiliar promove a replicação do vetor de AAV e a expressão dos genes de AAV a partir do plasmídeo auxiliar. O plasmídeo auxiliar não é empacotado em quantidades significativas devido à falta de sequências de ITR. A contaminação com adenovírus pode ser reduzida por, por exemplo, tratamento térmico ao qual o adenovírus é mais sensível que AAV.

[00215] Em muitas aplicações de terapia genética, é desejável que o vetor de terapia genética seja entregue com um alto grau de especificidade a um tipo de tecido específico. Por conseguinte, um vetor viral pode ser modificado para ter especificidade para um determinado tipo de célula, expressando um ligando como uma proteína de fusão com uma proteína de revestimento viral na superfície externa do vírus. O ligando é escolhido para ter afinidade com um receptor conhecido por estar presente no tipo de célula de interesse. Por exemplo, Han *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

92: 9747-9751 relatou que o vírus da leucemia murina de Moloney pode ser modificado para expressar a heregulina humana fundida à gp70, e o vírus recombinante infecta certas células de câncer de mama humanas que expressam o receptor do fator de crescimento epidérmico humano. Este princípio pode ser estendido a outros pares de células alvo de vírus, nos quais a célula alvo expressa um receptor e o vírus expressa uma proteína de fusão compreendendo um ligante para o receptor da superfície celular. Por exemplo, o fago filamentoso pode ser manipulado geneticamente para exibir fragmentos de anticorpo (por exemplo, FAB ou Fv) tendo afinidade de ligação específica para praticamente qualquer receptor celular escolhido. Embora a descrição acima se aplique principalmente a vetores virais, os mesmos princípios podem ser aplicados a vetores não virais. Tais vetores podem ser manipulados geneticamente para conter sequências de captação específicas que favorecem a captação por células alvo específicas.

[00216] Os vetores de terapia gênica podem ser entregues *in vivo* por administração a um indivíduo, tipicamente por administração sistêmica (por exemplo, infusão intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica, sublingual ou intracraniana), aplicação tópica, como descrito abaixo, ou por inalação pulmonar. Como alternativa, os vetores podem ser entregues às células *ex vivo*, como as células explantadas de um paciente individual (por exemplo, linfócitos, aspirados de medula óssea, biópsia de tecido) ou células-tronco hematopoiéticas de doadores universais, seguidas de reimplante das células em um paciente, geralmente após seleção para células que incorporaram o vetor.

[00217] Os vetores (por exemplo, retrovírus, adenovírus, lipossomas, etc.) contendo nucleases e/ou construtos doadoreses também podem ser administrados diretamente a um organismo para

transdução de células *in vivo*. Alternativamente, o DNA nu pode ser administrado. A administração é realizada por qualquer uma das vias normalmente usadas para introduzir uma molécula no contato final com células sanguíneas ou teciduais, incluindo, entre outras, injeção, infusão, aplicação tópica, inalação e eletroporação. Os métodos adequados para administrar esses ácidos nucleicos estão disponíveis e são bem conhecidos dos especialistas na técnica e, embora mais de uma rota possa ser usada para administrar uma composição específica, uma rota específica pode frequentemente fornecer uma reação mais imediata e mais eficaz do que outra rota.

[00218] Os vetores adequados para a introdução de polinucleotídeos aqui descritos incluem vetores de lentivírus não integrantes (IDLV). *Vide*, por exemplo, Ory, *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11382-11388; Dull *et al.* (1998) *J. Virol.* 72: 8463-8471; Zuffery *et al.* (1998) *J. Virol.* 72: 9873-9880; Follenzi *et al.* (2000) *Nature Genetics* 25: 217-222; Patente U.S. 8.936.936.

[00219] Os veículos farmacêuticamente aceitáveis são determinados em parte pela composição específica a ser administrada, bem como pelo método específico utilizado para administrar a composição. Por conseguinte, existe uma grande variedade de formulações adequadas de composições farmacêuticas disponíveis, como descrito abaixo (*Vide*, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., 1989).

[00220] Será evidente que as sequências que codificam a nuclease e os construtos doadores podem ser entregues usando o mesmo ou diferentes sistemas. Por exemplo, um polinucleotídeo doador pode ser transportado por um AAV, enquanto as uma ou mais nucleases podem ser transportadas por mRNA. Além disso, os diferentes sistemas podem ser administrados pela mesma ou por diferentes vias (injeção intramuscular, injeção nas veias da cauda, outra injeção intravenosa,

administração intraperitoneal e/ou injeção intramuscular). Vários vetores podem ser entregues simultaneamente ou em qualquer ordem sequencial.

[00221] As formulações para administrações *ex vivo* e *in vivo* incluem suspensões em líquidos ou líquidos emulsionados. Os ingredientes ativos são frequentemente misturados com excipientes que são farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo. Excipientes adequados incluem, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou similares, e combinações dos mesmos. Além disso, a composição pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares, como agentes umectantes ou emulsificantes, agentes tamponantes de pH, agentes estabilizadores ou outros reagentes que aumentam a eficácia da composição farmacêutica.

Aplicações

[00222] Os métodos e composições aqui divulgados são para fornecer terapias para cânceres, distúrbios inflamatórios e outras doenças, por exemplo, através do fornecimento de proteínas que modulam a capacidade de resposta das células T. A célula pode ser modificada *in vivo* ou pode ser modificada *ex vivo* e subsequentemente administrada a um indivíduo. Assim, os métodos e composições fornecem o tratamento e/ou prevenção de um distúrbio.

[00223] A integração direcionada de um transgene (por exemplo, transgene CAR, gene HLA, gene TCR modificado ou exógeno ou ACTR) pode ser usada para corrigir um gene relacionado ao *CISH* aberrante, inserir um gene de tipo selvagem (por exemplo, proteínas terapêuticas), ou alterar a expressão de um gene endógeno. Por exemplo, um transgene que codifica um CAR pode ser integrado a uma célula para fornecer uma célula que produz uma proteína CAR funcional. A edição genômica também pode incluir a correção de

mutações (por exemplo, mutações pontuais) em um gene endógeno defeituoso, recorrendo assim à expressão do gene e ao tratamento do distúrbio.

[00224] Em certas modalidades, um ou mais CARs são integrados no gene *CISH*. Os transgenes CAR são conhecidos na técnica e compreendem fragmento variável de cadeia única extracelular (scFv) com especificidade para um antígeno particular ligado a uma parte de sinalização intracelular compreendendo um domínio coestimulatório e um domínio de ativação. O domínio coestimulatório pode ser derivado de, por exemplo, CD28, e o domínio de ativação pode ser derivado de, por exemplo, CD3-zeta. Os transgenes CAR podem incluir dois, três, quatro ou mais domínios coestimulatórios. O scFv CAR pode ser projetado para atingir, por exemplo, CD19, que é uma proteína transmembranar expressa por células na linhagem de células B, incluindo todas as células B normais e neoplasias malignas de células B, incluindo, mas não se limitando a, NHL, CLL e células não T ALL. *Vide*, por exemplo, a Patente U.S. 9.855.298. Além ou em vez do transgene (s) CAR, uma ou mais proteínas HLA, B2M e/ou outras proteínas imunomoduladoras podem ser integradas no gene *CISH*, incluindo, entre outras, fusões de B2M e HLA-G e/ou HLA-E, como descrito no Pedido de Patente U.S. No. 16/058.307, depositado em 8 de agosto de 2018.

[00225] A título de exemplo não limitativo, os métodos e composições aqui descritos podem ser utilizados para tratamento e/ou prevenção de cânceres, como leucemias de células B e/ou doenças inflamatórias, como colite.

[00226] Os exemplos a seguir se referem a modalidades exemplares da presente divulgação em que a nuclease compreende uma nuclease de dedo de zinco (ZFN). Será apreciado que isso é apenas para fins de exemplificação e que outras nucleases podem ser

usadas, por exemplo, sistemas TALEN, TtAgo e CRISPR/Cas, endonucleases de homing (meganucleases) com domínios de ligação de DNA manipulados geneticamente e/ou fusões de ocorrência natural de domínios de ligação ao DNA de endonucleases de homing manipuladas geneticamente (meganucleases) e domínios de clivagem heterólogos e/ou fusões de meganucleases e proteínas TALE. Por exemplo, nucleases adicionais podem ser manipuladas geneticamente para se ligar a uma sequência compreendendo 9 a 12 nucleotídeos contíguos das sequências aqui divulgadas (por exemplo, Tabela 2).

EXEMPLOS

Exemplo 1: Nucleases de proteína de dedo de zinco (ZFN) direcionadas para *CISH*

[00227] As proteínas de dedo de zinco direcionadas para *CISH* foram manipuladas geneticamente e incorporadas em mRNA, plasmídeos, AAV ou vetores adenovirais essencialmente como descrito em Urnov, *et al.* (2005) *Nature* 435 (7042): 646-651, Perez, *et al.* (2008) *Nature Biotechnology* 26 (7): 808-816, e como descrito na Patente U.S. No. 6.534.261. A Tabela 1 mostra as hélices de reconhecimento dentro do domínio de ligação ao DNA de domínios de ligação ao DNA de ZFP *CISH* exemplares e os sítios alvo para esses ZFPs (sítios alvo do DNA indicados em letras maiúsculas; nucleotídeos sem contato indicados em letras minúsculas). Os nucleotídeos no sítio alvo que são contatados pelas hélices de reconhecimento da ZFP são indicados em letras maiúsculas; nucleotídeos não contatados indicados em minúsculas. TALENs e/ou sgRNAs também são manipulados geneticamente para as sequências de *CISH* mostradas na Tabela 2 (por exemplo, um sítio alvo compreendendo 9 a 20 ou mais (incluindo 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou mais) nucleotídeos (contíguos ou não contíguos) dos sítios alvo mostrados na Tabela 2. seguindo os métodos

conhecidos na técnica. *Vide*, por exemplo, Patente U.S. No. 8.586.526 (usando RVDs canônicos ou não canônicos para TALENs) e Publicação de Patente U.S. No. 2015/0056705.

Tabela 1: Projetos de hélices de reconhecimento de proteínas dos dedos de zinco *CISH*

SBS #		Projeto					
	Li-gante	F1	F2	F3	F4	F5	F6
59488	L0	RSDHLS Q (SEQ ID NO:2)	QNATRT K (SEQ ID NO:3)	RSDNLS E (SEQ ID NO:4)	KRCNLR C (SEQ ID NO:5)	DRSTRT K (SEQ ID NO:6)	RRDNLH S (SEQ ID NO:7)
59489	L0	GHTSLK R (SEQ ID NO:8)	TSGHLS R (SEQ ID NO:9)	RSDNLA R (SEQ ID NO:10)	QNVSRP R (SEQ ID NO:11)	TSGHLS R (SEQ ID NO:9)	QSGHLS R (SEQ ID NO:12)
59440	L0	RWQYLP T (SEQ ID NO:13)	DRSALA R (SEQ ID NO:14)	RSDNLA R (SEQ ID NO:10)	DRSNLT R (SEQ ID NO:15)	QSGNLA R (SEQ ID NO:16)	ATCCLA H (SEQ ID NO:17)
59441	L0	RSDDL R (SEQ ID NO:18)	QAATLS R (SEQ ID NO:19)	RSDHLS A (SEQ ID NO:20)	DRSDLS R (SEQ ID NO:21)	RSDDL R (SEQ ID NO:18)	DRSHLA R (SEQ ID NO:22)
59558	N6a	QSGDLT R(SEQ ID NO:23)	QSGNLH V(SEQ ID NO:24)	QSGHLA R(SEQ ID NO:25)	NRYDLM T(SEQ ID NO:26)	RSDSLL R(SEQ ID NO:27)	CREYRG K(SEQ ID NO:28)
59557	L0	QSSHLT R(SEQ ID NO:29)	QSSDLT R(SEQ ID NO:30)	QSGNLA R(SEQ ID NO:16)	RLDILQQ (SEQ ID NO:31)	RSDNLS T(SEQ ID NO:32)	DNSYLP R(SEQ ID NO:33)
59581	N7a	DRSNLS R (SEQ ID NO:34)	LRQDLK R(SEQ ID NO:35)	RSDNLS T(SEQ ID NO:32)	DNSNRIN (SEQ ID NO:36)	QSSDLS R(SEQ ID NO:37)	WKWNLR A(SEQ ID NO:38)
59580	L0	RSDSLL R(SEQ ID NO:27)	CREYRG K(SEQ ID NO:28)	QSGHLA R(SEQ ID NO:25)	QKGTLG E(SEQ ID NO:39)	RSDNLS T(SEQ ID NO:32)	QSGHLS R(SEQ ID NO:12)

Tabela 2: Sítios alvo das proteínas dos dedos de zinco

SBS #	Sítio Alvo
59488	5' ggAAGGCCcCAGCAGGCAAGGgctgcat (SEQ ID NO:40)
59489	5' gaGGAGGTgGCAGAGGGTACCccagccc (SEQ ID NO:41)
59440	5' ccAGCAAAgGACGAGGTCTAGaaggcag (SEQ ID NO:42)
59441	5' gtGGAGCGGACTGGGCAGCGgcccctgt (SEQ ID NO:43)
59558	5' gaTGCGTGgCCTGGACAAGCAgttgag (SEQ ID NO:44)
59557	5' gaGTCCAGACGGAAGCTGGAgtcggcat (SEQ ID NO:45)
59581	5' atAGTGCTgCACAAGGCTGACcacaatcc (SEQ ID NO:46)
59580	5' ccGGAAAGgCCAGGATGCGTGgcctgga (SEQ ID NO:47)

[00228] Todas as combinações de pares de ZFN foram testadas quanto à atividade de clivagem. Células T Ativadas foram eletroporadas com mRNAs que codificam *CISH* direcionados a ZFNs em uma faixa de mRNA (0,5 µg a 6 µg por célula T 3E6 em uma reação de transfecção de 100 uL). As células T foram expandidas por 3-4 dias após a transfecção, o DNA genômico foi colhido e a eficiência da edição de *CISH* é avaliada por sequenciamento profundo. Todos os pares foram considerados ativos, como mostrado na Tabela 3 (onde a porcentagem de clivagem é mostrada com os pares indicados na dosagem indicada, por exemplo, 89% de clivagem do gene *CISH* usando o par 59488/59489 usando 6 µg de mRNA).

Tabela 3: Clivagem mediada por nuclease

	Par ZFN		6 µg	2 µg	0,5 µg
Éxon 2	59488	59489	89	84	60
	59440	59441	84	82	59
Éxon 3	59558	59557	84	80	55
	59581	59580	82	83	72

[00229] Será evidente que esses projetos podem incluir qualquer ligante entre qualquer um dos módulos de dedos e/ou entre a ZFP e o domínio de clivagem, incluindo, entre outros, ligantes canônicos ou não canônicos (entre os dedos) e/ou ligantes entre a ZFP e o domínio

de clivagem, como descrito na Patente U.S. No. 9.394.531. *Vide* também a Patente U.S. 8.772.453 e a Publicação de Patente U.S. 2015/0064789.

[00230] Além disso, qualquer uma das nucleases (sistemas ZFNs, CRISPR/Cas e TALENs) pode incluir domínios de clivagem manipulados geneticamente, por exemplo, heterodímeros divulgados na Patente U.S. No. 8.623.618 (por exemplo, domínios de clivagem manipulados geneticamente ELD e KKR) e/ou domínios de clivagem com mais ou mais mutações nas posições 416, 422, 447, 448 e/ou 525, conforme descrito na Publicação de Patente U.S. No. 2018/0087072. As ZFNs também podem incluir uma ou mais mutações nos resíduos da estrutura principal da ZFP, conforme descrito na Publicação de Patente U.S. No. 2018/0087072. Estes mutantes foram utilizados em conjunto com os domínios de ligação ao DNA exemplares aqui descritos.

Exemplo 2: Inserção direcionada de doador de *CISH*

[00231] A integração direcionada ao locus *CISH* também foi realizada usando um doador GFP de AAV. Primeiro, um doador GFP de AAV foi construído para codificar um cassete de expressão de GFP que é flanqueado pelos braços de homologia 5' e 3' para o sítio de clivagem *CISH*. Quando as células são tratadas com a ZFN direcionada a *CISH* e coadministram com o doador de AAV, os braços de homologia flanqueadores são necessários para mediar a inserção direcionada do cassete de expressão de GFP no sítio de clivagem *CISH* através da via de reparo direcionada à homologia. Nesta experiência, as células T ativadas são eletroporadas com o mRNA de *CISH* e coadministram com o doador GFP de AAV. A eficiência de integração direcionada foi avaliada 7 dias depois por análise FACS de % de células positivas para GFP.

[00232] Como mostrado nas Figuras 2 e 3, a análise de FACS para

a expressão de GFP mostrou que foi obtida pelo menos 70% de eficiência da inserção de doador (GFP) em células que recebem ambas as nucleases direcionadas para *CISH*, como descrito aqui e o doador.

Exemplo 3: Ativação imunoestimuladora aprimorada após inserção do doador em *CISH* em comparação com locus de abrigo seguro de *AAVS1*

[00233] A integração direcionada no locus *CISH* ou *AAVS1* também foi realizada usando um doador GFP de AAV. Primeiro, um doador GFP de AAV foi construído para codificar um cassete de expressão de GFP que é flanqueado pelos braços de homologia 5' e 3' para o sítio de clivagem *CISH* ou *AAVS1*. Quando as células são tratadas com as ZFNs direcionadas para *CISH* ou *AAVS1* (ZFNs específicas para *CISH*: SB59440/SB59441 (como mostrado na Tabela 1 acima); ZFNs específicas para *AAVS1* (compreendendo ZFPs manipuladas geneticamente SB30054 e SB30035, conforme descrito na Patente U.S. 9.957.526) e coadministradas com o doador de AAV correspondente, os braços de homologia flanqueadores são necessários para mediar a inserção direcionada do cassete de expressão de GFP no sítio de clivagem *CISH* ou *AAVS1* através da via de reparo direcionada à homologia. Nesta experiência, as células T efetoras ativadas são eletroporadas com *CISH* ou mRNA de ZFN *AAVS1* e coadministram com o correspondente doador GFP de AAV. A modificação do genoma eficiente foi avaliada 7 dias depois por análise Miseq.

[00234] Como mostrado na Figura 5, altos níveis de eficiência de modificação do genoma foram obtidos em células que recebem ambas as nucleases direcionadas *CISH* e *AAVS1*, conforme descrito aqui e o doador GFP de AAV. A Figura 6 demonstra que a integração direcionada do doador de GFP em *CISH* aprimora a função

imunoestimuladora de células T efetoras na ativação mediada por TCR, presumivelmente devido ao nocaute da expressão de *CISH*, um membro do supressor da família de sinalização de citocinas (SOCS).

Exemplo 4: Métodos ex vivo

[00235] As células geneticamente modificadas (por exemplo, células T ou células-tronco hematopoiéticas) como aqui descritas, compreendendo um transgene integrado ao gene *CISH* (por exemplo, um CAR e/ou outro transgene terapêutico) são administradas a pacientes com câncer ou um distúrbio inflamatório. A administração (dosagem única ou múltipla) das células é qualquer método conhecido na terapia celular. A doença ou distúrbio (ou sintomas dos mesmos) são melhorados após a administração.

[00236] Todas as patentes, pedidos de patente e publicações aqui mencionadas são aqui incorporadas por referência na sua totalidade.

[00237] Embora a divulgação tenha sido fornecida com alguns detalhes a título de ilustração e exemplo para fins de clareza de entendimento, será evidente para os especialistas na técnica que várias mudanças e modificações podem ser praticadas sem se afastar do espírito ou escopo da divulgação. Por conseguinte, as descrições e exemplos anteriores não devem ser interpretados como limitativos.

REIVINDICAÇÕES

1. Célula geneticamente modificada, caracterizada pelo fato de que compreende uma modificação genômica no éxon 2 ou éxon 3 de um gene *CISH* endógeno.

2. Célula geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a modificação genômica é selecionada a partir do grupo que consiste em inserções e/ou exclusões.

3. Célula geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que um ou mais transgenes são/estão integrados no gene *CISH*.

4. Célula geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o transgene codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR), um fator imunomodulador, um receptor de célula T modificado ou exógeno (TCR).

5. Célula geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o TCR manipulado geneticamente é um receptor de célula T acoplado a anticorpo (ACTR).

6. Célula geneticamente modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o gene *CISH* é modificado após a clivagem por uma nuclease.

7. Célula geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que a nuclease é selecionada a partir do grupo que consiste em uma nuclease de dedo de zinco, um TALEN e/ou um sistema de nuclease CRISPR/Cas.

8. Célula geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que a nuclease compreende um domínio de ligação ao DNA que se liga ao sítio alvo, como mostrado na Tabela 2.

9. Célula geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que a nuclease de dedo de zinco compreende uma proteína de dedo de zinco compreendendo 4, 5 ou 6 domínios de dedo de zinco compreendendo uma hélice de reconhecimento e adicionalmente em que a proteína de dedo de zinco compreende as regiões de hélice de reconhecimento das proteínas designadas SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581 ou SBS#59580.

10. Célula geneticamente modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, ou uma célula descendente da mesma, caracterizada pelo fato de que a célula é selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula-tronco hematopoiética, uma célula efetora T e uma célula reguladora T.

11. Proteína de dedo de zinco, caracterizada pelo fato de que compreende 6 domínios de dedo de zinco, cada um compreendendo uma região de hélice de reconhecimento, em que a proteína de dedo de zinco compreende as regiões de hélice de reconhecimento das proteínas designadas SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581 ou SBS#59580.

12. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende a proteína de dedo de zinco, como definida na reivindicação 11, e um domínio de clivagem do tipo selvagem ou manipulado geneticamente ou meio domínio de clivagem do tipo selvagem ou manipulado geneticamente.

13. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica uma ou mais proteínas, como definidas na reivindicação 11 ou 12.

14. Célula isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma ou mais proteínas, como definidas na reivindicação 11 ou 12 e/ou um ou mais polinucleotídeos, como definidos na

reivindicação 13.

15. Célula isolada, de acordo com a reivindicação 14, ou uma célula descendente da mesma, caracterizada pelo fato de que a célula é selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula efetora T, uma célula reguladora T e uma célula-tronco hematopoiética.

16. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende uma ou mais proteínas, como definidas na reivindicação 11 ou 12, um ou mais polinucleotídeos, como definidos na reivindicação 13 e/ou uma ou mais células isoladas, como definidas na reivindicação 14 ou 15.

17. Método para gerar uma célula geneticamente modificada, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que compreende introduzir na célula um ou mais polinucleotídeos que codificam uma ou mais nucleases compreendendo um domínio de ligação ao DNA que se liga ao sítio alvo em éxon 2 ou éxon 3 do gene *CISH*, em que a nuclease se liga e cliva o gene *CISH*, desse modo modificando geneticamente a célula.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a célula geneticamente modificada compreende um transgene que é integrado ao gene *CISH* e expresso na célula.

19. Método para fornecer uma proteína a um indivíduo em necessidade da mesma, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma célula geneticamente modificada, como definida em qualquer uma das reivindicações 3 a 15, em que a célula expressa o transgene no indivíduo.

FIG. 1

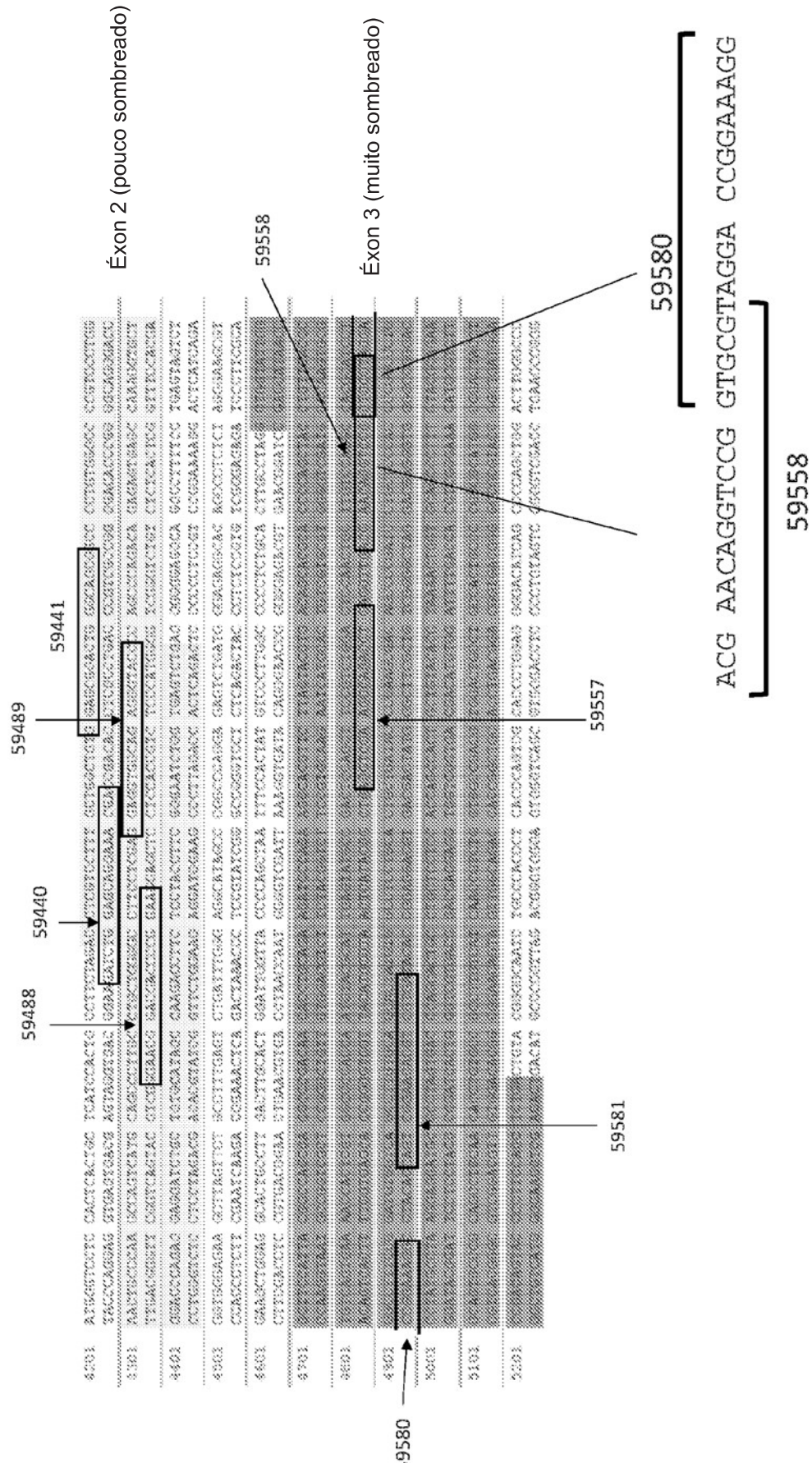


FIG. 2B

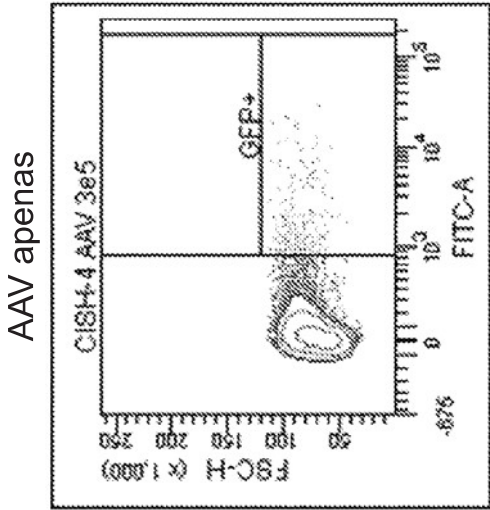


FIG. 2D

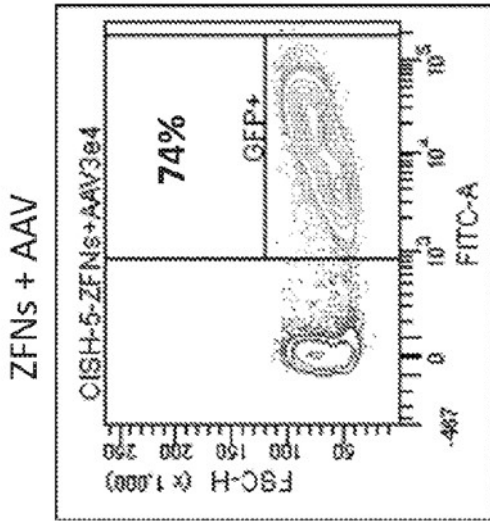


FIG. 2A

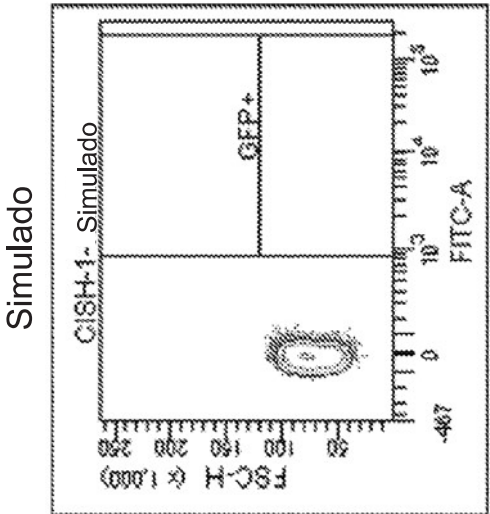
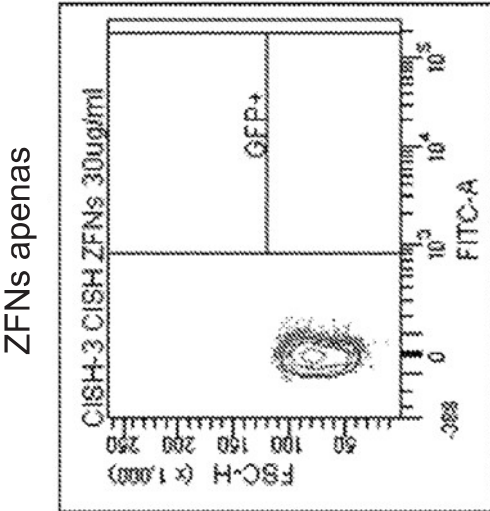


FIG. 2C



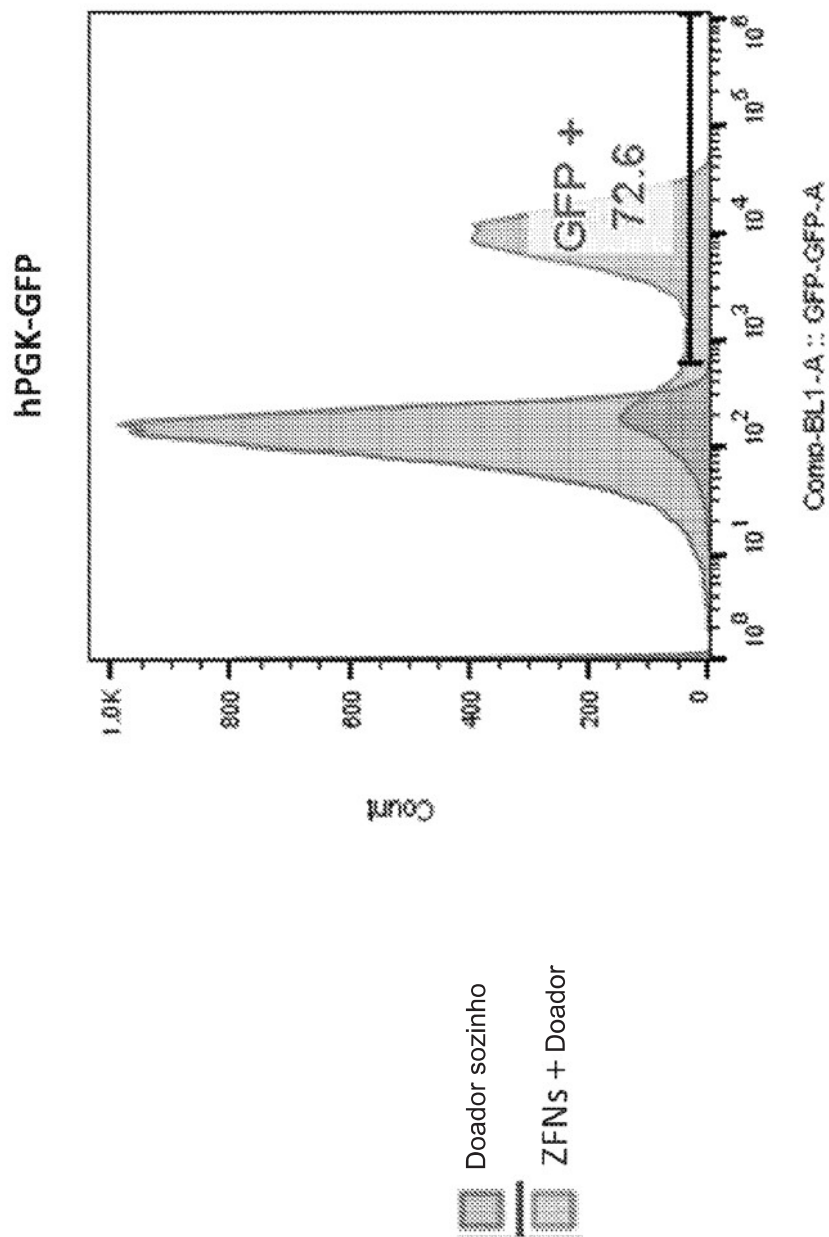
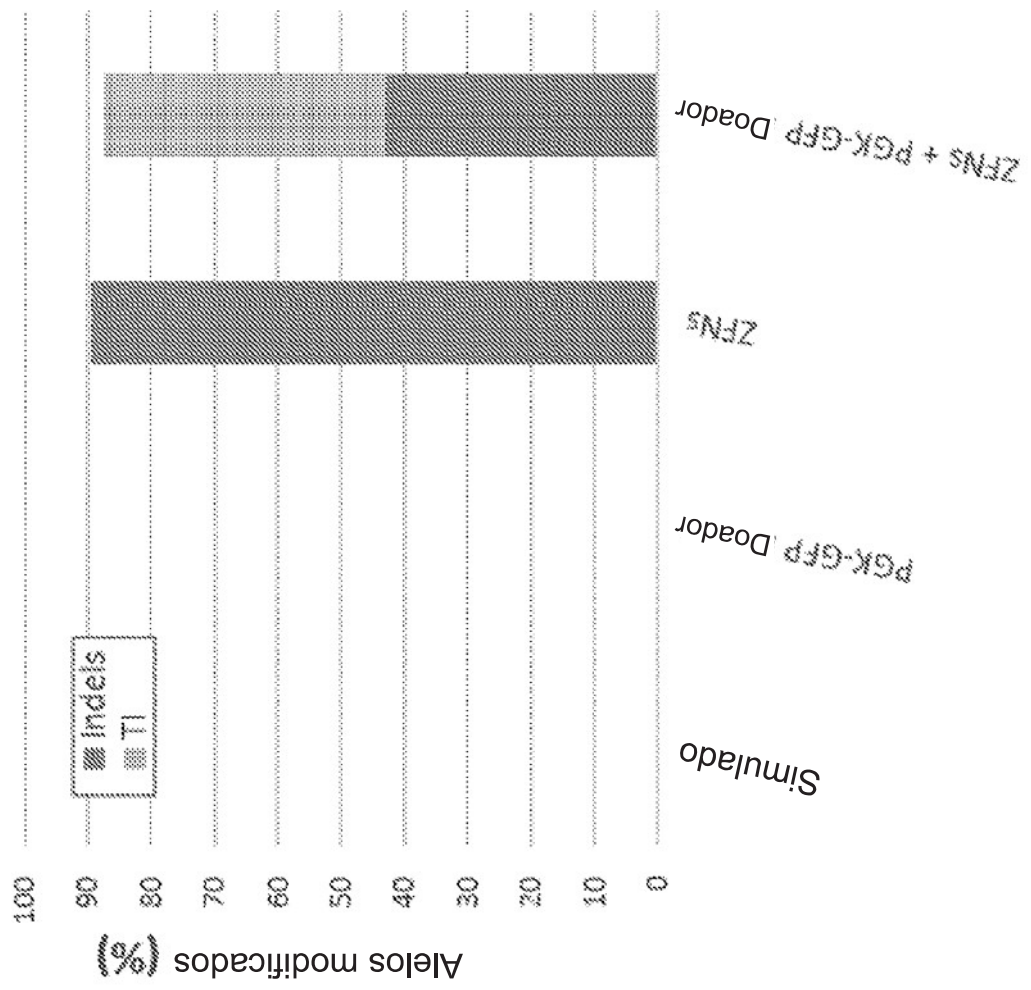


FIG. 3

FIG. 4



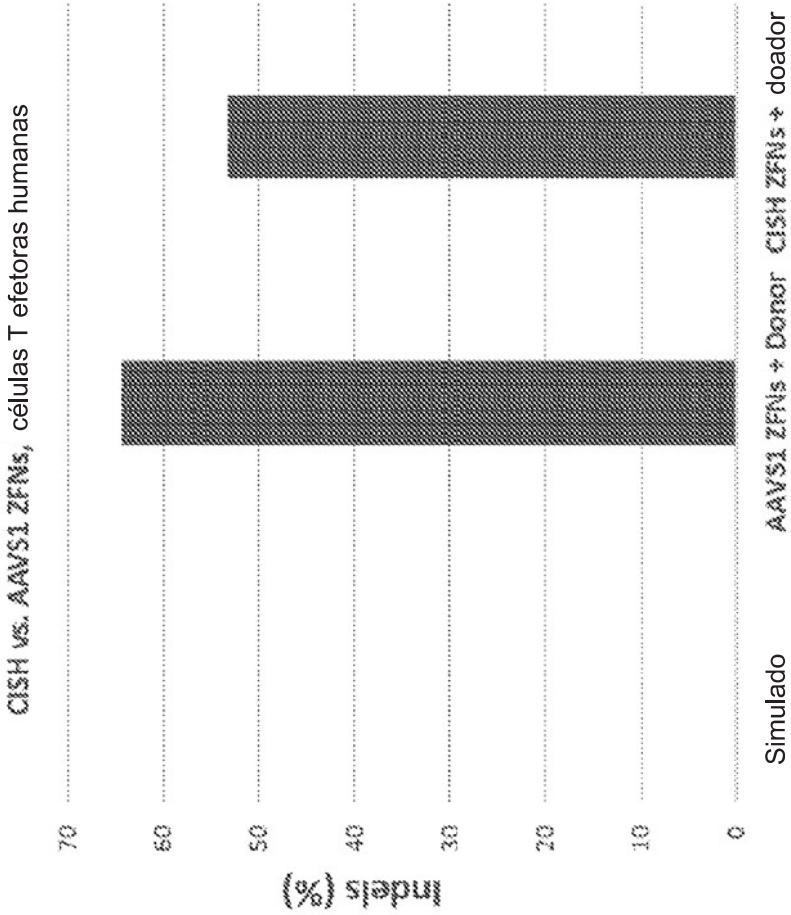


FIG. 5

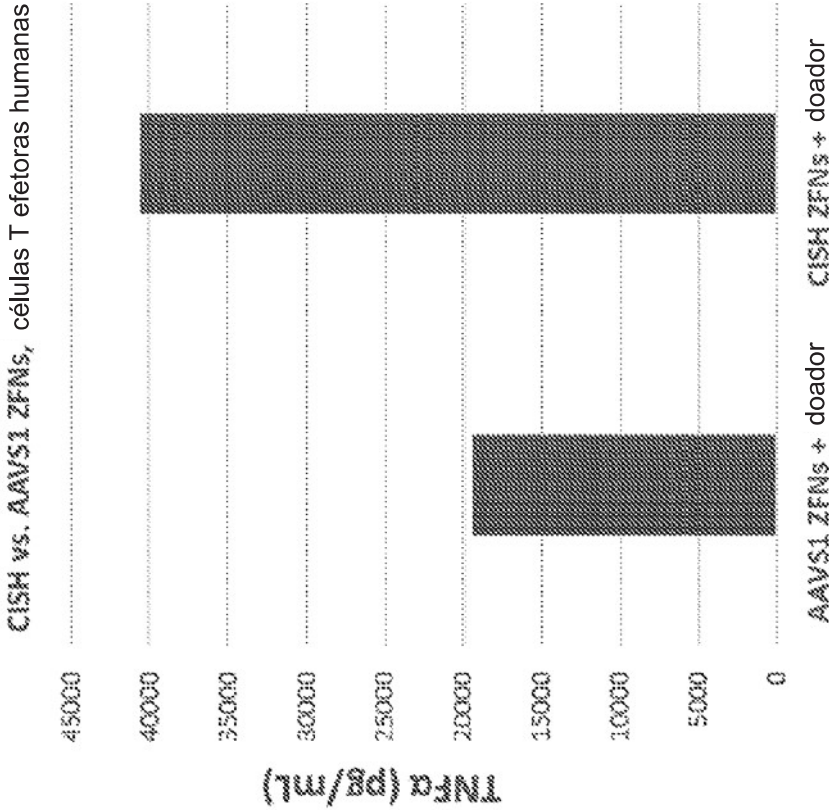


FIG. 6

RESUMO

Patente de Invenção: **"MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE GENE DE PROTEÍNA CONTENDO SH2 INDUTÍVEL POR CITOQUINA (*CISH*)"**.

A presente divulgação é no campo da manipulação genética de genoma, particularmente modificação genética direcionada de um gene *CISH*.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência - P246667.TXT
- Data de Geração do Código: 29/04/2020
- Hora de Geração do Código: 15:39:16
- Código de Controle:
 - Campo 1: FBE01403E0B53BFF
 - Campo 2: 241F5E341B252123