

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION BELGE

(41) Date de publication : 23/07/2024

(21) Numéro de demande : BE2022/6101

(22) Date de dépôt : 28/12/2022

(62) Divisée de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : C12N 15/90, A61K 35/17, C12N 15/10, C07K 14/725, C12N 9/22, C12N 5/0783

(30) Données de priorité :

(71) Demandeur(s) :

QUIDDITAS SA

SA

6900, MARCHE-EN-FAMENNE

Belgique

(72) Inventeur(s) :

CHERBONNEAU François

6900 MARCHE-EN-FAMENNE

Belgique

CHERBONNEAU PRUNEVILLE Aurore

6900 MARCHE-EN-FAMENNE

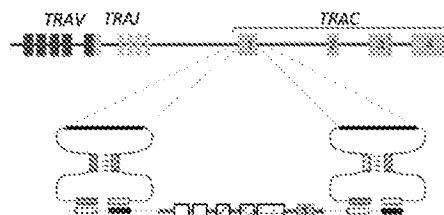
Belgique

(54) Composition, cellules immunitaires la comprenant et utilisation de ces dernières

(57) L'invention concerne une composition comprenant - une première molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant une région complémentaire d'une cible et des sites de reconnaissance d'une transposase, - une deuxième molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant une région complémentaire d'une cible et des sites de reconnaissance d'une transposase, et - une troisième molécule simple brin comprenant une séquence codant du CD3ζ du TCR, et des sites de liaison à une transposase.

[Fig. 6]

A.



Description

Titre de l'invention : **Composition, cellules immunitaires la comprenant et utilisation de ces dernières**

5

L'invention concerne une composition ainsi que des cellules immunitaires comprenant ladite composition et l'utilisation des cellules comprenant ladite composition.

Les lymphocytes T sont une catégorie de globules blancs qui participent aux défenses immunitaires de l'organisme en détruisant les agents pathogènes et les cellules tumorales.

10 Cependant, dans le cas de certains cancers, ces cellules tumorales ont la capacité d'inactiver les défenses immunitaires de leur hôte.

Les cellules CAR-T ou *Chimeric Antigenic Receptor-T* sont une approche d'immunothérapie cellulaire visant à combattre certains cancers, notamment les leucémies à lymphocytes B et certains lymphomes, en renforçant le système immunitaire du patient.

15 Cette approche novatrice consiste à modifier génétiquement des lymphocytes T du patient ou d'un donneur compatible à partir d'un prélèvement sanguin afin qu'ils puissent reconnaître et éliminer efficacement les cellules cancéreuses. Cette modification ex vivo (hors de l'organisme du patient) permet un meilleur contrôle de la modification génétique à effectuer, ici l'introduction d'un gène permettant la production de récepteurs de surface (CAR) permettant
20 aux cellules T d'attaquer et de détruire les cellules cancéreuses. Une fois ces cellules produites en quantité suffisante pour combattre la maladie, elles sont injectées dans le système sanguin du patient.

Plusieurs technologies d'édition du génome ont été adaptées pour la production de ces cellules CAR T, comme CRISPR/CAS9, Zinc-finger et les TALENs. Néanmoins, ces dernières
25 souffrent d'une efficacité relative quant à l'insertion du gène CAR dans les cellules T.

D'autres systèmes sont également utilisés, comme les vecteurs viraux (AAV, Lentivirus) et le transposon *sleeping beauty*, mais l'intégration pseudo spécifique du gène CAR avec ces approches peut entraîner des conséquences en aval de leur utilisation (par exemple la demande WO2017180989A2).

30 Aussi, au vu de la puissance de la technologie CAR, il demeure un besoin dans l'efficacité de production des cellules T modifiées CAR-T.

La présente invention a pour but de pallier ces inconvénients.

Un but de l'invention est de proposer une composition capable de permettre la production simple et efficace des cellules T modifiées CAR-T.

35 Un autre but de l'invention est de fournir une méthode ou un médicament capable de traiter des pathologies par l'intermédiaire desdites cellules T modifiées CAR-T.

L'invention concerne une composition comprenant

- une première molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant ou constituée essentiellement d'une séquence A permettant l'insertion d'une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ou comprenant une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ladite séquence complémentaire étant liée en 5' à une première séquence riches en T de 40 à 60 nucléotides de long et en 3' à une deuxième séquence riches en T de 40 à 60 nucléotides de long, lesdites première et deuxième séquences riches en T comprenant respectivement un premier et un deuxième domaine de 6 à 12 nucléotides riches en G/C, la séquence du premier domaine étant complémentaire de la séquence du deuxième domaine, ledit premier et deuxième domaine étant positionnés de 15 à 52 nucléotides de ladite séquence A, ladite première molécule comprenant en son extrémité 5' au moins une première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase,
- une deuxième molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant ou constituée essentiellement d'une séquence B permettant l'insertion d'une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ou comprenant une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ladite séquence B complémentaire étant liée en 5' à une troisième séquence riche en T de 40 à 60 nucléotides de long et en 3' à une quatrième séquence riche en T de 40 à 60 nucléotides de long, ladite troisième et quatrième séquence riche en T comprenant respectivement un troisième et un quatrième domaine de 6 à 12 nucléotides riches en G/C, la séquence du troisième domaine étant complémentaire de la séquence du quatrième domaine, ledit troisième et quatrième domaine étant positionnés de 15 à 52 nucléotides de ladite séquence B, ladite deuxième molécule comprenant en son extrémité 5' au moins la première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance de ladite transposase et en son extrémité 3' la deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase, ladite séquence B étant une séquence complémentaire dudit acide nucléique d'intérêt, la séquence A étant positionnée en 5' d'une région d'intérêt dudit acide nucléique d'intérêt et la séquence B positionnée en 3' de la région d'intérêt dudit acide nucléique d'intérêt, et
- une troisième molécule simple brin comprenant
 - * dans sa partie 5', au moins une séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule,
 - * dans sa partie 3' au moins une séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule, et
 - * une région intermédiaire située entre la séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule et la séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule, ladite région intermédiaire comprenant une séquence codant une protéine

de fusion, ladite protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale du domaine activateur du lymphocyte T, c'est-à-dire la chaîne CD3ζ du récepteur des cellules T ou TCR,

- 5 les première et troisième molécules d'acides nucléiques simple brin étant appariées selon la complémentarité des bases définie par Watson et Crick de sorte à définir deux sites double brin de liaison de ladite transposase et les deuxième et troisième molécules d'acides nucléiques simple brin étant appariées selon la complémentarité des bases définie par Watson et Crick de sorte à définir deux sites double brin de liaison de ladite transposase.
- 10 L'invention repose sur la constatation faite par les inventeurs que l'utilisation d'un complexe molécule tel que décrit ci-dessus, et faisant intervenir une transposase bactérienne permet un remplacement ciblé et efficace d'une cible génomique, et de produite à l'aide d'une séquence d'intérêt des fusions CART, permettant de produire à façon des cellules T ciblant des cellules tumorales spécifiques.

- 15 Cela signifie que l'invention concerne un complexe moléculaire comprenant une première molécule d'acides nucléiques simple brin, une deuxième molécule d'acides nucléiques simple brin et une troisième molécule d'acide nucléique simple brin, ladite troisième molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant ou étant constituée essentiellement en son extrémité 5' d'au moins une séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance
- 20 de ladite transposase, et ladite troisième molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant ou étant constituée essentiellement en son extrémité 3' d'au moins une séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase,

- ledit complexe étant tel que les première, deuxième et troisième molécules d'acides nucléiques simple brin sont appariées selon la complémentarité des bases définie par Watson
- 25 et Crick de sorte à définir deux sites double brin de liaison de ladite transposase dans l'extrémité 5' de la troisième molécule et deux sites double brin de liaison de ladite transposase dans l'extrémité 3' de la troisième molécule.

- L'invention repose sur l'observation inattendue faite par l'inventeur que l'utilisation de guides simples brins spécifiques capables de cibler une région d'un acide nucléique d'intérêt
- 30 permettent de mobiliser de manière contrôlée et « site spécifique » des transposases, et ainsi utiliser les propriétés de recombinaison desdites transposases pour réaliser du remplacement de séquences dans des molécules d'intérêt.

- Le complexe moléculaire susmentionné est en fait l'unité de base de la technologie définie dans l'invention. Cette unité de base sert à guider les recombinases sur un site spécifique où
- 35 doit avoir lieu la recombinaison, et donc le remplacement de séquence. Contrairement au système CRISPR/Cas9 qui requiert la présence de séquences de type PAM (NGG), l'outil

moléculaire défini ici peut être utilisé sur n'importe quelle séquence cible, quelle qu'en soit sa séquence.

Le complexe moléculaire susmentionné est donc l'unité de base qui devra être complétée par :

- 5 - une région homologie d'une région 5' de la séquence cible, ladite région d'homologie étant représentée par la séquence A et
- une région homologie d'une région 3' de la séquence cible, ladite région d'homologie étant représentée par la séquence B.

Il s'agit donc ici d'un produit intermédiaire de l'outil tel que décrit ci-après.

- 10 Le complexe moléculaire est constitué de trois molécules d'acides nucléiques simples brins, qui peuvent être des molécules d'ADN, des molécules d'ARN ou des molécules mixtes d'ARN et d'ADN.

Ces trois molécules sont partiellement complémentaires entre elles deux à deux, selon la complémentarité des bases d'acides nucléiques définie par Watson et Crick, c'est-à-dire qu'une Adénine s'apparie à un Thymidine ou un Uracile, et une Cytosine s'apparie à une Guanine, et réciproquement.

Plus particulièrement les trois molécules formant le complexe susmentionné comprennent chacune la séquence d'un des brins d'une molécule double brin correspondant à la séquence de fixation d'une transposase. Aussi, chaque molécule simple brin comprend donc une « demie séquence » de fixation de transposase et ne peut donc pas permettre une interaction avec ladite transposase correspondante. En revanche, lorsque les trois molécules du complexe interagissent ensemble, par appariement des bases tel que défini ci-dessus, une molécule double brin est ainsi formée, reconstituant un site de liaison double brin de ladite transposase, celle-ci pouvant ainsi interagir avec la molécule formée.

- 25 La première molécule.

La première molécule du complexe est la molécule qui comprendra, une fois modifiée, une séquence d'acide nucléique qui permettra de cibler spécifiquement une région d'intérêt d'une molécule d'acide nucléique d'intérêt. Cette séquence d'intérêt sera choisie par l'utilisateur du système selon la cible choisie. Cette séquence d'intérêt sera insérée dans la première molécule dudit complexe au niveau de la région A. Cette région A correspond *a minima* à deux acides nucléiques entre lesquels sera inséré la séquence permettant de cibler la molécule cible. Au vu de la structure orientée des acides nucléiques (sens 5'-3'), il est important que la séquence permettant de cibler la région d'intérêt soit positionnée dans le bon sens, afin que l'appariement soit possible avec la séquence cible.

- 35 Aussi, avantageusement, la région A comprend un ou plusieurs sites reconnaissant des enzymes de restrictions afin de favoriser une insertion orientée. Un ou plusieurs des sites suivants peuvent être présents dans la région A :

[Table 1]

		AA/CGTT	AclI
		A/AGCTT	HindIII
		AAT/ATT	SspI
		/AATT	MluCI
		A/CATGT	PciI
		A/CCGGT	AgeI
		ACCTGC(4/8)	BfuAI BspMI
		A/CCWGGT	SexAI
		A/CGCGT	MluI
		ACGGC(12/14)	BceAI
		A/CGT	HpyCH4IV
		ACN/GT	HpyCH4III
SEQ ID NO :	4	(10/15)ACNNNNGTAYC(12/7)	BaeI
SEQ ID NO :	5	(9/12)ACNNNNNCTCC(10/7)	BsaXI
		A/CRYGT	AflIII
		A/CTAGT	SpeI
		ACTGG(1/-1)	BsrI
		ACTGGG(5/4)	BmrI
		A/GATCT	BglII
		AGC/GCT	AfeI
		AG/CT	AluI
		AGG/CCT	StuI
		AGT/ACT	Scal-
		AT/CGAT	ClaI BspDI
SEQ ID NO :	6	ATCTATGTCGGGTGCGGAGAAAGAGGTA AT(-15/-19)	PI-SceI
		ATGCA/T	NsiI
		AT/TAAT	Asel
		ATTT/AAAT	Swal
SEQ ID NO :	7	(11/13)CAANNNNNGTGG(12/10)	CspCI
		C/AATTG	MfeI
		CACCTGC(4/8)	PaqCI
		CACGAG	Nb.BssSI
		CACGAG(-5/-1)	BssSI-v2

		CACGTC(-3/-3)	BmgBI
		CAC/GTG	PmlI
		CACNNN/GTG	DraIII
SEQ ID NO :	8	CACNN/NNGTG	AleI-v2
		CAGCAG(25/27)	EcoP15I
		CAG/CTG	PvuII
		CAGNNN/CTG	AlwNI
		CAGTG(2/0)	BtsIMutI
		CA/TATG	NdeI
		CATG/	NlaIII
		/CATG	FatI
		C/ATG	CviAI
SEQ ID NO :	9	CAYNN/NNRTG	MslI
		CC(12/16)	FspEI
SEQ ID NO :	10	CCANNNNN/NNNTGG	XcmI
SEQ ID NO :	11	CCANNNNN/NTGG	BstXI
SEQ ID NO :	12	CCANNNN/NTGG	PfiMI
		CCATC(4/5)	BclI
		C/CATGG	NcoI
		CCCAGC(-5/-1)	BseYI
		CCCGC(4/6)	FauI
		CCC/GGG	SmaI
		C/CCGGG(0/-1)CCD	TspMI XmaI Nt.CviPII
		CCDG(10/14)	LpnPI
		CCGC(-3/-1)	AccI
		CCGC/GG	SacII
		CCGCTC(-3/-3)	BsrBI
		C/CGG	MspI HpaII
		CC/NGG	ScrFI
		/CCNGG	StyD4I
		C/CNNGG	BsaJI
SEQ ID NO :	13	CCNNNNN/NGGG	BsII
		C/CRYGG	BtgI
		CC/SGG	NciI

		C/CTAGG	AvrII
		CCTC(7/6)	MnII
		CCTCAGC	Nb.BbvCI
		CCTCAGC(-5/-7)	Nt.BbvCI
		CCTCAGC(-5/-2)	BbvCI
		CCTGCA/GG	SbfI
		CCTNAGC(-5/-2)	Bpu10I
		CC/TNAGG	Bsu36I
SEQ ID NO :	14	CCTNN/NNNAGG	EcoNI
		CCTTC(6/5)	HpyAV
		/CCWGG	PspGI
		CC/WGG	BstNI
		C/CWWGG	StyI
SEQ ID NO :	15	(10/12)CGANNNNNNTGC(12/10)	Bcgl
		CGAT/CG	PvuI
		CG/CG	BstUI
		C/GGCCG	EagI
		CG/GWCCG	RsrII
		CGRY/CG	BsiEI
		C/GTACG	BsiWI
		CGTCTC	BsmBI-v2
		CGTCTC(1/5)	Esp3I
		CGWCG/	Hpy99I
		CMG/CKG	MspA1I
SEQ ID NO :	16	CNNNNNNNNNN/NNNNNNNNNG	AbaSI
		CNNR(9/13)	MspJI
		CR/CCGGYG	SgrAI
		C/TAG	Bfal
		CTCAG(9/7)	BspCNI
		C/TCGAG	XhoI PaeR7I
		CTCTTC(1/4)	EarI
		CTGAAG(16/14)	AcuI
		CTGCA/G	PstI
		CTGGAG(16/14)	Bpml
		C/TNAG	DdeI

		C/TRYAG	Sfcl
		C/TTAAG	AflII
		CTTGAG(16/14)	BpuEI
		C/TYRAG	SmlI
		C/YCGRG	BsoBI Aval
		GAAGA(8/7)	MbolI
		GAAGAC(2/6)	BbsI
SEQ ID NO :	17	GAANN/NNTTC	XmnI
		GAATGC(1/-1)	BsmI
		GAATGC	Nb.BsmI
		G/AATTC	EcoRI
		GACGC(5/10)	HgaI
		GACGT/C	AatII
		GAC/GTC	ZraI
		GACN/NNGTC	PfiFI Tth111I
SEQ ID NO :	18	GACNN/NNGTC	PshAI
SEQ ID NO :	19	GACNNN/NNGTC	AhdI
SEQ ID NO :	20	GACNNNN/NNGTC	DrdI
		GAG/CTC	Eco53kI
		GAGCT/C	SacI
		GAGGAG(10/8)	BseRI
		GAGTC(4/-5)	Nt.BstNBI
		GAGTC(4/5)	PleI
		GAGTC(5/5)	MlyI
		G/ANTC	HinfI
		GAT/ATC	EcoRV
		GA/TC	DpnI
		/GATC	Sau3AI DpnI I MboI
SEQ ID NO :	21	GATNN/NNATC	BsaBI
		G/AWTC	TfiI
		GCAATG	Nb.BsrDI
		GCAATG(2/0)	BsrDI
		GCAGC(8/12)	BbvI
		GCAGTG(2/0)	BtsI-v2

		GCAGTG	Nb.BtsI
SEQ ID NO :	22	GCANNNN/NTGC	BstAPI
		GCATC(5/9)	SfaNI
		GCATG/C	SphI
		GCCC/GGGC	SrfI
		GCCGAG(21/19)	NmeAIII
		G/CCGGC	NgoMIV
		GCC/GGC	NaeI
SEQ ID NO :	23	GCCNNNN/NGGC	BglI
		GCGAT/CGC	AsiSI
		GCGATG(10/14)	BtgZI
		GCG/C	HhaI
		G/CGC	HinP1I
		G/CGCGC	BssHII
		GC/GGCCGC	NotI
		GC/NGC	Fnu4HI
		GCN/NGC	Cac8I
SEQ ID NO :	24	GCNNNNN/NGGC	MwoI
		G/CTAGC	NheI
		GCTAG/C	BmtI
		GCTCTTC(1/-7)	Nt.BspQI
		GCTCTTC(1/4)	SapI BspQI
		GC/TNAGC	BlpI
		G/CWGC	ApeKI TseI
		GDGCH/C	Bsp1286I
		GGATC(4/5)	AlwI
		GGATC(4/-5)	Nt.AlwI
		G/GATCC	BamHI
		GGATG(9/13)	FokI
		GGATG(2/0)	BtsCI
		GG/CC	HaeIII
		GGCCGG/CC	FseI
SEQ ID NO :	25	GGCCNNNN/NGGCC	SfiI
		G/GCGCC	KasI
		GG/CGCC	NarI

		GGCGC/C	PluTI
		GGC/GCC	SfoI
		GG/CGCGCC	AscI
		GGCGGA(11/9)	EciI
		GGGAC(10/14)	BsmFI
		GGGCC/C	ApaI
		G/GGCCC	PspOMI
		G/GNCC	Sau96I
		GGN/NCC	NlaIV
		G/GTACC	Acc65I
		GGTAC/C	KpnI
		GGTCTC(1/5)	BsaI v2
		GGTGA(8/7)	HphI
		G/GTNACC	BstEII
		G/GWCC	Avall
		G/GYRCC	BanI
		GKGCM/C	BaeGI
		GR/CGYC	BsaHI
		GRGCI/C	BanII
		GT/AC	RsaI
		G/TAC	CviQI
		GTATAC	BstZ17I
		GTATCC(6/5)	BciVI
		G/TCGAC	Sall
		GTCTC(1/5)	BsmAI BcoD I
		GTCTC(1/-5)	Nt.BsmAI
		G/TGCAC	ApaLI
		GTGCAG(16/14)	BsgI
		GT/MKAC	AccI
		GTN/NAC	Hpy166II
		/GTSAC	Tsp45I
		GTT/AAC	HpaI
		GTTT/AAAC	PmeI
		GTY/RAC	HincII

		GWGCW/C	BsiHKA1
		NNCASTGNN/	TspRI
		R/AATTY	ApoI
		RCATG/Y	NspI
		R/CCGGY	BsrFI-v2
		R/GATCY	BstYI
		RGCGC/Y	HaeII
		RG/CY	CviKI-1
		RG/GNCCY	EcoO109I
		RG/GWCCY	PpuMI
SEQ ID NO :	26	TAAC TATAACGGTCCTAAGGTAGCGAA(-9/-13)	I-CeuI
		TAC/GTA	SnaBI
SEQ ID NO :	27	TAGGGATAACAGGGTAAT(-9/-13)	I-SceI
		T/CATGA	BspHI
		T/CCGGA	BspEI
		TCCRAC(20/18)	MmeI
		T/CGA	TaqI-v2
		TCG/CGA	NruI
		TCN/GA	Hpy188I
		TC/NNGA	Hpy188III
		T/CTAGA	XbaI
		T/GATCA	BclI
		TG/CA	HpyCH4V
		TGC/GCA	FspI
SEQ ID NO :	28	TGGCAAACAGCTATTATGGGTATTATGGGT(-13/-17)	PI-PspI
		TGG/CCA	MscI
		T/GTACA	BsrGI
		T/TAA	MseI
		TTAAT/TAA	PacI
		TTA/TAA	PsiI-v2
		TT/CGAA	BstBI
		TTT/AAA	DraI
		VC/TCGAGB	PspXI

		W/CCGGW	BsaWI
		YAC/GTR	BsaAI
		Y/GGCCR	EaeI

Évidemment, dans le cadre d'une synthèse chimique de la première molécule, il n'est pas nécessaire de disposer de sites de clonage (ou d'insertion) de la séquence permettant de cibler la région cible, mais de bien prendre la précaution de donner une séquence
5 correctement orientée. Cela est bien évidemment toutefois possible.

La première molécule est en outre constituée de part et d'autre de la région A, de séquences riches en A/T, ou s'il s'agit d'ARN en A/U, afin de permettre une certaine flexibilité de la structure. Par riche en A/T, ou en A/U, on entend dans l'invention une séquence qui comprend plus de 50% de A ou T, ou U, de préférence plus de 50% de T ou de U, par rapport
10 au nombre total de nucléotides constituant la séquence. Ces séquences de part et d'autre de la région A ont une taille en nucléotides variant de 10 nucléotides à 60 nucléotides.

La flexibilité de ces séquences flanquantes de la région A, du fait de la présence de nombreux A, T ou U, peut avoir pour effet de permettre une recombinaison par l'intermédiaire des recombinaisons trop peu contrôlées, voire même lorsque le complexe n'a pas encore
15 reconnu la molécule cible.

Aussi, afin de pallier ce problème, des séquences riches en G/C sont introduites dans chacune des séquences riches en A/T, notamment riches en T, ou A/U, bordant la région A. Ces régions riches en G/C sont constituées de 6 à 12 nucléotides, dont la quantité de C ou de G est supérieure à 50% des nucléotides contenus dans ladite séquence riche en G/C.

Pour stabiliser la structure de la première molécule, et comme décrit ci-dessus éviter une recombinaison intempestive, les régions riches en G/C sont positionnées de 15 à 52 nucléotides par rapport à l'extrémité de la région A.

Pour plus de clarté, si la région A consiste en 3 nucléotides, le nucléotide central correspondant à la position 0, la région riche en A/T ou A/U débutera à gauche en position -2, et à droite en position +2. Dès lors, à gauche, la région riche en G/C sera positionnée de la position -17 à la position -54, et du côté droit de la position +17 à la position +54.

Autre élément important, la séquence riche en G/C à droite (ou 5') de la région A est nécessairement complémentaire (selon le principe d'appariement de Watson et Crick) de la région riche en G/C de la région à droite (ou 3') de la région A. Aussi, la première molécule simple brin s'apparie-t-elle avec elle-même au niveau des régions riches en G/C, ce qui
30 empêche toute recombinaison par les transposases, tant qu'il n'y aura pas d'interaction avec la séquence cible complémentaire de la région qui sera insérée dans la région A de la première molécule.

Enfin la première molécule comprend à son extrémité 5' une séquence correspondant à un premier site de liaison à une transposase, et à son extrémité 3' un deuxième site de liaison à ladite transposase.

5 Le premier site de liaison et le deuxième site de liaison sont avantageusement les mêmes, et surtout correspondent tous les deux au même brin du site de liaison double brin de ladite transposase. Cela signifie que le premier site de liaison à la transposase présent dans la région 5' de la première molécule ne peut s'apparier intégralement, et donc de manière stable avec le site de liaison à la transposase présent dans la région 3'.

10 Le premier site de liaison et le deuxième site de liaison sont avantageusement les mêmes, mais correspondent chacun à un brin différent du site double brin de liaison à la transposase. Aussi, par exemple, si le premier site de liaison à la transposase correspond au brin sens, le deuxième site de liaison à la transposase correspond à la séquence du brin complémentaire. Il est alors possible d'avoir deux configurations : i) soit le deuxième site de liaison qui correspond au brin complémentaire est orienté dans le sens 3'-5', dans ce cas il pourra
15 s'apparier avec le premier site de liaison à la transposase et former le site double brin, ii) soit le deuxième site de liaison qui correspond au brin complémentaire est orienté dans le sens 5'-3', et dans ce cas ne pourra pas s'apparier avec la première séquence de liaison à la transposase, les séquences, du fait de leur orientation n'étant pas complémentaires. Dans le cas i) susmentionné, si la première molécule simple brin s'auto-apparie au niveau des premier
20 et deuxième site de liaison, il ne sera pas possible de former le complexe susmentionné, car il n'y aura plus de région complémentaire simple brin disponible pour s'apparier avec la deuxième molécule de sorte à former deux sites de liaison double brin à la transposase.

Aussi, la première molécule, lorsqu'elle est dépourvue de séquence complémentaire de la région cible dans la partie A, ou lorsqu'elle contient une telle séquence cible mais que cette
25 dernière n'interagit pas (ne s'apparie pas) avec ladite séquence cible, forme une structure tridimensionnelle où toute la molécule est simple brin à l'exception de la région correspondant aux régions riches en G/C qui s'apparient entre elles.

Une représentation schématique de sous forme appariée est représentée aux **Figures 1A à 1E**.

30 La deuxième molécule.

La deuxième molécule du complexe est de structure similaire à la première molécule. les explications susmentionnées s'appliquent donc mutatis mutandis. Toutefois, dans la deuxième molécule la région B (ou séquence B) ainsi que les sites de liaison à la transposase sont organisés de manière différente.

35 Tout d'abord la région B est différente de la région A de la première molécule. En effet, il ne peut, dans l'objectif d'une recombinaison orientée, y avoir de compétition pour la même cible d'intérêt entre la première et la deuxième molécule.

Aussi, est-il nécessaire que la région B corresponde à une deuxième séquence complémentaire de la séquence cible, cette deuxième séquence complémentaire de la séquence cible étant positionnée en 3' par rapport à la première séquence reconnue par la séquence complémentaire correspondant à la séquence A de la première molécule.

Par conséquent, lorsque la première molécule et la deuxième molécule seront appariées à la séquence cible, la séquence cible sera bordée par ces deux molécules, la première molécule étant localisée en 5' et la deuxième molécule étant positionnée en 3'. La région de la séquence cible localisée entre la région d'interaction avec la première molécule et la région d'interaction avec la deuxième molécule correspond à la séquence qui sera remplacée par celle de la troisième molécule.

La troisième molécule

La troisième molécule du complexe susmentionné est plus simple que les deux premières (la première et la deuxième molécule). la troisième molécule comprend, dans sa partie 5', un site de liaison à la transposase qui est complémentaire du site de liaison à ladite transposase présent dans la partie 3' de la première molécule. De ce fait, lorsque le complexe sera formé, le ½ site de liaison à la transposase (simple brin) localisé en 3' de la première molécule pourrait s'apparier avec le ½ site de liaison (simple brin) à la transposase localisé en 5' de la deuxième molécule de sorte à former un site de liaison double brin à la transposase, site double brin sur lequel la transposase pourra venir se fixer.

Dans la partie 3' de la troisième molécule se trouve site de liaison à la transposase qui est complémentaire du site de liaison à ladite transposase présent dans la partie 5' de la deuxième molécule. De ce fait, lorsque le complexe sera formé, le ½ site de liaison à la transposase (simple brin) localisé en 3' de la troisième molécule pourrait s'apparier avec le ½ site de liaison (simple brin) à la transposase localisé en 5' de la deuxième molécule de sorte à former un site de liaison double brin à la transposase, site double brin sur lequel la transposase pourra venir se fixer.

Entre la partie 5' qui comprend un ½ site de liaison à la transposase et la partie 3' qui comprend un ½ site de liaison à la transposase, la troisième molécule comprend une séquence de remplacement, c'est à dire la séquence qui à terme remplacera la séquence cible. Cette séquence de remplacement est bordée en 5' par au moins un site de restriction et en 3' par au moins un site de restriction ; ces deux sites de restrictions étant distincts. Aussi, la troisième molécule comprend dans le sens 5' vers 3' : un ½ site de liaison à la transposase complémentaire du site de liaison à la transposase de la première molécule, suivi d'au moins un site de restriction, suivi de la séquence de remplacement, suivi d'au moins un site de restriction différent du site de restriction en amont de la séquence de remplacement, suivi enfin d'un ½ site de liaison à la transposase complémentaire du site de liaison à la transposase de la deuxième molécule.

La séquence de remplacement correspond quant à la partie de la séquence codante du gène CD247 codant au moins le domaine intracellulaire de la protéine CD3 ζ (CD3 zeta).

La chaîne ζ (ou CD3 ζ) est une protéine transmembranaire qui est l'une des composantes du complexe du récepteur des cellules T (TCR) et participe à la transduction du signal.

- 5 La chaîne ζ présente une petite partie N terminale extracellulaire (9 acides aminés) qui interagit avec les chaînes CD3 α et CD3 β , un seul domaine transmembranaire et une longue chaîne cytoplasmique (120 acides aminés). Cette longue chaîne cytoplasmique contient trois motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (ITAM), qui participent à son interaction avec le cytosquelette du lymphocyte T lors de l'activation de ce dernier.
- 10 La composition selon l'invention permet d'obtenir le complexe sus-décrit. La **Figure 2** illustre schématiquement le complexe formé entre les première, deuxième et troisième molécules selon l'invention.

Le complexe formé à partir des molécules de la composition de l'invention, lorsque les trois molécules sont correctement appariées, comprend deux paires de sites de liaison double brin

15 de reconnaissance d'une transposase :

- la première paire étant obtenue par l'hybridation de la première molécule avec la troisième molécule, et
- la seconde paire étant obtenue par l'hybridation de la deuxième molécule avec la troisième molécule.

- 20 La séquence A contenue dans la première molécule est complémentaire du même brin de l'acide nucléique qui est complémentaire de la séquence B contenue dans la deuxième molécule. En d'autres termes, la séquence A contenue dans la première molécule et la séquence B contenue dans la deuxième molécule sont capables de s'hybrider au même acide nucléique simultanément, car les deux séquences A et B ne reconnaissent pas la même
- 25 séquence.

Pour clarifier encore plus le propos, l'intérêt dans la présente invention est de proposer une première molécule et une deuxième molécule, toutes deux telles que définies ci-dessus, les séquences A et B respectives étant telles qu'elles sont capables de reconnaître pour l'une, une séquence localisée en 5' de la séquence cible de l'acide nucléique d'intérêt et pour l'autre,

30 une séquence localisée en 3' de la même séquence cible de l'acide nucléique d'intérêt. Les séquences A et B sont donc complémentaires de régions bordant la séquence d'intérêt, que l'on souhaite remplacer, de la molécule d'acide nucléique d'intérêt.

Les première et deuxième molécules d'intérêt sont donc essentielles pour cibler spécifiquement la molécule d'intérêt, afin d'encadrer la séquence à remplacer.

- 35 La troisième molécule de l'ensemble, quant à elle, est celle qui apporte la molécule d'acides nucléiques qui contient la séquence de remplacement, i.e. une séquence comprenant la partie intracellulaire d'activation du CD3 ζ .

D'un point de vue mécanistique, le complexe selon l'invention est tel qu'il est constitué de ses trois molécules, la première et la deuxième molécule étant structurellement organisées dans l'espace de sorte que leurs régions riches en G/C soient appariées.

De part et d'autre de la troisième molécule, c'est à dire en 5' et en 3', du faite de l'hybridation avec les première et deuxième molécules, deux paires de site de liaison à une transposase permettent, lorsqu'elle est présente, à des dimères de transposases de lier à l'ensemble.

On notera que les sites de liaison à la transposase de la première molécule peuvent être les mêmes que ceux de la deuxième molécule, ou être différents. Dans le cas où les séquences de liaison sont les mêmes, les dimères de transposases en 5' de la troisième molécule (par hybridation de la partie 5' de la troisième molécule avec la première molécule), et en 3' de la troisième molécule (par hybridation de la partie 3' de la troisième molécule avec la deuxième molécule) seront les mêmes. Aussi, à titre d'exemple, si les sites de liaison sont tous des sites de liaison de la transposase de Tn5, l'ensemble sera associé à 2 dimères de transposases de Tn5.

Il est également possible que les sites de liaison de la première molécule et de la deuxième molécule ne reconnaissent pas la même transposase. Dans ce cas, et selon la définition donnée ci-dessus, la partie 5' de la troisième molécule formera par hybridation avec la première molécule deux sites double brin de liaison à une première transposase, et partie 3' de la troisième molécule formera par hybridation avec la deuxième molécule deux sites double brin de liaison à une deuxième transposase.

Si maintenant le complexe susmentionné, lié à deux dimères de transposases est mis en présence d'une molécule d'acides nucléiques d'intérêt dont la partie 5' est complémentaire de la séquence A de la première molécule de l'ensemble et dont la partie 3' est complémentaire de la séquence B de la deuxième molécule de l'ensemble, alors il y aura appariement entre la molécule d'acide nucléiques d'intérêt et l'ensemble au niveau des régions A et B sus-décrites.

Cette interaction aura pour conséquence de rompre l'interaction des deux séquences riches en G/C de chacune des première et deuxième molécules de l'ensemble. Dès lors, la troisième molécule et la molécule d'acides nucléiques d'intérêt seront rapprochées spatialement et les transposases pourront exercer leur activité de tagmentation, dont le résultat sera le remplacement de la séquence de la molécule d'intérêt, bordée par les séquences complémentaires des séquences A et B, par la séquence de la troisième molécule de l'ensemble, qui se trouve entre les demi-sites de liaison à la /aux transposases en 5' et en 3'.

Dans l'invention, les premières molécules, deuxième molécules et troisième molécule de l'ensemble sont avantageusement des molécules constituées de désoxyribonucléotides, afin de former des molécules d'ADN simple brin.

De manière encore plus avantageuse, les premières molécules, deuxième molécules et troisième molécule de l'ensemble sont des molécules hybrides ADN/ARN, où, le « squelette »

des molécules est de l'ADN, et les séquences de reconnaissance A et B de la molécule d'acides nucléiques d'intérêt, et la région centrale de la troisième molécule sont de l'ARN. Ceci est particulièrement avantageux lorsque le remplacement de séquence que permet l'invention doit se faire directement sur une molécule d'ARN.

5 La **Figure 2-A** illustre l'interaction entre la molécule d'intérêt et le complexe première/deuxième/troisième molécules selon l'invention.

De manière avantageuse, l'invention concerne le complexe susmentionné, où ladite première molécule ou ladite deuxième molécule, ou les deux est/sont couplée(s) à une enzyme, notamment par le biais d'un nucléotide modifié. Cette enzyme a pour but de favoriser le

10 remplacement de la molécule d'intérêt. Il peut s'agir

- d'une hélicase, enzyme capable d'ouvrir une molécule double brin qui serait superenroulée ou encore associée à des protéines telles que des histones,

- une topoisomérase, enzyme agissant sur la structure topologique de l'ADN en générant des coupures transitoires,

15 - une ligase qui permet de former une liaison phosphodiester entre une extrémité 5' phosphate d'un nucléotide et l'extrémité 3' OH d'un autre nucléotide,

- une polymérase, qui synthétisera une molécule d'acides nucléiques à partir d'un site d'initiation, 3'OH libre, dans le sens 5'→ 3', notamment en recopiant un brin complémentaire antiparallèle selon le modèle de Watson et Crick.

20 Il est également possible de combiner deux ou plusieurs desdites enzymes pour disposer de tout le matériel enzymatique nécessaire pour permettre le remplacement de séquences prévu dans le cadre de l'invention.

Dans un aspect particulier, de l'invention, la première molécule de l'ensemble peut contenir dans sa partie 5', plus précisément entre le premier site de liaison à la transposase et la région

25 A, un ou plusieurs nucléotides modifiés. De la même manière la troisième molécule de l'ensemble peut contenir dans sa partie 3', plus précisément entre le premier site de liaison à la transposase et la région 3, un ou plusieurs nucléotides modifiés.

Ce nucléotide modifié est notamment modifié par greffage d'une chaîne carbonée substituée avec une étiquette protéique, ou tag en anglais, ou encore une molécule permettant une

30 interaction spécifique telle que la streptavidine ou la biotine.

De telles modifications permettent alors de lier spécifiquement, à la première molécule de l'ensemble, des enzymes qui peuvent servir à favoriser la tagmentation, et le remplacement de séquence. Il sera particulièrement avantageux d'avoir par exemple un greffage streptatvidine, qui permettra de greffer une hélicase biotinylée (inversement hélicase greffée

35 à la streptavidine et nucléotide biotinylé) servant à ouvrir une molécule double brin. Il est également possible d'envisager le greffage avec une ligase biotinylée (ou couplé à la streptavidine), afin de relier le brin recombiné coté 3'.

Il est également possible d'associer à la première molécule ou à la deuxième molécule de l'ensemble un oligonucléotide, de sorte que ledit oligonucléotide s'appariera sur une région prédéterminée de la dite première ou deuxième molécule. Cet oligonucléotide est alors avantageusement couplé à une molécule de greffage comme expliqué ci-dessus.

- 5 De manière avantageuse, l'invention concerne la composition susmentionnée, où ladite protéine de fusion comprend le peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule, fusionné à une partie transmembranaire d'une protéine membranaire, ce dernier fusionné à la chaîne CD3ζ du TCR.

10 Dans ce mode de réalisation avantageux, la troisième molécule comprend une séquence qui code une protéine de fusion dont l'organisation dans le sens N-terminal vers C-terminal est la suivante : un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule, généralement une cellule tumorale comme cela sera développé ci-après, ce peptide étant suivi d'un domaine transmembranaire, lui-même suivi par la partie intracellulaire de la chaîne CD3ζ du TCR.

- 15 Il est notamment avantageux que la partie transmembranaire de la protéine de fusion suscitée soit celle de la chaîne CD3ζ du TCR, mais tout autre domaine transmembranaire peut être utilisé, à partir du moment où une fois synthétisée dans une cellule la protéine de fusion est telle que : le peptide de liaison se retrouve exposé à l'extérieur de la cellule (extracellulaire), et la chaîne CD3ζ du TCR est exposée à l'intérieur de la cellule (intracellulaire) afin de
20 permettre la transduction d'un signal.

Si aucun autre domaine n'est présent dans ladite protéine de fusion, on parlera alors de récepteur chimérique ou CAR de première génération.

- De manière avantageuse, l'invention concerne la composition susmentionnée, où ladite protéine de fusion comprend le peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une
25 cellule, fusionné à une partie transmembranaire d'une protéine membranaire, le domaine transmembranaire de la protéine membranaire étant fusionné à un domaine de coactivation, ce dernier étant fusionné à la chaîne CD3ζ du TCR.

Avantageusement, la protéine de fusion susmentionnée comprend en outre, entre le domaine transmembranaire et le domaine d'activation (i.e. le domaine intracellulaire) de la chaîne CD3ζ
30 du TCR, un domaine de coactivation d'une autre protéine que le CD3ζ. Cette configuration est basée sur le mécanisme d'activation normale du TCR.

- Le double signal intracellulaire est la caractéristique typique de l'activation des cellules T. Trois types de récepteurs différents, dont les récepteurs antigéniques des cellules T, les récepteurs des cytokines et les récepteurs co-stimulateurs, sont inclus dans cette progression. Le premier
35 signal est le signal spécifique qui est déclenché par le TCR lorsqu'il reconnaît le complexe peptide antigénique-Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Le second signal est le signal co-stimulateur, produit par une

molécule co-stimulatrice telle que CD28/B7, qui favorise la synthèse d'IL-2 pour achever l'activation des cellules T et éviter l'apoptose.

Les cellules T naïves ne peuvent pas jouer leur rôle normal si le signal co-stimulateur est absent, et il en va de même si les cellules T sont stimulées par l'antigène.

5 Les CAR qui ne comprennent que la séquence CD3ζ ne peuvent pas activer les cellules sans signal co-stimulateur endogène qui devra être recruté, ce qui peut différer la réponse cellulaire. Pour éviter cet inconvénient, il est préférable de regrouper à la fois le signal d'activation de la chaîne CD3ζ et le signal de co-activation sur une même protéine de fusion. Lors de l'activation du TCR après avoir reconnu le CMH présentant l'antigène, les deux signaux seront activés
10 simultanément. La prolifération, la cytotoxicité et la réponse soutenue, ainsi que la survie des cellules exprimant cette protéine de fusion seront donc accrues.

Il est également possible d'inclure en outre un troisième domaine d'activation permettant la production de cytokines stimulatrices de la production d'IL-12. Ce troisième signal peut être généré, par exemple, à l'aide du domaine de liaison aux facteurs STAT3 du récepteur de l'IL-
15 2.

D'autres exemples sont envisageables, et l'homme du métier saura adapter les domaines de co-activation à son gré et selon les besoins et l'évolution de la technologie des cellules CAR. De manière encore plus avantageuse, l'invention concerne la composition susmentionnée,
- où ladite séquence A comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une
20 première région du locus du gène codant la protéine TRAC et
- où ladite séquence B comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une deuxième région du locus du gène codant la protéine TRAC, ladite séquence A et la dite séquence B étant deux séquences différentes, lesdites première et deuxième régions du locus TRAC encadrant avantageusement une région 5' région du locus
25 du gène codant la protéine TRAC.

Comme expliqué ci-dessus, afin d'opérer le remplacement du gène cible par la troisième molécule, il est avantageux que les séquences de la partie A de la première molécule et de la partie B de la deuxième molécule soient capables :

- de reconnaître la même molécule cible, et
30 - d'encadrer la région cible à remplacer, ce qui signifie que la première molécule doit, par l'intermédiaire de sa région A, reconnaître une séquence en amont de la séquence à remplacer de la molécule cible et la deuxième molécule doit, par l'intermédiaire de sa région B, reconnaître une séquence en aval de la séquence à remplacer de la molécule cible, ou l'inverse, i.e. la première molécule doit, par l'intermédiaire de sa région A,
35 reconnaître une séquence en aval de la séquence à remplacer de la molécule cible et la deuxième molécule doit, par l'intermédiaire de sa région B, reconnaître une séquence en amont de la séquence à remplacer de la molécule cible.

Il est ainsi possible de remplacer n'importe quelle séquence cible par n'importe quelle séquence de remplacement, du moment que les séquences A et B respectivement des première et deuxième molécules reconnaissent la région cible et l'encadrent.

Dans l'invention, il est particulièrement avantageux d'insérer la fusion codée par la troisième molécule à un locus qui permette son expression de manière équivalente à la chaîne CD3 ζ du TCR, sans pour autant remplacer la chaîne CD3 ζ du TCR endogène qui est nécessaire pour l'activité des cellules T.

Il est donc possible d'insérer la fusion (i.e. la séquence de la troisième molécule codant la protéine de fusion) n'importe où dans le génome cible, du moment que cette insertion ne génère aucune mutation (interruption d'un gène ou d'un élément de régulation). Plus particulièrement, il est intéressant de proposer une insertion de la fusion au niveau du locus du gène TRAC, gène qui code la partie constante du domaine α du TCR. Encore plus particulièrement, il est avantageux de réaliser une insertion au niveau du premier exon du locus TRAC, et encore plus avantageusement, immédiatement en 5' du premier exon.

Une telle insertion au locus TRAC permet non seulement d'obtenir une expression basale similaire à celle des chaînes du TCR, et offre une meilleure efficacité antitumorale.

En outre une telle insertion au locus TRAC :

- réduit la signalisation d'activation tonique et le développement d'une internalisation efficace et d'une réexpression équilibrée du CAR lors d'une exposition unique ou répétée à un antigène.

- permet de conserver un phénotype de mémoire naïf/central, de retarder la différenciation et l'épuisement des cellules T effectrices, ce qui en fait de meilleures cellules effectrices.

- améliore le profil de sécurité. (Parce que l'absence de TCR réduit le risque d'alloéactivité et d'auto-immunité induites par le TCR, et que l'insertion précise de la séquence codante du CAR réduit le risque d'oncogénèse insertionnelle).

De manière avantageuse, l'invention concerne la composition susmentionnée où ladite première molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence orientée

5'-3' de reconnaissance de ladite transposase et

où la deuxième molécule comprend son extrémité 5' une première séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase suivie d'une deuxième séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase.

De manière plus avantageuse, l'invention concerne la composition telle que définie ci-dessus, où ladite première molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence orientée

5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence orientée 5'-3' de reconnaissance de ladite transposase,

ladite deuxième molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence

5 orientée 5'-3' de reconnaissance de ladite transposase, et

où la troisième molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule suivie d'une deuxième séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule et en son
10 extrémité 3' une première séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule suivie d'une deuxième séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule.

Ici il est défini une possibilité de format de première et deuxième molécules de l'invention.

15 Cette configuration est schématisée en figure 1B. Bien évidemment, dans le cadre de cet exemple de configuration des première, deuxième et troisième molécules, entre les deux demis sites de transposases des parties 5' et 3' de la troisième molécule se trouve la séquence de remplacement, ici, la séquence codant la protéine de fusion contenant la chaîne CD3ζ du TCR.

20 De manière avantageuse, l'invention concerne la composition telle que définie ci-dessus, où ladite première molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase, suivie d'une première séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase et

25 où la deuxième molécule comprend son extrémité 5' une séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase.

De manière encore plus avantageuse, l'invention concerne la composition susmentionnée, où ladite première molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence orientée 5'-3'

de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase, suivie d'une première séquence complémentaire de

30 ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule, la deuxième molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence orientée 5'-3' de

reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase, ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de l'extrémité 5' étant précédé d'une deuxième séquence complémentaire de la

35 ladite deuxième séquence reconnaissance de ladite transposase de la première molécule, et

où la troisième molécule comprend en son extrémité 5' une séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule et en son extrémité 3' une séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule.

5 Ici il est défini une autre possibilité de format de première et deuxième molécules de l'invention. Cette configuration est schématisée en figure 1C et en figure 1D. Bien évidemment, dans le cadre de cet exemple de configuration des première, deuxième et troisième molécules, entre les deux demis sites de transposase des parties 5' et 3' de la troisième molécule se trouve la séquence de remplacement, la séquence codant la protéine de fusion contenant la chaîne
10 CD3ζ du TCR.

De manière avantageuse, l'invention concerne la composition susmentionnée, où ladite première molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' d'une première séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la
15 première molécule suivi d'une deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase, et

où la troisième molécule comprend en son extrémité 5' une séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule.

De manière encore plus avantageuse, l'invention concerne la composition susmentionnée, où
20 ladite première molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' d'une première séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule suivie d'une deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase, la deuxième molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence orientée 5'-3' de
25 reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' d'une deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule, ladite première séquence étant suivie d'une deuxième séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule, et

où la troisième molécule comprend en son extrémité 5' une séquence complémentaire de
30 ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule et en son extrémité 3' une séquence complémentaire de la première séquence de reconnaissance de la transposase de la deuxième molécule.

Cette configuration est schématisée en figure 1E. Bien évidemment, dans le cadre de cet exemple de configuration des première, deuxième et troisième molécules, entre les deux
35 demis sites de transposase des parties 5' et 3' de la troisième molécule se trouve la séquence de remplacement, la séquence codant la protéine de fusion contenant la chaîne CD3ζ du TCR.

Avantageusement, l'invention concerne la composition susmentionnée, où ladite transposase est une transposase bactérienne, notamment une transposase choisie parmi Tn5, Tn9, Tn10 ou Tc1/mariner.

De manière avantageuse, la transposase susmentionnée est une transposase de type bactérienne choisie parmi la transposase du transposon Tn5, la transposase du transposon Tn9, la transposase du transposon Tn10, Tn903, Tn602 ou encore la transposase du transposon Tc1, ou plus généralement de la superfamille des transposons mariner.

D'autres exemples de transposases qui peuvent être utilisés dans le cadre de l'invention sont : la transposase de *Vibrio harveyi* (transposase caractérisée par Agilent et utilisée dans le produit SureSelect QXT), la transposase MuA et un site de reconnaissance de la transposase Mu comprenant les séquences terminales R1 et R2, la transposase du transposon Tn552 de *Staphylococcus aureus*, la transposase du transposon Tn7, la transposase Tn/O et IS10, la transposase du transposon Tn3.

La transposase de Tn5 est la plus connue. Elle est codée par le gène Tnp du transposon Tn5.

La transposase initie la transposition en formant un dimère de transposases qui se fixe sur ses séquences cibles. Dans le contexte de ce complexe, la transposase catalyse ensuite quatre réactions de transfert de phosphoryle (coupure d'ADN, formation en épingle à cheveux d'ADN, résolution en épingle à cheveux et transfert de brin dans l'ADN cible) entraînant l'intégration du transposon dans son nouveau site d'ADN : il s'agit de la tagmentation.

C'est sur le principe de cette tagmentation que l'invention repose. En utilisant les propriétés de tagmentation des transposases, il est possible d'insérer une séquence dans une autre de manière ciblée, grâce au complexe susmentionné.

Aussi dans le cadre de l'invention, lorsqu'il est fait référence à une transposase, il est fait référence à l'une des transposases susmentionnées, à savoir les transposases des transposons Tn5, Tn9, Tn10 ou Tc1/mariner (ou transposases mutées afin d'augmenter leur activité de transposition ou de tagmentation).

Dans l'invention, lorsque plusieurs transposases sont utilisées simultanément, l'une se liant au complexe formé par la première molécule et à la troisième molécule, et l'autre se liant au complexe formé par la deuxième molécule et la troisième molécule, on privilégiera les couples de transposases issus de transposons Tn5 et Tn10.

De manière avantageuse, la première et la deuxième séquence de reconnaissance de la transposase est une séquence de reconnaissance de la transposase de Tn5 ayant l'une des séquences suivantes :

- CTGtCTCTTataCAcAtcT (SEQ ID NO : 29),
- CTGACTCTTataCACAagT (SEQ ID NO : 30), et
- CTGtCTCTTgatCAgATCT (SEQ ID NO : 31).

En conséquence les séquences complémentaires correspondantes sont les suivantes :

- AgaTgTGtatAAGAGaCAG (SEQ ID NO : 32), complémentaire de la séquence SEQ ID NO: 29,

- ActTGTGtatAAGAGTCAG (SEQ ID NO : 33), complémentaire de la séquence SEQ ID NO: 30, et

5 - AGATcTGatcAAGAGaCAG (SEQ ID NO : 34), complémentaire de la séquence SEQ ID NO: 31.

D'autres séquences de reconnaissance d'une transposase sont les suivantes :

Tn5MErev,

5'-[phos]CTGTCTCTTATACACATCT-3' (SEQ ID NO : 35)

10 Tn5ME-A (Illumina FC-121-1030),

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'; (SEQ ID NO : 36)

et Tn5ME-B (Illumina FC-121-1031),

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3' (SEQ ID NO : 37)

Encore d'autres séquences de reconnaissance de la transposase sont les suivantes

15 - séquence sens SEQ ID NO : i

- séquence antisens SEQ ID NO : i+1,

où i varie de 38 à 192.

Cela signifie par exemple que les couples de séquences sens et antisens respectifs suivants sont envisagés : SEQ ID NO : 38 et SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO : 40 et SEQ ID NO: 41, SEQ

20 ID NO : 42 et SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO : 44 et SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO : 46 et SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO : 48 et SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO : 50 et SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO : 52 et SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO : 54 et SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO : 56 et SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO : 58 et SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO : 60 et SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO : 62 et SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO : 64 et SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO : 66 et SEQ ID NO: 67, SEQ

25 ID NO : 68 et SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO : 70 et SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO : 72 et SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO : 74 et SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO : 76 et SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO : 78 et SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO : 80 et SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO : 82 et SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO : 84 et SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO : 86 et SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO : 88 et SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO : 90 et SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO : 92 et SEQ ID NO: 93, SEQ

30 ID NO : 94 et SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO : 96 et SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO : 98 et SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO : 100 et SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO : 102 et SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO : 104 et SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO : 106 et SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO : 108 et SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO : 110 et SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO : 112 et SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO : 114 et SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO : 116 et SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO : 118 et

35 SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO : 120 et SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO : 122 et SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO : 124 et SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO : 126 et SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO : 128 et SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO : 130 et SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO : 132 et SEQ ID NO:

133, SEQ ID NO : 134 et SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO : 136 et SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO :
138 et SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO : 140 et SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO : 142 et SEQ ID
NO: 143, SEQ ID NO : 144 et SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO : 146 et SEQ ID NO: 147, SEQ
ID NO : 148 et SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO : 150 et SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO : 152 et
5 SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO : 154 et SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO : 156 et SEQ ID NO: 157,
SEQ ID NO : 158 et SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO : 160 et SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO : 162
et SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO : 164 et SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO : 166 et SEQ ID NO:
167, SEQ ID NO : 168 et SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO : 170 et SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO :
172 et SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO : 174 et SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO : 176 et SEQ ID
10 NO: 177, SEQ ID NO : 178 et SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO : 180 et SEQ ID NO: 181, SEQ
ID NO : 182 et SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO : 184 et SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO : 186 et
SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO : 188 et SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO : 190 et SEQ ID NO: 191,
et SEQ ID NO : 192 et SEQ ID NO: 193.

De manière avantageuse, le premier domaine riche en G/C de la première molécule (ou de la
15 deuxième molécule) correspond à la séquence suivante GGCGATCGC (SEQ ID NO : 194) de
sorte que le deuxième domaine riche en G/C sera le même. En effet, du fait du repliement de
la molécule sur elle-même, le deuxième domaine riche en G/C sera dans une orientation
complémentaire et antiparallèle par rapport à au premier domaine riche en G/C, et l'interaction
se fera au niveau de la région palindromique (souligné dans la séquence ci-dessus).

20 Le premier et le deuxième domaine riches en G/C peuvent également être la séquence
suivante GCGGCGATCGGC (SEQ ID NO : 195). Les explications ci-dessus s'appliquent
mutatis mutandis.

D'autres séquences des domaines riches en G/C de la première molécule ou de la
deuxième molécule, peuvent être les suivantes :

25 - premier domaine riche en G/C de séquence GGTCTGC (SEQ ID NO : 196) et le second
domaine riche en G/C de séquence GCGACC (SEQ ID NO : 197).

Ces exemples sont donnés à titre illustratif seulement et ne sauraient limiter la portée de
l'invention.

Dans un mode de réalisation avantageux, les séquences riches en A/T de la première
30 molécule dudit complexe sont constituées essentiellement, ou constituées de A ou de T.

De manière encore plus avantageuse, la séquence riche en A/T de la première molécule
dudit complexe est constituée de T.

Avantageusement, l'invention concerne la composition susmentionnée, où la région
intermédiaire de la troisième molécule comprend la séquence SEQ ID NO : 3 ou la séquence

35 SEQ ID NO : 1134.

Comme mentionné ci-dessus, la troisième molécule comprend une séquence codant la partie intracellulaire de la chaîne CD3 ζ du TCR. Cette séquence est préférentiellement orientée dans le sens 5'-3'.

La séquence complète de la protéine CD3 ζ du TCR est représentée par la séquence SEQ ID

5 NO : 1, où

- la partie peptidique de 1 à 21 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 correspond au propeptide, qui est clivé lors de la maturation du CD3 ζ ,

- la partie peptidique de 22 à 30 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 correspond au domaine extracellulaire du CD3 ζ ,

10 - la partie peptidique de 31 à 51 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 correspond au domaine transmembranaire du CD3 ζ , et

- la partie peptidique de 52 à 164 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 correspond au domaine intracellulaire du CD3 ζ , c'est à dire le domaine transduisant le signal.

La séquence SEQ ID NO : 3 correspond à l'ADN codant la partie intracellulaire de séquence

15 SEQ ID NO : 2.

La séquence SEQ ID NO : 1134 correspond à l'ADN codant le domaine transmembranaire et la partie intracellulaire du CD3 ζ .

De manière avantageuse, l'invention concerne la composition susmentionnée, où le peptide capable de se lier à une protéine membranaire est un fragment variable simple chaîne (scFv pour *Single-chain variable fragment* en anglais) reconnaissant une protéine membranaire, notamment la partie extracellulaire d'une protéine membranaire.

La technologie des scFv est particulièrement adaptée à la fusion telle que décrite dans l'invention, car elle permet de reproduire la partie variable des anticorps en fusionnant la partie variable de la chaîne légère à la partie variable de la chaîne lourde, les deux parties variables étant reliées entre elles par un lien (ou *linker* en anglais), la protéine ainsi générée conserve la spécificité de l'immunoglobuline originale, malgré l'élimination des régions constantes et l'introduction du lien. Il est alors possible de créer une molécule d'acides nucléiques permettant de synthétiser le peptide correspondant et donc d'obtenir un « anticorps court » de manière simplifiée. Le lien ou linker a généralement une taille de 10 à 25 acides aminés (soit 30 à 75

25 nucléotides) et est généralement riche en glycine pour la flexibilité, ainsi qu'en sérine ou en thréonine pour la solubilité. Le lien peut relier l'extrémité N-terminale de la partie variable de chaîne lourde (VH) à l'extrémité C-terminale de la partie variable de la chaîne légère (VL), ou inversement.

Les scFv d'intérêt dans le cadre de l'invention sont notamment les scFv dirigés contre des

35 protéines membranaires largement exprimées dans les tumeurs, telles que CD19, BCma, CD123, CD20, CD22, CD38, LeY, ROR1, c-MET, CD133, CD171, CD70, CEA, EGFR-VIII, EpCAM, EphA2, FAP, c-KIT, Flt3, VEGFR2, PSMA, PSCA, MUC1, IL13Ra2, HER2, FAP,

GD2, GPC3, Mésothéline, EIIIB, gp100/HLA-A2, HLA-A2-WT1Db126, HA-1 H/HLA-A2, HLA-A*02:01, PD-1, PD-L1, CTLA-4 and TGFβ. Cette liste n'est bien évidemment pas limitative.

De manière avantageuse, l'invention concerne la composition susmentionnée, où le peptide capable de se lier à une protéine membranaire est un peptide fusionné à la streptavidine. De cette manière lorsque le peptide de fusion (peptide streptavidine extracellulaire et partie intracellulaire d'activation comprenant la chaîne CD3ζ du TCR), il est possible de venir coupler à façon des anticorps spécifiques dont la chaîne lourde est associée à de la biotine. La streptavidine et la biotine vont alors interagir de manière spécifique, ce qui reproduira une chimère hybride permettant de reconnaître la cible cellulaire par l'intermédiaire de l'anticorps et d'activer le signal recherché par l'intermédiaire de la chaîne CD3ζ du TCR.

Le peptide capable de se lier à une protéine membranaire peut également être le ligand d'un récepteur membranaire retrouvé sur la cellule cible. Il peut s'agir par exemple d'une cytokine, comme par exemple l'IL-13 qui reconnaîtra le récepteur IL13ra, mais aussi le ligand des récepteurs Flt3, c-Kit, c-Met, VEGFR2, PD1, HER2, EGFR, TNFRs, NKG2, CD116 (récepteur du GM-CSF)... ici encore cette liste n'est pas limitative.

De manière avantageuse, l'invention concerne une composition telle que définie ci-dessus, où le domaine de coactivation correspond au domaine de co-activation d'une protéine choisie parmi CD28, 4-1BB, OX40 ou ICOS.

Tel qu'utilisé dans la présente description, le terme « domaine de coactivation » « "région de signalisation costimulatoire » se réfère à la partie du récepteur chimérique des cellules T comprenant le domaine intracellulaire d'une molécule costimulatoire. Les molécules costimulatrices sont des molécules de surface cellulaire autres que les récepteurs d'antigènes ou leurs ligands qui sont nécessaires pour une réponse efficace des lymphocytes à l'antigène. Des exemples de telles molécules comprennent CD28, 4-1BB, DAP-10 et ICOS. Par exemple, des TCR chimériques contenant le domaine intracellulaire de

- CD28 (SEQ ID NO : 1135),
- 4-1BB (séquence complète donnée dans Seq ID No : 1136),
- ICOS (séquence complète donnée dans Seq ID No : 1137) et
- DAP-10 (Seq ID No : 1138) sont employés de manière appropriée dans le cadre de la présente invention.

De manière encore plus avantageuse, l'invention concerne la composition telle que définie ci-dessus, où les première, deuxième et troisième molécules sont choisies parmi les triplets tels que définis dans le tableau 2 ci-dessous.

De manière avantageuse, l'invention concerne une composition comprenant l'un des triplets de première deuxième et troisième molécules décrits dans le tableau 2 suivant :

[Table 2]

Triplet	Première molécule SEQ ID NO :	Deuxième molécule SEQ ID NO :	Troisième molécule SEQ ID NO :
#1	198	199	200
#2	201	202	203
#3	204	205	206
#4	207	208	209
#5	210	211	212
#6	213	214	215
#7	216	217	218
#8	219	220	221
#9	222	223	224
#10	225	226	227
#11	228	229	230
#12	231	232	233
#13	234	235	236
#14	237	238	239
#15	240	241	242
#16	243	244	245
#17	246	247	248
#18	249	250	251
#19	252	253	254
#20	255	256	257
#21	258	259	260
#22	261	262	263
#23	264	265	266
#24	267	268	269
#25	270	271	272
#26	273	274	275
#27	276	277	278
#28	279	280	281
#29	282	283	284
#30	285	286	287
#31	288	289	290
#32	291	292	293
#33	294	295	296

#34	297	298	299
#35	300	301	302
#36	303	304	305
#37	306	307	308
#38	309	310	311
#39	312	313	314
#40	315	316	317
#41	318	319	320
#42	321	322	323
#43	324	325	326
#44	327	328	329
#45	330	331	332
#46	333	334	335
#47	336	337	338
#48	339	340	341
#49	342	343	344
#50	345	346	347
#51	348	349	350
#52	351	352	353
#53	354	355	356
#54	357	358	359
#55	360	361	362
#56	363	364	365
#57	366	367	368
#58	369	370	371
#59	372	373	374
#60	375	376	377
#61	378	379	380
#62	381	382	383
#63	384	385	386
#64	387	388	389
#65	390	391	392
#66	393	394	395
#67	396	397	398
#68	399	400	401

#69	402	403	404
#70	405	406	407
#71	408	409	410
#72	411	412	413
#73	414	415	416
#74	417	418	419
#75	420	421	422
#76	423	424	425
#77	426	427	428
#78	429	430	431
#79	432	433	434
#80	435	436	437
#81	438	439	440
#82	441	442	443
#83	444	445	446
#84	447	448	449
#85	450	451	452
#86	453	454	455
#87	456	457	458
#88	459	460	461
#89	462	463	464
#90	465	466	467
#91	468	469	470
#92	471	472	473
#93	474	475	476
#94	477	478	479
#95	480	481	482
#96	483	484	485
#97	486	487	488
#98	489	490	491
#99	492	493	494
#100	495	496	497
#101	498	499	500
#102	501	502	503
#103	504	505	506

#104	507	508	509
#105	510	511	512
#106	513	514	515
#107	516	517	518
#108	519	520	521
#109	522	523	524
#110	525	526	527
#111	528	529	530
#112	531	532	533
#113	534	535	536
#114	537	538	539
#115	540	541	542
#116	543	544	545
#117	546	547	548
#118	549	550	551
#119	552	553	554
#120	555	556	557
#121	558	559	560
#122	561	562	563
#123	564	565	566
#124	567	568	569
#125	570	571	572
#126	573	574	575
#127	576	577	578
#128	579	580	581
#129	582	583	584
#130	585	586	587
#131	588	589	590
#132	591	592	593
#133	594	595	596
#134	597	598	599
#135	600	601	602
#136	603	604	605
#137	606	607	608
#138	609	610	611

#139	612	613	614
#140	615	616	617
#141	618	619	620
#142	621	622	623
#143	624	625	626
#144	627	628	629
#145	630	631	632
#146	633	634	635
#147	636	637	638
#148	639	640	641
#149	642	643	644
#150	645	646	647
#151	648	649	650
#152	651	652	653
#153	654	655	656
#154	657	658	659
#155	660	661	662
#156	663	664	665
#157	666	667	668
#158	669	670	671
#159	672	673	674
#160	675	676	677
#161	678	679	680
#162	681	682	683
#163	684	685	686
#164	687	688	689
#165	690	691	692
#166	693	694	695
#167	696	697	698
#168	699	700	701
#169	702	703	704
#170	705	706	707
#171	708	709	710
#172	711	712	713
#173	714	715	716

#174	717	718	719
#175	720	721	722
#176	723	724	725
#177	726	727	728
#178	729	730	731
#179	732	733	734
#180	735	736	737
#181	738	739	740
#182	741	742	743
#183	744	745	746
#184	747	748	749
#185	750	751	752
#186	753	754	755
#187	756	757	758
#188	759	760	761
#189	762	763	764
#190	765	766	767
#191	768	769	770
#192	771	772	773
#193	774	775	776
#194	777	778	779
#195	780	781	782
#196	783	784	785
#197	786	787	788
#198	789	790	791
#199	792	793	794
#200	795	796	797
#201	798	799	800
#202	801	802	803
#203	804	805	806
#204	807	808	809
#205	810	811	812
#206	813	814	815
#207	816	817	818
#208	819	820	821

#209	822	823	824
#210	825	826	827
#211	828	829	830
#212	831	832	833
#213	834	835	836
#214	837	838	839
#215	840	841	842
#216	843	844	845
#217	846	847	848
#218	849	850	851
#219	852	853	854
#220	855	856	857
#221	858	859	860
#222	861	862	863
#223	864	865	866
#224	867	868	869
#225	870	871	872
#226	873	874	875
#227	876	877	878
#228	879	880	881
#229	882	883	884
#230	885	886	887
#231	888	889	890
#232	891	892	893
#233	894	895	896
#234	897	898	899
#235	900	901	902
#236	903	904	905
#237	906	907	908
#238	909	910	911
#239	912	913	914
#240	915	916	917
#241	918	919	920
#242	921	922	923
#243	924	925	926

#244	927	928	929
#245	930	931	932
#246	933	934	935
#247	936	937	938
#248	939	940	941
#249	942	943	944
#250	945	946	947
#251	948	949	950
#252	951	952	953
#253	954	955	956
#254	957	958	959
#255	960	961	962
#256	963	964	965
#257	966	967	968
#258	969	970	971
#259	972	973	974
#260	975	976	977
#261	978	979	980
#262	981	982	983
#263	984	985	986
#264	987	988	989
#265	990	991	992
#266	993	994	995
#267	996	997	998
#268	999	1000	1001
#269	1002	1003	1004
#270	1005	1006	1007
#271	1008	1009	1010
#272	1011	1012	1013
#273	1014	1015	1016
#274	1017	1018	1019
#275	1020	1021	1022
#276	1023	1024	1025
#277	1026	1027	1028
#278	1029	1030	1031

#279	1032	1033	1034
#280	1035	1036	1037
#281	1038	1039	1040
#282	1041	1042	1043
#283	1044	1045	1046
#284	1047	1048	1049
#285	1050	1051	1052
#286	1053	1054	1055
#287	1056	1057	1058
#288	1059	1060	1061
#289	1062	1063	1064
#290	1065	1066	1067
#291	1068	1069	1070
#292	1071	1072	1073
#293	1074	1075	1076
#294	1077	1078	1079
#295	1080	1081	1082
#296	1083	1084	1085
#297	1086	1087	1088
#298	1089	1090	1091
#299	1092	1093	1094
#300	1095	1096	1097
#301	1098	1099	1100
#302	1101	1102	1103
#303	1104	1105	1106
#304	1107	1108	1109
#305	1110	1111	1112
#306	1113	1114	1115
#307	1116	1117	1118
#308	1119	1120	1121
#309	1122	1123	1124
#310	1125	1126	1127
#311	1128	1129	1130
#312	1131	1132	1133

Aussi, avantageusement l'invention concerne la composition susmentionnée, ladite composition comprenant un triplet choisi parmi les triplets #1 à #312 susmentionnés.

De manière avantageuse, l'invention concerne la composition telle que décrite ci-dessus, comprenant en outre

- 5 ** une quatrième molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant ou constituée essentiellement d'une séquence A' permettant l'insertion d'une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ou comprenant une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ladite séquence complémentaire étant liée en 5' à une cinquième séquence riches en T de 40 à 60 nucléotides de long et en 3' à une sixième séquence riches en T de 40 à 60 nucléotides de long, lesdites cinquième et sixième séquences riches en T comprenant respectivement un cinquième et un sixième domaine de 6 à 12 nucléotides riches en G/C, la séquence du cinquième domaine étant complémentaire de la séquence du sixième domaine, ledit cinquième et sixième domaine étant positionnés de 15 à 52 nucléotides de ladite séquence A', ladite quatrième molécule comprenant en son extrémité 5' au moins une première séquence orientés 5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase,
- 10 ** une cinquième molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant ou constituée essentiellement d'une séquence B' permettant l'insertion d'une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ou comprenant une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ladite séquence B' complémentaire étant liée en 5' à une septième séquence riche en T de 40 à 60 nucléotides de long et en 3' à une huitième séquence riche en T de 40 à 60 nucléotides de long, ladite septième et huitième séquence riche en T comprenant respectivement un septième et un huitième domaine de 6 à 12 nucléotides riches en G-C, la séquence du septième domaine étant complémentaire de la séquence du huitième domaine, ledit septième et huitième domaine étant positionnés de 15 à 52 nucléotides de ladite séquence B', ladite cinquième molécule comprenant en son extrémité 5' au moins la première
- 20 séquence orientée 5'-3' de reconnaissance de ladite transposase et en son extrémité 3' la deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase,
- ladite séquence B' étant une séquence complémentaire dudit acide nucléique d'intérêt, la séquence A' étant positionnée en 5' d'une région d'intérêt dudit acide nucléique d'intérêt et la séquence B' positionnée en 3' de la région d'intérêt dudit acide nucléique d'intérêt, et
- 30 ** une sixième molécule simple brin comprenant
- * dans sa partie 5', au moins une séquence complémentaire de ladite cinquième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule,
 - * dans sa partie 3' au moins une séquence complémentaire de ladite quatrième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule, et
- 35 * une région intermédiaire située entre séquence complémentaire de ladite quatrième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule et la séquence complémentaire de ladite cinquième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la

deuxième molécule, une séquence complémentaire de ladite séquence codant ladite protéine de fusion contenue dans la troisième molécule, c'est à dire une séquence complémentaire de la séquence codant la chaîne CD3 ζ du TCR,

les quatrième et sixième molécules d'acides nucléiques simple brin étant appariées selon la complémentarité des bases définie par Watson et Crick de sorte à définir deux sites double brin de liaison de ladite transposase et les cinquième et sixième molécules d'acides nucléiques simple brin étant appariées selon la complémentarité des bases définie par Watson et Crick de sorte à définir deux sites double brin de liaison de ladite transposase.

De manière avantageuse, la composition selon l'invention comprend 6 molécules, soit deux triplets qui permettent un remplacement double brin d'une molécule cible. Ce remplacement pourra se faire seulement si les régions A, B et A' et B' sont correctement choisies de sorte que la région d'intérêt à remplacer soit correctement encadrée.

Bien évidemment, toutes les définitions données pour la composition comprenant 3 molécules s'appliquent mutatis mutandis pour une composition comprenant 6 molécules.

De manière avantageuse, l'invention concerne la composition susmentionnée, où

- ladite séquence A comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une première région du locus du gène codant la protéine TRAC,

- ladite séquence B comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une deuxième région du locus du gène codant la protéine TRAC,

ladite séquence A et la dite séquence B étant deux séquences différentes, lesdites première et deuxième régions encadrant avantageusement une région 5' région du locus du gène codant la protéine TRAC,

et où

- ladite séquence A' comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une troisième

- région du locus du gène codant la protéine TRAC,

- ladite séquence B' comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une quatrième région du locus du gène codant la protéine TRAC,

ladite séquence A' et la dite séquence B' étant deux séquences différentes, lesdites troisième et quatrième régions du locus du gène codant la protéine TRAC, encadrant avantageusement

une séquence complémentaire de ladite région 5' du locus du gène codant la protéine TRAC, et où

la séquence A et la séquence A' sont au plus en partie complémentaires,

la séquence A et la séquence B' sont au plus en partie complémentaires,

la séquence B et la séquence A' sont au plus en partie complémentaires, et

la séquence B et la séquence B' sont au plus en partie complémentaires.

Par « au plus en partie complémentaires » on entend dans l'invention que les séquences possèdent des séquences qui sont capables de s'apparier selon la complémentarité des bases

définie par Watson et Crick, mais pas sur la totalité des séquences. En d'autres termes, seule une partie des séquences est complémentaire. De manière avantageuse les séquences A, A', B et B' sont en partie complémentaires sur moins de 50% des séquences, notamment moins de 30% des séquences, en particulier moins de 10% des séquences, notamment ne sont pas du tout complémentaires entre elles.

De cette manière il est possible d'encadrer la partie 5' du locus TRAC (juste en amont du premier exon) de manière spécifique et orienté, pour les deux brins, afin d'éviter des recombinaisons (i.e. des tagmentations) désordonnées ou incohérentes de sorte que le résultat ne serait pas celui escompté.

- 10 Il est également envisageable de créer une molécule comprenant la séquence de fusion et l'exon 1 du gène TRAC, de sorte que l'insertion se fait par remplacement de l'exon 1 par une séquence contenant la séquence codante de la fusion contenant le CD3ζ du TCR, suivi d'une séquence de terminaison de la transcription, elle-même suivie de la séquence de l'exon 1 de TRAC. Un exemple de recombinaison au locus de TRAC est représenté schématiquement à
- 15 la figure 6.

De manière encore plus avantageuse, la composition susmentionnée comprend l'un au moins des sextuplets mentionnés dans le tableau 3 suivant :

[Table 3]

Sextuplet	Première molécule SEQ ID NO :	Deuxième molécule SEQ ID NO :	Troisième molécule SEQ ID NO :	Cinquième molécule SEQ ID NO :	Quatrième molécule SEQ ID NO :	Sixième molécule SEQ ID NO :
#1	198	199	200	201	202	203
#2	204	205	206	207	208	209
#3	210	211	212	213	214	215
#4	216	217	218	219	220	221
#5	222	223	224	225	226	227
#6	228	229	230	231	232	233
#7	234	235	236	237	238	239
#8	240	241	242	243	244	245
#9	246	247	248	249	250	251
#10	252	253	254	255	256	257
#11	258	259	260	261	262	263
#12	264	265	266	267	268	269
#13	270	271	272	273	274	275
#14	276	277	278	279	280	281

#15	282	283	284	285	286	287
#16	288	289	290	291	292	293
#17	294	295	296	297	298	299
#18	300	301	302	303	304	305
#19	306	307	308	309	310	311
#20	312	313	314	315	316	317
#21	318	319	320	321	322	323
#22	324	325	326	327	328	329
#23	330	331	332	333	334	335
#24	336	337	338	339	340	341
#25	342	343	344	345	346	347
#26	348	349	350	351	352	353
#27	354	355	356	357	358	359
#28	360	361	362	363	364	365
#29	366	367	368	369	370	371
#30	372	373	374	375	376	377
#31	378	379	380	381	382	383
#32	384	385	386	387	388	389
#33	390	391	392	393	394	395
#34	396	397	398	399	400	401
#35	402	403	404	405	406	407
#36	408	409	410	411	412	413
#37	414	415	416	417	418	419
#38	420	421	422	423	424	425
#39	426	427	428	429	430	431
#40	432	433	434	435	436	437
#41	438	439	440	441	442	443
#42	444	445	446	447	448	449
#43	450	451	452	453	454	455
#44	456	457	458	459	460	461
#45	462	463	464	465	466	467
#46	468	469	470	471	472	473
#47	474	475	476	477	478	479
#48	480	481	482	483	484	485
#49	486	487	488	489	490	491

#50	492	493	494	495	496	497
#51	498	499	500	501	502	503
#52	504	505	506	507	508	509
#53	510	511	512	513	514	515
#54	516	517	518	519	520	521
#55	522	523	524	525	526	527
#56	528	529	530	531	532	533
#57	534	535	536	537	538	539
#58	540	541	542	543	544	545
#59	546	547	548	549	550	551
#60	552	553	554	555	556	557
#61	558	559	560	561	562	563
#62	564	565	566	567	568	569
#63	570	571	572	573	574	575
#64	576	577	578	579	580	581
#65	582	583	584	585	586	587
#66	588	589	590	591	592	593
#67	594	595	596	597	598	599
#68	600	601	602	603	604	605
#69	606	607	608	609	610	611
#70	612	613	614	615	616	617
#71	618	619	620	621	622	623
#72	624	625	626	627	628	629
#73	630	631	632	633	634	635
#74	636	637	638	639	640	641
#75	642	643	644	645	646	647
#76	648	649	650	651	652	653
#77	654	655	656	657	658	659
#78	660	661	662	663	664	665
#79	666	667	668	669	670	671
#80	672	673	674	675	676	677
#81	678	679	680	681	682	683
#82	684	685	686	687	688	689
#83	690	691	692	693	694	695
#84	696	697	698	699	700	701

#85	702	703	704	705	706	707
#86	708	709	710	711	712	713
#87	714	715	716	717	718	719
#88	720	721	722	723	724	725
#89	726	727	728	729	730	731
#90	732	733	734	735	736	737
#91	738	739	740	741	742	743
#92	744	745	746	747	748	749
#93	750	751	752	753	754	755
#94	756	757	758	759	760	761
#95	762	763	764	765	766	767
#96	768	769	770	771	772	773
#97	774	775	776	777	778	779
#98	780	781	782	783	784	785
#99	786	787	788	789	790	791
#100	792	793	794	795	796	797
#101	798	799	800	801	802	803
#102	804	805	806	807	808	809
#103	810	811	812	813	814	815
#104	816	817	818	819	820	821
#105	822	823	824	825	826	827
#106	828	829	830	831	832	833
#107	834	835	836	837	838	839
#108	840	841	842	843	844	845
#109	846	847	848	849	850	851
#110	852	853	854	855	856	857
#111	858	859	860	861	862	863
#112	864	865	866	867	868	869
#113	870	871	872	873	874	875
#114	876	877	878	879	880	881
#115	882	883	884	885	886	887
#116	888	889	890	891	892	893
#117	894	895	896	897	898	899
#118	900	901	902	903	904	905
#119	906	907	908	909	910	911

#120	912	913	914	915	916	917
#121	918	919	920	921	922	923
#122	924	925	926	927	928	929
#123	930	931	932	933	934	935
#124	936	937	938	939	940	941
#125	942	943	944	945	946	947
#126	948	949	950	951	952	953
#127	954	955	956	957	958	959
#128	960	961	962	963	964	965
#129	966	967	968	969	970	971
#130	972	973	974	975	976	977
#131	978	979	980	981	982	983
#132	984	985	986	987	988	989
#133	990	991	992	993	994	995
#134	996	997	998	999	1000	1001
#135	1002	1003	1004	1005	1006	1007
#136	1008	1009	1010	1011	1012	1013
#137	1014	1015	1016	1017	1018	1019
#138	1020	1021	1022	1023	1024	1025
#139	1026	1027	1028	1029	1030	1031
#140	1032	1033	1034	1035	1036	1037
#141	1038	1039	1040	1041	1042	1043
#142	1044	1045	1046	1047	1048	1049
#143	1050	1051	1052	1053	1054	1055
#144	1056	1057	1058	1059	1060	1061
#145	1062	1063	1064	1065	1066	1067
#146	1068	1069	1070	1071	1072	1073
#147	1074	1075	1076	1077	1078	1079
#148	1080	1081	1082	1083	1084	1085
#149	1086	1087	1088	1089	1090	1091
#150	1092	1093	1094	1095	1096	1097
#151	1098	1099	1100	1101	1102	1103
#152	1104	1105	1106	1107	1108	1109
#153	1110	1111	1112	1113	1114	1115
#154	1116	1117	1118	1119	1120	1121

#155	1122	1123	1124	1125	1126	1127
#156	1128	1129	1130	1131	1132	1133

La composition selon l'invention, propose ainsi de manière avantageuse, 156 sextuplets de molécules permettant l'insertion au locus du gène TRAC d'une séquence hybride codant une protéine de fusion comprenant la chaîne CD3ζ du TCR, et comprenant dans sa partie N-terminale une séquence protéique reconnaissant un peptide exprimé à la surface d'une cellule cible.

Cela permet donc en fonction de la cellule cible de restaurer une fonction perdue par la mutation, et de réaliser une complémentarité fonctionnelle.

Dans un autre aspect, l'invention concerne une cellule immunitaire, notamment un lymphocyte T, comprenant une composition telle que définie ci-dessus. La cellule immunitaire susmentionnée est isolée et purifiée, hors de son contexte naturel.

La cellule immunitaire dont il est question est dans un état où la recombinaison, c'est à dire l'insertion n'a pas encore été réalisée. La cellule contient dans son cytoplasme ou son noyau, ou les deux, le complexe moléculaire tel qu'il est formé par les triplets de première, deuxième et troisième molécules, et éventuellement les sextuplets comprenant en outre les quatrième, cinquième et sixième molécules, susmentionnées.

La cellule immunitaire est encore plus avantageusement une cellule immunitaire infiltrante d'une tumeur, en particulier une cellule T infiltrante.

S'il est escompté de réaliser une insertion simple brin, par exemple pour réaliser une insertion de sorte que la cellule résultante possèdera deux allèles différents : un allèle possédant une insertion, et un allèle ne possédant pas l'insertion, il sera avantageux d'utiliser la composition comprenant les première, deuxième et troisième molécules. Il en sera de même si un remplacement est réalisé sur un ARN, et en particulier un ARN messager.

En revanche si une insertion double brin est souhaitée, il sera avantageux d'utiliser les première, deuxième, troisième, quatrième, cinquième et sixième molécules.

La composition selon l'invention est introduite dans la cellule immunitaire selon des techniques de transfection bien connues de l'homme du métier, et notamment l'électroporation ou la précipitation au phosphate de calcium. L'homme du métier saura choisir la meilleure technique selon la nature de la cellule immunitaire ciblée.

Il est d'ailleurs avantageux que la cellule comprenne une composition comprenant l'un quelconque des triplets du tableau 2, ou l'un quelconque des sextuplets du tableau 3.

Dans un autre aspect, l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant la composition susmentionnée, ou encore une cellule immunitaire susdécrite, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La composition susmentionnée, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable peut être utilisée dans le cadre du traitement de pathologies. Le véhicule est un

véhicule communément admis et connu de l'homme du métier, par exemple de l'eau distillée, ou encore un tampon physiologique. Ce véhicule doit permettre la formation d'un complexe comme mentionné ci-dessus, mais aussi être acceptable pour une cellule ou un être vivant.

Il en est de même pour la cellule. Celle-ci est mise en contact avec un véhicule
5 pharmaceutiquement acceptable qui a pour propriété de la maintenir en vie (ne pas affecter la membrane, et ne pas induire des phénomènes de mort cellulaire) et être compatible avec un organisme vivant.

Dans un autre aspect, l'invention concerne la composition susmentionnée, ou la cellule immunitaire susmentionnée, en tant que médicament.

10 Il est d'ailleurs avantageux que la composition comprenant l'un quelconque des triplets du tableau 2, ou l'un quelconque des sextuplets du tableau 3 soit utilisée en tant que médicament. Dans encore un autre aspect, l'invention concerne la composition susmentionnée, ou la cellule immunitaire susmentionnée, pour son utilisation pour le traitement du cancer.

Dans la mesure où la composition susmentionnée a pour objectif de fournir des cellules CAR,
15 il est particulièrement pertinent d'utiliser cette composition pour traiter le cancer.

La composition sera adaptée à la cellule cancéreuse cible, en choisissant la partie extracellulaire de la protéine de fusion de manière à cibler une cellule tumorale déterminée.

L'expression par les lymphocytes modifiés par la composition selon l'invention assure ainsi la spécificité vis-à-vis de l'antigène tumoral. Il suffit alors d'injecter au patient quelques dizaines
20 ou centaines de millions de lymphocytes exprimant le CAR. Enfin, comme ils prolifèrent in vivo, les lymphocytes modifiés persistent pendant des semaines, voire des mois, et participent ainsi à la réduction voire la destruction de la tumeur en tuant les cellules cancéreuses.

De manière avantageuse, l'invention concerne une méthode de traitement du cancer chez un patient dans le besoin, la méthode comprenant l'administration d'une dose efficace de
25 composition telle que décrite ci-dessus. En particulier, la méthode susmentionnée comprend l'administration d'une quantité efficace de cellules immunitaires comprenant ladite composition telle que décrite ci-dessus.

De manière avantageuse, le cancer peut être de tout type et concerner des tumeurs solides et des tumeurs hématopoïétiques de tout type. Le cancer peut donc notamment être

30 - de type hématopoïétique : la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), la leucémie lymphoïde chronique (LLC), le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), le lymphome folliculaire (FL), lymphome à cellules du manteau (MCL), le myélome multiple (MM), le lymphome non hodgkinien (NHL), la leucémie multiple aiguë (LMA), les cancers CD19 positifs, la leucémie myéloïde chronique (LMC), la leucémie aiguë myéloïde (LAM), la leucémie lymphocytaire de
35 petite taille (SLL), et les malignités CD20 positives, ou
de type solide : le neuroblastome (NB), le gliome, le mésothéliome, le cancer du poumon, le cancer de l'ovaire (OC), le cancer du sein (BC), le sarcome, l'ostéosarcome (OS), le carcinome

hépatocellulaire (HCC), le cancer HER2 positif, le cancer EGFRvIII positif, le glioblastome (GBM), le cancer du pancréas (PC), le cancer positif pour MUC1, le cancer de la prostate (PCa), l'adénocarcinome colorectal (COADREAD), le cancer colorectal (CRC), le mélanome (MEL), le méduloblastome (MB), le cancer gastrique (GC), le cancer du foie, le cancer du cou, le cancer de la tête, le cancer de la peau, le cancer des os, le cancer du cerveau, le cancer colorectal, le cancer de l'estomac, la tumeur de la vessie associée, le cancer des testicules, le cancer de la thyroïde, le cancer de l'endomètre, le cancer du col de l'utérus et endocervical.

Dans un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'une composition susmentionnée, pour insérer, dans une cellule lymphocytaire T, une séquence codant une protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3 ζ du TCR, sous réserve que l'utilisation ne comprenne pas un procédé pour la modification de l'identité génétique germinale d'êtres humains et que ladite utilisation ne soit pas une méthode pour le traitement du corps humain ou animal par une chirurgie ou une thérapie.

Cette insertion est préférentiellement localisée au locus TRAC comme décrit ci-dessus.

Comme expliqué ci-dessus la composition permet de cibler spécifiquement une région cible et de la remplacer par une séquence d'intérêt, en utilisant les propriétés de tagmentation des transposases.

La composition selon l'invention est notamment avantageuse pour des cellules CAR in vitro, c'est à dire des cellules T modifiées exprimant outre le récepteur T (TCR), un récepteur T chimérique qui permet le ciblage cellulaire spécifique de tumeurs.

L'invention concerne en outre une méthode d'insertion, notamment in vitro, d'une séquence codant une protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3 ζ du TCR, ladite méthode comprenant :

- la mise en contact, afin d'obtenir un complexe de remplacement, d'une composition telle que définie ci-dessus, avec un acide nucléique cible comprenant au moins une région 5' du locus du gène codant la protéine TRAC,

ladite composition étant telle que

la séquence A de ladite première molécule comprend une séquence complémentaire d'une première région du locus du gène codant la protéine TRAC,

la séquence B de ladite deuxième molécule comprend une séquence complémentaire d'une deuxième région du locus du gène codant la protéine TRAC, et

la troisième molécule comprend la séquence d'une protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3 ζ du TCR située entre une séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la

première molécule et la séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule,

- la mise en présence du complexe de remplacement avec une transposase reconnaissant les sites double brin de liaison de ladite transposase contenus dans ladite composition, pour

5 obtenir un complexe de recombinaison, et

- la recombinaison du complexe de combinaison pour obtenir la séquence codant la protéine de fusion insérée dans l'acide nucléique cible entre la première et la deuxième région du locus du gène codant la protéine TRAC.

De manière avantageuse, l'invention concerne une méthode d'insertion in vitro d'une
10 séquence codant une protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3ζ du TCR, ladite méthode comprenant :

- la mise en contact, afin d'obtenir un complexe de remplacement, d'une composition avec un acide nucléique cible comprenant au moins une région 5' du locus du gène codant la protéine

15 TRAC, ladite composition comprenant un triplet tel que défini dans le tableau 2 ou un sextuplet tel que défini dans le tableau 3

- la mise en présence du complexe de remplacement avec une transposase reconnaissant les sites double brin de liaison de ladite transposase contenus dans ladite composition, pour obtenir un complexe de recombinaison, et

20 - la recombinaison du complexe de combinaison pour obtenir la séquence codant la protéine de fusion insérée dans l'acide nucléique cible entre la première et la deuxième région du locus du gène codant la protéine TRAC.

Dans un autre aspect, l'invention concerne une méthode de production de cellules T à récepteur antigénique chimérique ou *CAR T cell* comprenant la séquence d'une protéine de

25 fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3ζ du TCR, ladite méthode comprenant :

- la mise en contact d'une composition telle que définie ci-dessus, avec une cellule T purifiée, l'ADN génomique de ladite cellule T purifiée comprenant le locus du gène codant la protéine

30 TRAC,

ladite composition ou ledit ensemble étant tel que

la séquence A de ladite première molécule comprend une séquence complémentaire d'une première région du locus du gène codant la protéine TRAC,

la séquence B de ladite deuxième molécule comprend une séquence complémentaire d'une

35 deuxième région du locus du gène codant la protéine TRAC, et

la troisième molécule comprend la séquence d'une protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule

et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3 ζ du TCR située entre une séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule et la séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule, afin d'obtenir un complexe

5 de remplacement,

- la mise en présence du complexe de remplacement avec une transposase reconnaissant les sites double brin de liaison de ladite transposase contenus dans ledit ensemble, pour obtenir un complexe de recombinaison,

- la recombinaison du complexe de combinaison pour obtenir une cellule *CART*, l'ADN génomique de ladite cellule *CART* comprenant la séquence codant ladite protéine de fusion

10 au locus du gène codant la protéine TRAC, et

- la purification de la cellule *CART*.

Avantageusement, l'invention concerne une méthode de production de cellules T à récepteur antigénique chimérique ou *CART cell* comprenant la séquence d'une protéine de fusion

15 comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3 ζ du TCR, ladite méthode comprenant :

- la mise en contact d'une composition avec une cellule T purifiée, l'ADN génomique de ladite cellule T purifiée comprenant le locus du gène codant la protéine TRAC, afin d'obtenir un

20 complexe de remplacement,

- la mise en présence du complexe de remplacement avec une transposase reconnaissant les sites double brin de liaison de ladite transposase contenus dans ledit ensemble, pour obtenir un complexe de recombinaison,

- la recombinaison du complexe de combinaison pour obtenir une cellule *CART*, l'ADN génomique de ladite cellule *CART* comprenant la séquence codant ladite protéine de fusion

25 au locus du gène codant la protéine TRAC, et

- la purification de la cellule *CART*.

L'invention concerne également une cellule lymphoïde T modifiée susceptible d'être obtenue par la méthode susmentionnée, ladite cellule lymphoïde T modifiée comprenant dans son

30 génome une insertion d'une séquence codant une protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3 ζ du TCR, ladite insertion étant localisée au locus du gène codant la protéine TRAC.

Du fait de la recombinaison par « tagmentation » opérée par les transposases, et de la

35 signature moléculaire qu'une telle recombinaison engendre, c'est-à-dire une modification génique au niveau des zones de clivage de l'ADN par les transposases, ces cellules lymphocytaires ne peuvent être définies plus précisément que par leur méthode d'obtention.

Ces cellules sont reconnaissables par les zones de reconnaissance des régions A, B, et éventuellement A' et B', qui différeront des séquences originelles.

Ces cellules sont nouvelles, et diffèrent de celles qui pourraient être obtenues par exemple avec les technologies modernes d'édition du génome, comme CRISPR/Cas9.

5

Brève description des figures

L'invention sera mieux comprise à la lecture des exemples ci-après et des figures suivantes :

[Fig. 1A] est une première représentation schématique d'une première forme d'appariement des première, deuxième et troisième molécules de la composition selon l'invention.

10 [Fig. 1B] est une deuxième représentation schématique d'une première forme d'appariement des première, deuxième et troisième molécules de la composition selon l'invention.

[Fig. 1C] est une troisième représentation schématique d'une première forme d'appariement des première, deuxième et troisième molécules de la composition selon l'invention.

15 [Fig. 1D] est une quatrième représentation schématique d'une première forme d'appariement des première, deuxième et troisième molécules de la composition selon l'invention.

[Fig. 1E] est une cinquième représentation schématique d'une première forme d'appariement des première, deuxième et troisième molécules de la composition selon l'invention.

[Fig. 2] est un schéma montrant le principe et les étapes du remplacement simple brin en utilisant les première, deuxième et troisième molécules de la composition selon l'invention.

20 [Fig. 3] est un schéma montrant le principe et les étapes du remplacement double brin en utilisant les première, deuxième, troisième, quatrième, cinquième et sixième molécules de la composition selon l'invention.

[Fig. 4] est un schéma montrant l'association des molécules contenues dans le tube 1 de l'exemple 1. La boule noire représente la biotine.

25 [Fig. 5] est un schéma montrant l'association des molécules contenues dans le tube 2 de l'exemple 1. La boule noire représente la biotine.

[Fig. 6] est un schéma montrant l'insertion d'une fusion ScFV-domaine co-activateur-CD3 ζ . A. illustre le locus *TRAC* à proximité des locus *TRAV* et *TRAJ*, et la zone de reconnaissance autour de l'exon 1 du complexe formé de la première, la troisième molécule (qui contient la séquence de fusion et l'exon 1 de *TRAC*) et la deuxième molécule. B. représente la
30 tagmentation en présence des transposases. C. représente le résultat de l'insertion au locus *TRAC* de la séquence de fusion. D. représente schématiquement la protéine codée par la séquence de fusion insérée au locus *TRAC*. * représente le scFv exposé à l'extérieur de la cellules T, ** représente le domaine coactivateur (par exemple CD28), et *** représente le
35 domaine intracellulaire activateur de CD3 ζ .

TGGATCCAAAACCAAATTTTTTTTTTTTTTTTGGCGATCGCCTTTTTTTTTTTTTTGATACATTT
AgaTgTGtatAAGAGaCAGGATGAT-3'

- l'oligo Great X3 (10µM) correspondant à la molécule 4, de séquence SEQ ID : 201 suivante
5'-

5 CACGTGCTGtCTCTTataCAcAtcTTTTCTCGATCATTATTATTTTTTGGCGATCGCTTTTTTT
TTTTTTTTTTCATTGCCGAGGCCACCAGGGCTGGCTCAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCGATC
GCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAgaTgTGtatAAGAGaCAGCACGTGTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTCAGCTATACTGtCTCTTataCAcAtcT-3'

- l'oligo reverse GREAT X1 Rev (10µM) correspondant à la partie 5' de la molécule 3 de
10 séquence SEQ ID NO : 1139 suivante
5'-

TACACTACCTGtCTCTTataCAcAtcTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTggttacGCGGCCGCCGT
ACA-3'

- l'oligo reverse GREAT X3 Rev (10µM) correspondant à la partie 3' de la molécule 6 de
15 séquence SEQ ID NO : 1140 suivante
5'-

TGTACGGCGGCCGCgtaaccTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAgaTgTGtatAAGAGaCAGTAT
AGCTG-3'

- l'oligo Reverse Helix Rev correspondant à un brin additionnel permettant de lier une hélicase
20 par l'extrémité 3' biotinylée, l'oligo ayant la séquence SEQ ID NO : 1141 suivante
5'-ATAATAATGATCGAGAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[Biot]-3'

** Tube 2 (10µL) :

- l'oligo Great X2 (10µM) correspondant à la molécule 2, de séquence SEQ ID NO : 199
suivante

25 5'-
CACGTGCTGtCTCTTataCAcAtcTTTTCTCGATCATTATTATTTTTTGGCGATCGCTTTTTTT
TTTTTTT

TTGTTGGAGCCACTGACCCTGCCAGAATATGGTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCGATCGCCTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTAgaTgTGtatAAGAGaCAGCACGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAC
30 GAATACTGtCTCTTataCAcAtcT-3'

- l'oligo Great X4 (10µM) correspondant à la molécule 5, de séquence SEQ ID NO : 202
suivante :

5'-

AgaTgTGtatAAGAGaCAGAGTATGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTATCATCCTGtCTCTTataCAcA
35 tcTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCGATCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGCATGACTCACT
AGCACTCTATCACGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCGATCGCCTTTTTTTTTTTTTTTGATACATT
TAgATgTGtatAAGAGaCAGGATGAT-3'

- l'oligo reverse GREAT X2 Rev (10µM) correspondant à la partie 3' de la molécule 3 de séquence SEQ ID NO : 1142 suivante

5'-

CGATACGGTACCatgttcTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAgaTgTGtatAAGAGaCAGTATTCG

5 TC-3'

- l'oligo reverse GREAT X4 Rev (10µM) correspondant à la partie 5' de la molécule 6 SEQ ID NO : 1143 suivante

5'-

TTCATACTCTGtCTCTTataCAcAtcTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTgaacatGGTACCGTATCG

10 -3'

- l'oligo Reverse Helix Rev correspondant à un brin additionnel permettant de lier une hélicase par l'extrémité 3' biotinylée, l'oligo ayant la séquence SEQ ID NO : 1142.

Les deux tubes sont alors chauffés à 95°C pendant 5 min puis laissés 1h à température ambiante puis chaque tube est alors digéré avec les enzymes de restriction correspondantes

15 : Tube 1 : NotI et Tube 2 : KpnI puis purifié par PCR purification kit (élution 20µL).

Les figures 4 et 5 représentent schématiquement le contenu des tubes 1 et 2 respectivement avant la digestion enzymatique.

En parallèle, la séquence anti-CD19-CD3ζ-P2A-GFP a été obtenue via amplification directe
20 par bactéries DH5α du plasmide pSLCAR-CD19-CD3 ζ. Cette séquence est amplifiée (oligos avec architecture de site de restriction NotI et KpnI digérés après PCR) puis digérée avec les enzymes de restriction correspondantes et purifiée par kit PCR purification élué à un volume de 20µL. La fusion GFP- CD19-CD3ζ est alors à bouts flanquants (i.e. demi-site NotI et KpnI libres) dans le tube 3.

25

Le contenu des 3 tubes (tube 1, tube 2 et tube 3) est alors mélangé et de la ligase de phage T4 est ajoutée au mélange (4µL, 100 U) en présence de tampon approprié (tampon T4 ; 5µL 10X) et 11µL d'eau distillée. Le mélange est laissé 1h à température ambiante. Puis le mélange est purifié sur gel (30µL d'élution) afin d'isoler le fragment le plus important GFP-CD19-CD3ζ,
30 supérieur à 1Kb, et comportant les quatre sarcophages X1, X2, X3 et X4 à ses extrémités 5' et 3'. Le fragment purifié est prêt à être utilisé et comprend les première, deuxième, quatrième et cinquième molécules aux extrémités, les troisième et sixième molécules correspondant à la fusion GFP-CD19-CD3ζ (tube 4).

Le fragment GFP- CD19-CD3ζ de remplacement avec ses quatre sarcophages positionnés
35 aux extrémités 5' et 3' est alors prêt à recevoir les dimères de transposases.

A ce stade, l'oligonucléotide simple brin modifié complémentaire d'une partie des première et quatrième molécules, la partie 3' de l'oligonucléotide simple brin modifié complémentaire étant

couplée à de la biotine (oligo biotinylé), a été ajouté. Cette molécule biotinylée n'est pas obligatoire.

C- Transfection de lymphocytes T avec la composition selon l'invention.

- 5 Le contenu du tube 4, contenant l'oligo biotinylé ou non, est alors utilisé pour transfecter par électroporation les cellules lymphocytes T isolées.

Les cellules sont centrifugées à 300g pendant 5min et lavées au PBS avant d'être suspendues dans du tampon électrolytique à une densité cellulaire de 75 000 à 100 000 cellules par chambre d'électroporation. Le contenu du tube 4, ainsi qu'un plasmide codant la protéine Tn5, et éventuellement un plasmide codant une fusion hélicase-streptavidine (UVRD-mSA) est

10 ajouté dans la chambre d'électroporation selon le protocole « *Episomal iPSC Reprogramming Vectors* » du système de transfection Neon® Transfert System proposé par Thermofisher.

Le mélange est électroporé à 1650V par trois séquences de 10 ms.

- Les cellules sont ensuite immédiatement centrifugées à 300g pendant 5min et suspendues
- 15 dans du milieu de culture pour cellules hématopoïétiques supplémenté pendant 48 à 96h à 37°C et 5% de CO₂.

La tagmentation (i.e. le remplacement génique) est alors possible. Les cellules sont entretenues dans un milieu de culture approprié.

20 D- Vérification de la transfection

Les cellules transfectées ayant inséré au locus la molécule d'intérêt sont sélectionnées au moyen de la sélection par un antibiotique dont le gène de résistance est contenu dans la séquence de remplacement (par exemple la néomycine, la bléomycine, blasticidine S etc...).

- Une simple PCR en utilisant un oligonucléotide sens en 5' de l'insertion et un oligonucléotide
- 25 antisens en 3' de l'insertion est réalisée (*Single-Tail Adapter/Tag (STAT)-PCR based method*).

Le produit de PCR est alors séquencé selon les techniques classiques, afin de détecter dans la région d'intérêt au moins la présence de la GFP, signe de de l'insertion de la fusion.

- Les cellules transfectées peuvent également être détectées par cytométrie afin de détecter
- 30 l'expression de la GFP.

Il peut également être réalisé une transcription inverse sur cellules isolées afin d'obtenir une banque d'ADNc. Une amplification de la séquence de fusion est alors réalisée par PCR Oligos pour la PCR et le séquençage antiCD19 : AGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGT (SEQ ID NO : 1144) et GFP Rev : CACGAACTCCAGCAGGACCATG (SEQ ID NO : 1145) et le fragment

35 amplifié est séquencé en séquençage de Sanger mais aussi migré sur gel d'agarose. Comme attendu, après analyse (NCBI blast), on retrouve une similitude très proche avec le fragment GFP-CD19-CD3ζ théorique au locus TRAC.

E- Analyse fonctionnelle des cellules T modifiées par la composition selon l'invention

Afin de vérifier que les cellules ont été transfectées efficacement et que l'insertion est fonctionnelle, plusieurs tests sont réalisés :

1- Test de prolifération des cellules CAR T

Les cellules T produites sont cultivées en plaque 24 puits en milieu non supplémenté en IL-2 et en présence de cellules de Raji irradiées (ratio 1:1) à 37°C et 5% CO₂ ;

Une fraction des cellules T est récoltée au bout de 4, 7 et 10 jours afin de les compter par cytométrie en flux.

2- Test de cytotoxicité des cellules CAR T

Les cellules T produites sont cultivées en plaque 12 puits en milieu non supplémenté en IL-2 et en présence de cellules de Raji exprimant un fluorochrome (ratio 3:1) à 37°C et 5% CO₂ ;

Après 24h d'incubation, une fraction des cellules est récoltée pour quantifier la présence du fluorochrome par cytométrie en flux et le reste des cellules est remis en culture avec un ratio additionnel de cellules de Raji ;

Cette étape est reproduite à 36h et à 48h d'incubation.

Exemple 2 – Autre format de fusion CD3ζ.

Il est également possible de réaliser une autre fusion en suivant le protocole décrit ci-dessus dans l'exemple 1.

Le tube 1 est préparé comme décrit dans l'exemple 1 pour les séquences suivantes

- l'oligo reverse GREAT X1 Rev (10μM) correspondant à la partie 5' de la molécule 3 de séquence SEQ ID NO : 1146 suivante

5'-

TACACTACCTGtCTCTTataCAcAtcTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTgggtacACCGGTCGTACA

-3'

- l'oligo reverse GREAT X3 Rev (10μM) correspondant à la partie 3' de la molécule 6 de séquence SEQ ID NO : 1147 suivante

5'-

TGTACGACCGGTgtaaccTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAgATgTGtatAAGAGaCAGTATAGC

TG-3'

Le tube 2 est préparé comme suit

- l'oligo reverse GREAT X2 Rev (10µM) correspondant à la partie 3' de la molécule 3 de séquence SEQ ID NO : 1148 suivante

5'-

5 CGATACCCGCGGatgttcTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAgatGtGtatAAGAGaCAGTATTTCGTC-3'

- l'oligo reverse GREAT X4 Rev (10µM) correspondant à la partie 5' de la molécule 6 SEQ ID NO : 1149 suivante

5'-

10 TTCATACTCTGtCTCTTataCAcAtcTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTgaacatCCGCGGGTATCG-3'

- l'oligo Reverse Helix Rev correspondant à un brin additionnel permettant de lier une hélicase par l'extrémité 3' biotinylée, l'oligo ayant la séquence SEQ ID NO : 1142.

15 Les deux tubes sont alors chauffés à 95°C pendant 5 min puis laissés 1h à température ambiante puis chaque tube est alors digéré avec les enzymes de restriction correspondantes : Tube 1 : Agel et Tube 2 : SacII puis purifié par PCR purification kit (élution 20µL).

En parallèle, la séquence anti-CD19-CD3ζ-P2A-GFP a été obtenue via amplification directe
20 par bactéries DH5α du plasmide pSLCAR-CD19-CD3 ζ. Ce plasmide est alors digéré via les sites de restrictions Agel et SacII puis la séquence CD19- CD3ζ-P2A-GFP est alors purifiée par kit de gel purification à un volume de 20µL. La fusion CD19-CD3ζ-P2A-GFP est alors à bouts flanquants (i.e. demi-site Agel et SacII libres) dans le tube 3.

Le contenu des 3 tubes (tube 1, tube 2 et tube 3) est alors mélangé et de la ligase de phage
25 T4 est ajouté au mélange (4µL, 100 U) en présence de tampon approprié (tampon T4 ; 5µL 10X) et 11µL d'eau distillée. Le mélange est laissé 1h à température ambiante. Puis le mélange est purifié sur gel (30µL d'élution) afin d'isoler le fragment le plus important CD19-CD3ζ-P2A-GFP, supérieur à 1Kb, et comportant les quatre sarcophages X1, X2, X3 et X4 à ses extrémités 5' et 3'. Le fragment purifié est prêt à être utilisé et comprend les première, deuxième,
30 quatrième et cinquième molécules aux extrémités, les troisième et sixième molécules correspondant à la fusion CD19-CD3ζ-P2A-GFP (tube 4).

Le fragment CD19-CD3ζ-P2A-GFP de remplacement avec ses quatre sarcophages positionnés aux extrémités 5' et 3' est alors prêt à recevoir les dimères de transposases.

35 A ce stade, l'oligonucléotide simple brin modifié complémentaire d'une partie des première et quatrième molécules, la partie 3' de l'oligonucléotide simple brin modifié complémentaire étant

couplée à de la biotine (oligo biotinylé), a été ajouté. Cette molécule biotinylée n'est pas obligatoire.

La transfection est réalisée comme décrit à l'exemple 1.

La vérification de la transfection est réalisée comme décrit à l'exemple 1, sauf pour la détection par transcriptase inverse. Une amplification de la séquence de fusion est alors réalisée par PCR Oligos pour la PCR et le séquençage antiCD19 : AGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGT (SEQ ID NO : 1144) et GFP Rev : CACGAACTCCAGCAGGACCATG (SEQ ID NO : 1145) et le fragment amplifié est séquencé en séquençage de Sanger mais aussi migré sur gel d'agarose. Comme attendu, après analyse (NCBI blast), on retrouve une similitude très proche avec le fragment CD19-CD3 ζ -P2A-GFP théorique au locus TRAC.

Exemple 3 – Obtention de cellules T exprimant le la fusion contenant le CD3 ζ à partir de cellules souches pluripotentes.

Dans la mesure où il peut être difficile d'obtenir des cellules T chez le patient, il est possible d'utiliser la technologie des cellules pluripotentes induites (iPSc).

Les cellules iPSc peuvent être issues de banques de de cellules, dont le profil immunologique est compatible avec les patients.

Il est possible également de prélever des cellules différenciées chez le patient (par exemple des fibroblastes ou encore des cellules épithéliales), et de forcer la dédifférenciation par l'expression des gènes Oct4 et Socs2, ainsi que d'autres gènes tels que Klf4, Dub3, c-Myc, Nanog. De telles techniques sont désormais bien connues de l'homme du métier, et il pourra adapter les protocoles décrits dans l'art antérieur selon le type cellulaire qu'il souhaitera engager dans un modèle de dédifférenciation.

A ce stade il est possible de de transfecter les cellules iPSc avec de la lipofectamine en présence du tube 4 comme décrit à l'exemple 1 ou à l'exemple 2.

Les cellules transfectées sont sélectionnées par utilisation de l'antibiotique approprié, et l'insertion est vérifiée comme décrit à l'exemple 1.

Les cellules iPSc sont cultivées sur plaques enduites de gel de matrice cellulaire, en coculture avec des fibroblastes embryonnaires murins inactivés pendant 24h, en milieu de culture complet pour les cellules souches et supplémenté en bFGF et d'inhibiteur de ROCK.

Les cellules iPSc sont ensuite cultivées pendant 7jours dans milieux de culture de 24h contenant des cocktails de différenciation distincts chaque jour :

- o J0-1 : milieu supplémenté en hBMP-4, hVEGF, hWnt3a et KOSR ;
- o J2 : milieu supplémenté en hBMP-4, hVEGF et KOSR ;
- o J3 : milieu supplémenté en hBMP-4, hVEGF et bFGF ;
- o J4-5 : milieu supplémenté en hVEGF et bFGF ;

o J6 : milieu IMDM supplémenté en F12, B27, N2, BSA, hVEGF, bFGF, human stem cell factor et hFlt3 ligand ;

o J7 : milieu IMDM supplémenté en F12, B27, N2, BSA, hVEGF, bFGF, human stem cell factor, hFlt3 ligand, TPO, IL-6, hEPOgen, et FICZ (6-formylindolo [3,2-b]carbazole)

5 Au bout de 7 jours, les cellules sont ensuite maintenues en culture pendant 3 à 7 jours supplémentaires avant de poursuivre les expérimentations sur les cellules non adhérentes récoltées. Ces cellules sont testées pour vérifier qu'elles expriment le marqueur CD34+, par cytométrie de flux en utilisant un anticorps anti-CD34.

10 Si les cellules n'ont pas été transfectées au stade iPSc, elles peuvent dès lors être transfectées au stade CD34+ comme décrit à l'exemple 1.

Leur différenciation en cellules T est alors induite comme suit :

- Différenciation en cellules progénitrices de la lignée lymphoïde :

15 Les cellules CD34+ obtenues sont cultivées sur plaques enduites de gel de matrice cellulaire spécifiquement conçu pour la culture de progéniteurs lymphoïdes sans cellules nourricières, dans un milieu de culture pour cellules hématopoïétiques supplémenté en cytokines humaines recombinantes pour promouvoir spécifiquement la différenciation en cellules progénitrices T CD7+CD5+ (pro-T cells).

20 Les cellules sont maintenues en culture à 37°C 5% CO₂ pendant 14 jours en rafraichissant la moitié du milieu tous les 3-4 jours.

- Maturation des cellules progénitrices en cellules T CD4+CD8+ :

25 A J14, les cellules pro-T sont collectées, transférées dans de nouvelles plaques enduites de gel de matrice cellulaire et cultivées dans un nouveau milieu de culture pour cellules hématopoïétiques supplémenté en cytokines humaines recombinantes pour promouvoir spécifiquement la maturation des cellules pro-T en cellules T matures.

Les cellules sont maintenues en culture à 37°C 5% CO₂ pendant 14 jours en rafraichissant la moitié du milieu tous les 3-4 jours.

30

Maturation des cellules T en CD8+ :

35 Les cellules obtenues à l'étape précédente sont collectées, transférées dans de nouvelles plaques enduites de gel de matrice cellulaire et cultivées dans le même milieu de culture que précédemment supplémenté notamment en IL-15 recombinante humaine et en cocktail d'activation CD3/28.

Les cellules sont maintenues en culture à 37°C 5% CO₂ pendant 7 jours en rafraichissant la moitié du milieu à J3-4.

Revendications

1. Composition comprenant

- une première molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant ou constituée essentiellement d'une séquence A permettant l'insertion d'une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ou comprenant une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ladite séquence complémentaire étant liée en 5' à une première séquence riches en T de 40 à 60 nucléotides de long et en 3' à une deuxième séquence riches en T de 40 à 60 nucléotides de long, lesdites première et deuxième séquences riches en T comprenant respectivement un premier et un deuxième domaine de 6 à 12 nucléotides riches en G/C, la séquence du premier domaine étant complémentaire de la séquence du deuxième domaine, ledit premier et deuxième domaine étant positionnés de 15 à 52 nucléotides de ladite séquence A, ladite première molécule comprenant en son extrémité 5' au moins une première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase,

- une deuxième molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant ou constituée essentiellement d'une séquence B permettant l'insertion d'une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ou comprenant une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ladite séquence B complémentaire étant liée en 5' à une troisième séquence riche en T de 40 à 60 nucléotides de long et en 3' à une quatrième séquence riche en T de 40 à 60 nucléotides de long, ladite troisième et quatrième séquence riche en T comprenant respectivement un troisième et un quatrième domaine de 6 à 12 nucléotides riches en G/C, la séquence du troisième domaine étant complémentaire de la séquence du quatrième domaine, lesdits troisième et quatrième domaines étant positionnés de 15 à 52 nucléotides de ladite séquence B, ladite deuxième molécule comprenant en son extrémité 5' au moins la première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance de ladite transposase et en son extrémité 3' la deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase,

ladite séquence B étant une séquence complémentaire dudit acide nucléique d'intérêt, la séquence A étant positionnée en 5' d'une région d'intérêt dudit acide nucléique d'intérêt et la séquence B positionnée en 3' de la région d'intérêt dudit acide nucléique d'intérêt, et

- une troisième molécule simple brin comprenant

* dans sa partie 5', au moins une séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule,

* dans sa partie 3' au moins une séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule, et

* une région intermédiaire située entre séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule et la séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule, ladite région intermédiaire comprenant une séquence codant une protéine de fusion, ladite protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale du domaine activateur du lymphocyte T, c'est-à-dire la chaîne CD3ζ du récepteur des cellules T ou TCR, les première et troisième molécules d'acides nucléiques simple brin étant appariées selon la complémentarité des bases définie par Watson et Crick de sorte à définir deux sites double brin de liaison de ladite transposase et les deuxième et troisième molécules d'acides nucléiques simple brin étant appariées selon la complémentarité des bases définie par Watson et Crick de sorte à définir deux sites double brin de liaison de ladite transposase.

2. Composition selon la revendication 1, où ladite protéine de fusion comprend le peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule, fusionné à une partie transmembranaire d'une protéine membranaire, ce dernier fusionné à la chaîne CD3ζ du TCR.

3. Composition selon la revendication 1, où ladite protéine de fusion comprend le peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule, fusionné à une partie transmembranaire d'une protéine membranaire, le domaine transmembranaire de la protéine membranaire étant fusionné à un domaine de coactivation, ce dernier étant fusionné à la chaîne CD3ζ du TCR.

4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3,

- où ladite séquence A comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une première région du locus du gène codant la protéine TRAC et

- où ladite séquence B comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une deuxième région du locus du gène codant la protéine TRAC,

ladite séquence A et la dite séquence B étant deux séquences différentes, lesdites première et deuxième régions du locus TRAC encadrant avantageusement une région 5' région du locus du gène codant la protéine TRAC.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, où ladite première molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence orientée 5'-3' de reconnaissance de ladite transposase et
- 5 où la deuxième molécule comprend son extrémité 5' une première séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase suivi d'une deuxième séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase.
- 10 6. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, où ladite première molécule comprend en son extrémité 5' une première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase, suivie d'une première séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase et
- 15 où la deuxième molécule comprend son extrémité 5' une séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase.
7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, où ladite transposase est une transposase bactérienne, notamment une transposase choisie parmi Tn5, Tn9, Tn10
- 20 ou Tc1/mariner.
8. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, où la région intermédiaire de la troisième molécule comprend la séquence SEQ ID NO : 3 ou la séquence SEQ ID NO : 1134.
- 25 9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, où les première, deuxième et troisième molécules sont choisies parmi les triplets tels que définis dans le tableau 2.
10. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 comprenant en outre,
- 30 ** une quatrième molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant ou constituée essentiellement d'une séquence A' permettant l'insertion d'une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ou comprenant une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ladite séquence complémentaire étant liée en 5' à une cinquième séquence riches en T de 40 à 60 nucléotides de long et en 3' à une sixième séquence
- 35 riches en T de 40 à 60 nucléotides de long, lesdites cinquième et sixième séquences riches en T comprenant respectivement un cinquième et un sixième domaine de 6 à 12

nucléotides riches en G/C, la séquence du cinquième domaine étant complémentaire de la séquence du sixième domaine, ledit cinquième et sixième domaine étant positionnés de 15 à 52 nucléotides de ladite séquence A', ladite quatrième molécule comprenant en son extrémité 5' au moins une première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance d'une transposase et en son extrémité 3' une deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase,

** une cinquième molécule d'acides nucléiques simple brin comprenant ou constituée essentiellement d'une séquence B' permettant l'insertion d'une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ou comprenant une séquence complémentaire d'un acide nucléique d'intérêt, ladite séquence B' complémentaire étant liée en 5' à une septième séquence riche en T de 40 à 60 nucléotides de long et en 3' à une huitième séquence riche en T de 40 à 60 nucléotides de long, ladite septième et huitième séquence riche en T comprenant respectivement un septième et un huitième domaine de 6 à 12 nucléotides riches en G-C, la séquence du septième domaine étant complémentaire de la séquence du huitième domaine, lesdits septième et huitième domaines étant positionnés de 15 à 52 nucléotides de ladite séquence B', ladite cinquième molécule comprenant en son extrémité 5' au moins la première séquence orientée 5'-3' de reconnaissance de ladite transposase et en son extrémité 3' la deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase, ladite séquence B' étant une séquence complémentaire dudit acide nucléique d'intérêt, la séquence A' étant positionnée en 5' d'une région d'intérêt dudit acide nucléique d'intérêt et la séquence B' positionnée en 3' de la région d'intérêt dudit acide nucléique d'intérêt, et ** une sixième molécule simple brin comprenant

* dans sa partie 5', au moins une séquence complémentaire de ladite cinquième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule,

* dans sa partie 3' au moins une séquence complémentaire de ladite quatrième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule, et

* une région intermédiaire située entre séquence complémentaire de ladite quatrième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule et la séquence complémentaire de ladite cinquième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule, une séquence complémentaire de ladite séquence codant ladite protéine de fusion contenue dans la troisième molécule,

les quatrième et sixième molécules d'acides nucléiques simple brin étant appariées selon la complémentarité des bases définie par Watson et Crick de sorte à définir deux sites double brin de liaison de ladite transposase et les cinquième et sixième molécules d'acides nucléiques simple brin étant appariées selon la complémentarité des bases définie par Watson et Crick de sorte à définir deux sites double brin de liaison de ladite transposase.

11. Composition selon la revendication 10, où

- ladite séquence A comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une première région du locus du gène codant la protéine TRAC,

- ladite séquence B comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une deuxième région du locus du gène codant la protéine TRAC,

ladite séquence A et la dite séquence B étant deux séquences différentes, lesdites première et deuxième régions encadrant avantageusement une région 5' région du locus du gène codant la protéine TRAC,

et où

- ladite séquence A' comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une troisième région du locus du gène codant la protéine TRAC,

- ladite séquence B' comprend une séquence complémentaire de la séquence d'une quatrième région du locus du gène codant la protéine TRAC,

ladite séquence A' et la dite séquence B' étant deux séquences différentes, lesdites troisième et quatrième régions du locus du gène codant la protéine TRAC, encadrant avantageusement une séquence complémentaire de ladite région 5' du locus du gène codant la protéine TRAC,

et où

la séquence A et la séquence A' sont au plus en partie complémentaires,

la séquence A et la séquence B' sont au plus en partie complémentaires,

la séquence B et la séquence A' sont au plus en partie complémentaires, et

la séquence B et la séquence B' sont au plus en partie complémentaires.

12. Cellule immunitaire, notamment une cellule lymphocytaire T, isolée et purifiée, comprenant

une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

13. Composition pharmaceutique comprenant :

- une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, ou

- une cellule immunitaire selon la revendication 12,

en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

14. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, pour son utilisation en tant que médicament.

15. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, pour son utilisation pour le traitement du cancer.

16. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, pour insérer, dans une cellule lymphocytaire T, une séquence codant une protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3ζ du TCR, sous réserve que l'utilisation ne comprenne pas un procédé pour la modification de l'identité génétique germinale d'êtres humains et que ladite utilisation ne soit pas une méthode pour le traitement du corps humain ou animal par une chirurgie ou une thérapie.
17. Méthode d'insertion in vitro d'une séquence codant une protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3ζ du TCR, ladite méthode comprenant :
- la mise en contact, afin d'obtenir un complexe de remplacement, d'une composition telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 11, avec un acide nucléique cible comprenant au moins une région 5' du locus du gène codant la protéine TRAC, ladite composition étant telle que
 - la séquence A de ladite première molécule comprend une séquence complémentaire d'une première région du locus du gène codant la protéine TRAC,
 - la séquence B de ladite deuxième molécule comprend une séquence complémentaire d'une deuxième région du locus du gène codant la protéine TRAC, et
 - la troisième molécule comprend la séquence d'une protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3ζ du TCR située entre une séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule et la séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule,
 - la mise en présence du complexe de remplacement avec une transposase reconnaissant les sites double brin de liaison de ladite transposase contenus dans ladite composition, pour obtenir un complexe de recombinaison, et
 - la recombinaison du complexe de combinaison pour obtenir la séquence codant la protéine de fusion insérée dans l'acide nucléique cible entre la première et la deuxième région du locus du gène codant la protéine TRAC.
18. Méthode de production de cellules T à récepteur antigénique chimérique ou *CAR T cell* comprenant la séquence d'une protéine de fusion comprenant, dans la partie

aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3ζ du TCR, ladite méthode comprenant :

- la mise en contact d'une composition telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 11, avec une cellule T purifiée, l'ADN génomique de ladite cellule T purifiée comprenant le locus du gène codant la protéine TRAC,

ladite composition ou ledit ensemble étant tel que

la séquence A de ladite première molécule comprend une séquence complémentaire d'une première région du locus du gène codant la protéine TRAC,

la séquence B de ladite deuxième molécule comprend une séquence complémentaire d'une deuxième région du locus du gène codant la protéine TRAC, et

la troisième molécule comprend la séquence d'une protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3ζ du TCR située entre une séquence complémentaire de ladite deuxième séquence de reconnaissance de ladite transposase de la première molécule et la séquence complémentaire de ladite première séquence de reconnaissance de ladite transposase de la deuxième molécule, afin d'obtenir un complexe de remplacement,

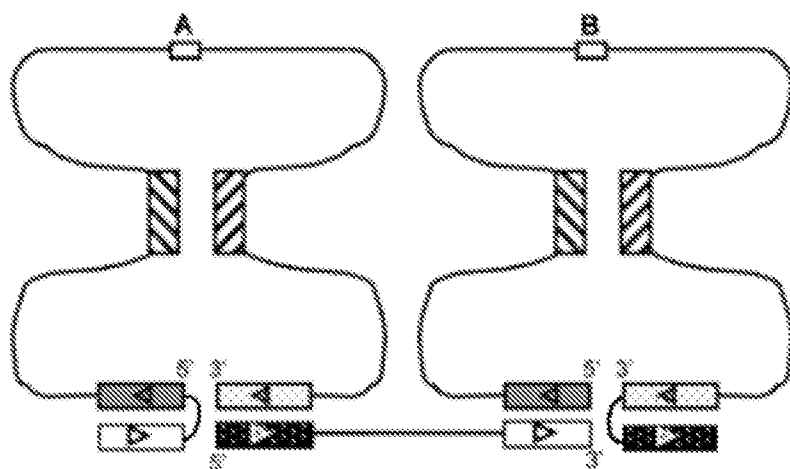
- la mise en présence du complexe de remplacement avec une transposase reconnaissant les sites double brin de liaison de ladite transposase contenus dans ledit ensemble, pour obtenir un complexe de recombinaison,

- la recombinaison du complexe de combinaison pour obtenir une cellule *CART*, l'ADN génomique de ladite cellule *CART* comprenant la séquence codant ladite protéine de fusion au locus du gène codant la protéine TRAC, et

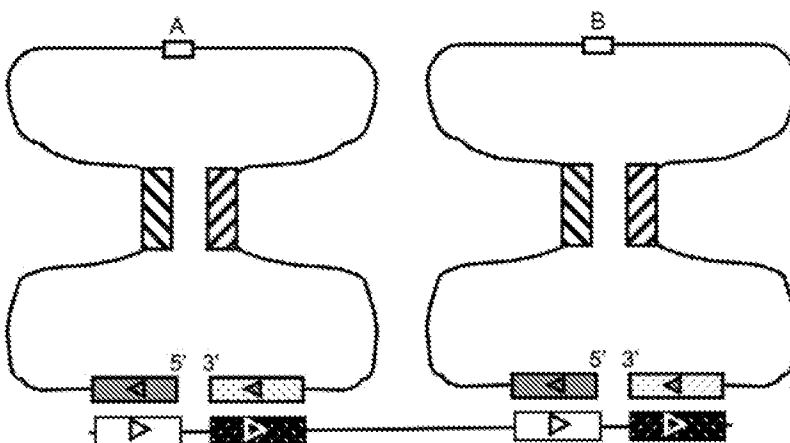
- la purification de la cellule *CART*.

19. Cellule lymphoïde T modifiée susceptible d'être obtenue par la méthode selon la revendication 19, ladite cellule lymphoïde T modifiée comprenant dans son génome une insertion d'une séquence codant une protéine de fusion comprenant, dans la partie aminoterminal un peptide capable de se lier à une protéine membranaire d'une cellule et dans la partie carboxyterminale la chaîne CD3ζ du TCR, ladite insertion étant localisée au locus du gène codant la protéine TRAC.

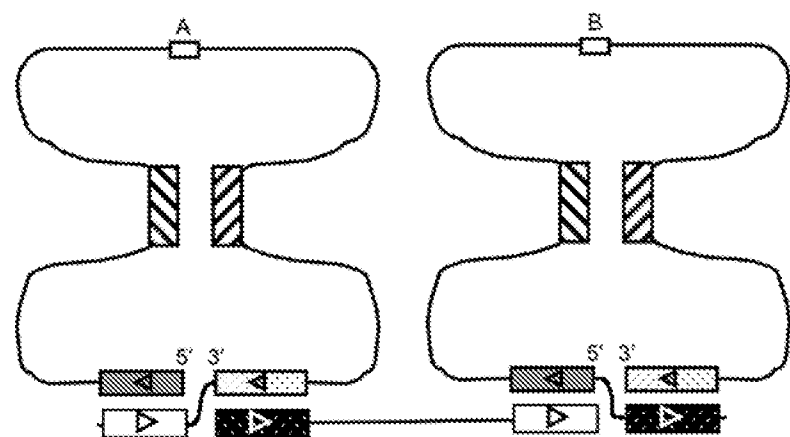
[Fig. 1A]



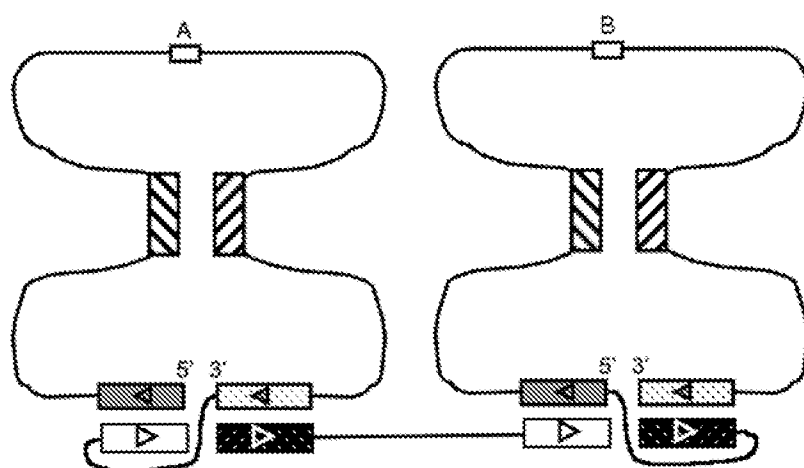
[Fig. 1B]



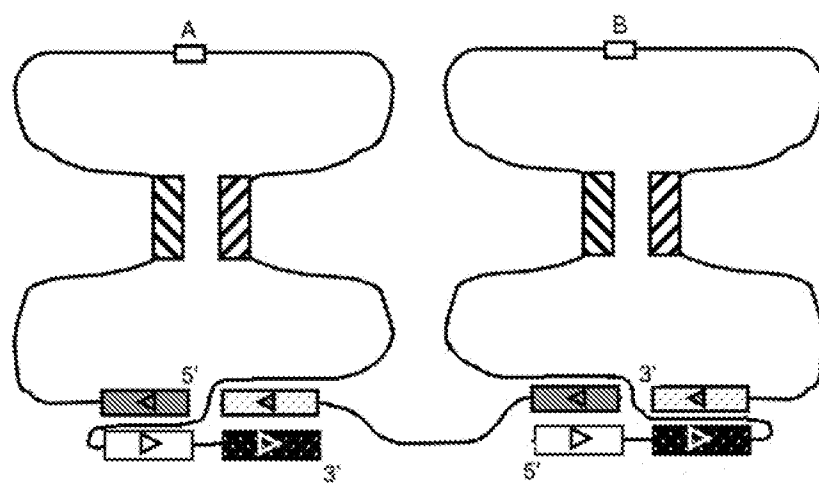
[Fig. 1C]



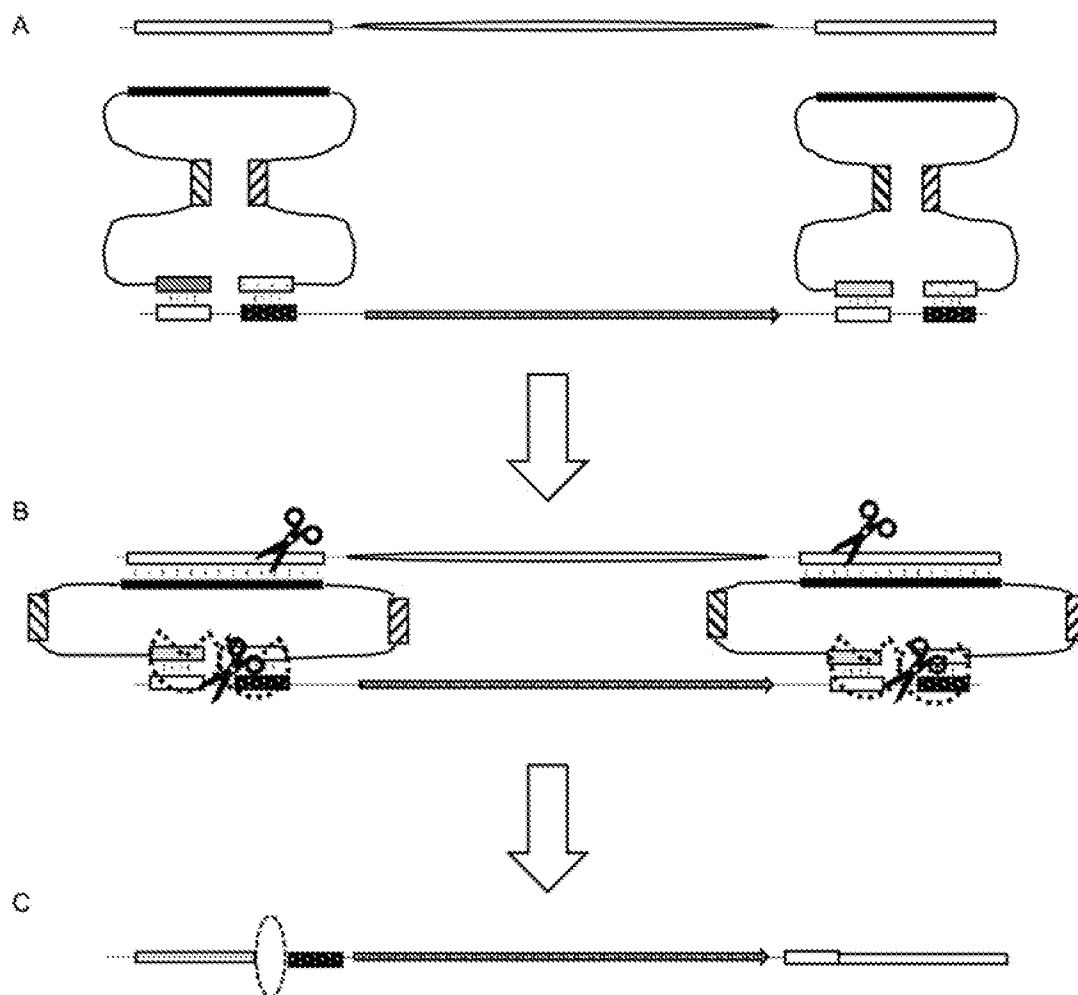
[Fig. 1D]



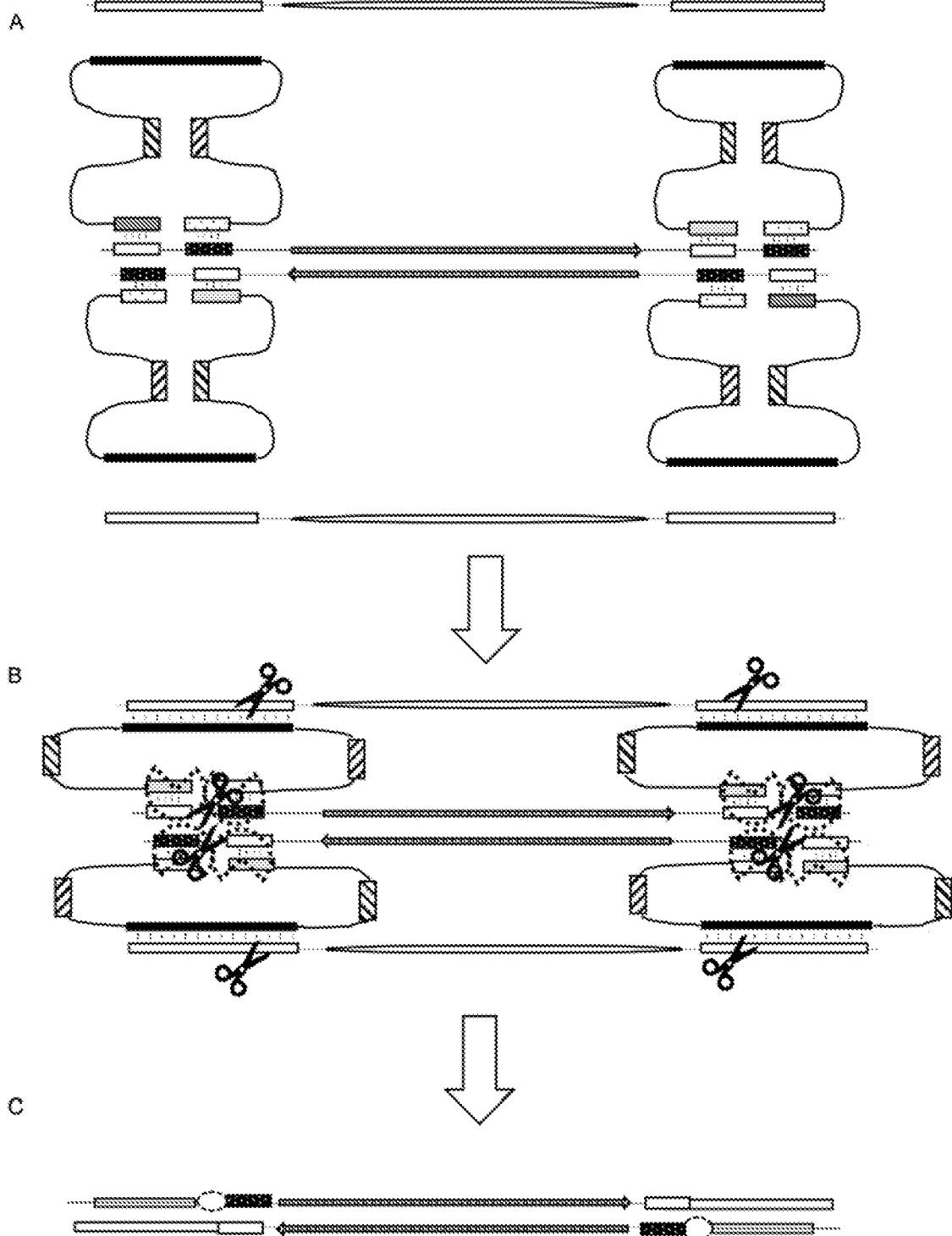
[Fig. 1E]



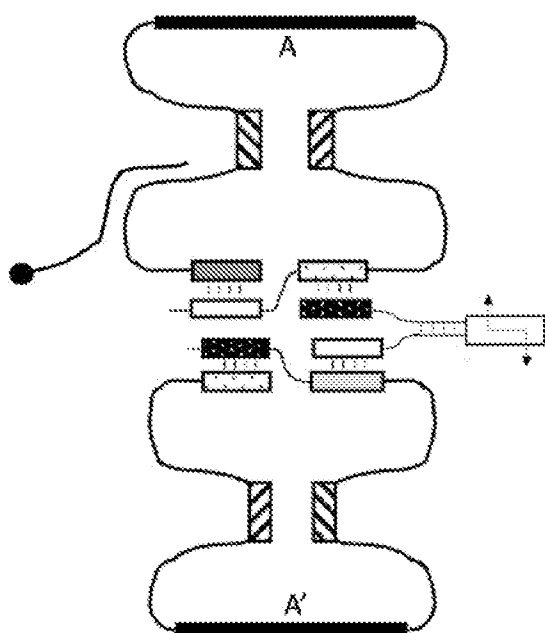
[Fig. 2]



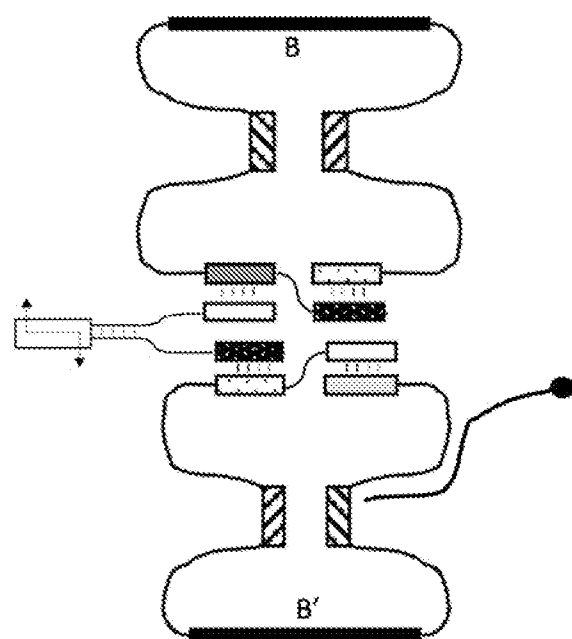
[Fig. 3]



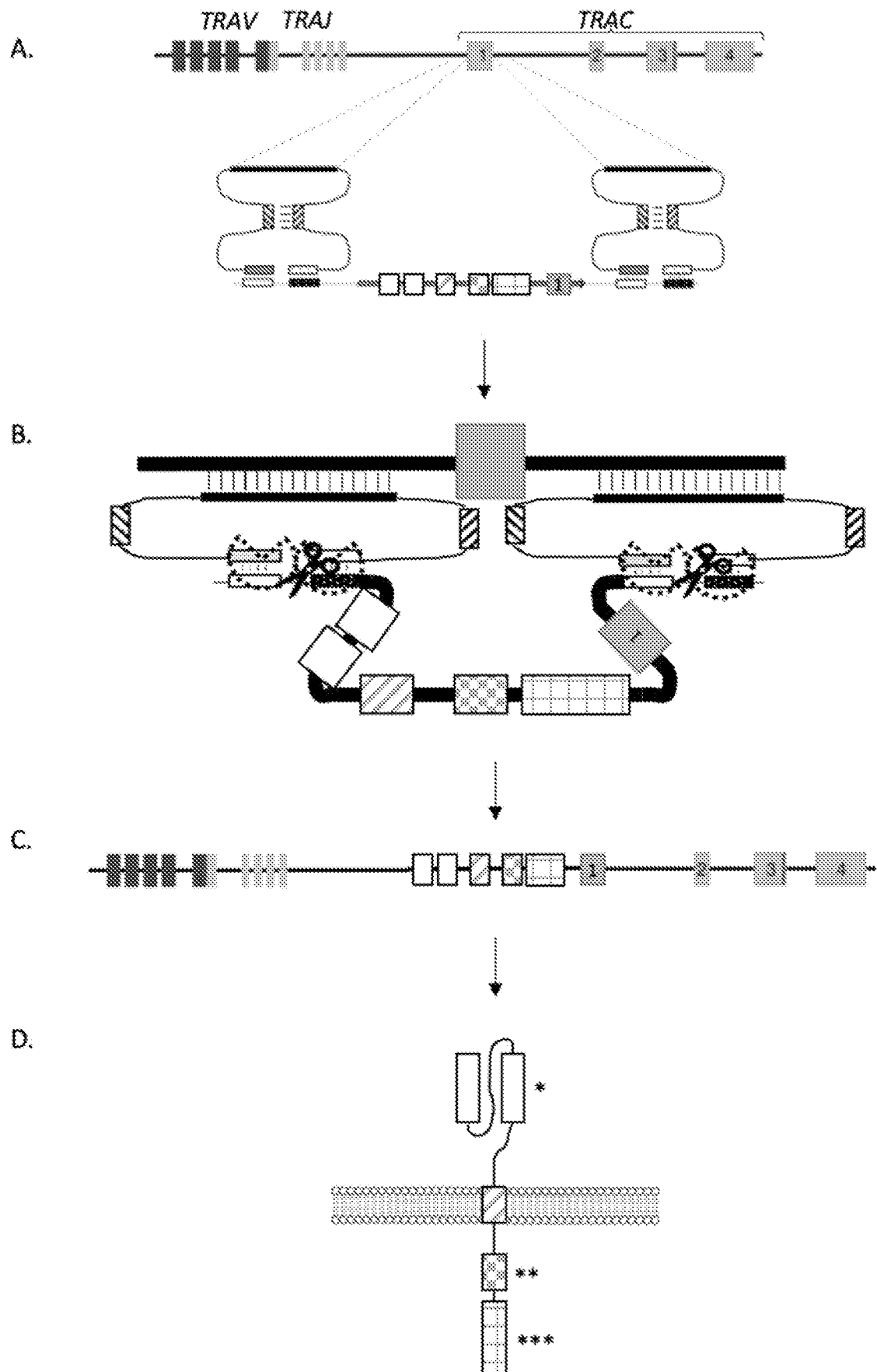
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ÉTABLI EN VERTU DE L'ARTICLE XI.23., §10 DU CODE DE DROIT ÉCONOMIQUE BELGE

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE BR141769/RIM/EVG
Demande nationale belge n° 202206101	Date du dépôt 28-12-2022
	Date de priorité revendiquée
Déposant (Nom) QUIDDITAS SA	
Date de la requête d'une recherche de type international 14-01-2023	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international SN83011
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Voir rapport de recherche	
II. DOMAINES RECHERCHES	
Documentation minimale consultée	
Système de classification	Symboles de la classification
IPC	Voir rapport de recherche
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés	
III. ☐ IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	
IV. ☐ ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE À L'ÉTENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 202206101

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N15/10 A61K35/17 C07K14/725 C12N5/0783 C12N9/22 C12N15/90 ADD. Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N C07K A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	KLOMPE SANNE E ET AL: "Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 571, no. 7764, 12 juin 2019 (2019-06-12), pages 219-225, XP036831898, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/S41586-019-1323-Z [extrait le 2019-06-12] * le document en entier * ----- -/--	1-19
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
° Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée 12 juin 2023		Date d'expédition du rapport de recherche de type international
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Seroz, Thierry

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MORIARITY BRANDEN S. ET AL: "Modular assembly of transposon integratable multigene vectors using RecWay assembly", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 41, no. 8, 1 avril 2013 (2013-04-01), pages e92-e92, XP055919256, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkt115 Extrait de l'Internet: URL:https://watermark.silverchair.com/gkt115.pdf?token=AQECAHi208BE49Oan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAtAwggLMBgkqhkiG9w0BBwagggK9MIICuQIBADCCArIGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMghSykix3GnbnsRg3AgEQgIICgxhhEjk4CGu901FL7BLEZFR874_GYKcheUcU6fiEKuYmo8NIDpvKm6FPsGcoI_TSV_hwU4FIq81bnEeIxMEwHKDsOGEI0> * le document en entier * -----	1-19
A	E. L. ARONOVICH ET AL: "The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy", HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 20, no. R1, 15 avril 2011 (2011-04-15), pages R14-R20, XP055177523, ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/hmg/ddr140 * le document en entier * -----	1-19
A	WO 2021/061832 A1 (UNIV MINNESOTA [US]) 1 avril 2021 (2021-04-01) * le document en entier * -----	1-19
A	MIYAMOTO TATSUO ET AL: "Updated summary of genome editing technology in human cultured cells linked to human genetics studies", JOURNAL OF HUMAN GENETICS, SPRINGER SINGAPORE, SINGAPORE, vol. 63, no. 2, 11 octobre 2017 (2017-10-11), pages 133-143, XP036428428, ISSN: 1434-5161, DOI: 10.1038/S10038-017-0349-Z [extrait le 2017-10-11] * le document en entier * -----	1-19
A	WO 2019/046636 A1 (BROAD INST INC [US]; CLAUSSNITZER MELINA [US] ET AL.) 7 mars 2019 (2019-03-07) * le document en entier * -----	1-19

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n

BE 202206101

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
WO 2021061832	A1	01-04-2021	AU 2020355025 A1	07-04-2022
			CA 3151690 A1	01-04-2021
			CN 115175987 A	11-10-2022
			EP 4034640 A1	03-08-2022
			JP 2022548315 A	17-11-2022
			US 2022282285 A1	08-09-2022
			WO 2021061832 A1	01-04-2021

WO 2019046636	A1	07-03-2019	US 2020255867 A1	13-08-2020
			WO 2019046636 A1	07-03-2019



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN83011	Date du dépôt(jour/mois/année) 28.12.2022	Date de priorité (jour/mois/année)	Demande n° BE202206101
Classification internationale des brevets (CIB) INV. C12N15/10 A61K35/17 C07K14/725 C12N5/0783 C12N9/22 C12N15/90			
Déposant QUIDDITAS SA			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- ☒ Cadre n° I Base de l'opinion
- ☐ Cadre n° II Priorité
- ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- ☐ Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- ☐ Cadre n° VI Certains documents cités
- ☐ Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- ☒ Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de couverture) (Juillet 2022)	Examineur Seroz, Thierry
--	-----------------------------

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE202206101

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, la présente opinion a été effectuée sur la base d'un listage des séquences
 - a. ☒ faisant partie de la demande telle que déposée.
 - b. ☐ remis postérieurement à la date du dépôt aux fins de la recherche,
 - ☐ accompagné d'une déclaration selon laquelle le listage des séquences ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée.
3. ☐ En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande, la présente opinion a été effectuée dans la mesure où une opinion valable pouvait être formulée en l'absence d'un listage des séquences conforme à la norme ST.26 de l'OMPI.
4. Commentaires complémentaires :

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

Item VIII

Il est noté que la Demanderesse emploie deux "orthographes" différentes pour apparemment désigner un même objet, G/C et G-C.

De plus, page 12, lignes 16-19 de la présente demande, *[des séquences riches en GC sont introduites dans chacune des séquences riches en A/T, notamment riches en T, ou A/U, bordant la région A. Ces régions riches en G/C sont constituées de 6 à 12 nucléotides, dont la quantité de C ou de G est supérieure à 50% des nucléotides contenus dans ladite séquence riche en G/C.]* (nous soulignons).

De plus l'"orthographe" du terme G/C employé dans le revendication 10 laisse penser qu'il est fait référence aux dinucléotides GC et non aux G ou C comme le passage de la présente demande cité plus haut. La confusion est encore plus marquée à la lecture de la page 25, lignes 14-22 de la présente demande qui mentionne que *[De manière avantageuse, le premier domaine riche en G/C de la première molécule (ou de la deuxième molécule) correspond à la séquence suivante GGCGATCGC (SEQ ID NO : 194) de sorte que le deuxième domaine riche en G/C sera le même. En effet, du fait du repliement de la molécule sur elle-même, le deuxième domaine riche en G/C sera dans une orientation complémentaire et antiparallèle par rapport à au premier domaine riche en G/C, et l'interaction se fera au niveau de la région palindromique (souligné dans la séquence ci-dessus).*

Le premier et le deuxième domaine riches en G/C peuvent également être la séquence suivante GCGGCGATCGGC (SEQ ID NO: 195). Les explications ci-dessus s'appliquent mutatis mutandis].

En effet, aucune des 2 séquences présentées ne comprend plus de 50% de C ou plus de 50% de G. Les 2 séquences comprennent plus de 50% de C et de G, c'est à dire le total des nucléotides C et G cumulés représentent plus de 50% des nucléotides desdites séquences.

L'absence de clarté de la définition même des régions riches en G-C entraîne une absence de clarté des revendications.

Remarques complémentaires:

Bien que la méthode de la **revendication 17** soit mise en oeuvre *in vitro*, elle comprend un procédé pour la modification de l'identité génétique germinale d'êtres humains.