



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

(21) BR 112020008704-1 A2



* B R 1 1 2 0 2 0 0 8 7 0 4 A 2 *

(22) Data do Depósito: 30/10/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 10/11/2020

(54) Título: EDIÇÃO DE GENES DE CÉLULAS PRIMÁRIAS

(51) Int. Cl.: A61K 35/17; C12N 5/0783; C12N 15/113; C12N 15/85; C12N 15/66; (...).

(30) Prioridade Unionista: 30/10/2017 US 62/579,114; 30/10/2017 US 62/579,113.

(71) Depositante(es): PACT PHARMA, INC..

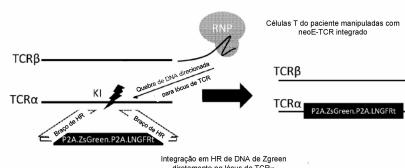
(72) Inventor(es): KYLE MARTIN JACOBY; ALEXIS FRANZUSOFF; STEFANIE MANDL-CASHMAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2018058230 de 30/10/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/089610 de 09/05/2019

(85) Data da Fase Nacional: 30/04/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a métodos e composições que são fornecidos para edição de genes mediada por nuclease de células primárias sem o uso de entrega mediada por vírus. Métodos de tratamentos usando células primárias editadas também são fornecidos.



“EDIÇÃO DE GENES DE CÉLULAS PRIMÁRIAS”

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001]Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório US. No. 62/579.113, depositado em 30 de outubro de 2017, e Pedido Provisório US. No. 62/579.114, depositado em 30 de outubro de 2017, cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade para todos os fins.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002]O presente pedido contém uma Lista de Sequências que foi enviada via EFS-Web e é aqui incorporada aqui por referência em sua totalidade. A cópia ASCII, criada no mês XX, 20XX, é denominada XXXXUS_sequencelisting.txt e tem X.XXX.XXX bytes de tamanho.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003]O direcionamento genético é um método pelo qual o genoma pode ser editado diretamente, fornecendo um caminho para a engenharia de produtos celulares, reparando mutações que causam doenças genéticas, ou criando mutações para estudar genes. O direcionamento genético se baseia na recombinação homóloga após a entrega de um DNA modelo de reparo de homologia contendo a sequência alterada desejada, juntamente com uma nuclease sítio-específica visando o lócus de interesse.

[004]O direcionamento genético tem sido utilizado em células T humanas primárias para criar células T com novas especificidades. Nesses casos, AAV foi usado para entregar o DNA modelo de reparo de homologia. O DNA contém sequência de codificação para receptores de抗ígenos quiméricos (CARs) ou receptores de células T (TCRs) específicos para um novo epítopo. Quando essas sequências são dirigidas ao lócus de TCR α (comumente) ou TCR β , o investigador pode obter um nocaute simultâneo do TCR endógeno (e remoção da especificidade correspondente), e um “knockin” da nova proteína (e especificidade correspondente).

Este processo é usado em escala para produzir células T CAR e células T TCR para uso terapêutico. No entanto, a produção de AAV leva muito tempo, é dispendiosa, difícil e altamente regulamentada, limitando sua aplicação.

[005]A edição de genes com DNA de plasmídeo nu foi descrita anteriormente, mas apenas no contexto de linhagens celulares imortalizadas, citando problemas com toxicidade em células primárias. Esses problemas podem resultar de investigadores que usam o mRNA para entregar a nuclease, que exibe alguma toxicidade, juntamente com o DNA que diminui ainda mais a viabilidade celular. Esses problemas também podem surgir do fato de que a eficiência na entrega do DNA depende do tamanho do DNA, e os vetores podem não ter sido otimizados adequadamente. Além disso, sabe-se que as impurezas de DNA comuns às preparações de plasmídeos baseados em kits usadas pela maioria dos laboratórios de pesquisa contribuem para a toxicidade celular, o que pode ter impedido o progresso no uso do DNA de plasmídeo como modelo de reparo de homologia. Apenas recentemente as técnicas de purificação e entrega de DNA foram aprimoradas (por exemplo, emergência de vacinas plasmídicas e protocolos e equipamentos de eletroporação otimizados, tal como Nucleofection).

[006]Transposons também foram utilizados para inserir o DNA nas células T humanas primárias, mas de maneira inespecífica (mais semelhante à entrega retroviral). Nesse caso, o DNA nu a ser inserido randomicamente no genoma é entregue como DNA de plasmídeo nu. No entanto, alta toxicidade e baixa eficiência são limitações deste método. A edição de genes em células T humanas primárias via recombinação homóloga também já foi descrita anteriormente (por exemplo, Schumann e outros, Proc Natl Acad Sci USA. 18 de agosto de 2015; 112 (33): 10437-42), porém apenas no contexto de pequenas edições ou reparos, por exemplo, 20 nucleotídeos ou menos. A edição de genes por eletroporação de complexos de ribonucleoproteínas (RNP) por recombinação homóloga também foi descrita anteriormente, por exemplo, por Kim e outros (Genome Res. Junho de 2014; 24 (6):

1012-9) e na Pub. Internacional No. WO2016/123578, no entanto, apenas inserções relativamente pequenas (ou substituições da sequência genômica) de 12 nucleotídeos foram demonstradas em cada uma usando modelos lineares. As composições e métodos para edições maiores também não são bem descritos para células primárias que não as células T, tal como células-tronco hematopoiéticas e células exterminadoras naturais (NK). Na falta de campo, existem métodos eficientes de fazer grandes edições em células primárias, limitando assim potencialmente as aplicações terapêuticas da edição de genes.

[007]Portanto, composições e métodos aprimorados para mediar a edição de genes em células, tal como células primárias humanas e células T primárias humanas, são muito necessários no campo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008]São aqui fornecidas células modificadas compreendendo: um polinucleotídeo circular compreendendo uma sequência de nucleotídeo exógena, a sequência de nucleotídeo exógena compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um lócus alvo genômico endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus alvo genômico endógeno, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do lócus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus alvo genômico endógeno, e em que a célula modificada está substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus. Em algumas modalidades, a célula modificada compreende ainda uma sequência de nucleotídeo integrada, em que a sequência de nucleotídeo integrada compreende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção do gene, a sequência de nucleotídeo integrada é integrada no lócus alvo genômico endógeno, e a sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma

porção do gene seja capaz de ser expressa. Em algumas modalidades, a célula modificada compreende ainda uma composição de nuclease capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida dentro do lócus alvo genômico endógeno.

[009]Também são aqui fornecidas células modificadas compreendendo uma célula T, a célula T compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa; b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma primeira sequência de polipeptídeo ligante; d) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência de polipeptídeo ligante; em que a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são integradas em um lócus de TCR-alfa endógeno, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são orientadas de modo que cada uma das sequências de polipeptídeo seja capaz de ser expressa como um único polipeptídeo, em que a segunda sequência de polipeptídeo ligante está posicionada entre a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta, o primeiro e o segundo polipeptídeo ligante são polipeptídeos ligantes cliváveis capazes de serem clivados na célula T, de modo que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta formem, cada uma, polipeptídeo separado, em que os polipeptídeos separados são capazes de se associar para formar um TCR funcional, em que a célula modificada está substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus, e em que um lócus de TCR-beta endógeno é rompido.

[010]Também são aqui fornecidas células modificadas compreendendo uma

célula T, a célula T compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa; b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma primeira sequência de polipeptídeo ligante; d) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência de polipeptídeo ligante; em que a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são integradas em um lócus de TCR endógeno, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são orientadas de modo que cada uma das sequências de polipeptídeo seja capaz de ser expressa como um único polipeptídeo, em que a segunda sequência de polipeptídeo ligante está posicionada entre a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta, e o primeiro e o segundo polipeptídeo ligante são polipeptídeos ligantes cliváveis capazes de serem clivados na célula T, de modo que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta formem, cada uma, um polipeptídeo separado, em que os polipeptídeos separados são capazes de se associarem para formar um TCR funcional. Em algumas modalidades, a célula modificada compreende ainda um polinucleotídeo circular compreendendo uma sequência de nucleotídeo exógena, a sequência de nucleotídeo exógena compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de nucleotídeo codificando a sequência do polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica o polipeptídeo TCR-beta sequência e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região do lócus de TCR

endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus de TCR endógeno, e as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do lócus de TCR endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus de TCR endógeno. Em algumas modalidades, a célula modificada está substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus. Em algumas modalidades, a célula modificada compreende ainda uma composição de nuclease capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida dentro do lócus de TCR endógeno.

[011]Em algumas modalidades, a célula modificada compreende ainda uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Em algumas modalidades, a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região de codificação do gene selecionada a partir do grupo que consiste de: uma mutação de deslocamento de quadro resultando em uma alteração no quadro da proteína traduzida, uma mutação sem sentido causando uma substituição de um aminoácido para um códon terminal, e uma mutação “missense” resultando na substituição de um aminoácido para outro. Em algumas modalidades, a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região não codificante do gene selecionado a partir do grupo que consiste de: uma mutação que altera a expressão de um produto de mRNA codificado pelo gene, e uma mutação que altera a estabilidade de um produto de mRNA codificado pelo gene. Em algumas modalidades, a célula modificada compreende ainda uma segunda composição de nuclease capaz de clivar a segunda sequência de nucleotídeo definida dentro da célula modificada.

[012]Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende uma nuclease selecionada a partir do grupo que consiste de uma nuclease da família de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespacadas (CRISPR) ou um derivado da mesma, uma nuclease efetora semelhante a ativadores

de transcrição (TALEN) ou derivado da mesma, uma nuclease dedo de zinco (ZFN) ou derivado da mesma, e uma endonuclease teleguiada (HE) ou derivado da mesma. Em algumas modalidades, a nuclease da família CRISPR é uma nuclease Cas9. Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende um complexo proteico preformado. Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende um vetor de nucleotídeo capaz de expressar a nuclease dentro da célula modificada. Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende um CRISPR RNA (crRNA) e um CRISPR RNA com transativação (tracrRNA). Em algumas modalidades, o crRNA compreende um RNA guia (gRNA), em que o gRNA é complementar à sequência de nucleotídeo definida. Em algumas modalidades, o crRNA e o tracrRNA estão em um único polinucleotídeo. Em algumas modalidades, o crRNA e o tracrRNA estão em polinucleotídeos separados.

[013]Em algumas modalidades, a expressão da sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene ou das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor endógeno dentro do lócus alvo genômico endógeno ou lócus de TCR endógeno. Em algumas modalidades, a expressão da sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene ou das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor exógeno. Em algumas modalidades, o promotor exógeno é selecionado a partir do grupo que consiste de promotores de mamíferos, promotores humanos, promotores virais, promotores derivados de repetição terminal longa (LTR) a partir de um retrovírus ou lentivírus, fusões de dois promotores, fusões de duas porções de promotores, promotores MMLV LTR, promotores HIV LTR, promotores MCMV LTR, EF1a, MND, CMV, SV40, PGK1, Ubc, beta-actina, CAG, promotores induzíveis de pequenas moléculas, promotores induzíveis de tetraciclina, promotores condicionais de pequenas moléculas, sistemas promotores condicionais Cre-LoxP, sistemas promotores condicionais Flp-FRT, e sistemas promotores condicionais de tamoxifeno.

[014]Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa ou a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta é maior ou igual a 100 bases de comprimento. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa ou a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta é maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 400 bases de comprimento, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 800 bases de comprimento, maior ou igual a 1500 bases de comprimento, maior ou igual a 2000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 4000 bases de comprimento.

[015]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região do lócus alvo genômico endógeno ou do lócus de TCR endógeno são maiores ou iguais a 50 bases de comprimento, maiores ou iguais a 100 bases de comprimento, maiores ou iguais a 200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 600 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento, ou maiores ou iguais a 2000 bases de comprimento.

[016]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do lócus alvo genômico endógeno ou do lócus de TCR endógeno são maiores ou iguais a 50 bases de comprimento, maiores ou iguais a 100 bases de comprimento, maiores ou iguais a 200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 600 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento, ou maiores ou iguais a 2000 bases de comprimento.

[017]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região do lócus alvo genômico endógeno ou ao lócus de TCR endógeno e as

sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do lócus alvo genômico endógeno ou ao lócus de TCR endógeno são maiores ou iguais a 600 bases de comprimento.

[018]Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo definida é rompida após a integração das sequências de nucleotídeo.

[019]Em algumas modalidades, a expressão de um gene endógeno associado operacionalmente ao lócus alvo genômico endógeno ou ao lócus de TCR endógeno é rompida.

[020]Em algumas modalidades, a célula modificada compreende ainda reagentes adicionais que são capazes de aumentar as taxas de recombinação homóloga. Em algumas modalidades, os reagentes adicionais que são capazes de aumentar as taxas de recombinação homóloga compreendem ativadores de vias de reparo de recombinação homóloga, inibidores de vias de reparo de junção de extremidade não homóloga (NHEJ), ou combinações dos mesmos.

[021]Em algumas modalidades, a célula modificada compreende ainda reagentes adicionais que são capazes de aumentar a viabilidade da célula modificada. Em algumas modalidades, os reagentes adicionais que são capazes de aumentar a viabilidade da célula modificada compreendem inibidores das vias de detecção de ácido nucleico. Em algumas modalidades, as vias de detecção de ácido nucleico compreendem o grupo selecionado a partir de: vias de detecção de ácido nucleico TLR9, vias de detecção de ácido nucleico AIM2, vias de detecção de ácido nucleico IFI16, vias de detecção de ácido nucleico cGAS e vias de detecção de ácido nucleico citosólico. Em algumas modalidades, os inibidores das vias de detecção de ácido nucleico compreendem um antagonista de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, o antagonista de oligonucleotídeo compreende a sequência TTAGGG ou repetições em tandem da mesma.

[022]Em algumas modalidades, o polinucleotídeo circular compreende um

plasmídeo ou um nanoplasmídeo. Em algumas modalidades, o plasmídeo tem um esqueleto de vetor inferior a 500 bases, e em que o esqueleto de vetor é uma sequência de nucleotídeo que não é a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene, nem a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, nem a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, nem as sequências de nucleotídeo que codificam o primeiro e o segundo polipeptídeo ligante, e nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao primeiro lócus genômico alvo endógeno ou lócus de TCR endógeno, e nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao segundo lócus genômico alvo endógeno ou lócus de TCR endógeno.

[023]Em algumas modalidades, o polinucleotídeo circular não é um polinucleotídeo amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR).

[024]Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno ou o lócus de TCR endógeno compreende uma região de codificação. Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno ou o lócus de TCR endógeno compreende um ítron.

[025]Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno ou o lócus de TCR endógeno compreende o lócus do receptor de célula T (TCR)-alfa. Em algumas modalidades, o gene não funcional codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida é um gene de TCR-beta rompido.

[026]Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno ou o lócus de TCR endógeno compreende o lócus de TCR-beta. Em algumas modalidades, o gene não funcional codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida é um gene de TCR-alfa rompido.

[027]Em algumas modalidades, o alvo genômico endógeno compreende um lócus da via de sinalização imune. Em algumas modalidades, o lócus da via de sinalização imune é selecionado a partir do grupo que consiste de PD-1, CTLA-4, BTLA, TIM3, LAG3 e VISTA.

[028]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene compreende uma sequência ligante. Em algumas modalidades, a sequência ligante codifica uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que um polipeptídeo codificado apenas por pelo menos uma porção do gene é produzido. Em algumas modalidades, qualquer um dos polipeptídeos ligantes cliváveis compreende um sítio de clivagem de furina. Em algumas modalidades, qualquer uma das sequências ligantes compreende um elemento de salto do ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de: T2A, E2A, P2A e F2A. Em algumas modalidades, qualquer um dos polipeptídeos ligantes cliváveis compreende um ligante Gly-Ser-Gly, opcionalmente em que o ligante Gly-Ser-Gly é N terminal de um elemento de salto do ribossomo 2A e, opcionalmente, em que o ligante Gly-Ser-Gly está em uma orientação de sítio de clivagem de furina: ligante Gly-Ser-Gly: elemento de salto do ribossomo 2A do N terminal ao C terminal.

[029]Em algumas modalidades, a sequência ligante, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante, ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES).

[030]Em algumas modalidades, a sequência ligante, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem um promotor exógeno.

[031]Em algumas modalidades, em que a sequência ligante, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante, ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem uma sequência acceptora de splice.

[032]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de

nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene de TCR compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica um peptídeo sinal, em que o peptídeo sinal está operacionalmente ligado a um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene, a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de polipeptídeo TCR-beta ou um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene de TCR. Em algumas modalidades, o peptídeo sinal é um peptídeo sinal exógeno, opcionalmente em que o peptídeo sinal exógeno é um peptídeo sinal do hormônio do crescimento humano.

[033]Em algumas modalidades, a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem a mesma sequência de polipeptídeo ligante. Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica a segunda sequência de polipeptídeo ligante que codificam a mesma sequência de polipeptídeo ligante compreendem sequências de nucleotídeo de códon divergente, e em que as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica o segundo polipeptídeo ligante são códon divergentes entre si.

[034]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene codifica uma região de codificação. Em algumas modalidades, a região de codificação é selecionada a partir do grupo que consiste de: um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T, e um inibidor da via de sinalização imune.

[035]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene codifica uma região não codificante. Em algumas modalidades, a região não codificante é selecionada a partir do grupo que consiste de: um shRNA, um siRNA, um miRNA, um

fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove sobrevivência de células T, e um fator que promove a função das células T. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene compreende pelo menos uma porção de um gene de TCR. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene de TCR compreende: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa; b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; e c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência ligante.

[036]Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou pelo menos uma porção do gene de TCR é selecionada a partir do grupo que consiste de: pelo menos um porção de um TCR murinizado, um TCR humanizado, um TCR de domínio trocado, um TCR com mutação pontual, um TCR manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR códon-otimizado para expressão em humanos, um TCR de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA, uma sequência de região variável do gene de TCR, um receptor de antígeno quimérico (CAR), e um TCR de cadeia única.

[037]Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de polipeptídeo TCR-beta ou um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene de TCR é manipulado para demonstrar uma associação maior com uma segunda sequência de polipeptídeo exógeno de TCR em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena, opcionalmente em que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta são modificadas para demonstrar uma maior associação entre si em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena.

[038]Em algumas modalidades, as sequências de polipeptídeo codificadas

estão em uma orientação de ligante: TCR-alfa: segundo ligante: TCR-beta do N terminal ao C terminal. Em algumas modalidades, as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-beta: segundo ligante: TCR-alfa do N terminal ao C terminal.

[039]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene de TCR compreende uma sequência de nucleotídeo de códon divergente, e em que a sequência de nucleotídeo de códon divergente é um códon divergente em relação a uma sequência de nucleotídeo endógena.

[040]Em algumas modalidades, a célula modificada compreende uma célula imune. Em algumas modalidades, a célula imune compreende uma célula T. Em algumas modalidades, a célula T é selecionada a partir do grupo que consiste de: um linfócito T citotóxico (CTL), uma célula T CD8+, uma célula T CD4+, uma célula T primária, uma célula T de tumor infiltrante, uma célula T manipulada, uma célula T reguladora (Treg), uma célula T auxiliar, uma célula Th1, uma célula Th2, uma célula Th17, uma célula T alfa-beta e uma célula T gama-delta. Em algumas modalidades, em que a célula imune compreende uma célula extermidora natural. Em algumas modalidades, a célula imune é selecionada a partir do grupo que consiste de: uma célula B, um monócito, um macrófago, uma célula dendrítica e uma célula T extermidora natural.

[041]Em algumas modalidades, a célula modificada compreende uma célula-tronco. Em algumas modalidades, a célula-tronco compreende uma célula-tronco hematopoiética. Em algumas modalidades, a célula-tronco compreende uma célula-tronco embrionária.

[042]Em algumas modalidades, a célula modificada é uma célula primária.

[043]Em algumas modalidades, a célula modificada é uma célula isolada, em que a célula isolada é isolada a partir de um indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo é conhecido ou suspeito de ter câncer.

[044]Em algumas modalidades, a célula modificada compreende uma célula humana ou célula derivada de humanos.

[045]Em algumas modalidades, a célula modificada é uma célula cultivada ex vivo. Em algumas modalidades, a célula cultivada ex vivo compreende uma célula estimulada. Em algumas modalidades, a célula estimulada compreende uma célula T estimulada por citocina, opcionalmente em que a célula T estimulada por citocina compreende uma célula T estimulada por CD3, uma célula T estimulada por CD28 ou uma célula T estimulada por CD3 e CD28. Em algumas modalidades, a célula T estimulada por citocinas é cultivada na presença de IL7, IL15 ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a célula T estimulada por citocinas é cultivada na presença de IL2. Em algumas modalidades, a célula T estimulada por citocinas é cultivada em meios substancialmente livres de IL2.

[046]Em algumas modalidades, a célula modificada está livre de um vírus integrado, em que o vírus integrado está operacionalmente associado aos componentes de entrega mediada por vírus. Em algumas modalidades, a classe MHC I na superfície da célula modificada está livre de peptídeos derivados de componentes de entrega mediada por vírus ou de um vírus integrado, em que o vírus integrado está operacionalmente associado aos componentes de entrega mediada por vírus.

[047]Em algumas modalidades, a célula modificada compreende ainda um segundo polinucleotídeo circular compreendendo uma segunda composição de nucleotídeo exógena, a segunda composição de nucleotídeo exógena compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um segundo gene; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um segundo lócus alvo genômico endógeno; e c) uma sequência

de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do segundo lócus alvo genômico endógeno, e as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do segundo lócus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no segundo lócus alvo genômico endógeno. Em algumas modalidades, a célula modificada compreende ainda uma segunda sequência de nucleotídeo integrada, em que a segunda sequência de nucleotídeo integrada compreende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção do segundo gene, a segunda sequência de nucleotídeo integrada é integrada no segundo lócus alvo genômico endógeno, e a segunda sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do segundo gene seja capaz de ser expressa.

[048]Também é fornecida neste documento uma população de células compreendendo qualquer uma das células modificadas aqui descritas, em que mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60% ou mais de 70% da população compreende a sequência de nucleotídeo integrada. Em algumas modalidades, as células modificadas não foram submetidas à classificação, seleção ou isolamento após a integração da sequência de nucleotídeo integrada.

[049]Também é aqui fornecida uma população de células compreendendo: uma sequência de nucleotídeo integrada, em que a sequência de nucleotídeo integrada compreende pelo menos uma porção de um gene, a sequência de nucleotídeo integrada é integrada em um lócus alvo genômico endógeno, e a sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa, em que a população de células está substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus, e em que mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60% ou mais de 70% das células T na população compreendem a sequência de nucleotídeo integrada. Em algumas modalidades, as células T não foram submetidas à

classificação, seleção ou isolamento após a integração da sequência de nucleotídeo integrada.

[050]Em algumas modalidades, a população de células comprehende ainda uma composição de nuclease capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida dentro do lócus de TCR endógeno.

[051]Em algumas modalidades, a população de células comprehende ainda um polinucleotídeo circular comprendendo uma sequência de nucleotídeo exógena, a sequência de nucleotídeo exógena comprehendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região do lócus endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus endógeno, e as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do lócus endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus endógeno.

[052]Em algumas modalidades, a população de células é de pelo menos 1×10^6 células T, pelo menos 2×10^6 células T, pelo menos 5×10^6 células T, pelo menos 1×10^7 células T ou pelo menos 5×10^7 células T.

[053]Em algumas modalidades, a população de células comprehende ainda uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Em algumas modalidades, a mutação que produz o gene não funcional comprehendete uma mutação em uma região de codificação do gene selecionada a partir do grupo que consiste de: uma mutação de deslocamento de quadro resultando em uma alteração no quadro da proteína traduzida, uma mutação sem sentido causando uma substituição de um aminoácido para um códon terminal, e uma mutação “missense” resultando na substituição de um aminoácido para outro. Em algumas modalidades, a mutação que produz o gene não funcional comprehendete uma mutação em uma região não codificante do gene selecionada a partir do grupo que consiste de: uma mutação que altera a expressão de um produto

de mRNA codificado pelo gene, e uma mutação que altera a estabilidade de um produto de mRNA codificado pelo gene.

[054]Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende uma nuclease selecionada a partir do grupo que consiste de uma nuclease da família de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespacadas (CRISPR) ou um derivado da mesma, uma nuclease efetora semelhante a ativadores de transcrição (TALEN) ou derivado da mesma, uma nuclease dedo de zinco (ZFN) ou derivado da mesma, e uma endonuclease teleguiada (HE) ou derivado da mesma. Em algumas modalidades, a nuclease da família CRISPR é uma nuclease Cas9. Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende um complexo proteico preformado. Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende um vetor de nucleotídeo capaz de expressar a nuclease dentro da população de células. Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende um CRISPR RNA (crRNA) e um CRISPR RNA com transativação (tracrRNA). Em algumas modalidades, o crRNA compreende um RNA guia (gRNA), em que o gRNA é complementar à sequência de nucleotídeo definida. Em algumas modalidades, o crRNA e o tracrRNA estão em um único polinucleotídeo. Em algumas modalidades, o crRNA e o tracrRNA estão em polinucleotídeos separados.

[055]Em algumas modalidades, a população de células compreende ainda uma segunda composição de nuclease capaz de clivar a segunda sequência de nucleotídeo definida dentro da população de células.

[056]Em algumas modalidades, a expressão das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor endógeno dentro do lócus alvo genômico endógeno. Em algumas modalidades, a expressão das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor exógeno. Em algumas modalidades, o promotor exógeno é selecionado a partir do grupo que consiste de promotores de mamíferos, promotores humanos, promotores virais, promotores derivados de

repetição terminal longa (LTR) a partir de um retrovírus ou lentivírus, fusões de dois promotores, fusões de duas porções de promotores, promotores MMLV LTR, promotores HIV LTR, promotores MCMV LTR, EF1a, MND, CMV, SV40, PGK1, Ubc, beta-actina, CAG, promotores induzíveis de pequenas moléculas, promotores induzíveis de tetraciclina, promotores condicionais de pequenas moléculas, sistemas promotores condicionais Cre-LoxP, sistemas promotores condicionais Flp-FRT e sistemas de promotores condicionais de tamoxifeno.

[057]Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é maior ou igual a 100 bases de comprimento. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 400 bases de comprimento, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 800 bases de comprimento, maior ou igual a 1500 bases de comprimento, maior ou igual a 2000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 4000 bases de comprimento.

[058]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região do lócus alvo genômico endógeno são maiores ou iguais a 50 bases de comprimento, maiores ou iguais a 100 bases de comprimento, maiores ou iguais a 200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 600 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento, ou maiores ou iguais a 2000 bases de comprimento.

[059]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do lócus alvo genômico endógeno são maiores ou iguais a 50 bases de comprimento, maiores ou iguais a 100 bases de comprimento, maiores ou iguais a 200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 600 bases, maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento, ou maiores ou iguais a 2000 bases de comprimento.

[060]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo idênticas à

primeira região do lócus alvo genômico endógeno e as sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do lócus alvo genômico endógeno são maiores ou iguais a 600 bases de comprimento.

[061]Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo definida é rompida após a integração das sequências de nucleotídeo.

[062]Em algumas modalidades, a expressão de um gene endógeno operacionalmente associado ao lócus alvo genômico endógeno ou ao lócus de TCR endógeno é rompida.

[063]Em algumas modalidades, a população de células compreende ainda reagentes adicionais que são capazes de aumentar as taxas de recombinação homóloga.

[064]Em algumas modalidades, a população de células compreende ainda reagentes adicionais que são capazes de aumentar a viabilidade da população de células.

[065]Em algumas modalidades, o polinucleotídeo circular compreende um plasmídeo ou um nanoplasmídeo. Em algumas modalidades, o plasmídeo tem um esqueleto de vetor inferior a 500 bases, e em que o esqueleto de vetor é uma sequência de nucleotídeo que não é a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene, nem a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, nem a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, nem as sequências de nucleotídeo que codificam o primeiro e o segundo polipeptídeo ligante, nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao primeiro lócus genômico alvo endócrino ou lócus endógeno de TCR, e nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao segundo lócus genômico alvo endógeno ou lócus de TCR endógeno.

[066]Em algumas modalidades, o polinucleotídeo circular não é um polinucleotídeo amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR).

[067]Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno compreende uma região de codificação. Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno compreende um íntron.

[068]Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno compreende o lócus do receptor de células T (TCR)-alfa. Em algumas modalidades, o gene não funcional codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida é um gene de TCR-beta rompido.

[069]Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno compreende o lócus de TCR-beta. Em algumas modalidades, o gene não funcional codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida é um gene de TCR-alfa rompido.

[070]Em algumas modalidades, o alvo genômico endógeno compreende um lócus de via de sinalização imune. Em algumas modalidades, o lócus de via de sinalização imune é selecionado a partir do grupo que consiste de PD-1, CTLA-4, BTLA, TIM3, LAG3 e VISTA.

[071]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene compreende uma sequência ligante. Em algumas modalidades, a sequência ligante codifica uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que um polipeptídeo codificado apenas por pelo menos uma porção do gene é produzido. Em algumas modalidades, o polipeptídeo ligante clivável compreende um elemento de salto do ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de: T2A, E2A, P2A e F2A. Em algumas modalidades, os polipeptídeos ligantes cliváveis compreendem um sítio de clivagem de furina. Em algumas modalidades, os polipeptídeos ligantes cliváveis compreendem um ligante Gly-Ser-Gly, opcionalmente em que o ligante Gly-Ser-Gly é N terminal de um elemento de salto do ribossomo 2A e, opcionalmente, em que o ligante Gly-Ser-Gly está em uma orientação de sítio de clivagem de furina: ligante Gly-Ser-Gly: elemento de salto do ribossomo 2A do N terminal ao C terminal.

[072]Em algumas modalidades, a sequência ligante compreende um sítio de interno de entrada do ribossomo (IRES).

[073]Em algumas modalidades, a sequência ligante compreende uma sequência de promotor exógeno.

[074]Em algumas modalidades, a sequência ligante compreende uma sequência acceptora de splice.

[075]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene compreende uma primeira sequência de polipeptídeo ligante e uma segunda sequência de polipeptídeo ligante. Em algumas modalidades, a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem a mesma sequência de polipeptídeo ligante. Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica a segunda sequência de polipeptídeo ligante que codificam a mesma sequência de polipeptídeo ligante compreendem sequências de nucleotídeo de códons divergentes, e em que as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica o segundo polipeptídeo ligante são códon divergentes entre si.

[076]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene codifica uma região de codificação. Em algumas modalidades, a região de codificação é selecionada a partir do grupo que consiste de: um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função da células T, e um inibidor da via de sinalização imune.

[077]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene codifica uma região não codificante. Em algumas modalidades, a região não codificante é selecionada a partir do grupo que consiste de: um shRNA, um siRNA, um miRNA, um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função

das células T, um fator que promove a sobrevivência de células T, e um fator que promove a função das células T.

[078]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene compreende pelo menos uma porção de um gene de TCR. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene de TCR compreende: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa; b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; e c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência ligante. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta ou pelo menos uma porção do gene de TCR é selecionada a partir do grupo que consiste de: pelo menos uma porção de um TCR murinizado, um TCR humanizado, um TCR de domínio trocado, um TCR com mutação pontual, um TCR manipulado com uma cisteína projetada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR códon-otimizado para expressão em humanos, um TCR de sequência otimizada para uso de códons, e remoção de elementos de instabilidade do RNA, uma sequência de região variável do gene de TCR, um receptor de antígeno quimérico (CAR) e um TCR de cadeia única. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de polipeptídeo TCR-beta ou um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene de TCR é modificado para demonstrar uma associação maior com uma segunda sequência de polipeptídeo TCR exógena em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena, opcionalmente em que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta são modificadas para demonstrar uma maior associação entre si em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena. Em algumas modalidades, as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-alfa: segundo ligante: TCR-beta. Em algumas modalidades, as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma

orientação de ligante: TCR-beta: segundo ligante: TCR-alfa. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta ou a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene de TCR comprehende uma sequência de nucleotídeo de códon divergente, e em que a sequência de nucleotídeo de códon divergente é códon divergente em relação a uma sequência de nucleotídeo endógena.

[079]Em algumas modalidades, a população de células comprehende células humanas ou células derivadas de humanos.

[080]Em algumas modalidades, a população de células comprehende uma população de células imunes. Em algumas modalidades, a população de células imunes comprehende uma população de células T. Em algumas modalidades, a população de células T é selecionada a partir do grupo que consiste de: um linfócito T citotóxico (CTL), uma célula T CD8+, uma célula T CD4+, uma célula T primária, uma célula T de tumor infiltrante, uma célula T manipulada, uma célula T reguladora (Treg), uma célula T auxiliar, uma célula Th1, uma célula Th2, uma célula Th17, uma célula T alfa-beta, e uma célula T gama-delta. Em algumas modalidades, a população de células imunes comprehende uma população de células exterminadoras naturais. Em algumas modalidades, a população de células comprehende uma população selecionada a partir do grupo que consiste de: células B, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células T exterminadoras naturais.

[081]Em algumas modalidades, a população de células comprehende uma população de células-tronco. Em algumas modalidades, a população de células-tronco comprehende uma população de células-tronco hematopoiéticas. Em algumas modalidades, a população de células-tronco comprehende uma população de células-tronco embrionárias.

[082]Em algumas modalidades, a população de células é uma célula primária.

[083]Em algumas modalidades, a população de células é uma população isolada de células, em que a população isolada de células é isolada a partir de um indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo é conhecido ou suspeito de ter câncer.

[084]Em algumas modalidades, a população de células compreende células cultivadas ex vivo. Em algumas modalidades, as células cultivadas ex vivo compreendem células estimuladas. Em algumas modalidades, as células estimuladas compreendem células T estimuladas por citocinas, opcionalmente em que as células T estimuladas por citocinas compreendem células T estimuladas por CD3, células T estimuladas por CD28 ou células T estimuladas por CD3 e CD28. Em algumas modalidades, as células T estimuladas por citocinas são cultivadas na presença de IL7, IL15 ou uma combinação das mesmas. Em algumas modalidades, as células T estimuladas por citocinas são cultivadas na presença de IL2. Em algumas modalidades, as células T estimuladas por citocinas são cultivadas em meios substancialmente livres de IL2.

[085]Em algumas modalidades, a população de células compreende ainda uma segunda sequência de nucleotídeo integrada, em que a segunda sequência de nucleotídeo integrada compreende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção de um segundo gene, a segunda sequência de nucleotídeo integrada é integrada em um segundo lócus alvo genômico endógeno, e a segunda sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do segundo gene seja capaz de ser expressa. Em algumas modalidades, a população de células compreende ainda um segundo polinucleotídeo circular compreendendo uma segunda composição de nucleotídeo exógena, a segunda composição de nucleotídeo exógena compreendendo: a) a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do segundo gene; b) a sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região do segundo lócus alvo genômico

endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do segundo lócus alvo genômico endógeno, em que as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do segundo lócus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no segundo lócus alvo genômico endógeno.

[086]Também é aqui fornecido um método de tratamento para um indivíduo em necessidade, em que o tratamento compreende administrar uma dose terapeuticamente eficaz de qualquer uma das células modificadas ou de qualquer população de células aqui descritas. Em algumas modalidades, as células modificadas ou a população de células são derivadas do indivíduo. Em algumas modalidades, as células modificadas ou a população de células são alogênicas em relação ao indivíduo.

[087]Também é aqui fornecido um método para modificar geneticamente uma célula, o método compreendendo as etapas de: 1) fornecer uma composição de nucleotídeo compreendendo um único polinucleotídeo, o único polinucleotídeo compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um lócus alvo genômico endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus alvo genômico endógeno, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do lócus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus alvo genômico endógeno, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa após a integração da composição no lócus alvo genômico endógeno; e 2) fornecer uma composição de nuclease capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida dentro do lócus alvo genômico endógeno; 3) colocar a célula em contato com a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease; 4) entregar a composição

de nucleotídeo e a composição de nuclease à célula por outros meios que não infectar a célula com um vírus. Em algumas modalidades, o método compreende ainda fornecer uma segunda composição de nuclease capaz de clivar uma segunda sequência de nucleotídeo definida dentro da célula, em que a segunda composição de nuclease é colocada em contato com a célula na etapa de contato e é entregue à célula na etapa de entrega. Em algumas modalidades, a clivagem resulta em uma mutação que produz um gene não funcional codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida. Em algumas modalidades, a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região de codificação do gene selecionada a partir do grupo que consiste de uma mutação de deslocamento de quadro que resulta em uma alteração no quadro da proteína traduzida, uma mutação sem sentido causando uma substituição de um aminoácido para um códon terminal, e uma mutação “missense” resultando na substituição de um aminoácido para outro. Em algumas modalidades, a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região não codificante do gene selecionada a partir do grupo que consiste de uma mutação que altera a expressão de um produto de mRNA codificado pelo gene, e uma mutação que altera estabilidade de um produto de mRNA codificado pelo gene. Em algumas modalidades, o método compreende ainda: fornecer uma segunda composição de nucleotídeo, a segunda composição compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um segundo gene; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um segundo local alvo genômico endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do segundo lócus alvo genômico endógeno, em que todas as sequências de nucleotídeo estão em um único polinucleotídeo, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda regiões do segundo lócus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no segundo lócus alvo genômico endógeno, a sequência de

nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é orientada de modo que pelo menos uma porção do segundo gene seja capaz de ser expressa após a integração da composição no segundo lócus alvo genômico endógeno, e a segunda composição de nucleotídeo é colocada em contato com a célula na etapa de contato e é entregue à célula na etapa de entrega.

[088]Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende uma nuclease selecionada a partir do grupo que consiste de uma nuclease da família de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespacadas (CRISPR) ou um derivado da mesma, uma nuclease efetora semelhante a ativadores de transcrição (TALEN) ou derivado da mesma, uma nuclease dedo de zinco (ZFN) ou derivado da mesma, e uma endonuclease teleguiada (HE) ou derivado da mesma. Em algumas modalidades, a nuclease da família CRISPR é uma nuclease Cas9. Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende um complexo proteico preformado. Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende um vetor de nucleotídeo capaz de expressar a nuclease dentro da célula. Em algumas modalidades, a etapa de contato é menor do que 60 minutos, menor do que 45 minutos, menor do que 30 minutos, menor do que 20 minutos, menor do que 15 minutos, menor do que 10 minutos, menor do que 5 minutos ou menor do que 1 minuto entre o contato da célula com a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease e a etapa de entrega.

[089]Em algumas modalidades, a etapa de entrega é selecionada a partir do grupo que consiste de eletroporação, transfecção, deformação da membrana celular por meios físicos, nanopartículas lipídicas (LNP), partículas semelhantes a vírus (VLP) e sonicação. Em algumas modalidades, a etapa de entrega compreende eletroporação. Em algumas modalidades, a expressão das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor endógeno dentro do lócus alvo genômico endógeno. Em algumas modalidades, a expressão das sequências de

polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor exógeno. Em algumas modalidades, o promotor exógeno é selecionado a partir do grupo que consiste de promotores de mamíferos, promotores humanos, promotores virais, promotores derivados de repetição terminal longa (LTR) a partir de um retrovírus ou lentivírus, fusões de dois promotores, fusões de duas porções de promotores, promotores MMLV LTR, promotores HIV LTR, promotores MCMV LTR, EF1a, MND, CMV, SV40, PGK1, Ubc, beta-actina, CAG, promotores induzíveis de pequenas moléculas, promotores induzíveis de tetraciclina, promotores condicionais de pequenas moléculas, sistemas promotores condicionais Cre-LoxP, sistemas promotores condicionais Flp-FRT, e sistemas promotores condicionais de tamoxifeno.

[090]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene é maior ou igual a 100 bases de comprimento. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene é maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 400 bases de comprimento, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 800 bases de comprimento, maior ou igual a 1500 bases de comprimento, maior ou igual a 2000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 4000 bases de comprimento.

[091]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região ou à segunda região do lócus alvo genômico endógeno têm 50 bases de comprimento, 100 bases de comprimento, 200 bases de comprimento, 200 bases de comprimento, 400 bases de comprimento, 600 bases de comprimento, 800 bases de comprimento, 1500 bases de comprimento, 2000 bases de comprimento ou 4000 bases de comprimento.

[092]Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo definida é rompida após a integração.

[093]Em algumas modalidades, a expressão de um gene endógeno operacionalmente associado ao lócus alvo genômico endógeno é rompida.

[094]Em algumas modalidades, o método compreende ainda reagentes

adicionais que são capazes de aumentar as taxas ou viabilidade de recombinação homóloga.

[095]Em algumas modalidades, o polinucleotídeo único é selecionado a partir do grupo que consiste de um plasmídeo circular, um fragmento de DNA linear, um minicírculo e um ssDNA. Em algumas modalidades, o plasmídeo circular tem um esqueleto de vetor inferior a 500 bases, em que o esqueleto de vetor compreende uma sequência de nucleotídeo que não é a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene, nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao primeiro lócus alvo genômico endógeno, nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao segundo lócus alvo genômico endógeno. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo único não é um polinucleotídeo amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR). Em algumas modalidades, o polinucleotídeo único está substancialmente livre de contaminantes. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo único está substancialmente livre de componentes que reduzem a viabilidade celular.

[096]Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno compreende uma região de codificação. Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno compreende um íntron.

[097]Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno é o lócus do receptor de células T (TCR)-alfa. Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno é o lócus de TCR-beta. Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno é um lócus de via de sinalização imune. Em algumas modalidades, o lócus da via de sinalização imune é selecionado a partir do grupo que consiste de PD-1, CTLA-4, BTLA, TIM3, LAG3 e VISTA.

[098]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene compreende uma sequência ligante. Em algumas modalidades, a sequência ligante codifica uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que um polipeptídeo codificado apenas por pelo

menos uma porção do gene é produzido. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo de ligante clivável compreende um elemento de salto do ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de T2A, E2A, P2A e F2A.

[099]Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo ligante clivável compreende uma sequência de sítio de clivagem de furina. Em algumas modalidades, a sequência ligante compreende um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES). Em algumas modalidades, a sequência ligante compreende um promotor exógeno. Em algumas modalidades, a sequência ligante compreende ainda uma sequência acceptora de splice.

[0100]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene codifica uma região de codificação. Em algumas modalidades, a região de codificação é selecionada a partir do grupo que consiste de: um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T, e um inibidor da via de sinalização imune.

[0101]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene codifica uma região não codificante. Em algumas modalidades, a região não codificante é selecionada a partir do grupo que consiste de: um shRNA, um siRNA, um miRNA, um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência de células T, e um fator que promove a função das células T.

[0102]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene compreende pelo menos uma porção de um gene de TCR. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene de TCR é selecionada a partir do grupo que consiste de pelo menos uma porção de um TCR murinizado, um TCR humanizado, um TCR de domínio trocado, um TCR com mutação pontual, um TCR modificado com uma cisteína modificada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR códon-otimizado

para expressão em humanos, um TCR de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA, uma sequência de região variável do gene de TCR, um receptor de antígeno quimérico (CAR), e um TCR de cadeia única. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene de TCR compreende: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa; b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; e c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência ligante. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo TCR-alfa é selecionada a partir do grupo que consiste de um TCR-alfa murinizado, um TCR-alfa humanizado, um TCR-alfa de domínio trocado, um TCR-alfa com mutação pontual, um TCR-alfa modificado com uma cisteína modificada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR-alfa códon-otimizado para expressão em humanos, um receptor de antígeno quimérico (CAR) e um TCR-alfa de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo TCR-beta é selecionada a partir do grupo que consiste de um TCR-beta murinizado, um TCR-beta humanizado, um TCR-beta de domínio trocado, um TCR-beta com mutação pontual, um TCR-beta modificado com uma cisteína modificada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR-beta códon-otimizado para expressão em humanos, um receptor de antígeno quimérico (CAR) e um TCR-beta de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA. Em algumas modalidades, as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-alfa: segundo ligante: TCR-beta. Em algumas modalidades, as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-beta: segundo ligante: TCR-alfa. Em algumas modalidades, a segunda sequência ligante compreende uma sequência de polipeptídeo ligante clivável. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo de ligante clivável compreende um elemento de salto de ribossomo 2A selecionado a

partir do grupo que consiste de T2A, E2A, P2A e F2A. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo ligante clivável compreende uma sequência do sítio de clivagem de furina. Em algumas modalidades, a segunda sequência ligante compreende um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES). Em algumas modalidades, a segunda sequência ligante compreende um promotor exógeno.

[0103]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene é selecionada a partir do grupo que consiste de um shRNA, um siRNA, um miRNA, um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T e um inibidor da via de sinalização imune.

[0104]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do segundo gene compreende pelo menos uma porção de um gene de TCR.

[0105]Em algumas modalidades, a célula modificada compreende uma célula imune. Em algumas modalidades, a célula imune compreende uma célula T. Em algumas modalidades, a célula T é selecionada a partir do grupo que consiste de: um linfócito T citotóxico (CTL), uma célula T CD8+, uma célula T CD4+, uma célula T primária, uma célula T de tumor infiltrante, uma célula T manipulada, uma célula T reguladora (Treg), uma célula T auxiliar, uma célula Th1, uma célula Th2, uma célula Th17, uma célula T alfa-beta e uma célula T gama-delta. Em algumas modalidades, a célula imune compreende uma célula extermínadora natural. Em algumas modalidades, a célula imune é selecionada a partir do grupo que consiste de: uma célula B, um monócito, um macrófago, uma célula dendrítica e uma célula T extermínadora natural.

[0106]Em algumas modalidades, a célula modificada compreende uma célula-tronco. Em algumas modalidades, a célula-tronco compreende uma célula-tronco hematopoiética. Em algumas modalidades, a célula-tronco compreende uma célula-tronco embrionária.

[0107]Em algumas modalidades, a célula modificada é uma célula primária.

[0108]Em algumas modalidades, a célula modificada é uma célula isolada, em que a célula isolada é isolada a partir de um indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo tem ou é suspeito de ter câncer.

[0109]Em algumas modalidades, a célula modificada compreende uma célula humana ou célula derivada de humanos.

[0110]Em algumas modalidades, a célula modificada é uma célula cultivada ex vivo. Em algumas modalidades, a célula cultivada ex vivo compreende uma célula estimulada. Em algumas modalidades, a célula estimulada compreende uma célula T estimulada por citocina, opcionalmente em que a célula T estimulada por citocina compreende uma célula T estimulada por CD3, uma célula T estimulada por CD28 ou uma célula T estimulada por CD3 e CD28. Em algumas modalidades, a célula T estimulada por citocinas é cultivada na presença de IL7, IL15 ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a célula T estimulada por citocinas é cultivada na presença de IL2. Em algumas modalidades, a célula T estimulada por citocinas é cultivada em meios substancialmente livres de IL2.

[0111]Em algumas modalidades, a célula modificada está livre de um vírus integrado, em que o vírus integrado está operacionalmente associado aos componentes de entrega mediada por vírus. Em algumas modalidades, o MHC classe I na superfície da célula modificada está livre de peptídeos derivados de componentes de entrega mediada por vírus ou de um vírus integrado, em que o vírus integrado está operacionalmente associado aos componentes de entrega mediada por vírus.

[0112]Também é fornecida neste documento uma célula modificada produzida por qualquer um dos métodos descritos aqui, em que a célula modificada compreende uma sequência de nucleotídeo integrada, em que a sequência de nucleotídeo integrada compreende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção do gene, a sequência de nucleotídeo integrada é

integrada no lócus alvo genômico endógeno, e a sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa.

[0113]Uma população de células produzidas por qualquer um dos métodos descritos aqui, em que mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60% ou mais de 70% das células da população compreendem uma sequência de nucleotídeo integrada, em que a sequência de nucleotídeo integrada compreende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção do gene, a sequência de nucleotídeo integrada é integrada no lócus alvo genômico endógeno, e a sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa.

[0114]Em algumas modalidades, as células não foram submetidas à classificação, seleção ou isolamento após a integração da sequência de nucleotídeo integrada. Em algumas modalidades, a viabilidade da população de células após a etapa de entrega é de pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 40%, pelo menos 60% ou pelo menos 80%. Em algumas modalidades, a viabilidade é avaliada 4 dias após a etapa de entrega. Em algumas modalidades, a viabilidade é avaliada pela coloração de AOPI.

[0115]Também é aqui fornecido um método de tratamento para um indivíduo em necessidade, em que o tratamento compreende administrar uma dose terapeuticamente eficaz de qualquer uma das células ou população de células produzidas por qualquer um dos métodos aqui descritos. Em algumas modalidades, as células ou a população de células são derivadas do indivíduo. Em algumas modalidades, as células ou a população de células são alogênicas com referência ao indivíduo.

[0116]Também é aqui fornecido um método para modificar geneticamente uma célula, o método compreendendo as etapas de: 1) fornecer uma composição de nucleotídeo, compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo

menos uma porção de um gene; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um lócus alvo genômico endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus alvo genômico endógeno, em que pelo menos uma porção do gene tem 100 bases de comprimento, todas as sequências de nucleotídeo estão em um único polinucleotídeo, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do lócus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus alvo genômico endógeno, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa após a integração da composição no lócus alvo genômico endógeno; e 2) fornecer uma composição de nuclease CRISPR / Cas9 capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida dentro do lócus alvo genômico endógeno; 3) colocar a célula T em contato com a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease CRISPR / Cas9, e 4) fornecer a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease CRISPR / Cas9 à célula T por eletroporação.

[0117]Também é aqui fornecido um método para gerar uma célula T modificada com um receptor de células T definido, o método compreendendo as etapas de: 1) fornecer uma composição de nucleotídeo, compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa; b) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma primeira sequência de polipeptídeo ligante; d) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência de polipeptídeo ligante; e) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um lócus de TCR endógeno; e f) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus de TCR endógeno, em que todas as sequências de nucleotídeo estão em um único polinucleotídeo, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região

do lócus de TCR endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus de TCR endógeno, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são orientadas de modo que cada uma das sequências de polipeptídeo seja capaz de ser expressa como um único polipeptídeo após a integração da composição no lócus de TCR endógeno, a primeira sequência de polipeptídeo ligante é posicionada antes de pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa, pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta e a segunda sequência de polipeptídeo ligante, a segunda sequência de polipeptídeo ligante é posicionada entre a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta e a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta forma, cada uma, um polipeptídeo separado, em que os polipeptídeos separados são capazes de se associar para formar um TCR funcional; 2) fornecer uma composição de nuclease capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida dentro do lócus de TCR endógeno; 3) colocar a célula T em contato com a composição de nucleotídeo e a composição nuclease e 4) administrar a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease à célula T.

[0118]Em algumas modalidades, o método compreende ainda fornecer uma segunda composição de nuclease capaz de clivar uma segunda sequência de nucleotídeo definida dentro da célula T, em que a segunda composição de nuclease é colocada em contato com a célula T na etapa de contato e é entregue à célula T na etapa de entrega. Em algumas modalidades, a clivagem resulta em uma mutação que produz um gene não funcional codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida. Em algumas modalidades, a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região de codificação do gene selecionada a partir

do grupo que consiste de uma mutação de deslocamento de quadro resultando em uma alteração no quadro da proteína traduzida, uma mutação sem sentido causando uma substituição de um aminoácido para um códon terminal, e uma mutação “missense” resultando na substituição de um aminoácido para outro. Em algumas modalidades, a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região não codificante do gene selecionada partir do grupo que consiste de uma mutação que altera a expressão de um produto de mRNA codificado pelo gene e uma mutação que altera estabilidade de um produto de mRNA codificado pelo gene.

[0119]Em algumas modalidades, o método compreende ainda: fornecer uma segunda composição de nucleotídeo, a segunda composição compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um lócus alvo genômico endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus alvo genômico endógeno, em que todas as sequências de nucleotídeo estão em um único polinucleotídeo, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do lócus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus alvo genômico endógeno, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa após a integração da composição no lócus alvo genômico endógeno, e a segunda composição de nucleotídeo é colocada em contato com a célula T na etapa de contato e é entregue à célula T na etapa de entrega.

[0120]Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende uma nuclease selecionada a partir do grupo que consiste em uma nuclease da família de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespacadas (CRISPR) ou um derivado da mesma, uma nuclease efetora semelhante a ativadores de transcrição (TALEN) ou derivado da mesma, uma nuclease dedo de zinco (ZFN) ou derivado da mesma, e uma endonuclease teleguiada (HE) ou derivado da mesma.

Em algumas modalidades, a nuclease da família CRISPR é uma nuclease Cas9. Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende um complexo proteico preformado. Em algumas modalidades, a composição de nuclease compreende um vetor de nucleotídeo capaz de expressar a nuclease dentro da célula T. Em algumas modalidades, a etapa de contato é menor do que 60 minutos, menor do que 45 minutos, menor do que 30 minutos, menor do que 20 minutos, menor do que 15 minutos, menor do que 10 minutos ou menor do que 5 minutos entre o contato da célula T com a composição de nucleotídeo e composição de nuclease e etapa de entrega.

[0121]Em algumas modalidades, a etapa de entrega é selecionada a partir do grupo que consiste de eletroporação, transfecção, deformação da membrana celular por meios físicos, nanopartículas lipídicas (LNP), partículas semelhantes a vírus (VLP) e sonicação. Em algumas modalidades, a etapa de entrega compreende eletroporação.

[0122]Em algumas modalidades, a expressão das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor endógeno dentro do lócus alvo genômico endógeno. Em algumas modalidades, a expressão das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor exógeno. Em algumas modalidades, o promotor exógeno é selecionado a partir do grupo que consiste de promotores de mamíferos, promotores humanos, promotores virais, promotores derivados de repetição terminal longa (LTR) a partir de um retrovírus ou lentivírus, fusões de dois promotores, fusões de duas porções de promotores, promotores MMLV LTR, promotores HIV LTR, promotores MCMV LTR, EF1a, MND, CMV, SV40, PGK1, Ubc, beta-actina, CAG, promotores induzíveis de pequenas moléculas, promotores induzíveis de tetraciclina, promotores condicionais de pequenas moléculas, sistemas promotores condicionais Cre-LoxP, sistemas promotores condicionais Flp-FRT e sistemas promotores condicionais de tamoxifeno.

[0123]Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa ou a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta é maior ou igual a 100 bases de comprimento. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa ou a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta é maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 400 bases de comprimento, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 800 bases de comprimento, maior ou igual a 1500 bases de comprimento, maior ou igual a 2000 bases de comprimento ou maior igual ou igual a 4000 bases de comprimento.

[0124]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região ou à segunda região do lócus endógeno de TCR têm 50 bases de comprimento, 100 bases de comprimento, 200 bases de comprimento, 200 bases de comprimento, 400 bases de comprimento, 600 bases de comprimento, 800 bases de comprimento, 1500 bases de comprimento, 2000 bases de comprimento ou 4000 bases de comprimento.

[0125]Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo definida é rompida após a integração.

[0126]Em algumas modalidades, a expressão de um gene endógeno operacionalmente associado ao lócus de TCR endógeno é rompida.

[0127]Em algumas modalidades, o método compreende ainda reagentes adicionais que são capazes de aumentar as taxas de recombinação homóloga ou a viabilidade.

[0128]Em algumas modalidades, o polinucleotídeo único é selecionado a partir do grupo que consiste de um plasmídeo circular, um fragmento de DNA linear, um minicírculo e um ssDNA. Em algumas modalidades, o plasmídeo circular tem um

esqueleto de vetor inferior a 500 bases, em que o esqueleto de vetor é uma sequência de nucleotídeo que não é a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa, nem a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta, nem as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo único não é um polinucleotídeo amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR). Em algumas modalidades, o polinucleotídeo único está substancialmente livre de contaminantes.

[0129]Em algumas modalidades, o lócus de TCR endógeno compreende uma região de codificação. Em algumas modalidades, o lócus de TCR endógeno compreende um ítron.

[0130]Em algumas modalidades, o lócus de TCR endógeno compreende o lócus de TCR-alfa. Em algumas modalidades, o lócus de TCR endógeno compreende o lócus de TCR-beta.

[0131]Em algumas modalidades, a primeira sequência ligante compreende uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que um polipeptídeo codificado apenas pela codificação de pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa, pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são produzidas. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo de ligante clivável compreende um elemento de salto de ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de T2A, E2A, P2A e F2A. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo ligante clivável compreende uma sequência do sítio de clivagem de furina. Em algumas modalidades, a primeira sequência de polipeptídeo ligante compreende um IRES. Em algumas modalidades, a primeira sequência ligante compreende uma sequência acceptora de splice.

[0132]Em algumas modalidades, a segunda sequência ligante compreende

uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta formam, cada uma, polipeptídeo separado, em que os polipeptídeos separados são capazes de se associar para formar um TCR funcional. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo ligante clivável compreende um elemento de salto do ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de T2A, E2A, P2A e F2A. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo ligante clivável compreende uma sequência do sítio de clivagem de furina.

[0133]Em algumas modalidades, a segunda sequência ligante compreende um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES). Em algumas modalidades, a segunda sequência ligante compreende um promotor exógeno.

[0134]Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo TCR-alfa é selecionada a partir do grupo que consiste de um TCR-alfa murinizado, um TCR-alfa humanizado, um TCR-alfa de domínio trocado, um TCR-alfa com mutação pontual, um TCR-alfa modificado com uma cisteína modificada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR-alfa códon-otimizado para expressão em seres humanos, um receptor de antígeno quimérico (CAR) e um TCR-alfa de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA.

[0135]Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo TCR-beta é selecionada a partir do grupo que consiste de um TCR-beta murinizado, um TCR-beta humanizado, um TCR-beta de domínio trocado, um TCR-beta com mutação pontual, um TCR-beta modificado com uma cisteína modificada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR-beta códon-otimizado para expressão em humanos, um receptor de antígeno quimérico (CAR) e um TCR-beta de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA.

[0136]Em algumas modalidades, as sequências de polipeptídeo codificadas

estão em uma orientação de primeiro ligante: TCR-alfa: segundo ligante: TCR-beta. Em algumas modalidades, as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-beta: segundo ligante: TCR-alfa.

[0137]Em algumas modalidades, a segunda sequência de nucleotídeo definida está dentro de um lócus de TCR-beta endógeno se a sequência de nucleotídeo definida estiver dentro de um lócus de TCR-alfa endógeno.

[0138]Em algumas modalidades, a segunda sequência de nucleotídeo definida está dentro de um lócus de TCR-alfa endógeno se a sequência de nucleotídeo definida estiver dentro de um lócus de TCR-beta endógeno. Em algumas modalidades, a segunda sequência de nucleotídeo definida está dentro de um lócus da via de sinalização imune. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene é selecionada a partir do grupo que consiste de um shRNA, um siRNA, um miRNA, uma citocina, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T, e um inibidor da via de sinalização imune.

[0139]Também é aqui fornecida uma composição de nucleotídeo para uso em dirigir a recombinação homóloga em um lócus alvo genômico endógeno, compreendendo um polinucleotídeo circular compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um lócus alvo genômico endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus alvo genômico endógeno, em que todas as sequências de nucleotídeo estão em um único polinucleotídeo, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do lócus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus alvo genômico endógeno, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa após a integração da composição no lócus alvo genômico endógeno. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que

codifica pelo menos uma porção do gene é maior que ou igual a 100 bases de comprimento. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 400 bases de comprimento, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 800 bases de comprimento, maior ou igual a 1500 bases de comprimento, maior ou igual a 2000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 4000 bases de comprimento.

[0140]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região do lócus alvo genômico endógeno é maior ou igual a 50 bases de comprimento, maior ou igual a 100 bases de comprimento, maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 300 bases de comprimento, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 1000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 2000 bases de comprimento.

[0141]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do lócus alvo genômico endógeno é maior ou igual a 50 bases de comprimento, maior ou igual a 100 bases de comprimento, maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 300 bases de comprimento, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 1000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 2000 bases de comprimento.

[0142]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região do lócus alvo genômico endógeno e as sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do lócus alvo genômico endógeno são maiores ou iguais a 600 bases de comprimento.

[0143]Em algumas modalidades, o polinucleotídeo circular compreende um plasmídeo ou um nanoplasmídeo. Em algumas modalidades, o plasmídeo tem um esqueleto de vetor inferior a 500 bases, e em que o esqueleto de vetor é uma sequência de nucleotídeo que não é a sequência de nucleotídeo que codifica pelo

menos uma porção do gene e nem a sequência de nucleotídeo idêntica à primeira local genômico alvo endógeno.

[0144]Em algumas modalidades, o polinucleotídeo circular não é um polinucleotídeo amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR).

[0145]Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno compreende uma região de codificação. Em algumas modalidades, o lócus alvo genômico endógeno compreende um ítron.

[0146]Em algumas modalidades, o alvo genômico endógeno compreende um lócus da via de sinalização imune. Em algumas modalidades, o lócus da via de sinalização imune é selecionado a partir do grupo que consiste de PD-1, CTLA-4, BTLA, TIM3, LAG3 e VISTA.

[0147]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene compreende uma sequência ligante. Em algumas modalidades, a sequência ligante codifica uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que um polipeptídeo codificado apenas por pelo menos uma porção do gene é produzido. Em algumas modalidades, qualquer um dos polipeptídeos ligantes cliváveis compreende um sítio de clivagem de furina. Em algumas modalidades, qualquer uma das sequências ligantes compreende um elemento de salto do ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de: T2A, E2A, P2A e F2A. Em algumas modalidades, qualquer um dos polipeptídeos ligantes cliváveis compreende um ligante Gly-Ser-Gly, opcionalmente em que o ligante Gly-Ser-Gly é N terminal de um elemento de salto do ribossomo 2A e, opcionalmente, em que o ligante Gly-Ser-Gly está em uma orientação de sítio de clivagem de furina: ligante Gly-Ser-Gly: elemento de salto do ribossomo 2A do N terminal ao C terminal. Em algumas modalidades, a sequência ligante, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem

um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES). Em algumas modalidades, a sequência ligante, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem um promotor exógeno.

[0148]Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem uma sequência aceptora de splice.

[0149]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica um peptídeo sinal, em que o peptídeo sinal está operacionalmente ligado a um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene, a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de polipeptídeo TCR-beta ou um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene de TCR. Em algumas modalidades, o peptídeo sinal é um peptídeo sinal exógeno, opcionalmente em que o peptídeo sinal exógeno é um peptídeo sinal do hormônio do crescimento humano.

[0150]Em algumas modalidades, a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem a mesma sequência de polipeptídeo ligante. Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica a segunda sequência de polipeptídeo ligante que codifica a mesma sequência de polipeptídeo ligante compreendem sequências de nucleotídeo códons divergentes e em que as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica o segundo polipeptídeo ligante são códon divergentes entre si.

[0151]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene codifica uma região de codificação. Em algumas modalidades, a região de codificação é

selecionada a partir do grupo que consiste de: um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T e um inibidor da via de sinalização imune.

[0152]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene codifica uma região não codificante. Em algumas modalidades, a região não codificante é selecionada a partir do grupo que consiste de: um shRNA, um siRNA, um miRNA, um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência de células T, e um fator que promove a função das células T.

[0153]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene comprehende pelo menos uma porção de um gene de TCR. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene de TCR comprehende: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa; b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; e c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência ligante.

[0154]Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou pelo menos uma porção do gene de TCR é selecionada a partir do grupo que consiste de: pelo menos uma porção de um TCR murinizado, um TCR humanizado, um TCR de domínio trocado, um TCR com mutação pontual, um TCR manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR códon-otimizado para expressão em humanos, um TCR de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA, uma sequência de região variável do gene de TCR, um receptor de antígeno quimérico (CAR) e um TCR de cadeia única.

[0155]Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a

sequência de polipeptídeo TCR-beta ou um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene de TCR é modificado para demonstrar uma maior associação com uma segunda sequência de polipeptídeo de TCR exógeno relativa a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena, opcionalmente em que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta são modificadas para demonstrar uma maior associação entre si em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena.

[0156]Em algumas modalidades, as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-alfa: segundo ligante: TCR-beta do N terminal ao C terminal. Em algumas modalidades, as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-beta: segundo ligante: TCR-alfa do N terminal N ao C terminal.

[0157]Em algumas modalidades, pelo menos uma porção do gene, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou a sequência de nucleotídeo codificando pelo menos uma porção do gene de TCR compreende uma sequência de nucleotídeo códon divergente, e em que a sequência de nucleotídeo códon divergente é códon divergente em relação a uma sequência de nucleotídeo endógena.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0158]Estas e outras características, aspectos e vantagens da presente invenção serão compreendidos melhor com relação à descrição a seguir e desenhos em anexo, onde:

[0159]A Figura 1 apresenta um esquema que representa a estratégia geral de edição usada para a integração do repórter ZsGreen em um lócus TRAC. A estratégia geral de direcionamento do lócus de TCR α usou um modelo de reparo homólogo contendo uma sequência de codificação de ZsGreen sem promotor e LNGRF

truncada, flanqueada por braços de homologia esquerdo e direito de 1 kb (“Braços HR”) e separados por sequências P2A, bem como uma sequência 5’ P2A que separa ZsGreen e o cassete LNGRF das sequências do lócus de TCR α , codificadas em um nanoplasmídeo circular.

[0160]A Figura 2 apresenta a linha de tempo geral de edição para a integração de ZsGreen.

[0161]A Figura 3 mostra a eficiência de edição de células T usando o repórter ZsGreen integrado em um lócus TRAC.

[0162]A Figura 4 apresenta um esquema representando a estratégia de direcionamento geral usada para integrar construtos de TCR específicos de neoantígenos (neoTCRs) no lócus de TCR α .

[0163]A Figura 5 ilustra o modelo de construto de TCR específico de neoantígeno usado para integrar construtos de TCR específicos de neoantígeno (neoTCRs) no lócus de TCR α . A Figura 5A ilustra o lócus de TCR α alvo (TRAC endógeno, painel superior) e seu sítio alvo CRISPR Cas9 (faixa horizontal, sítio de clivagem designado pela seta), e o modelo HR de plasmídeo circular (painel inferior) com o polinucleotídeo que codifica o neoTCR, que está localizado entre os braços de homologia esquerdo e direito (“LHA” e “RHA”, respectivamente) antes da integração. A Figura 5B ilustra o neoTCR integrado no lócus de TCR α (painel superior), o neoTCR mRNA transcrito e spliced (painel do meio), e a tradução e processamento do neoTCR expresso (painel inferior).

[0164]A Figura 6 apresenta a linha de tempo geral para editar células T inserindo um construto de neoTCR.

[0165]A Figura 7 mostra a técnica de PCR in-out (estratégia geral, painel superior) e os produtos de amplificação por PCR visualizados em um gel de agarose (painéis inferiores) usado para confirmar a integração genômica precisa de um construto de neoTCR no lócus de TCR α .

[0166]A Figura 8 mostra a expressão de MART-1 neoTCR por citometria de fluxo. A Figura 8A mostra a expressão de MART-1 neoTCR usando coloração com dextrâmero específica de MART-1. A Figura 8B mostra um resumo dos resultados de edição para o MART-1 neoTCR usando coloração com dextrâmero específica de MART-1 no Dia 10.

[0167]A Figura 9 mostra a avaliação de células T manipuladas em um ensaio de produção de citocinas específico de antígeno para IFN γ (painel esquerdo) e IL-2 (painel direito).

[0168]A Figura 10 mostra a avaliação de células T manipuladas em um ensaio de proliferação específico de antígeno (Figura 10A) e ensaio de morte mediada por célula T específico de antígeno (Figura 10B).

[0169]A Figura 11 mostra que células T manipuladas que expressam o MART-1 neoTCR ou NY-ESO neoTCR foram geradas usando um procedimento de transdução lentiviral (Figura 11, painéis superiores) ou células T manipuladas que expressam o MART-1 neoTCR gerado usando edição de HR mediada por eletroporação usando pequenas ou grandes formatos (Figura 11, painéis inferiores).

[0170]A Figura 12 mostra a avaliação de células T manipuladas em um ensaio de morte mediada por células T específico de antígeno. As colunas de cima para baixo em cada grupo: MHC HLA-A01 não cognato não pulsado com peptídeo cognato; MHC HLA-A01 não cognato pulsado com 10 μ M de MART1; MHC HLA-A02 cognato não pulsado com peptídeo cognato; MHC HLA-A01 cognato pulsado com 10 μ M de MART1; células alvo HLA-A02 que expressam constitutivamente um peptídeo antigênico cognato MART-1.

[0171]A Figura 13 mostra a eficiência de edição mediada por HR relativa ao uso de DNA de plasmídeo circular purificado e dsDNA linear gerado por PCR como modelos de HR. A Figura 13A mostra um produto de PCR padrão (superior) e um produto de PCR semiprotegido (inferior). A Figura 13B mostra eficiências de edição

usando um plasmídeo circular, um produto de PCR padrão e um produto de PCR semiprotegido para um modelo de HR.

[0172]A Figura 14 mostra a viabilidade das células T usando um purificado adquirido (“pUC57”) ou purificado internamente (“pUC57 interno”), avaliada pela contagem de células (esquerda) ou coloração AOPI (direita).

[0173]A Figura 15 mostra a expressão de Neo12 neoTCR como detectada pela coloração com dextrâmero específico de Neo12.

[0174]A Figura 16 mostra a expressão de Neo12 neoTCR como detectado pela coloração com dextrâmero específico de Neo12.

[0175]A Figura 17 mostra a expressão de neoTCRs MART-1, Neo12 e NY-ESO como detectada por coloração específica com dextrâmero.

[0176]A Figura 18 mostra a integração de neoTCRs em células T derivadas de doadores. Figura 18A mostra a eficiência de edição (como % de CD8+) dos neoTCRs MART-1, Neo12 e NY-ESO como detectada pela coloração específica com dextrâmero em células T derivadas de pacientes ou doadores saudáveis. A Figura 18A mostra a eficiência de edição (como % de CD8+) de neoTCR neo12 em células T derivadas de doadores saudáveis.

[0177]A Figura 19 mostra a eficiência de edição de células CD4+ e CD8+ conforme avaliada pela detecção de complexos CD3 que não se ligam a um anticorpo pan-TCR.

[0178]A Figura 20 mostra os níveis de expressão superficial de neoTCRs integrados e TCRs endógenos. A Figura 20A mostra histogramas de MFI para o TCR endógeno (histograma esquerdo) e Neo12 neoTCR TCR (histograma direito) corados usando o mesmo anticorpo (CD3). A Figura 20A mostra a análise dos níveis de expressão superficial de neoTCRs MART-1, Neo12 e NY-ESO em comparação com um TCR endógeno. *Os níveis de expressão de TCR por célula são baseados na literatura.

[0179]A Figura 21 mostra a expressão de Neo12 neoTCR como avaliada por coloração específica com dextrâmero específica de Neo12 usando edição em grande formato de células T a partir de PBMCs recém-isoladas e isoladas usando a plataforma Prodigy.

[0180]A Figura 22 mostra a estratégia geral para avaliar células T editadas usando células alvo (HLA-A02 expressando células K562) ou pulsadas com peptídeo.

[0181]A Figura 23 mostra a estratégia geral para avaliar células T editadas usando células alvo (HLA-A02 expressando células K562) manipuladas para expressar o peptídeo preformado em um complexo HLA (pHLA).

[0182]A Figura 24 mostra a avaliação de células T manipuladas em um ensaio de morte mediada por células T específicas de antígeno. *Os peptídeos pulsados são exibidos apenas brevemente nas células alvo in vitro, em contraste com os tumores in vivo que expressam neoantígenos alvo.

[0183]A Figura 25 mostra a avaliação de células T manipuladas em um ensaio de proliferação específico de antígeno. A Figura 25A mostra um gráfico de histograma representativo demonstrando a proliferação com células em divisão percentual calculadas na Figura 25B.

[0184]A Figura 26 mostra a avaliação de células T manipuladas em um ensaio de produção de citocinas específico de antígeno para as citocinas IFN γ (Figura 26A), IL-2 (Figura 26B), TNF α (Figura 26C) e IL-6 (Figura 26D).

[0185]A Figura 27 mostra a avaliação de células T editadas usando células T derivadas de doadores. A Figura 27A mostra a eficiência de edição de células T derivadas de doadores saudáveis e doadores pacientes. A Figura 27B mostra um ensaio de morte mediada por células T específico de antígeno para células T derivadas de doadores saudáveis e doadores pacientes. A Figura 27C mostra um ensaio de proliferação específico de antígeno para células T derivadas de doadores saudáveis e doadores pacientes. A Figura 27D mostra um ensaio de produção de

citocinas específico de antígeno para células T derivadas de doadores saudáveis e doadores pacientes.

[0186]A Figura 28 mostra a avaliação de células T editadas usando células T derivadas de doadores. A Figura 28A mostra a eficiência de edição de células T do doador que expressam um Neo12 neoTCR ou um MART-1 neoTCR. A Figura 28B mostra um ensaio de morte mediada por células T específico de antígeno para células T de doadores que expressam um Neo12 neoTCR ou um MART-1 neoTCR. A Figura 28C mostra um ensaio de proliferação específico de antígeno para células T de doadores que expressam um Neo12 neoTCR ou um MART-1 neoTCR.

[0187]A Figura 29 mostra um ensaio de morte mediado por células T específico de antígeno para células T de doadores que expressam um Neo12 neoTCR ou um MART-1 neoTCR aos 14 dias (painel esquerdo) e 2 meses (painel direito) após a fabricação com eficiência comparável.

[0188]A Figura 30 mostra a análise de Isoplexis para uma célula T editada que expressa um Neo12 neoTCR (Figura 30A) ou um MART-1 neoTCR (Figura 30B). A Figura 30C mostra a contribuição das células T manipuladas para uma resposta de citocinas (painel esquerdo) e a porcentagem de células T produzindo cada citocina (painel direito).

[0189]A Figura 31 mostra o fluxo de trabalho geral para a edição HSC usada.

[0190]A Figura 32 mostra os produtos de amplificação por PCR por técnica de PCR in-out visualizados em um gel de agarose usado para confirmar a integração genômica precisa de um construto neo12 neoTCR no lócus de TCR α de HSCs.

[0191]A Figura 33 mostra um gráfico representativo demonstrando a expressão de ZsGreen no Dia 11 de um repórter ZsGreen integrado no lócus de TCR α de células NK.

[0192]A Figura 34 mostra os produtos de amplificação por PCR por técnica de PCR in-out visualizados em um gel de agarose usado para confirmar a integração

genômica precisa de um repórter ZsGreen integrado no lócus de TCRα de células NK.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0193]Definições

[0194]Como usado aqui, “antígeno” inclui qualquer antígeno, incluindo neoantígenos específicos de paciente. Um antígeno inclui qualquer substância que possa induzir uma resposta imune.

[0195]Como usado aqui, “células T específicas de antígeno” se referem a células que são diferenciadas umas das outras por seus receptores de células T (TCRs), que lhes dão sua especificidade de antígeno.

[0196]Como usado aqui, “complexo de antígeno”, “antígeno-MHC”, “complexo antígeno-MHC”, “complexo antígeno-MHC recombinante”, “peptídeo MHC”, “p / MHC” e “pHLA” são usados de forma intercambiável para se referir a um complexo principal de histocompatibilidade recombinante com um peptídeo no sulco de ligação ao antígeno. Como aqui utilizado, o termo MHC inclui, mas não está limitado a, MHCs humanos denominados antígenos leucocitários humanos (HLAs).

[0197]O termo “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” refere-se a uma quantidade que é eficaz para melhorar um sintoma de uma doença, por exemplo, uma quantidade que é eficaz para inibir o crescimento de um tumor.

[0198]O termo “melhora” refere-se a qualquer resultado terapeuticamente benéfico no tratamento de um estado de doença, por exemplo, um estado de doença cancerosa, incluindo profilaxia, diminuição da gravidade ou progressão, remissão, ou cura da mesma.

[0199]O termo “in situ” refere-se a processos que ocorrem em uma célula viva que cresce separada de um organismo vivo, por exemplo, que cresce na cultura de tecidos.

[0200]O termo “in vivo” refere-se a processos que ocorrem em um organismo vivo.

[0201]O termo “mamífero”, conforme usado aqui, inclui humanos e não humanos e inclui, mas não está limitado a humanos, primatas não humanos, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos, e suínos.

[0202]O termo “identidade” percentual, no contexto de duas ou mais sequências de ácido nucleico ou polipeptídeo, refere-se a duas ou mais sequências ou subsequências que têm uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos iguais, quando comparadas e alinhadas para correspondência máxima, conforme medido usando um dos algoritmos de comparação de sequência descritos abaixo (por exemplo, BLASTP e BLASTN ou outros algoritmos disponíveis para pessoas versadas na técnica) ou por inspeção visual. Dependendo da aplicação, a “identidade” percentual pode existir em uma região da sequência que está sendo comparada, por exemplo, em um domínio funcional ou, alternativamente, ao longo de todo o comprimento das duas sequências a serem comparadas.

[0203]Para comparação de sequências, normalmente uma sequência atua como uma sequência de referência com a qual as sequências de teste são comparadas. Ao usar um algoritmo de comparação de sequências, a sequência de teste e a sequência de referência são inseridas em um computador, as coordenadas de subsequência são designadas, se necessário, e os parâmetros do programa de algoritmo de sequência são designados. O algoritmo de comparação de sequências calcula a identidade percentual de sequências para a(s) sequência(s) de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros de programa designados.

[0204]O alinhamento ideal de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), pelo método de busca por

similaridade de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), por implementações computadorizadas desses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) ou por inspeção visual (consultar geralmente Ausubel e outros).

[0205]Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a identidade percentual de sequências e a similaridade de sequências é o algoritmo BLAST, que é descrito por Altschul e outros, J. Mol. Biol. 215: 403 a 410 (1990). O software para realizar análises BLAST está disponível para o público no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (<www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

[0206]Uma “substituição conservativa” ou uma “substituição conservativa de aminoácidos”, refere-se à substituição de um aminoácido por um aminoácido quimicamente ou funcionalmente similar. As tabelas de substituição conservativa que fornecem aminoácidos similares são bem conhecidas na técnica. A título de exemplo, os grupos de aminoácidos fornecidos nas Tabelas 1 a 4 são, em algumas modalidades, considerados substituições conservativas um do outro.

[0207]Tabela 1. Grupos selecionados de aminoácidos que são considerados substituições conservativas um do outro, em certas modalidades.

<i>Resíduos ácidos</i>	D e E
<i>Resíduos básicos</i>	K, R, e H
<i>Resíduos hidrofílicos não carregados</i>	S, T, N, e Q
<i>Resíduos alifáticos não carregados</i>	G, A, V, L, e I
<i>Resíduos não polares não carregados</i>	C, M, e P
<i>Resíduos aromáticos</i>	F, Y, e W

[0208]Tabela 2. Grupos selecionados de aminoácidos adicionais que são considerados substituições conservativas um do outro, em certas modalidades.

<i>Grupo 1</i>	A, S, e T
<i>Grupo 2</i>	D e E
<i>Grupo 3</i>	N e Q
<i>Grupo 4</i>	R e K

Grupo 5	I, L, e M
Grupo 6	F, Y, e W

[0209]Tabela 3. Outros grupos de aminoácidos selecionados que são considerados substituições conservativas um do outro, em certas modalidades.

Grupo A	A e G
Grupo B	D e E
Grupo C	N e Q
Grupo D	R, K, e H
Grupo E	I, L, M, V
Grupo F	F, Y, e W
Grupo G	S e T
Grupo H	C e M

[0210]Substituições conservativas adicionais podem ser encontradas, por exemplo, em Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties 2^a ed. (1993) W.H. Freeman & Co., Nova Iorque, NY. Uma proteína gerada realizando uma ou mais substituições conservativas de resíduos de aminoácidos em uma proteína de origem é chamada de uma “variante conservativamente modificada”.

[0211]O termo “aminoácido” refere-se aos vinte aminoácidos comuns de ocorrência natural. Os aminoácidos de ocorrência natural incluem alanina (Ala; A), arginina (Arg; R), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), cisteína (Cys; C); ácido glutâmico (Glu; E), glutamina (Gln; Q), glicina (Gly; G); histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro; P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptofano (Trp; W), tirosina (Tir; Y) e valina (Val; V).

[0212]A menos que seja especificamente declarado ou aparente do contexto, como usado aqui, o termo “cerca de” é entendido como dentro de uma faixa de tolerância normal na técnica, por exemplo, dentro de 2 desvios padrão da média. Cerca de pode ser entendido como estando dentro de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% ou 0,01% do valor declarado.

[0213]O termo “substancialmente livre de” é entendido como significando

menos do que uma quantidade estatisticamente significativa de componente (por exemplo, um contaminante ou um componente viral) presente em uma composição total relevante, incluindo o componente em um nível indetectável na composição total relevante (ou seja, “livre de”). Menos do que uma quantidade estatisticamente significativa pode se referir a um nível de detecção que não se qualifica como tendo confiança estatística de que um componente está presente em uma composição relevante, tal como um valor de p maior do que 0,1, 0,05 ou 0,01. Uma composição pode estar substancialmente livre de um componente se a composição contém menos de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,001% ou 0,0001% do componente por concentração de porcentagem em massa / volume.

[0214]Deve-se notar que, conforme usado na especificação e nas reivindicações em anexo, as formas singulares “um”, “uma” e “o”, “a” incluem referentes plurais, a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[0215]Células Modificadas

[0216]São fornecidas aqui células modificadas, por exemplo, incluindo células humanas primárias modificadas para adicionar e / ou remover elementos genéticos sem o uso de um sistema de entrega viral.

[0217]Em um aspecto, as células modificadas compreendem: um polinucleotídeo circular compreendendo uma sequência de nucleotídeo exógena, a sequência de nucleotídeo exógena compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um lócus alvo genômico endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus alvo genômico endógeno, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do lócus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus alvo genômico endógeno, e em que a célula modificada está substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus. A célula

modificada pode ainda compreender uma sequência de nucleotídeo integrada, em que a sequência de nucleotídeo integrada compreende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção do gene, a sequência de nucleotídeo integrada é integrada no lócus alvo genômico endógeno, e a sequência integrada de nucleotídeo é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa.

[0218]Em outro aspecto, uma célula modificada é fornecida, a célula modificada compreendendo: uma célula T, a célula T compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa; b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma primeira sequência de polipeptídeo ligante; d) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência de polipeptídeo ligante; em que a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são integradas em um lócus de TCR-alfa endógeno, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são orientadas de modo que cada uma das sequências de polipeptídeo seja capaz de ser expressa como um único polipeptídeo, em que a segunda sequência de polipeptídeo ligante está posicionada entre a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta, o primeiro e o segundo polipeptídeo ligante são polipeptídeos ligantes cliváveis capazes de serem clivados na célula T, de modo que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta formam, cada uma, um polipeptídeo separado, em que os polipeptídeos separados são capazes de se associarem para formar um TCR

funcional, em que a célula modificada está substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus, e em que um lócus de TCR-beta endógeno é rompido. A célula T modificada pode ainda compreender um polinucleotídeo circular compreendendo uma sequência de nucleotídeo exógena, a sequência de nucleotídeo exógena compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região do lócus de TCR endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus de TCR endógeno, e as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do lócus de TCR endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus de TCR endógeno.

[0219]Em outro aspecto, as células T modificadas são fornecidas compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa; b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma primeira sequência de polipeptídeo ligante; d) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência de polipeptídeo ligante; em que a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são integradas em um lócus de TCR endógeno, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são orientadas de modo que cada uma das sequências de polipeptídeo seja capaz de ser expressa como um único

polipeptídeo, em que a segunda sequência de polipeptídeo ligante está posicionada entre a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta, e o primeiro e o segundo polipeptídeo ligante são polipeptídeos ligantes cliváveis capazes de serem clivados na célula T modificada, de modo que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta formam, cada uma, um polipeptídeo separado, em que os polipeptídeos separados são capazes de se associarem para formar um TCR funcional. A célula T modificada pode ainda compreender um polinucleotídeo circular compreendendo uma sequência de nucleotídeo exógena, a sequência de nucleotídeo exógena compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região do lócus de TCR endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus de TCR endógeno, e as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do lócus de TCR endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus de TCR endógeno. A célula T modificada pode estar substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus.

[0220]Modificações de Células e Edição de Genes

[0221]Em geral, as células modificadas são modificadas para serem editadas genomicamente ou capazes de serem editadas genomicamente. Por exemplo, uma célula modificada pode ser editada genomicamente para expressar um gene exógeno usando sistemas de edição de genes mediados por nuclease. Como tal, a célula modificada pode compreender uma composição de nuclease que cliva uma sequência de nucleotídeo definida dentro de um lócus alvo genômico endógeno, incluindo um lócus de TCR endógeno. Uma célula pode ser considerada modificada se um

polinucleotídeo exógeno (por exemplo, um gene exógeno ou parte dele) for integrado no genoma da célula modificada. Uma célula pode ser considerada modificada se contém um ou mais dos componentes geralmente usados na edição de genes mediada por nuclease, ou seja, contendo componentes que podem promover a edição genômica (por exemplo, nucleases, modelos de reparo de homologia, nucleotídeos do sistema CRISPR, etc.). Uma célula pode ser considerada modificada se contém uma ou mais mutações não modeladas (por exemplo, mutações separadas de um polinucleotídeo exógeno integrado), tal como uma ou mais mutações não modeladas que rompem um lócus alvo endógeno. As várias modificações não são mutuamente exclusivas, ou seja, uma célula modificada pode ter um polinucleotídeo exógeno integrado (por exemplo, um gene exógeno ou parte dele), bem como um ou mais dos componentes geralmente usados na edição de genes mediada por nuclease, tal como os componentes que promovem a integração de polinucleotídeos exógenos.

[0222]Em um exemplo ilustrativo, uma célula T modificada pode ter um polinucleotídeo integrado que codifica uma sequência de TCR exógena, um CRISPR / Cas9 RNP que tem como alvo um lócus de TCR endógeno, e um modelo de reparo de homologia (HRT) que codifica uma sequência de TCR exógena. Em outro exemplo ilustrativo, uma célula modificada pode ter um CRISPR / Cas9 RNP que tem como alvo um lócus de TCR endógeno e um modelo de reparo de homologia (HRT) que codifica uma sequência de TCR exógena.

[0223]Em outro exemplo ilustrativo, uma célula modificada pode ter um polinucleotídeo integrado que codifica uma sequência exógena (por exemplo, pelo menos uma porção de um gene), um CRISPR / Cas9 RNP que tem como alvo um lócus endógeno, e um modelo de reparo de homologia (HRT) que codifica uma sequência exógena. Em outro exemplo ilustrativo, uma célula modificada pode ter um CRISPR / Cas9 RNP que tem como alvo um lócus endógeno e um modelo de reparo de homologia (HRT) que codifica uma sequência exógena.

[0224]Em outro exemplo ilustrativo, uma célula-tronco hematopoietica modificada (HSC) pode ter um polinucleotídeo integrado que codifica uma sequência exógena (por exemplo, pelo menos uma porção de um gene), um CRISPR / Cas9 RNP que tem como alvo um lócus endógeno e um modelo de reparo de homologia (HRT) que codifica uma sequência exógena. Em outro exemplo ilustrativo, um HSC modificado pode ter um CRISPR / Cas9 RNP que tem como alvo um lócus endógeno e um modelo de reparo de homologia (HRT) que codifica uma sequência exógena.

[0225]Em outro exemplo ilustrativo, uma célula extermínadora natural (NK) modificada pode ter um polinucleotídeo integrado que codifica uma sequência exógena (por exemplo, pelo menos uma parte de um gene), um CRISPR / Cas9 RNP que tem como alvo um lócus endógeno e um modelo de reparo de homologia (HRT) que codifica uma sequência exógena. Em outro exemplo ilustrativo, uma célula NK modificada pode ter um CRISPR / Cas9 RNP que tem como alvo um lócus endógeno e um modelo de reparo de homologia (HRT) que codifica uma sequência exógena.

[0226]Rompimento de um gene endógeno

[0227]As células modificadas podem ser modificadas de modo que um gene não funcional seja produzido ou possa ser produzido.

[0228]As mutações que resultam em um gene não funcional produzido por uma composição de nuclease podem ser um resultado de edição genômica modelada, por exemplo, mecanismos de reparo de DNA de recombinação homóloga. As células modificadas são as que são editadas genomicamente para expressar um polinucleotídeo exógeno (por exemplo, um gene) em um lócus alvo genômico também podem romper a expressão de um gene endógeno operacionalmente associado ao lócus alvo genômico endógeno. Por exemplo, um gene endógeno codificado pelo lócus alvo genômico pode ser funcionalmente excluído (por exemplo, remoção / substituição do gene endógeno ou parte dele pelo gene exógeno integrado) ou funcionalmente rompido (por exemplo, integração do gene exógeno no gene

endógeno ou uma porção do mesmo, de modo que a transcrição e / ou tradução do gene endógeno seja rompida). Em um exemplo ilustrativo, um gene exógeno que codifica um TCR pode ser integrado em um lócus de TCR endógeno, tal como uma região constante de TCR alfa que codifica o éxon, de modo que a expressão do gene de TCR endógeno seja rompida. A expressão rompida pode ser a expressão reduzida de mRNA que codifica o gene endógeno em comparação com uma célula não modificada ou pode ser a tradução reduzida do gene endógeno em comparação com uma célula não modificada. A expressão rompida pode ser a eliminação da expressão detectável de mRNA que codifica o gene endógeno em comparação com uma célula não modificada ou pode ser a eliminação da tradução detectável do gene endógeno em comparação com uma célula não modificada.

[0229]As células modificadas podem ter modificações que incluem mutações não modeladas (por exemplo, mutações separadas de um polinucleotídeo exógeno integrado) que produzem um gene não funcional codificado por uma sequência de nucleotídeo definida (isto é, um lócus genômico alvo). As mutações que resultam em um gene não funcional produzido por uma composição de nuclease podem ser o resultado de deleções genômicas não modeladas, por exemplo, mecanismos de reparo de DNA de junção não homóloga induzida pela clivagem de nuclease (NHEJ), resultando em inserção ou deleções genômicas (também chamadas de indels). As mutações que podem produzir um gene não funcional incluem uma mutação em uma região de codificação do gene (por exemplo, uma mutação de deslocamento de quadro resultando em uma alteração no quadro da proteína traduzida, uma mutação sem sentido causando uma substituição de um aminoácido para um códon terminal, ou uma mutação “missense” resultando em uma substituição de um aminoácido para outro) ou uma mutação em uma região não codificante (por exemplo, uma mutação que altera a expressão de um produto de mRNA codificado pelo gene, ou uma mutação que altera a estabilidade de um produto de mRNA codificado pelo gene). As

modificações podem incluir composições de nuclease capazes de produzir mutações não modeladas em células modificadas (por exemplo, uma composição de nuclease capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida).

[0230]Múltiplas Modificações

[0231]As células modificadas podem ter mais de uma modificação, por exemplo, modificações em mais de um lócus genômico na célula modificada. Por exemplo, as células modificadas podem ter mais de um polinucleotídeo exógeno integrado em mais de um lócus genômico, tal como a célula modificada que compreende ainda uma segunda sequência de nucleotídeo integrada, em que a segunda sequência de nucleotídeo integrada compreende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção de um segundo gene, a segunda sequência de nucleotídeo integrada é integrada no segundo lócus alvo genômico endógeno, e a segunda sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do segundo gene seja capaz de ser expressa. A célula modificada pode ter componentes que promovem a integração de um segundo polinucleotídeo exógeno, tal como um segundo polinucleotídeo circular compreendendo uma segunda composição de nucleotídeo exógena, a segunda composição de nucleotídeo exógena compreendendo: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um segundo gene; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um segundo lócus alvo genômico endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do segundo lócus alvo genômico endógeno, e as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do segundo lócus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no segundo lócus alvo genômico endógeno e / ou uma segunda composição de nuclease capaz de clivar uma segunda sequência de nucleotídeo definida dentro da célula modificada. Em geral, uma célula modificada não está limitada a apenas uma ou duas sequências de

nucleotídeo integradas e pode incluir qualquer número de sequências de nucleotídeo integradas, tal como 1-10, 1-2, 1-3, 2-3, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais sequências de nucleotídeo integradas.

[0232] Da mesma forma, uma célula modificada pode ter componentes que podem resultar em 1-10, 1-2, 1-3, 2-3, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais sequências de nucleotídeo integradas, tal como modelos de reparo homólogo, nucleases, etc. Em um exemplo ilustrativo, uma abordagem de edição de genes mediada por CRISPR “multiplexada” pode ser usada para integrar múltiplos genes ou porções dos mesmos através da introdução de múltiplos modelos de reparo homólogo simultaneamente com múltiplos complexos CRISPR RNP de clivagem direta em múltiplas localizações genômicas. As múltiplas sequências também podem ser integradas sequencialmente.

[0233] As células modificadas podem ter modificações que incluem múltiplas mutações não modeladas (por exemplo, mutações separadas a partir de um polinucleotídeo exógeno integrado), tal como múltiplas mutações não modeladas que produzem um gene não funcional codificado por uma sequência de nucleotídeo definida (ou seja, um lócus alvo genômico). As modificações podem incluir composições de nuclease capazes de produzir múltiplas mutações não modeladas em células modificadas. Por exemplo, uma célula modificada pode ter duas ou três mutações não modeladas separadas que resultam em dois ou três genes não funcionais, respectivamente. Em geral, uma célula modificada pode ter qualquer número de mutações não modeladas, por exemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais mutações não modeladas separadas, respectivamente. Em um exemplo ilustrativo, uma abordagem de edição de genes mediada por CRISPR “multiplexada” pode ser usada para romper vários genes através da introdução simultânea de múltiplos complexos de CRISPR RNP que dirigem a clivagem em múltiplas localizações genômicas, resultando em múltiplas mutações não modeladas.

[0234] Uma célula modificada pode ter mais de uma mutação que resulta em

mais de um gene não funcional. Por exemplo, uma célula modificada pode ter duas ou três mutações separadas que resultam em dois ou três genes não funcionais, respectivamente. Em geral, uma célula modificada pode ter qualquer número de mutações que resultam em qualquer número de genes não funcionais, por exemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais mutações separadas que resultam em 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais genes não funcionais, respectivamente. Em um exemplo ilustrativo, uma abordagem de edição de genes mediada por CRISPR “multiplexada” pode ser usada para romper vários genes através da introdução simultânea de múltiplos complexos de CRISPR RNP que dirigem a clivagem em várias localizações genômicas, resultando em múltiplas mutações. Os múltiplos genes também podem ser rompidos sequencialmente. As mutações que resultam em um gene não funcional produzido por uma composição de nuclease podem ser um resultado de edição genômica modelada, por exemplo, mecanismos de reparo de DNA de recombinação homóloga. As mutações que resultam em um gene não funcional produzido por uma composição de nuclease podem ser o resultado de deleções genômicas não modeladas, por exemplo, mecanismos de reparo de DNA de junção não homóloga induzida pela clivagem de nuclease (NHEJ), resultando em inserções ou deleções genômicas (também chamadas de indels).

[0235]Múltiplas modificações podem incluir uma combinação de qualquer uma das modificações descritas, tal como uma ou mais sequências de nucleotídeo integradas em combinação com uma ou mais mutações não modeladas. Em um exemplo ilustrativo, uma abordagem de edição de genes mediada por CRISPR “multiplexada” pode ser usada para integrar um ou mais genes ou partes dele por meio de reparo dirigido por homologia (ou seja, introduzir vários modelos de reparo homólogos simultaneamente com vários complexos CRISPR RNP que dirigem a clivagem em múltiplas localizações genômicas) enquanto rompe simultaneamente múltiplos genes (isto é, introduzindo simultaneamente múltiplos complexos CRISPR

RNP que dirigem a clivagem em múltiplas localizações genômicas, resultando em múltiplas mutações não modeladas, por exemplo, múltiplos indels). As integrações e rompimentos podem ser realizados sequencialmente.

[0236]Como um exemplo ilustrativo de uma célula modificada com múltiplas modificações, uma célula T modificada com um cassete de expressão de TCR integrado em um lócus de TCR α e um lócus de TCR β rompido, de modo que o lócus de TCR β seja um gene não funcional. Como outro exemplo ilustrativo, exemplo ilustrativo de uma célula modificada com múltiplas modificações, uma célula T modificada com um cassete de expressão de TCR integrado em um lócus de TCR β e um lócus de TCR α rompido, de modo que o lócus de TCR α seja um gene não funcional.

[0237]Lócus Alvo

[0238]As células modificadas são editadas genomicamente, ou são capazes de ser editadas genomicamente, em um lócus alvo genômico endógeno, ou seja, em uma localização genômica específica dentro da célula modificada, tal como um gene específico de interesse ou uma sequência de nucleotídeo específica de interesse. Um lócus alvo genômico endógeno pode ser uma região de codificação de um gene. Um lócus alvo genômico endógeno pode ser uma região não codificante de um gene, tal como um ítron. Um lócus alvo genômico endógeno pode ser uma região genômica não codificante que não uma região genômica tipicamente associada a um gene típico, tal como uma ou mais regiões que codificam RNAs funcionais não codificantes, elementos repetitivos de DNA, elementos retrovirais, pseudogenes e similares.

[0239]Populações de Células

[0240]Em um aspecto particular, é fornecida uma população de células (por exemplo, uma população de células T). A população de células pode compreender qualquer uma das células modificadas aqui descritas. A célula modificada pode estar dentro de uma população heterogênea de células e / ou de uma população

heterogênea de diferentes tipos de células. A população de células pode ser heterogênea em relação à porcentagem de células que são genomicamente editadas. Uma população de células pode ter mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60%, mais de 70%, mais de 80% ou mais de 90% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Em um certo aspecto, uma população de células compreende uma sequência de nucleotídeo integrada, em que a sequência de nucleotídeo integrada compreende pelo menos uma porção de um gene, a sequência de nucleotídeo integrada é integrada em um lócus alvo genômico endógeno, e a sequência de nucleotídeo integrada é orientada de tal que pelo menos uma porção do gene é capaz de ser expressa, em que a população de células é substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus, e em que mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40 %, mais de 50%, mais de 60%, mais de 70%, mais de 80% ou mais de 90% das células na população compreendem a sequência de nucleotídeo integrada.

[0241]Uma população de células pode ter mais de 91%, mais de 92%, mais de 93%, mais de 94%, mais de 95%, mais de 96% ou mais de 97%, mais de 98%, mais de 99%, mais de 99,5% ou mais de 99,9% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter mais de 20% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter mais de 30% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter mais de 60% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter mais de 70% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada.

[0242]Uma população de células pode ter entre 10% e 70%, entre 20% e 70%, entre 30% e 70%, entre 40% e 70%, entre 50% e 70%, entre 50% e 70%, entre 60% e 70%, entre 10% e 80%, entre 10% e 60%, entre 10% e 50%, entre 10% e 40%, entre

10% e 30%, entre 10% e 20%, entre 20% e 80%, entre 30% e 80%, entre 40% e 80%, entre 50% e 80%, entre 60% e 80%, entre 70% e 80% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter entre 10% e 100%, entre 20% e 100%, entre 30% e 100%, entre 40% e 100%, entre 50% e 100%, entre 60% e 100%, entre 70 % e 100%, entre 80% e 100%, entre 90% e 100%, entre 95% e 100%, entre 96% e 100%, entre 97% e 100%, entre 980% e 100%, entre 99% e 100%, entre 99,5% e 100% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter entre 10% e 70% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter entre 20% e 70% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter entre 30% e 70% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter entre 10% e 80% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter entre 20% e 80% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter entre 30% e 80% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada.

[0243]A população de células pode ser heterogênea em relação à porcentagem de células que têm uma única modificação, por exemplo, uma sequência de nucleotídeo integrada. A população de células pode ser heterogênea em relação à porcentagem de células que têm uma primeira modificação, uma segunda modificação ou ambas, uma primeira e uma segunda modificação, por exemplo, como um exemplo ilustrativo, heterogênea em relação à porcentagem de células que tem uma sequência de nucleotídeo integrada, uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida, ou tanto uma sequência de nucleotídeo integrada quanto uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida.

[0244]Uma população de células pode ter mais de 10%, mais de 20%, mais

de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60%, mais de 70%, mais de 80% ou mais de 90% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter mais de 91%, mais de 92%, mais de 93%, mais de 94%, mais de 95%, mais de 96% ou mais de 97%, mais de 98% e mais de 99%, mais de 99,5% ou mais de 99,9% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter mais de 20% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter mais de 30% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter mais de 60% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter mais de 70% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter entre 10% e 70%, entre 20% e 70%, entre 30% e 70%, entre 40% e 70%, entre 50% e 70%, entre 60% e 70%, entre 10% e 80%, entre 10% e 60%, entre 10% e 50%, entre 10% e 40%, entre 10% e 30%, entre 10% e 30%, entre 10% e 20%, entre 20% e 80%, entre 30% e 80%, entre 40% e 80%, entre 50% e 80%, entre 60% e 80%, entre 70% e 80% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma

população de células pode ter entre 10% e 100%, entre 20% e 100%, entre 30% e 100%, entre 40% e 100%, entre 50% e 100%, entre 60% e 100%, entre 70% e 100%, entre 80% e 100%, entre 90% e 100%, entre 95% e 100%, entre 96% e 100%, entre 97% e 100%, entre 98% e 100%, entre 99% e 100%, entre 99,5% e 100% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter entre 10% e 70% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter entre 20% e 70% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter entre 30% e 70% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter entre 10% e 80% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter entre 20% e 80% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter entre 30% e 80% compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada e uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida.

[0245]Uma população de células pode ter mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60%, mais de 70%, mais de 80% ou mais de 90% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada ou uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda

sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter entre 10% e 70%, entre 20% e 70%, entre 30% e 70%, entre 40% e 70%, entre 50% e 70%, entre 60% e 70%, entre 10 % e 80%, entre 10% e 60%, entre 10% e 50%, entre 10% e 40%, entre 10% e 30%, entre 10% e 20%, entre 20% e 80%, entre 30% e 80%, entre 40% e 80%, entre 50% e 80%, entre 60% e 80%, entre 70% e 80% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada ou uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter mais de 91%, mais de 92%, mais de 93%, mais de 94%, mais de 95%, mais de 96% ou mais de 97%, mais de 98% e mais de 99%, mais de 99,5% ou mais de 99,9% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada ou uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter mais de 20% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada ou uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter mais de 30% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada ou uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter mais de 60% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada ou uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter mais de 70% da população compreendendo uma sequência de nucleotídeo integrada ou uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida.

[0246]Uma população de células pode ter mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60%, mais de 70%, mais de 80%, mais de 90%, mais de 95%, mais de 98% ou mais de 99% das células modificadas que

compreendem uma sequência de nucleotídeo integrada também compreendem uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida. Uma população de células pode ter entre 10% e 70%, entre 20% e 70%, entre 30% e 70%, entre 40% e 70%, entre 50% e 70%, entre 60% e 70%, entre 10% e 80%, entre 10% e 60%, entre 10% e 50%, entre 10% e 40%, entre 10% e 30%, entre 10% e 20%, entre 20% e 80%, entre 30% e 80%, entre 40% e 80%, entre 50% e 80%, entre 60% e 80%, entre 70% e 80%, 10% e 90%, entre 20% e 90%, entre 30% e 90%, entre 40% e 90%, entre 50% e 90%, entre 60% e 90%, entre 70% e 90%, entre 80% e 90%, entre 10% e 95%, entre 20% e 95%, entre 30% e 95%, entre 40% e 95%, entre 50% e 95%, entre 60% e 95%, entre 70% e 95%, entre 80% e 95%, entre 10% e 98%, entre 20% e 98%, entre 30% e 98%, entre 40% e 98%, entre 50% e 98%, entre 60% e 98%, entre 70% e 98%, entre 80% e 98%, entre 10% e 99%, entre 20% e 99%, entre 30% e 99%, entre 40% e 99%, entre 50% e 99%, entre 60% e 99%, entre 70% e 99%, entre 80% e 99%, entre 90% e 99%, entre 95% e 99%, entre 95% e 99%, entre 90% e 95% e entre 95% e 98% das células modificadas que compreendem uma sequência de nucleotídeo integrada também compreendem uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida.

[0247]Uma população de células pode ter mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60%, mais de 70%, mais de 80%, mais de 90%, mais de 95%, mais de 98% ou mais de 99% das células modificadas que compreendem uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida também compreendem uma sequência de nucleotídeo integrada. Uma população de células pode ter entre 10% e 70%, entre 20% e 70%, entre 30% e 70%, entre 40% e 70%, entre 50% e 70%, entre 60% e 70%, entre 10% e 80%, entre 10% e 60%, entre 10% e 50%, entre 10% e 40%, entre 10% e 30%, entre 10% e 20%, entre 20% e 80%, entre 30% e 80%, entre 40% e 80%, entre 50% e 80%, entre 60% e 80%, entre 70% e 80%, 10% e 90%, entre 20% e 90%, entre 30% e 90%, entre 40% e 90%, entre 50% e 90%, entre 60% e 90%, entre 70% e 90%, entre 80% e 90%, entre 10% e 95%, entre 20% e 95%, entre 30% e 95%, entre 40% e 95%, entre 50% e 95%, entre 60% e 95%, entre 70% e 95%, entre 80% e 95%, entre 90% e 95%, entre 95% e 99%, entre 95% e 99%, entre 90% e 95% e entre 95% e 98% das células modificadas que compreendem uma sequência de nucleotídeo integrada também compreendem uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida.

50% e 80%, entre 60% e 80%, entre 70% e 80%, 10% e 90%, entre 20% e 90%, entre 30% e 90%, entre 40% e 90%, entre 50% e 90%, entre 60% e 90%, entre 70% e 90%, entre 80% e 90%, entre 10% e 95%, entre 20% e 95%, entre 30% e 95%, entre 40% e 95%, entre 50% e 95%, entre 60% e 95%, entre 70% e 95%, entre 80% e 95%, entre 10% e 98%, entre 20% e 98%, entre 30% e 98%, entre 40% e 98%, entre 50% e 98%, entre 60% e 98%, entre 70% e 98%, entre 80% e 98%, entre 10% e 99%, entre 20% e 99%, entre 30% e 99%, entre 40% e 99%, entre 50% e 99%, entre 60% e 99%, entre 70% e 99%, entre 80% e 99%, entre 90% e 99%, entre 95% e 99%, entre 90% e 95% e entre 95% e 98% das células modificadas que compreendem uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida também compreendem uma sequência de nucleotídeo integrada.

[0248]As células modificadas podem ser enriquecidas dentro de uma população de células após a modificação (por exemplo, após a edição genômica) para enriquecer para uma modificação específica (por exemplo, integração de um gene exógeno). A população pode ser enriquecida usando métodos que incluem, mas não estão limitados à classificação celular ativada por fluorescência (FACS) (por exemplo, o gene exógeno expressa ou coexpressa um marcador fluorescente, ou a população é corada usando anticorpos para a expressão de um gene exógeno ou perda de um gene endógeno), seleção de fármacos (por exemplo, o gene exógeno expressa ou coexpressa um gene de seleção de fármacos) ou purificação de afinidade (por exemplo, o gene exógeno expressa ou coexpressa uma etiqueta de afinidade).

[0249]Em um aspecto particular, as populações homogêneas aqui descritas podem ser alcançadas sem enriquecimento para células modificadas, ou seja, nenhuma etapa de enriquecimento é realizada após a modificação de células, tal como na edição de genoma mediada por nuclease (por exemplo, mediada por CRISPR).

[0250]Uma população de células, em particular uma população de células

imediatamente após a modificação em que a população não foi enriquecida, pode ter pelo menos 10 células, pelo menos 100 células, pelo menos 1000 células, pelo menos 10000 células, 1×10^6 células, pelo menos 2×10^6 células, pelo menos 5×10^6 células, pelo menos 1×10^7 células, pelo menos 5×10^7 células, pelo menos 1×10^8 células, pelo menos 5×10^8 células, pelo menos 1×10^9 células ou pelo menos 5×10^9 células. A população de células, em particular uma população de células imediatamente após a modificação em que a população não foi enriquecida, pode ser de pelo menos 1×10^7 células. A população de células, em particular uma população de células imediatamente após a modificação em que a população não foi enriquecida, pode ser de pelo menos 5×10^7 células.

[0251]Sistemas de Edição de Genes

[0252]Como descrito acima, em geral, as células modificadas são modificadas de modo que sejam editadas genomicamente ou sejam capazes de serem editadas genomicamente, utilizando edição mediada por nuclease.

[0253]Em geral, as nucleases promovem a edição através de primeiro dirigir a clivagem em uma sequência específica de ácido nucleico (isto é, uma “sequência de nucleotídeo definida” clivada por uma nuclease), por exemplo, uma sequência genômica, e a edição subsequente resultada de reparo de DNA não baseado em modelo, por exemplo, mecanismos de reparo de DNA de junção de extremidade não homóloga induzida por clivagem por nuclease, ou resulta de reparo baseado em modelos, por exemplo, mecanismos de reparo de DNA de recombinação homóloga.

[0254]Uma variedade de nucleases que podem ser manipuladas para promover a clivagem específica de sequência é conhecida dos versados na técnica e inclui, mas não está limitada à nuclease da família de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespacadas (CRISPR) ou um derivado da mesma, uma nuclease efetora semelhante a ativadores de transcrição (TALEN) ou derivado da mesma, uma nuclease dedo de zinco (ZFN) ou derivado da mesma, e

uma endonuclease teleguiada (HE) ou derivado da mesma. Em particular, os sistemas de edição de gene mediada por CRISPR podem ser usados, tal como o sistema de edição CRISPR / Cas9. A edição mediada por nuclease, e especificamente a edição mediada por CRISPR, é discutida em mais detalhes por Adli M (The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. Nat Commun. 2018 15 de maio de 2018; 9 (1): 1911), aqui incorporado por referência por tudo que descreve.

[0255]Edição de Genes Mediada por CRISPR

[0256]Em geral, um sistema de edição de genes mediada por CRISPR compreende uma nuclease (Cas) associada a CRISPR e um RNA(s) que dirige a clivagem para uma sequência alvo particular. Um sistema de edição de genes mediada por CRISPR exemplificativo é os sistemas CRISPR / Cas9 compostos por uma nuclease Cas9 e um RNA(s) que tem um domínio CRISPR RNA (crRNA) e um domínio CRISPR de transativação (tracrRNA). O crRNA normalmente tem dois domínios de RNA: uma sequência de RNA guia (gRNA) que dirige a especificidade por meio da hibridação de pares de bases para uma sequência alvo (“uma sequência de nucleotídeo definida”), por exemplo, uma sequência genômica; e um domínio de RNA que hibridiza com um tracrRNA. Um tracrRNA pode interagir e assim promover o recrutamento de uma nuclease (por exemplo, Cas9) para um lócus genômico. Os polinucleotídeos crRNA e tracrRNA podem ser polinucleotídeos separados. Os polinucleotídeos crRNA e tracrRNA podem ser um único polinucleotídeo, também conhecido como um RNA guia único (sgRNA). Enquanto o sistema Cas9 é ilustrado aqui, outros sistemas CRISPR podem ser usados, tal como o sistema Cpf1. As nucleases podem incluir seus derivativos, tal como mutantes funcionais de Cas9, por exemplo, um mutante “nickase” de Cas9 que, em geral, medeia a clivagem de apenas uma única fita de uma sequência de nucleotídeo definida, em oposição a uma quebra completa de fita dupla tipicamente produzida pelas enzimas Cas9.

[0257]Em geral, os componentes de um sistema CRISPR interagem entre si

para formar um complexo de ribonucleoproteína (RNP) para mediar a clivagem específica da sequência. Em alguns sistemas CRISPR, cada componente pode ser produzido separadamente e usado para formar o complexo RNP. Em alguns sistemas CRISPR, cada componente pode ser produzido separadamente *in vitro* e colocado em contato (ou seja, “complexado”) entre si *in vitro* para formar o complexo RNP. O RNP produzido *in vitro* pode então ser introduzido (isto é, “entregue”) no citosol e / ou núcleo de uma célula, por exemplo, citosol e / ou núcleo de uma célula T. Os complexos RNP produzidos *in vitro* podem ser entregues a uma célula por vários meios, incluindo, entre outros, eletroporação, transfecção mediada por lipídios, deformação da membrana celular por meios físicos, nanopartículas lipídicas (LNP), partículas semelhantes a vírus (VLP) e sonicação. Em um exemplo particular, os complexos RNP produzidos *in vitro* podem ser entregues a uma célula usando um sistema de entrega baseado em eletroporação Nucleofactor / Nucleofection® (Lonza®). Outros sistemas de eletroporação incluem, mas não estão limitados a sistemas de eletroporação MaxCyte, sistemas de eletroporação Miltenyi CliniMACS, sistemas de eletroporação Neon, e sistemas de eletroporação BTX. As nucleases CRISPR, por exemplo, Cas9, podem ser produzidas *in vitro* (isto é, sintetizadas e purificadas) usando uma variedade de técnicas de produção de proteínas conhecidas pelos versados na técnica. Os RNAs do sistema CRISPR, por exemplo, um sgRNA, podem ser produzidos *in vitro* (isto é, sintetizados e purificados) usando uma variedade de técnicas de produção de RNA conhecidas pelos versados na técnica, tal como transcrição *in vitro* ou síntese química.

[0258]Um complexo RNP produzido *in vitro* pode ser complexado em diferentes relações de nuclease para gRNA. Por exemplo, um complexo RNP produzido *in vitro* pode ser formado com sgRNAs complexados com proteína Cas9 a uma relação molar de Cas9: sgRNA entre 1:1 a 1:9, como uma relação molar de Cas9: sgRNA de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 ou 1:9. Um complexo RNP produzido in

vitro pode ser formado com sgRNAs complexados com proteína Cas9 a uma relação molar de Cas9: sgRNA de cerca de 1:1, cerca de 1:2, cerca de 1:3, cerca de 1:4, cerca de 1:5, cerca de 1:6, cerca de 1:7, cerca de 1:8 ou cerca de 1:9.

[0259]Um complexo RNP produzido in vitro também pode ser usado em diferentes quantidades em um sistema de edição mediada por CRISPR. Por exemplo, dependendo do número de células que se deseja editar, a quantidade total de RNP adicionada pode ser ajustada, tal como uma redução na quantidade de complexo de RNP adicionada ao editar um grande número de células (por exemplo, 5×10^7) em uma reação.

[0260]Em alguns sistemas CRISPR, cada componente (por exemplo, Cas9 e um sgRNA) pode ser codificado separadamente por um polinucleotídeo e cada polinucleotídeo introduzido em uma célula. Em alguns sistemas CRISPR, cada componente pode ser codificado por um único polinucleotídeo (isto é, um vetor multi-promotor ou multicistrônico, ver a descrição de sistemas multicistrônicos exemplificativos abaixo) e introduzido em uma célula. Após a expressão de cada componente CRISPR codificado por polinucleotídeo dentro de uma célula (por exemplo, tradução de uma nuclease e transcrição de CRISPR RNAs), um complexo RNP pode se formar dentro da célula e pode então dirigir a clivagem sítio-específica.

[0261]Alguns RNPs podem ser manipulados para ter porções que promovem a entrega do RNP ao núcleo. Por exemplo, uma nuclease Cas9 pode ter um domínio de sinal de localização nuclear (NLS), de modo que, se um complexo Cas9 RNP for entregue no citosol de uma célula ou após a tradução de Cas9 e subsequente formação de RNP, o NLS poderá promover o tráfego adicional de um Cas9 RNP para o núcleo.

[0262]As células modificadas aqui descritas podem ser modificadas usando métodos não virais, por exemplo, os sistemas de edição de genes mediada por nuclease e CRISPR aqui descritos podem ser entregues a uma célula usando

métodos não virais. Embora a entrega mediada por vírus (por exemplo, métodos de entrega baseados em adenoviral, retroviral e lentiviral) tenha sido usada para entregar sistemas de edição de genes mediada por nuclease e CRISPR, os sistemas mediados por vírus podem sofrer com os sistemas virais que também introduzem componentes que levam à imunogenicidade. Por exemplo, os componentes de entrega mediada por vírus podem incluir sequências de nucleotídeo virais ou derivadas de vírus que são capazes de integração em um genoma. Assim, as células modificadas aqui descritas podem estar substancialmente livres de componentes de entrega mediada por vírus. O termo “substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus” é entendido como significando menos do que uma quantidade estatisticamente significativa de um ou mais componentes de entrega mediada por vírus presentes em uma composição total relevante (por exemplo, uma célula ou populações de células), incluindo componentes de entrega mediada por vírus estando em um nível indetectável na composição total relevante (ou seja, “as células modificadas descritas neste documento podem estar livres de componentes de entrega mediada por vírus”). Menos que uma quantidade estatisticamente significativa pode se referir a um nível de detecção que não se qualifica como tendo confiança estatística de que um componente de entrega mediada por vírus está presente em uma composição relevante, tal como um valor de p maior do que 0,1, 0,05 ou 0,01. Os componentes de entrega mediada por vírus podem incluir proteínas virais, tal como proteínas estruturais virais (por exemplo, proteínas de capsídeo, envelope e / ou fusão de membrana). Em geral, todos os peptídeos que são derivados de sequências virais integradas ou de proteínas virais introduzidas podem ser potencialmente apresentados por moléculas MHC na superfície celular, particularmente alelos de MHC classe I, e podem subsequentemente levar à imunogenicidade. Em contextos terapêuticos, tal como terapias celulares adotivas, a imunogenicidade pode afetar negativamente a eficácia terapêutica. Assim, os métodos de entrega não viral podem

ser vantajosos na modificação e edição de células a serem usadas em terapias com células adotivas, tais como terapias com células T adotivas. Portanto, em um aspecto particular, o MHC classe I na superfície de uma célula modificada pode estar livre de peptídeos derivados de componentes de entrega mediada por vírus ou de um vírus integrado, em que o vírus integrado está operacionalmente associado aos componentes de entrega mediada por vírus.

[0263]Em alguns sistemas CRISPR, mais de uma composição de CRISPR pode ser fornecida de modo que cada uma tenha como alvo separadamente o mesmo gene ou lócus genômico geral em mais de uma sequência de nucleotídeo definida. Por exemplo, duas composições CRISPR separadas podem ser fornecidas para dirigir a clivagem em duas sequências de nucleotídeo definidas diferentes, a uma certa distância uma da outra, tal como uma distância menor ou igual a 10 pares de bases, menor ou igual a 20 pares de bases, menos igual ou igual a 30 pares de bases, menor ou igual a 40 pares de bases, menor ou igual a 50 pares de bases, menor ou igual a 100 pares de bases, menor ou igual a 200 pares de bases, menor ou igual a 300 pares de bases, menor ou igual a 400 pares de bases, menor ou igual a 500 pares de bases, menor ou igual a 1.000 pares de bases, menor ou igual a 2.000 pares de bases, menor igual ou igual a 5.000 pares de bases, ou menor ou igual a 10.000 pares de bases uma da outra. Em alguns sistemas CRISPR, mais de uma composição de CRISPR pode ser fornecida de modo que cada uma tenha como alvo separadamente fitas opostas do mesmo gene ou lócus genômico geral. Por exemplo, duas composições separadas de “nickase” CRISPR podem ser fornecidas para dirigir a clivagem no mesmo gene ou lócus genômico geral em fitas opostas.

[0264]Reparo Dirigido por Homologia (HDR) na Edição de Genes

[0265]Sem desejar estar vinculado à teoria, em geral, os sistemas de edição de genes mediada por nuclease usados para introduzir um gene exógeno aproveitam os mecanismos naturais de reparo de DNA de uma célula, particularmente as vias de

reparo de recombinação homóloga (HR). Resumidamente, após um insulto ao DNA genômico (normalmente uma quebra de fita dupla), uma célula pode resolver o insulto usando outra fonte de DNA que tem sequências idênticas ou substancialmente idênticas nas extremidades 5' e 3' como modelo durante a síntese de DNA para reparar a lesão. Em um contexto natural, o HDR pode usar o outro cromossomo presente em uma célula como um modelo. Nos sistemas de edição de genes, polinucleotídeos exógenos são introduzidos na célula para serem utilizados como um modelo de recombinação homóloga (HRT ou modelo HR). Em geral, qualquer sequência exógena adicional não encontrada originalmente no cromossomo com a lesão incluída entre as extremidades complementares 5' e 3' dentro do HRT (por exemplo, um gene ou uma parte de um gene) pode ser incorporada (ou seja, "integrada") no dado lócus genômico durante o HDR modelado. Assim, um modelo de HR típico para um determinado lócus genômico tem uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um lócus alvo genômico endógeno, uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus alvo genômico endógeno e uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene (por exemplo, um gene exógeno de interesse).

[0266]Em alguns exemplos, um modelo de HR pode ser linear. Exemplos de modelos de HR lineares incluem, entre outros, um vetor de plasmídeo linearizado, um ssDNA, um DNA sintetizado e um DNA amplificado por PCR.

[0267]Em exemplos particulares, um modelo de HR pode ser circular, tal como um plasmídeo ou nanoplasmídeo. Sem desejar estar vinculado à teoria, um modelo de HR circular pode ter vantagens particulares sobre os modelos lineares similares, tal como estabilidade aumentada, erros de síntese reduzidos (por exemplo, durante a amplificação por PCR) e facilidade de fabricação. Como demonstrado neste documento, um modelo de HR circular pode ter uma eficiência de edição aprimorada em relação a modelos lineares similares, por exemplo, um modelo linear de tamanho

similar. Um modelo circular pode incluir um modelo superenrolado.

[0268]Sem desejar estar vinculado à teoria, em geral, quanto maior o modelo de HR utilizado, menos eficiente em geral é a via de reparo de recombinação homóloga (HR). Assim, pode ser vantajoso limitar o tamanho de um modelo de HR, tal como remover sequências de nucleotídeo estranhas de modelos de HR, particularmente de modelos circulares. Por exemplo, um esqueleto de vetor (ou seja, todas as sequências de nucleotídeos que não sejam um gene ou parte dele) pode ser usado com menos de 500 bases de comprimento, tal como um vetor com todas as sequências estranhas removidas, exceto um marcador de resistência a antibióticos e uma origem de replicação.

[0269]Em um exemplo ilustrativo de um modelo circular de HR, Nanoplasmids™ (Nature Technology) são usados. Nanoplasmid™ é uma marca comercial de Nature Technology Corp. Os vetores de seleção e as linhagens de células RNA-OUT livres de antibióticos são descritos em mais detalhes no Pedido de Patente Mundial WO2008153733 e em patentes equivalentes americanas, europeias e australianas: US 2010/0303859; EP2333091; e AU 2008262478, respectivamente, aqui incorporadas por referência em sua totalidade por tudo que descrevem. Os vetores e linhagens de células Nanoplasmid™ são descritos adicionalmente em mais detalhes nas seguintes patentes mundiais sob o Tratado de Cooperação de Patentes: PCT/US 13/000259; PCT/US 13/00067; e PCT/US 13/00068, aqui incorporados por referência em sua totalidade por tudo que descrevem.

[0270]Sem desejar estar vinculado à teoria, em geral, as impurezas no modelo de HR podem levar a uma diminuição na eficiência de edição da célula modificada e / ou viabilidade das células modificadas. Assim, o modelo de HR usado pode estar substancialmente livre de impurezas (por exemplo, qualquer componente que não seja o DNA de um modelo de HR) ou livre de contaminantes com base nos limites de detecção. As impurezas podem incluir, entre outras, impurezas relacionadas ao

processo de purificação (por exemplo, sais ou solventes de tampões, etc.), DNA e outros ácidos nucleicos que não sejam o modelo de HR e contaminantes residuais de uma célula hospedeira residual (por exemplo, uma célula bacteriana, tal como *E. coli*) usada para produzir um modelo de HR, tal como endotoxina, proteína da célula hospedeira residual, RNA da célula hospedeira residual, RNA da célula hospedeira residual, gDNA da célula hospedeira residual, e lipídios ou carboidratos da célula hospedeira residual.

[0271]A homogeneidade de um modelo de HR (por exemplo, pureza de um modelo de HR livre de DNA e outros ácidos nucleicos que não o modelo de HR) pode ser avaliada por eletroforese em gel de agarose e pode ser tipicamente considerada substancialmente livre de DNA e outros ácidos nucleicos que não o modelo de HR quando a pureza é de pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 98%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99%, conforme avaliado por eletroforese em gel de agarose. Os modelos de HR podem ser considerados substancialmente livres de DNA e outros ácidos nucleicos que não o modelo de HR quando a pureza é de pelo menos 99,5%, pelo menos 99,6%, pelo menos 99,7%, pelo menos 99,8% ou pelo menos 99,9%, conforme avaliado por eletroforese em gel de agarose.

[0272]A contaminação por endotoxina de um modelo de HR pode ser avaliada por um ensaio de Lisado de Amebócitos de Limulus (LAL) e geralmente pode ser considerada substancialmente livre de endotoxina quando menos de 1000 EU / mg, menos de 900 EU / mg, menos de 800 EU / mg, menos de 700 UE / mg ou menos de 600 UE / mg é detectado. Um modelo de HR deve ser considerado substancialmente livre de endotoxina quando menos de 450 UE / mg, menos de 400 UE / mg, menos de 350 UE / mg, menos de 300 UE / mg, menos de 300 UE / mg, menos de 250 UE / mg, menos de 200 UE / mg, menos de 150 UE / mg, menos de 100 UE / mg ou menos de 50 UE / mg é detectado. Um modelo de HR deve ser considerado substancialmente

livre de endotoxina quando for detectado menos de 500 EU / mg.

[0273]A proteína de célula hospedeira residual pode ser avaliada por Micro BCA. Um modelo de HR deve ser considerado substancialmente livre de proteína de célula hospedeira residual quando menos de 5%, menos de 4%, menos de 3%, menos de 2%, menos de 1%, menos de 0,5% ou menos de 0,1% da composição compreende proteína de célula hospedeira residual. Um modelo de HR deve ser considerado substancialmente livre de proteína de célula hospedeira residual quando menos de 2% da composição compreende proteína de célula hospedeira residual.

[0274]O RNA de célula hospedeira residual pode ser avaliado por eletroforese em gel de agarose e corado com SYBR Gold. Um modelo de HR deve ser considerado substancialmente livre de RNA de célula hospedeira residual quando menos de 10%, menos de 7,5%, menos de 5%, menos de 2,5%, menos de 1%, menos de 0,5% ou menos de 0,1% da composição compreende RNA de célula hospedeira residual. Um modelo de HR deve ser considerado substancialmente livre de RNA de célula hospedeira residual quando menos de 5% da composição compreende RNA de célula hospedeira residual.

[0275]O DNA genômico de célula hospedeira residual pode ser avaliado por qPCR. Um modelo de HR deve ser considerado substancialmente livre de DNA genômico de célula hospedeira residual quando menos de 10%, menos de 7,5%, menos de 5%, menos de 2,5%, menos de 1%, menos de 0,5% ou menos de 0,1% da composição compreende DNA genômico de célula hospedeira residual. Um modelo de HR deve ser considerado substancialmente livre de DNA genômico de célula hospedeira residual quando menos de 5% da composição compreende DNA genômico de célula hospedeira residual.

[0276]As impurezas relacionadas ao processo (por exemplo, sais ou solventes de tampões, etc.) podem ser avaliadas por métodos conhecidos na técnica.

[0277]Os lipídios ou carboidratos de célula hospedeira residual podem ser

avaliados por métodos conhecidos na técnica.

[0278]Os modelos de HR podem ser avaliados por espectrometria. Um modelo de HR deve ser considerado substancialmente livre de contaminantes quando uma relação A_{260} / A_{280} de 1,8, 1,8 + / - 001, 1,8 + / - 01, ou 1,8 + / - 1 é avaliada por espectrometria.

[0279]Outros ensaios conhecidos na técnica podem ser usados para avaliar a pureza do modelo de HR. Os modelos de HR podem ter pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de pureza, conforme avaliado pelos ensaios conhecidos na técnica. Os modelos de HR podem ter pelo menos 99,5%, pelo menos 99,6%, pelo menos 99,7%, pelo menos 99,8% ou pelo menos 99,9% de pureza, conforme avaliado pelos ensaios conhecidos na técnica. Os modelos de HR podem ser entre 95% e 100%, entre 96% e 100%, entre 97% e 100%, entre 98% e 100%, entre 99% e 100%, entre 99,5% e 100% ou entre 99,9% e 100% puros como avaliado por ensaios conhecidos na técnica.

[0280]Os modelos de HR podem ser purificados por métodos conhecidos dos versados na técnica, incluindo, mas não limitados à purificação baseada em coluna de sílica, extração com fenol / clorofórmio, purificação por cromatografia (por exemplo, HPLC), purificação por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), e combinações dos mesmos.

[0281]Após o HDR, uma sequência alvo ("uma sequência de nucleotídeo definida") pode ser removida de modo que um lócus alvo genômico endógeno não seja mais capaz de ser clivado. Por exemplo, uma sequência de nucleotídeo exógena codificada em um modelo de HR pode não ter a sequência alvo que uma dada nuclease cliva.

[0282]Braços de HR

[0283]As sequências idênticas, ou substancialmente idênticas, encontradas nas extremidades 5' e 3' do modelo de HR (ou seja, as sequências de nucleotídeo

idênticas à primeira e à segunda região do lócus alvo genômico endógeno), com relação à sequência exógena a ser introduzida, são geralmente chamados de braços (braços de HR). Os braços de HR podem ser idênticos às regiões do lócus alvo genômico endógeno (isto é, 100% idênticos). Os braços de HR em alguns exemplos podem ser substancialmente idênticos às regiões do lócus alvo genômico endógeno (por exemplo, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,6%, pelo menos 99,7%, pelo menos 99,8% ou pelo menos 99,9% idênticos às regiões do lócus alvo genômico endógeno). Embora possam ser utilizados braços de HR substancialmente idênticos, pode ser vantajoso que os braços de HR sejam idênticos, pois a eficiência da via de HDR pode ser afetada por braços de HR com menos de 100% de identidade.

[0284] Embora os braços de HR possam, em geral, ter qualquer comprimento, considerações práticas, tal como o impacto do comprimento do braço de HR e o tamanho geral do modelo na eficiência geral da edição, também podem ser levadas em consideração. As sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à primeira região do lócus alvo genômico endógeno (ou seja, o braço de HR 5') podem ser maiores ou iguais a 50 bases de comprimento, maiores ou iguais a 100 bases de comprimento, maiores ou iguais a 200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 400 bases de comprimento, maiores ou iguais a 500 bases de comprimento, maiores ou iguais a 600 bases de comprimento, maiores ou iguais a 700 bases de comprimento, maiores ou iguais a 800 bases de comprimento, maiores ou iguais a 900 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1100 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1400 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1500 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1600 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1700 bases de comprimento, maiores ou iguais a

1800 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1900 bases de comprimento, maiores ou iguais a 2000 bases de comprimento. As sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à primeira região do lócus alvo genômico endógeno (isto é, o braço de HR 5') podem ser maiores ou iguais a 300 bases de comprimento. As sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à primeira região do lócus alvo genômico endógeno (isto é, o braço de HR 5') podem ser maiores ou iguais a 600 bases de comprimento. As sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à primeira região do lócus alvo genômico endógeno (isto é, o braço de HR 5') podem ser maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento. As sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à primeira região do lócus alvo genômico endógeno (isto é, o braço de HR 5') podem ser maiores ou iguais a 2000 bases de comprimento.

[0285]As sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à segunda região do lócus alvo genômico endógeno (isto é, o braço de HR 3') podem ser maiores ou iguais a 50 bases de comprimento, maiores ou iguais a 100 bases de comprimento, maiores ou iguais a 200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 400 bases de comprimento, maiores ou iguais a 500 bases de comprimento, maiores ou iguais a 600 bases de comprimento maiores ou iguais a 700 bases de comprimento, maiores ou iguais a 800 bases de comprimento, maiores ou iguais a 900 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1100 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1400 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1500 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1600 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1700 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1800 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1900 bases de comprimento, maiores ou iguais a 2000 bases de comprimento. As sequências de nucleotídeo idênticas ou

substancialmente idênticas à segunda região do alvo genômico endógeno o lócus (isto é, o braço de HR 3') podem ser maiores ou iguais a 300 bases de comprimento. As sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à segunda região do lócus alvo genômico endógeno (isto é, o braço de HR 3') podem ser maiores ou iguais a 600 bases de comprimento. As sequências de nucleotídeos idênticas ou substancialmente idênticas à segunda região do lócus alvo genômico endógeno (isto é, o braço de HR 3') podem ser maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento. As sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à segunda região do lócus alvo genômico endógeno (isto é, o braço de HR 3') podem ser maiores ou iguais a 2000 bases de comprimento.

[0286]Cada uma das sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à primeira e à segunda região do lócus alvo genômico endógeno pode ter o mesmo tamanho ou tamanhos diferentes. Por exemplo, as sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à primeira região do lócus alvo genômico endógeno e as sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à segunda região do lócus alvo genômico endógeno podem ser maiores ou iguais a 600 bases de comprimento.

[0287]As sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à primeira ou à segunda região do lócus alvo genômico endógeno podem ser idênticas ou substancialmente idênticas às regiões de um lócus alvo genômico endógeno imediatamente adjacente a um sítio de clivagem (ou seja, uma sequência de nucleotídeo definida). As sequências de nucleotídeo idênticas ou substancialmente idênticas à primeira ou à segunda região do lócus alvo genômico endógeno podem ser idênticas ou substancialmente idênticas a regiões de um lócus alvo genômico endógeno a uma certa distância de um sítio de clivagem (ou seja, uma sequência de nucleotídeo definida), tal como uma distância de 1 par de bases, menor ou igual a 2 pares de bases, menor ou igual a 3 pares de bases, menor ou igual a 4 pares de

bases, menor ou igual a 5 pares de bases, menor ou igual a 6 pares de bases, menor ou igual a 7 pares de bases, menor ou igual a 8 pares de bases, menor ou igual a 9 pares de bases, menor ou igual a 10 pares de bases, menor ou igual a 15 pares de bases, menor ou igual a 20 pares de bases, menor ou igual a 50 pares de bases ou menor ou igual a 100 pares de bases uma da outra. As sequências de nucleotídeos idênticas ou substancialmente idênticas à primeira ou à segunda região do lócus alvo genômico endógeno podem ser idênticas ou substancialmente idênticas às regiões de um lócus alvo genômico endógeno dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 pares de bases de um sítio de clivagem.

[0288] Sequências Exógenas

[0289] Uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene (por exemplo, um gene exógeno de interesse) pode, em geral, ser qualquer sequência de nucleotídeo exógena de interesse. Por exemplo, uma sequência de nucleotídeo exógena de interesse pode ser uma sequência curta, por exemplo, de 3 a 100 nucleotídeos de comprimento. Uma sequência de nucleotídeo exógena de interesse pode ser um único nucleotídeo. Além disso, uma sequência de nucleotídeo exógena de interesse pode ser uma sequência longa, por exemplo, de 500 a 3000 nucleotídeos de comprimento. Uma sequência de nucleotídeo exógena de interesse pode ser de codificação ou não codificante para uma sequência de polipeptídeo. Além disso, uma sequência de nucleotídeo exógena de interesse pode ser inserida em uma célula de modo a formar um gene quimérico após a inserção. Por exemplo, uma porção de receptor exógeno pode ser inserida no quadro em uma sequência de codificação de receptor endógena para produzir uma sequência de codificação de receptor quimérico que, após a edição, inclui a porção de receptor exógena ligada operacionalmente a uma porção intracelular endógena (por exemplo, para transdução de sinal).

[0290] Em alguns exemplos, um gene ou uma porção do mesmo pode ser uma

sequência de nucleotídeo de codificação de proteínas (isto é, uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo). Em geral, qualquer nucleotídeo de codificação de proteína pode ser usado. Em alguns exemplos, uma sequência de nucleotídeo de codificação de proteína codifica uma proteína útil em terapias com células autólogas (por exemplo, terapias com células T autólogas). Em alguns exemplos, uma sequência de nucleotídeo de codificação de proteína pode incluir, mas não está limitada a, um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T, ou inibidor da via de sinalização imune. Uma sequência de nucleotídeo que codifica a proteína, particularmente uma proteína secretada ou proteínas ligadas à membrana, pode incluir uma sequência de nucleotídeo que codifica um peptídeo sinal. O peptídeo sinal pode ser endógeno à proteína codificada pela sequência de nucleotídeo de codificação de proteína. O peptídeo sinal pode ser exógeno à proteína codificada pela sequência de nucleotídeo de codificação de proteína, tal como um peptídeo sinal do hormônio do crescimento humano.

[0291]Em alguns exemplos, um gene ou uma porção do mesmo pode ser uma sequência de nucleotídeo não codificante de proteínas. Em geral, qualquer nucleotídeo não codificante de proteína pode ser usado. Em alguns casos, uma sequência de nucleotídeo não codificante de proteínas pode ser uma sequência de nucleotídeo útil em terapias com células autólogas (por exemplo, terapias com células T autólogas). Em alguns casos, uma sequência de nucleotídeo não codificante de proteínas pode incluir, mas não está limitada a, um shRNA, um siRNA, um miRNA e um lncRNA.

[0292]Embora uma sequência de nucleotídeo codificando pelo menos uma porção de um gene (por exemplo, um gene exógeno de interesse) possa, em geral, ter qualquer tamanho, considerações práticas, tal como o impacto do tamanho do

gene no tamanho total do modelo e na subsequente eficiência de edição geral, pode ser levadas em consideração. Assim, em um aspecto particular, são fornecidas aqui células modificadas que são editadas genomicamente ou que são capazes de ser editadas genomicamente, para expressar um gene exógeno com comprimento maior ou igual a 100 bases a taxas de eficiência de HR superiores às descritas anteriormente (por exemplo, uma porcentagem maior de uma população que tem uma sequência polinucleotídica integrada), particularmente quando usando métodos de entrega não viral. As taxas de eficiência de HR aprimoradas aplicam-se de maneira semelhante a genes com mais de 100 bases de comprimento, tal como introduzindo sequências exógenas com tamanho maior ou igual a 200 bases, maior ou igual a 400 bases e maior ou igual a 500 bases, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 750 bases de comprimento, maior ou igual a 1000 bases de comprimento, maior ou igual a 1500 bases de comprimento, maior ou igual a 2000 bases de comprimento, maior ou igual a 3000 bases de comprimento ou maior ou igual a 4000 bases de comprimento. Pelo menos uma porção de um gene pode ser maior ou igual a 800 bases de comprimento. Pelo menos uma porção de um gene pode ser maior ou igual a 1600 bases de comprimento.

[0293]As sequências exógenas podem ter entre 100 e 200 bases de comprimento, entre 100 e 300 bases de comprimento, entre 100 e 400 bases de comprimento, entre 100 e 500 bases de comprimento, entre 100 e 600 bases de comprimento, entre 100 e 700 bases de comprimento, entre 100 e 800 bases de comprimento, entre 100 e 900 bases de comprimento ou entre 100 e 1000 bases de comprimento. As sequências exógenas podem ter entre 100 e 2000 bases de comprimento, entre 100 e 3000 bases de comprimento, entre 100 e 4000 bases de comprimento, entre 100 e 5000 bases de comprimento, entre 100 e 6000 bases de comprimento, entre 100 e 7000 bases em comprimento, entre 100 e 8000 bases de comprimento, entre 100 e 9000 bases de comprimento ou entre 100 e 10.000 bases

de comprimento. As sequências exógenas podem ter entre 1000 e 2000 bases de comprimento, entre 1000 e 3000 bases de comprimento, entre 1000 e 4000 bases de comprimento, entre 1000 e 5000 bases de comprimento, entre 1000 e 6000 bases de comprimento, entre 1000 e 6000 bases de comprimento, entre 1000 e 7000 bases em comprimento, entre 1000 e 8000 bases de comprimento, entre 1000 e 9000 bases de comprimento ou entre 1000 e 10.000 bases de comprimento.

[0294]As sequências exógenas podem ser maiores ou iguais a 10 bases de comprimento, maiores ou iguais a 20 bases de comprimento, maiores ou iguais a 30 bases de comprimento, maiores ou iguais a 40 bases de comprimento, maiores ou iguais a ou igual a 50 bases de comprimento, maior ou igual a 60 bases de comprimento, maior ou igual a 70 bases de comprimento, maior ou igual a 80 bases de comprimento maior ou igual a 90 bases de comprimento, ou maiores ou iguais a 95 bases de comprimento. As sequências exógenas podem ter entre 1 e 100 bases de comprimento, entre 1 e 90 bases de comprimento, entre 1 e 80 bases de comprimento, entre 1 e 70 bases de comprimento, entre 1 e 60 bases de comprimento, entre 1 e 50 bases em comprimento, entre 1 e 40 bases, ou entre 1 e 30 bases. As sequências exógenas podem ter entre 1 a 20 bases de comprimento, entre 2 a 20 bases de comprimento, entre 3 a 20 bases de comprimento, entre 5 a 20 bases de comprimento, entre 10 a 20 bases de comprimento ou entre 15 a 20 bases em comprimento. As sequências exógenas podem ter entre 1 a 10 bases de comprimento, entre 2 a 10 bases de comprimento, entre 3 e 10 bases de comprimento, entre 5 e 10 bases de comprimento, entre 1 e 5 bases de comprimento ou entre 1 e 15 bases de comprimento. As sequências exógenas podem ter 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 115, 120, 125, 150, 175, 200, 225 ou 250 bases

de comprimento. As sequências exógenas podem ter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 bases de comprimento.

[0295]Nos exemplos em que várias sequências exógenas são introduzidas, as múltiplas sequências exógenas podem ter tamanhos diferentes, por exemplo, uma primeira sequência exógena pode ser maior ou igual a 100 bases e uma segunda sequência exógena pode ser maior ou igual a 100 bases, ou uma primeira sequência exógena pode ser maior ou igual a 100 bases e uma segunda sequência exógena pode ser menor do que 100 bases (por exemplo, entre 1 e 100 bases de comprimento).

[0296]Pelo menos uma porção de um gene pode ser expressa após a integração no lócus alvo genômico endógeno.

[0297]Em alguns exemplos, o modelo de HR não codifica uma sequência de promotor. A expressão da sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene pode ser dirigida por um promotor endógeno dentro do lócus alvo genômico endógeno, ou seja, pelo menos uma porção de um gene é integrada em um lócus alvo genômico endógeno, de modo que um promotor endógeno está operacionalmente ligado a pelo menos uma porção de um gene. Em um exemplo ilustrativo, uma sequência exógena que codifica um TCR pode ser integrada a um lócus genômico de TCR, tal como uma região constante de TCR alfa que codifica éxon, de modo que o promotor endógeno de TCR alfa esteja operacionalmente ligado ao TCR.

[0298]Em alguns exemplos, o modelo de HR codifica uma sequência de promotor exógeno que está operacionalmente ligada a pelo menos uma porção de um gene. Exemplos de promotores exógenos incluem, mas não estão limitados a, promotores de mamíferos, promotores humanos, promotores virais, promotores derivados de repetição terminal longa (LTR) a partir de um retrovírus ou lentivírus, fusões de dois promotores, fusões de duas porções de promotores, promotores MMLV LTR, promotores HIV LTR, promotores MCMV LTR, EF1a, MND, CMV, SV40, PGK1,

Ubc, beta-actina, CAG, promotores induzíveis de pequenas moléculas, promotores induzíveis de tetraciclina, promotores condicionais de pequenas moléculas, sistemas promotores condicionais Cre-LoxP, sistemas de promotores condicionais Flp-FRT e sistema promotores condicionais de tamoxifeno. Os promotores exógenos podem ser constitutivos. Os promotores exógenos podem ser induzíveis, tal como induzíveis por uma molécula pequena (por exemplo, tetraciclina e derivados). Os promotores exógenos podem ser condicionais, tal como promotores que são ativos após rearranjos genômicos (por exemplo, sistemas Cre-LoxP e FLP-Frt). Os promotores exógenos podem ser dependentes do tipo de célula, isto é, apenas expressão direta em populações de células particulares. Os promotores exógenos podem ser de mamíferos, inclusive humanos. Os promotores exógenos podem ser virais.

[0299]As sequências exógenas podem ter uma sequência ligante. Por exemplo, uma sequência exógena pode ter uma sequência ligante que liga pelo menos uma porção de um gene a uma sequência endógena após a integração em um lócus alvo genômico endógeno. Um ligante pode codificar uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que um polipeptídeo codificado apenas por pelo menos uma porção do gene é produzido como um polipeptídeo separado. Exemplos de peptídeos cliváveis incluem um sítio de clivagem de furina e um sítio de clivagem de TEV. Em alguns exemplos, um ligante clivável inclui uma sequência de polipeptídeo que promove ainda a clivagem, tal como ligante flexível (por exemplo, uma sequência Gly-Ser-Gly). Em outro exemplo, um ligante pode codificar um elemento de salto do ribossomo 2A, por exemplo, T2A, E2A, P2A e F2A, de modo que um polipeptídeo codificado apenas por pelo menos uma porção do gene seja produzido como um polipeptídeo separado durante a tradução. Em outro exemplo, um ligante pode codificar um lócus interno de entrada do ribossomo (IRES), de modo que um polipeptídeo codificado apenas por pelo menos uma porção do gene seja produzido

como um polipeptídeo separado durante a tradução. Um ligante pode codificar um acceptor de “splice”, tal como um acceptor de “splice” viral.

[0300]O modelo de HR pode codificar um polinucleotídeo exógeno que é códon divergente de uma sequência de nucleotídeo endógena. Por exemplo, uma sequência códon divergente pode ser otimizada para promover uma expressão aumentada de uma proteína codificada. Uma sequência códon divergente pode ser códon divergente para remover elementos de sequência que podem levar à instabilidade genômica, tal como elementos de sequência que promovem a recombinação (por exemplo, Sequências Sinal de Recombinação).

[0301]Sistemas Multicistrônicos e Multipromotores

[0302]As sequências exógenas podem ser multicistrônicas, isto é, mais de um polipeptídeo separado pode ser produzido a partir de um único transcrito de mRNA. As sequências exógenas podem ser multicistrônicas através do uso de vários ligantes, por exemplo, uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um primeiro gene pode ser ligada a uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um segundo gene, tal como em uma orientação de primeiro gene: ligante: segundo gene de 5' a 3'. Por exemplo, um ligante pode codificar uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que são produzidos polipeptídeos separados codificados pelo primeiro e segundo gene. Exemplos de peptídeos cliváveis incluem um sítio de clivagem de furina e um sítio de clivagem de TEV. Em alguns exemplos, um ligante clivável inclui uma sequência de polipeptídeo que promove ainda a clivagem, tal como um ligante flexível (por exemplo, uma sequência Gly-Ser-Gly). Em outro exemplo, um ligante pode codificar um elemento de salto do ribossomo 2A, por exemplo, T2A, E2A, P2A e F2A, de modo que polipeptídeos separados codificados pelo primeiro e segundo gene sejam produzidos durante a tradução. Em outro exemplo, um ligante pode codificar um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES),

de modo que polipeptídeos separados codificados pelo primeiro e segundo gene sejam produzidos durante a tradução. Um ligante pode codificar um acceptor de “splice”, como um acceptor de “splice” viral. Em geral, um sistema multicistrônico pode usar qualquer número ou combinação de ligantes, como os descritos acima, para expressar qualquer número de genes ou partes dos mesmos (por exemplo, uma sequência exógena pode codificar um primeiro, um segundo e um terceiro gene, cada um separado por ligantes de modo que sejam produzidos polipeptídeos separados codificados pelo primeiro, segundo e terceiro genes. Em sistemas multicistrônicos que usam múltiplos dos mesmos ligantes, os ligantes podem codificar a mesma sequência de polipeptídeo, mas têm sequências de nucleotídeo códon divergentes.

[0303]As sequências exógenas podem ter vários quadros de leitura abertos (ORFs), isto é, mais de um transcrito de mRNA separado pode ser produzido a partir da sequência exógena. As sequências exógenas podem ter vários ORFs através do uso de múltiplos promotores, por exemplo, um primeiro promotor pode ser operacionalmente ligado a uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um primeiro gene e um segundo promotor pode ser operacionalmente ligado a uma sequência de nucleotídeo que codifica em pelo menos uma porção de um segundo gene. “Ligantes”, como aqui utilizado, pode se referir aos ligantes multicistrônicos descritos acima, aos promotores adicionais que estão operacionalmente ligados a ORFs adicionais descritos acima ou a polipeptídeos que ligam uma primeira sequência de polipeptídeo e uma segunda sequência de polipeptídeo.

[0304]Um segundo gene pode ser qualquer uma das sequências exógenas descritas aqui (consultar a seção Sequências Exógenas).

[0305]Reagentes Adicionais

[0306]Em alguns exemplos, as células modificadas (ou células a serem modificadas) podem ser colocadas em contato com (por exemplo, cultivadas com)

reagentes que promovem o reparo de HDR (isto é, aumentam as taxas de recombinação de homologia e / ou a eficiência), incluindo a promoção de reparo de HDR em relação a outras vias de reparo do DNA, tal como o NHEJ. Os reagentes que promovem o reparo de HDR incluem, mas não estão limitados a, ativadores de vias de reparo de recombinação homóloga, inibidores de vias de reparo de junção de extremidade não homóloga (NHEJ) ou combinações dos mesmos.

[0307]Em geral, as técnicas de modificação e edição de células aqui descritas podem ser tóxicas para (isto é, reduzir a viabilidade) das células modificadas. Assim, em alguns casos, pode ser vantajoso para eficiências gerais de edição, particularmente eficiências de edição de HR, fornecer reagentes que são capazes de aumentar a viabilidade da célula modificada. Os reagentes que são capazes de aumentar a viabilidade podem incluir inibidores das vias de detecção de ácido nucleico, tal como inibidores das vias de detecção de ácido nucleico TLR9, vias de detecção de ácido nucleico AIM2, vias de detecção de ácido nucleico IFI16, vias de detecção de ácido nucleico cGAS, e vias de detecção de ácido nucleico citosólico. Sem desejar estar vinculado à teoria, esses inibidores das vias de detecção de ácido nucleico podem reduzir as respostas celulares (por exemplo, vias de sinalização imune inata) que respondem aos vários ácidos nucleicos introduzidos (por exemplo, entregues) (por exemplo, modelos de HR e sgRNAs) e a redução das respostas celulares pode melhorar a viabilidade. Em um exemplo ilustrativo, um reagente capaz de aumentar a viabilidade pode ser um antagonista de oligonucleotídeo, tal como o antagonista A151 que tem o TTAGGG de repetição em tandem. Os reagentes capazes de aumentar a viabilidade podem incluir outros fatores além dos fornecidos na cultura de células, tal como modificar as células T para expressar fatores de viabilidade (por exemplo, um fator que promove a sobrevivência celular), por exemplo, os descritos em mais detalhes por Portt, e outros (Biochim Biophys Acta. Jan 2011; 1813 (1): 238-59), aqui incorporado por referência por tudo que descreve.

[0308]Células T Modificadas

[0309]Em um aspecto particular, as células modificadas são células T modificadas. Em geral, as células T modificadas podem ser modificadas de modo a serem editadas genomicamente ou capazes de serem editadas genomicamente, em qualquer lócus alvo genômico endógeno. O lócus alvo genômico endógeno pode ser um lócus de TCR endógeno. Um lócus de TCR endógeno pode ser um lócus de TCR-alfa ou um lócus de TCR-beta. O lócus alvo genômico endógeno pode ser um lócus da via de sinalização imune, tal como um lócus PD-1, CTLA-4, BTLA, TIM3, LAG3 e VISTA.

[0310]Em geral, as células T modificadas podem ser modificadas de modo que sejam editadas genomicamente ou capazes de serem editadas genomicamente, para expressar qualquer gene exógeno de interesse. Por exemplo, um gene exógeno de interesse (“pelo menos uma porção de um gene”) pode incluir pelo menos uma porção de um gene de TCR, tal como um gene de TCR-alfa ou TCR-beta, ou parte do mesmo. Um gene de TCR pode incluir um gene de TCR-alfa e um gene de TCR-beta. Um gene de TCR-alfa e um gene de TCR-beta podem ser ligados por um ligante (ver ligantes descritos acima em sistemas multicistrônicos). Um gene de TCR pode incluir um gene de TCR-gama ou TCR-delta, ou uma porção do mesmo. Um gene de TCR pode incluir um gene de TCR-gama e um TCR-delta. Um gene de TCR pode incluir, mas não está limitado a, um TCR murinizado, um TCR humanizado, um TCR de domínio trocado, um TCR com mutação pontual, um TCR manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR códon-otimizado para expressão em humanos, uma TCR de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA, uma sequência de região variável do gene de TCR, um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou um TCR de cadeia única. Um gene de TCR pode incluir pelo menos uma porção de: um TCR murinizado, um TCR humanizado, um TCR de domínio trocado, um TCR com mutação pontual,

um TCR manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR códon-otimizado para expressão em humanos, um TCR de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade de RNA, uma sequência de região variável do gene de TCR, um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou um TCR de cadeia única. Um gene de TCR pode incluir um gene de TCR manipulado para demonstrar uma associação maior com uma segunda sequência de polipeptídeo TCR exógena em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena, como uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa e uma sequência de polipeptídeo TCR-beta manipulada para demonstrar uma maior associação entre si em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena.

[0311]Em um aspecto particular, uma célula T modificada tem: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa; b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma primeira sequência de polipeptídeo ligante; d) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência de polipeptídeo ligante. Em um exemplo, as sequências de polipeptídeo codificadas estão em um orientação de ligante: TCR-alfa: segundo ligante: TCR-beta do N terminal ao C terminal. Em um exemplo, as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-beta: segundo ligante: TCR-alfa do N terminal ao C terminal.

[0312]Um gene de TCR pode ser um TCR (por exemplo, um construto de TCR-alfa e TCR-beta ligados) que reconhece um epítopo específico da doença apresentado em um MHC. Um gene de TCR pode ser um TCR (por exemplo, uma cadeia de TCR-alfa e uma de TCR-beta) que reconhece um epítopo específico de câncer apresentado em um alelo MHC, tal como um TCR que reconhece um neoepítopo específico de câncer (neoantígeno) apresentado em um alelo de MHC. O reconhecimento de TCR, em geral, refere-se a um TCR que liga um complexo

antígeno-MHC com afinidade suficiente, de modo que a ligação de TCR, ou combinação de múltiplas ligações de TCRs (isto é, agrupamento de TCRs), pode levar a uma resposta imune. Métodos e composições para identificar TCRs que reconhecem neoepítopos, especificamente neoepítopos específicos para pacientes, são descritos em mais detalhes no documento WO2018165475, aqui incorporado por referência em sua totalidade. Além disso, métodos úteis para identificar se células T específicas de neoantígenos estão presentes em uma amostra de paciente podem ser usados em combinação com os métodos aqui descritos, por exemplo, conforme descrito na Publicação US No. 2017/0003288 e PCT/US17/59598, aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

[0313]Em geral, uma célula T modificada pode ser qualquer célula T. Uma célula T modificada pode ser uma célula T humana. Uma célula T modificada pode ser uma célula T derivada de seres humanos, tal como uma célula T imortalizada ou uma célula T desenvolvida ex vivo (por exemplo, uma célula desenvolvida para a cultura de órgãos tímicos). Uma célula T modificada pode ser um linfócito T citotóxico (CTL), uma célula T CD8+, uma célula T CD4+, uma célula T primária, uma célula T de tumor infiltrante ou uma célula T manipulada. Uma célula T modificada pode ser uma célula T reguladora (Treg), uma célula T auxiliar (por exemplo, uma célula Th1, uma célula Th2 ou uma célula Th17), uma célula T alfa-beta ou uma célula T gama-delta. Uma célula T modificada pode ser uma célula T virgem, uma célula T de memória de células-tronco, células T de memória central, uma célula T de memória de transição, uma célula T de memória efetora, ou uma célula T efetora. Uma célula T modificada pode ser uma célula T primária.

[0314]Uma célula T modificada, tal como uma célula T primária, pode ser isolada a partir de um indivíduo, tal como um indivíduo que tem ou é suspeito de ter câncer. Os métodos de isolamento de células T são conhecidos dos versados na técnica e incluem, entre outros, técnicas de classificação com base na expressão do

marcador da superfície celular, tal como classificação de FACS, técnicas de isolamento positivo (por exemplo, CD4 e / ou CD8 MACS®) e isolamento negativo (por exemplo, CD3 MACS®), isolamento magnético e combinações dos mesmos. As fontes usadas para isolar células T incluem, mas não estão limitadas a, sangue, PBMCs, sangue coletado por aférese (por exemplo, um leukopak), e tecidos de tumor.

[0315]Uma célula T modificada pode ser uma célula T cultivada, tal como uma célula T cultivada ex vivo. Uma célula T modificada pode ser uma célula T primária cultivada ex vivo, tal como uma célula T primária isolada a partir de um indivíduo. As células T cultivadas podem ser cultivadas com uma ou mais citocinas. As células T cultivadas podem ser cultivadas com IL2, IL7, IL15 ou combinações das mesmas. Por exemplo, uma célula T cultivada pode ser cultivada com IL2. Em outro exemplo, uma célula T cultivada pode ser cultivada com IL7 e IL15. Em outro exemplo, uma célula T cultivada pode ser cultivada com IL2, IL7 e IL15. Em outro exemplo, uma célula T cultivada pode ser cultivada com IL7 e IL15 na ausência de (substancialmente livre de) IL2. Em outro exemplo, uma célula T cultivada pode ser cultivada apenas com IL21 em combinação com IL2, IL7 e / ou IL15 (por exemplo, em combinação com IL2, em combinação com IL7, em combinação com IL15 ou em combinação com IL7 e IL15). As células T cultivadas podem ser estimuladas, por exemplo, cultivadas com uma ou mais moléculas estimuladoras (por exemplo, um agonista de receptor). As moléculas estimuladoras incluem, mas não estão limitadas a, CD3 e CD28. Em um exemplo, uma célula T cultivada pode ser estimulada por CD3 (uma célula T estimulada por CD3). Em outro exemplo, uma célula T cultivada pode ser estimulada por CD28 (uma célula T estimulada por CD28). Em outro exemplo, uma célula T cultivada pode ser estimulada por CD3 e CD28 (uma célula T estimulada por CD3 e CD28). As moléculas estimuladoras podem ser imobilizadas em uma superfície, tal como a superfície de uma placa (ligada à placa) ou a superfície de uma microesfera (ligada à microesfera).

[0316]Em um exemplo ilustrativo, uma célula T modificada pode ser uma célula T primária editada genomicamente para expressar um TCR que reconhece um epítopo específico (isto é, antígeno), tal como um antígeno tumoral, um neoantígeno, um neoantígeno tumoral, um antígeno viral, fosfo-antígeno, antígeno bacteriano, antígeno microbiano, ou combinações dos mesmos.

[0317]Em um exemplo ilustrativo, uma célula T modificada pode ser uma célula T primária editada genomicamente para expressar um TCR que reconhece um epítopo específico de câncer, tal como um TCR que reconhece um neoepítopo específico de câncer (neoantígeno), apresentado em um alelo de MHC. Como aqui utilizado, o termo “neoantígeno” é um antígeno que tem pelo menos uma alteração que o distingue do antígeno de origem de ocorrência natural correspondente, por exemplo, via mutação em uma célula tumoral ou modificação pós-tradução específica para uma célula tumoral. Um neoantígeno pode incluir uma sequência de polipeptídeo ou uma sequência de nucleotídeo. Uma mutação pode incluir uma substituição de deslocamento de quadro ou sem deslocamento de quadro, “missense” ou sem sentido, alteração no sítio de “splice”, rearranjo genômico ou fusão de genes, ou qualquer alteração genômica ou de expressão que dê origem a um neoORF. Uma mutação também pode incluir uma variante de “splice”. As modificações pós-tradução específicas para uma célula tumoral podem incluir fosforilação aberrante. As modificações pós-tradução específicas de uma célula tumoral também podem incluir um antígeno spliced gerado por proteassoma (ver Liepe e outros, A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. 21 de outubro de 2016; 354 (6310): 354 a 358.) Um neoantígeno pode ser selecionado analisando dados de sequências tumorais, virais ou bacterianas de um indivíduo para identificar uma ou mais mutações somáticas, tal como analisando dados de sequenciamento usando um algoritmo preditivo in silico. Os algoritmos preditivos podem ser um algoritmo de ligação ao MHC para prever a ligação entre o neoantígeno e um alelo de

MHC de um indivíduo.

[0318]Em outro exemplo ilustrativo, uma célula T modificada pode ser uma célula T primária isolada a partir de um indivíduo e editada genomicamente para expressar um TCR que reconhece um epítopo específico de câncer, tal como um TCR que reconhece um neoepítopo específico de câncer (neoantígeno), apresentado em um alelo de MHC do indivíduo.

[0319]Em outro exemplo ilustrativo, uma célula T modificada pode ser uma célula T primária isolada a partir de um indivíduo e editada genomicamente para expressar um TCR que reconhece um epítopo específico de câncer, tal como um TCR que reconhece um neoepítopo específico de câncer (neoantígeno), previsto como estando presente em um alelo de MHC do indivíduo. Os métodos de predição de apresentação de MHC são conhecidos dos versados na técnica e incluem, entre outros, a identificação de neoantígenos por meio da combinação de dados de sequenciamento com espectrometria de massas e predição de apresentação de MHC (por exemplo, Publicação US No. 2017/0199961, aqui incorporada por referência por tudo o que descreve), e combinando dados de sequenciamento com predição de afinidade de ligação ao MHC (por exemplo, Patente US 9.115.402, aqui incorporada por referência por tudo que descreve).

[0320]Em outro exemplo ilustrativo, uma célula T modificada pode ser uma célula T primária que é alogênica com referência a um indivíduo e editada genomicamente para expressar um TCR que reconhece um epítopo específico de câncer, tal como um TCR que reconhece um neoepítopo específico de câncer (neoantígeno), apresentado em um alelo de MHC do indivíduo. A célula T alogênica pode ser do tipo HLA e combinada com um indivíduo (compatível com HLA), como nos exemplos em que é desejada uma redução na imunogenicidade como resultado da administração de uma célula T modificada. A tipagem do antígeno leucocitário humano (HLA) pode ser determinada a partir de uma amostra de tumor ou de sangue

do paciente. Os HLAs comumente encontrados na população humana também podem ser incluídos em algoritmos de predição de neoantígenos, tal como o HLA-A * 02, 24, 01; HLA-B * 35, 44, 51; DRB1 * 11, 13, 07 em caucasianos, HLA-A * 02, 03, 30; HLA-B * 35, 15, 44; DRB1 * 13, 11, 03 em afro-brasileiros e HLA-A * 24, 02, 26; HLA-B * 40, 51, 52; DRB1 * 04, 15, 09 em asiáticos. O pareamento específico dos alelos de HLA também pode ser usado. Os alelos comuns encontrados na população humana são descritos mais detalhadamente por Bardi e outros (Rev Bras Hematol Hemoter. 2012; 34 (1): 25 a 30), aqui incorporado por referência por tudo que descreve. As informações de HLA podem ser utilizadas em conjunto com sequências de peptídeo de neoantígenos putativos identificados em um algoritmo preditivo para ligação ao MHC, conforme descrito em mais detalhes por Fritsch e outros, 2014, Cancer Immunol Res. 2: 522 a 529, cujo conteúdo completo é aqui incorporado por referência.

[0321]Células Primárias Modificadas

[0322]Em um aspecto particular, células modificadas são células primárias modificadas. Em geral, as células primárias modificadas podem ser modificadas de modo a serem editadas genomicamente ou capazes de serem editadas genomicamente, em qualquer lócus alvo genômico endógeno. Em geral, as células primárias modificadas podem ser modificadas de modo a serem editadas genomicamente ou capazes de serem editadas genomicamente, para expressar qualquer gene exógeno de interesse.

[0323]Em geral, uma célula primária modificada pode ser qualquer célula primária. As células primárias exemplificativas incluem células-tronco, células-tronco humanas, células-tronco embrionárias, e células imunes (por exemplo, células hematopoiéticas). Exemplos de células imunes incluem, mas não estão limitadas a células B, células T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células exterminadoras naturais (NK). Uma célula imune pode ser uma célula NK. Uma célula imune pode ser uma célula NK-T. As células imunes podem incluir células do sistema

imunológico adaptativo e / ou sistema imunológico inato. As células-tronco, incluindo células-tronco humanas, podem ser células-tronco hematopoiéticas.

[0324]Uma célula primária modificada pode ser uma célula primária humana. Uma célula primária modificada pode ser uma célula primária infiltrada em tumor ou uma célula primária manipulada. Uma célula primária modificada pode ser uma célula T primária. Uma célula primária modificada pode ser uma célula-tronco hematopoiética (HSC). Uma célula primária modificada pode ser uma célula extermadora natural. Uma célula primária modificada pode ser qualquer célula somática.

[0325]Uma célula primária modificada pode ser isolada a partir de um indivíduo, tal como um indivíduo que tem ou é suspeito de ter câncer. Os métodos de isolamento de células primárias são conhecidos dos versados na técnica e incluem, entre outros, técnicas de classificação com base na expressão do marcador da superfície celular, tal como classificação de FACS, técnicas de isolamento positivo e isolamento negativo, isolamento magnético, e combinações dos mesmos.

[0326]Uma célula primária modificada pode ser uma célula primária cultivada, tal como uma célula primária cultivada ex vivo. Uma célula primária modificada pode ser uma célula primária cultivada ex vivo, tal como uma célula primária isolada a partir de um indivíduo. As células primárias cultivadas podem ser cultivadas com uma ou mais citocinas.

[0327]Métodos de Edição de Células Dirigida por Reparo de Homologia

[0328]Em um aspecto, são fornecidos métodos para modificar geneticamente uma célula.

[0329]Um método para modificar geneticamente uma célula pode incluir fornecer qualquer um dos modelos de HR aqui descritos, fornecer qualquer uma das composições de nuclease aqui descritas, colocar qualquer uma das células aqui descritas (por exemplo, uma célula T, uma célula primária, um HSC, ou uma célula

NK) em contato com o modelo de HR e a composição de nucleasse, e entregar o modelo de HR e a composição de nuclease à célula, particularmente por meios de entrega que não a entrega mediada por vírus. A etapa de contato pode ser menor do que 60 minutos, menor do que 45 minutos, menor do que 30 minutos, menor do que 20 minutos, menor do que 15 minutos, menor do que 10 minutos ou menor do que 5 minutos ou menor do que 1 minuto entre o contato da célula com o modelo de HR e a composição de nuclease e a etapa de entrega. Os meios de entrega podem incluir qualquer um dos métodos descritos para entrega de sistemas mediados por CRISPR aqui descritos, tais como os métodos para entrega de complexos RNP aqui descritos. Como descrito acima, vários modelos de HR e / ou composições de nuclease podem ser entregues a uma célula, tal como entregando vários modelos de HR e / ou composições de nuclease a uma célula simultaneamente.

[0330]Sem desejar estar vinculado à teoria, em geral (e como discutido no contexto da pureza do modelo de HR), as impurezas e contaminantes introduzidos durante o processo de edição podem levar a uma diminuição na eficiência de edição da célula modificada e / ou viabilidade das células modificadas. Por exemplo, meios residuais a partir de células em cultura podem introduzir impurezas e contaminantes no processo de edição. Assim, um método para modificar geneticamente uma célula pode incluir etapas realizadas para minimizar ou eliminar meios residuais.

[0331]Em um exemplo ilustrativo, um método para modificar geneticamente uma célula T primária humana (por exemplo, uma célula T isolada a partir de um indivíduo humano) pode incluir fornecer um modelo de HR que codifica um TCR completo (tanto um TCR-alfa quanto um TCR-beta), um complexo CRISPR RNP capaz de ter como alvo um lócus de TCR (por exemplo, um lócus constante de TCR-alfa), e entregar o modelo de HR e o complexo de RNP à célula T usando eletroporação.

[0332]Também são fornecidos métodos para que possam produzir

populações de células modificadas, tal como qualquer uma das populações modificadas de células aqui descritas.

[0333]Método de Tratamento

[0334]Em um aspecto, métodos de tratamento também são fornecidos. Por exemplo, são fornecidos métodos de tratamento de indivíduos com câncer. Em outro exemplo, os genes podem ser corrigidos (por exemplo, substituídos, também conhecido como terapia genética ou terapia de substituição genética), tal como substituir um gene não funcional por um gene funcional (por exemplo, HSCs para hemoglobinopatias). Os ditos métodos da invenção incluem administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de células modificadas, tal como células editadas genomicamente (por exemplo, células T editadas genomicamente). As células modificadas podem ser formuladas em composições farmacêuticas. Estas composições podem compreender, além de uma ou mais das células modificadas, um excipiente, carreador, tampão, estabilizador ou outro material farmaceuticamente aceitável bem conhecido dos versados na técnica. Esses materiais devem ser não tóxicos e não devem interferir na eficácia do ingrediente ativo. A natureza precisa do carreador ou outro material pode depender da via de administração, por exemplo, intravenosa.

[0335]As células modificadas podem ser derivadas (por exemplo, isoladas) a partir do indivíduo ao qual está sendo administrado o tratamento (autólogo).

[0336]As células modificadas podem ser alogênicas com referência ao indivíduo a que está sendo administrado o tratamento. As células alogênicas modificadas podem ser compatíveis com HLA para o indivíduo que está recebendo o tratamento, como descrito acima.

[0337]As células modificadas podem ser administradas isoladamente ou em combinação com outros tratamentos, dependentes simultânea ou sequencialmente da condição a ser tratada.

[0338]Composições de Nucleotídeo

[0339]São aqui descritas sequências de polipeptídeo e de ácidos nucleicos de genes úteis para a invenção, por exemplo, genes, vetores, sequências exógenas, construtos de expressão, modelos de HR. As sequências de polipeptídeo e de ácido nucleico úteis para a invenção são pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou pelo menos 99,5% idênticas às sequências aqui descritas ou aqui referidas por um número de acesso ao banco de dados. As sequências de polipeptídeo e de ácido nucleico úteis para a invenção podem ser 100% idênticas às sequências aqui descritas ou aqui referidas por um número de acesso ao banco de dados.

[0340]O termo “identidade percentual”, no contexto de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos, refere-se a duas ou mais sequências ou subsequências que têm uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos iguais, quando em comparados e alinhados para correspondência máxima, conforme medido usando um dos algoritmos de comparação de sequências descritos abaixo (por exemplo, BLASTP e BLASTN ou outros algoritmos disponíveis para versados na técnica) ou por inspeção visual. Dependendo da aplicação, a “identidade” percentual pode existir em uma região da sequência que está sendo comparada, por exemplo, em um domínio funcional ou, alternativamente, em todo o comprimento das duas sequências a serem comparadas. Para comparação de sequências, normalmente uma sequência atua como uma sequência de referência com a qual as sequências de teste são comparadas. Ao usar um algoritmo de comparação de sequências, as sequências de teste e de referência são inseridas em um computador, as coordenadas de subsequência são designadas, se necessário, e os parâmetros do programa do algoritmo de sequência são designados. O algoritmo de comparação de sequências calcula a identidade percentual de sequências para a(s) sequência(s) de teste em relação à sequência de

referência, com base nos parâmetros de programa designados. O alinhamento ideal de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), pelo método de busca por similaridade de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), por implementações computadorizadas desses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA em Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) ou por inspeção visual (ver geralmente Ausubel e outros). Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a identidade percentual e similaridade de sequência é o algoritmo BLAST, descrito por Altschul e outros, *J. Mol. Biol.* 215: 403 a 410 (1990). O software para realizar análises BLAST está disponível ao público no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (<www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

[0341]Em um aspecto, são fornecidas composições de nucleotídeo para uso em dirigir a recombinação homóloga em um lócus alvo genômico endógeno, tal como qualquer um dos modelos de HR aqui descritos.

[0342]Em um exemplo, as composições de nucleotídeo para uso em dirigir a recombinação homóloga em um lócus alvo genômico endógeno (isto é, um modelo de HR) compreendem: a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene; b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um lócus alvo genômico endógeno; e c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do lócus alvo genômico endógeno, em que pelo menos uma porção do gene tem 100 bases de comprimento, todas as sequências de nucleotídeo estão em um único polinucleotídeo, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do lócus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no lócus alvo genômico endógeno, e a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é orientada de modo que

pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa após a integração da composição no lócus alvo genômico endógeno. A composição de nucleotídeo pode ser circular.

[0343]EXEMPLOS

[0344]Abaixo estão exemplos de modalidades específicas para executar a presente invenção. Os exemplos são oferecidos apenas para fins ilustrativos e não são destinados a limitar o escopo da presente invenção de forma alguma. Esforços foram feitos para garantir a precisão em relação aos números e sequências utilizados (por exemplo, quantidades, temperaturas, etc.), mas alguns erros e desvios experimentais devem, é claro, ser permitidos.

[0345]A prática da presente invenção empregará, a menos que indicado de outra forma, métodos convencionais de química de proteínas, bioquímica, técnicas de DNA recombinante e farmacologia, dentro dos conhecimentos da técnica. Tais técnicas são explicadas por completo na literatura. Ver, por exemplo, T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., edição atual); Sambrook, e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^a Edição, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick e N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edição (Easton, Pensilvânia: Mack Publishing Company, 1990); Carey e Sundberg Advanced Organic Chemistry 3^a ed. (Plenum Press) Vols A e B (1992).

[0346]Exemplo 1: Métodos e materiais para a edição de células T usando CRISPR

[0347]Os métodos e materiais usados para incorporar genes de interesse (isto é, “em uma porção de um gene”) em um lócus alvo genômico endógeno e para analisar os mesmos são descritos abaixo.

[0348]Células T

[0349]PBMCs foram isoladas do sangue (por exemplo, um leukopak coletado por aférese) seguindo um método padrão de isolamento Ficoll. As PBMCs isoladas foram congeladas em alíquotas seguindo protocolos padrão. Como parte do protocolo padrão, as células mononucleares do sangue periférico humano congeladas (PBMCs) foram descongeladas e cultivadas com meio (TexMACS, soro AB humano a 3%, com citocinas) como parte do protocolo padrão de edição de genes. Em variações do protocolo, foram adquiridas PBMCs congeladas (AllCells). No dia seguinte, as células T CD8 e CD4-positivas foram enriquecidas por seleção positiva usando microesferas magnéticas (Miltenyi) seguindo o protocolo do fabricante como parte do protocolo padrão de edição de genes. Em variações do protocolo, as células foram enriquecidas usando a seleção negativa de CD3 ou positiva de CD62L, como indicado abaixo. As células enriquecidas foram estimuladas com TransAct (reagente CD3 / CD28, Miltenyi), usadas por recomendação do fabricante na relação de 1:17,5 por 48 a 72 horas antes do procedimento de eletroporação (ver abaixo) e cultivadas com meio (TexMACS, soro humano a 3% contendo 12,5 ng / mL de IL-7 e IL-15 cada) e como parte do protocolo padrão de edição de genes.

[0350]Onde é indicado o isolamento de PBMCs a partir do paciente / doador, um leukopak de células foi coletado por aférese do paciente. O leukopak foi então congelado e subsequentemente descongelado, conforme necessário, como parte do protocolo padrão de edição de genes, ou em variações do protocolo mantido a 2 a 8° C (fresco), como indicado. No dia seguinte, as células T CD8 e CD4-positivas foram enriquecidas por seleção positiva usando a plataforma Prodigy (Miltenyi). As células enriquecidas foram cultivadas como acima.

[0351]Modelos de Recombinação Homóloga (HR)

[0352]Nanoplasmids™ (Nature Technology) foram usados conforme observado (modelos de HR denotados como "NTC"). Nanoplasmid™ é uma marca comercial da Nature Technology Corp. Os vetores de seleção e as linhagens de

células de RNA-OUT livres de antibióticos são cobertos pelo Pedido de Patente Mundial WO2008153733 e pelas patentes equivalentes americana, europeia e australiana: US 2010/0303859; EP2333091; e AU 2008262478, respectivamente, aqui incorporadas por referência em sua totalidade por tudo que descrevem. Os vetores e linhagens de células Nanoplasmid™ são adicionalmente cobertos pelas seguintes patentes mundiais sob o Tratado de Cooperação de Patentes: PCT/US 13/000259; PCT/US 13/00067; e PCT/US 13/00068, aqui incorporados por referência em sua totalidade por tudo que descrevem.

[0353]Também foram utilizados plasmídeos padrão contendo uma origem de replicação PBR322 derivada de um vetor pUC57 e um marcador de resistência a antibióticos de Canamicina (Kan) (modelos de HR denotados como “pUCu”). As sequências estranhas foram removidas, exceto o marcador de resistência a antibióticos e a origem da replicação.

[0354]Onde indicado, o modelo de HR purificado foi adquirido (Nature Technology) ou purificado “internamente” usando técnicas de purificação de DNA padrão seguindo os protocolos do fabricante (Maxi kit, Macherey Nagel).

[0355]Os modelos de HR utilizados estão descritos na Tabela 4. A menos que indicado de outra forma, as sequências fornecidas incluem os modelos de HR completos com braços de homologia, cassete de genes e esqueleto do plasmídeo.

[0356]Tabela 4: Sequências de modelos de reparo homólogo

NTC9385R-TRAC(1k)_P2A.ZsGreen.f-P2A.LNGFRt.BGHpA (SEQ ID NO: 8)
CCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTGGCTTGTGCCACAACCGTTAACCTT AAAAGCTTAAAGCCTATATATTCTTTCTTATAAAACTAAACCTTAG AGGCTATTAAAGTTGCTGATTATTAATTATTGTTCAAACATGAGAGCTTA GTACGTGAAACATGAGAGCTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAG CCATGAGGGTTAGTCGTTAACATGAGAGCTTAGTACGTTAACATGAGAG CTTAGTACGTACTATCAACAGGTTGAAGTCTGATCCACGTTGTGGTAGAATT GGTAAAGAGAGTCGTGAAATATCGAGTTGCACATCTGTTGTCTGATTATT GATTTTGCGAAACCATTGATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTAACCTT AATGATTTGATAAAATCATTAGGTACCACTAAAAACACAAAATCCTACGG AAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAGCCTCCAGCAGCTCCTGC TTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACTAGCACTCT ATCACGGCCATATTCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAAACTAACATTGTTGGTA

CTTTACAGTTATTAAATAGATGTTATGGAGAAGCTCTCATTCTTCAG
 AAGAGCCTGGCTAGGAAGGTGGATGAGGCACCATTCTTGCAGGTGAA
 ATTCCCTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATCGAGTA
 AACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTGATTATAGTTCAAACCT
 CTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTCCCACCTAATGC
 CAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGAGAC
 CACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTGCTTGCCTGGCCTTCCATGCC
 TGCCTTACTCTGCCAGAGTTATTGCTGGGTTTGAAGAAGATCCTATTAA
 ATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGT
 GGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTACTGAAATCATGGCCTTGGCCA
 AGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGG
 TTTCTAAGATGCTATTCCGTATAAGCATGAGACCCTGACTTGCCAGCCCC
 ACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGG
 GGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCCTGATCCTTGTCCCACAGA
 TATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTACCCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGT
 GACAAGTCTGTGCCTATTGAATTGGCTCCGGAGGCCACTAACCTCTCCCT
 GTTGAACACGGCTGGCGATGTTGAAGAAACCCCGGTCTATGGCCCAGTCC
 AAGCACGCCCTGACCAAGGAGATGACCATGAAGTACCGCATGGAGGGCTGC
 GTGGACGCCACAAGTCTGATCACCGGCGAGGGCATCGCTACCCCTTC
 AAGGGCAAGCAGGCCATCACCTGTGCCTGGAGGGGGCCCTTGCCC
 TTCGCCGAGGACATCTTGTCCGCCCTCATGTACGGCAACCGCGTGTCA
 CCGAGTACCCCCAGGACATCGTGGACTACTCAAGAACTCCTGCCCGCCGG
 ATACACCTGGGACCGCTCTTCTGTCAGGACGGCGCCGTGTCATCTGC
 AACGCCGACATCACCGTCAGCGTGGAGGAGAACTGCATGTACCAAGTCCA
 AGTTCTACGGCGTGAACCTCCCCCGACGGCCCCGTGATGAAGAAGATGAC
 CGACAACCTGGGAGCCCTCCTGCGAGAAGATCATCCCCGTGCCAAGCAGGG
 CATCTTGAAGGGCGACGTCAGCATGTACCTGCTGTCAGGACGGTGGCCG
 CTTGCGCTGCCAGTTGACACCGTGTACAAGGCCAAGTCCGTGCCGCAAG
 ATGCCCGACTGGCACTTCATCCAGCACAAGCTGACCCCGAGGACCGCAGC
 GACGCCAAGAACCAAGAAGTGGCACCTGACCGAGCACGCCATGCCCTCCG
 TCCGCCCTGCCCGGGCCAAGCGGGGAGCGGGGCCACCAACTCAGCCTG
 CTGAAGCAGGCCGGGAGCGTGGAGGAGAACCCCGCCCTATGGGGCAGG
 TGCCACCGGCCGCGCTATGGACGGGCCGCTGCTGCTGTTGCTGCTTCT
 GGGGGTGTCCCTGGAGGTGCCAAGGAGGCATGCCAACAGGCCTGTACAC
 ACACAGCGGTGAGTGCAAAAGCCTGCAACCTGGCGAGGGTGTGGCCA
 GCCTTGTGGAGCCAACCAGACCGTGTGAGCCCTGCCCTGGACAGCGTGAC
 GTTCTCGACGTGGTGGAGCGCGACCGAGCCGTGCAAGCCGTGCAACCG
 CGTGGGCTCCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGGAGGCCAGCACGCC
 TGTGCCGCTGCCCTACGGCTACTACCAGGATGAGACGACTGGCGCTGCG
 AGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTGGGCCCTGTTCTCTGCCAGG
 ACAAGCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGCCCGACGGCACGTATTCCGACG
 AGGCCAACCAACGTTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCG
 AGGCCAGCTCCCGAGTGCACACGCTGGGCCAGGCCAGTGCAGGAG
 ATCCCTGCCGTTGGATTACACGGTCCACACCCAGAGGGCTGGACAGCA
 CAGCCCCCAGCACCCAGGAGCCTGAGGGCACCTCCAGAACAGACCTCATAG
 CCAGCACGGTGGCAGGTGTTGACCAAGTGTAGGGCAGCTCCAGGCC
 TGGTACCCGAGGCACCACCGACAAACCTCATCCCTGTCTATTGCTCCATCCT
 GGCTGCTGTGGTTGTGGCTTGTGGCCTACATAGCCTCAAGAGGTAACCTC

GAGTGTGCCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGCCCCTCCCCGTGCCTT CCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTCCTAATAAAATGAGGAA ATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGG GGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGG ATGCGGTGGGCTCTATGGCGCGGCCGACCGATTGATTCTCAAACAAATG TGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAATGTGCTAGAC ATGAGGCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGGCCTGGAGCAACAAAT CTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACC TTCTCCCCAGCCCAGGTAAGGGAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCC TTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAA ACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCCCTTTT ACTAAGAAACAGTGAGCCTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAA AAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTC TCTCCAAC TGAGTCCCTGCCCTGCCTTGCCTAGACTGTTGCCCTTAC TGCTCTCTAGGCCTCATTCTAACGCCCTCTCAAGGTTGCCCTCCTTATTTC TCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTCCCAGCTCACTAACAGTCAGTCTCACGCAGTC ACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGT TGAAGTGGAGGAATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACC ATTCTAGTTGGGGAGCCATCTGTCAGCTGGAAAAGTCAAATAACTTCAG ATTGGAATGTGTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTCAGGACAAAA GTCAGGGAAAGGGCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATAACCAGCCCTACCA AGGGCAGGGAGAGGACCCATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAA GGAGAAGAGCAGCAGGATGAGTTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGTCACA GGGCCTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAGGCTAGC 	NTC9385R-TRAC(1k)DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO: 9)
CCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTGGCTTGTCCACAACCGTTAACCTT AAAAGCTTAAAAGCCTTATATATTCTTTTTCTTATAAAACTTAAACCTTAG AGGCTATTAAAGTGTGATTATATTAAATTATTGTTCAAACATGAGAGCTTA GTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAG CCATGAGGGTTAGTCGTTAACATGAGAGCTTAGTACGTTAACATGAGAG CTTAGTACGTACTATCAACAGGTTGAACGTGCTGATCCACGTTGTGGTAGAATT GGTAAAGAGAGTCGTAAAATATCGAGTTCGCACATCTGTTGTCTGATTATT GATTTTGGCGAAACCATTGATCATATGACAAGATGTATCTACCTTAACCTT AATGATTTGATAAAATCATTAGGTACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCAT GCTTGCATACTCTGCCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTCCACACCCCATG GACATTAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACT AAGGAAAAGCCTCCAGCAGCTCTGCTTGAGGGTGAAGGATAGACGCTG TGGCTCTGCATGACTCACTAGCACTCTACGGCCATATTCTGGCAGGGTCA GTGGCTCCAACATACATTGTTGGTACTTACAGTTATTAAATAGATGTTTAT ATGGAGAAGCTCTCATTCTTCTCAGAAGAGCCTGGCTAGGAAGGTGGATGA GGCACCATATTCAATTGCAAGGTGAAATTCTCTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTG ACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGCTAGACGCA GGTGTCTGATTATAGTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGT AATGTGATAGATTCCCCAACTTAATGCCAACATACCAATAACCTCCATTCTGC TAATGCCAGCCTAAGTTGGGAGACCCTCCAGATTCCAAGATGTACAGTT GCTTGTGGCCTTTCCATGCCCTGCCTTACTCTGCCAGAGTTATTG CTGGGGTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAGAATAAGCAGTATTATTAGT AGCCCTGCATTCAGGTTCCCTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACG	

TTCACTGAAATCATGGCCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCCTGTCCTG
 AGTCCCAGTCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTATTCCCGTATAAA
 GCATGAGACCGTGACTTGCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACT
 GGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTC
 CTAACCCTGATCCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGT
 ACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCATTGAAATTC
 GGCTCCGGAGCCACTAACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAG
 AAAACCCCGGTCTATGGCCACCGGCTCTAGAACAGCCTGCTGCTCGCTT
 TGGCCTGCTCTGCCATGTCTCCAAGAGGGATCTGCCGGCATTACACAG
 GCCCCTACATCTCAGATTCTGGCCGCTGGCAGACGGATGACACTGAGATGCA
 CCCAGGACATGAGACACAACGCCATGTACTGGTATCGGCAGGACCTGGCCT
 GGGACTGAGACTGATCCACTACTCTAATACCGCCGGCACCACCGGAAAGGC
 GAAGTGCCTGATGGCTACTCCGTGTCAGGCCAGACCTCCGTGTACTTCTGTGCCAG
 TGACACTGGCCTCTGCTGTGCTAGCCAGACCTCCGTGTACTTCTGTGCCAG
 CAGCCTGTCCTTGGCACCGAGGCCTTTGGCCAAGGCACCAACTCGTGTGTCTGGC
 GTGGTGGAAAGATCTGAACAAAGTGTCCCTCCAGAGGTGGCGTGTGAGC
 CTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGC
 TACCGGCTTCTTCCCCGATCACGTGGAACGTCTTGGTGGGTAACGGCAA
 GAGGTGCACAGCGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGCCC
 GCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCGTCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCA
 CCTTCTGGCAGAACCCCCAGAAACCAACTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTACGG
 CCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGAACAGAGGCCAACGCTGTGACACA
 GATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTACCGCGTG
 TCATACCAGCAGGGCGTGCTGTGCTGCCACCCTGTATGAGATCCTGCTCG
 GCAAGGCCACACTGTACGCTGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGCTGATGGCTAT
 GGTCAAGCGGAAGGACTTCCGGGCCAAGCGGGCAGCGCGGCCACCAACTT
 CAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCAGCTGGAGGAGAACCCCCGGCCCTATGGC
 CACAGGCAGCAGAACATCTGCTGTGCTGGCCTTGGACTGCTGTCTGCC
 TGGCTGCAAGAGGCTTCCGGCCAGCAGAACAGAGGTGGAACAGAACAGCG
 CCTCTGAGCGTCCAGAAGGCCTATGCCAGCCTGAACACTGCACCTACAGCG
 ATAGAGGCAGCCAGAGCTTCTTGGTACAGACAGTACAGCGGCAAGAGGCC
 CGAGCTGATCATGTTCTACAGCAACGGCGACAAAGAGGAGGCCGGTT
 ACAGCCCAGCTGAACAAGGCCAGCCAATACGTGCTGTGATCAGAGATA
 GCCAGCCTAGCGACAGGCCACCTATCTGCGCCGTGAATTGGCG
 GAAAGCTGATCTTGGCCAGGGCACAGAGCTGAGCGTGAAGGCCAACATTCA
 GAACCCCGATCCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACAGCAAGAGCAGCGACAA
 GAGCGTGTGCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCAGAGC
 AAGGACAGCGACGTGTACATCAGCACAGAGCCGCTGGACATGCGGAGC
 ATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCTGGTCCAACAAGAGCGATTTCG
 CCTGCGCCAACGCCCTCAACAAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTCCA
 AGTCCTGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACA
 GACACCAACCTGAACCTCCAGAACCTGTCCGTGATCGGCTCCGCATCCTGC
 TGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCTGAGACTGTGGTCCAG
 CTGACTCGAGTGTGCCCTTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCC
 GTGCCCTCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGCCCTTCTAATAAAA
 TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTATTCTATTCTGGGGGGTG
 GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATG
 CTGGGGATGCGGTGGCTCATGGCGCGGCCGACCGATTGATTCTCAAA

CAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAATGTG
 CTAGACATGAGGTCTATGAGCTCAAGAGAACAGTGCTGGCCCTGGAGCA
 ACAAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAACAAACAGCATTATCCAGAA
 GACACCTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCT
 GTTCCTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATG
 TCTAAAACCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCC
 TCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTGTTCTGGCAGTCCAGAGAAATGACACG
 GGAAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCC
 TCAGTCTCTCCAAC TGAGTTCCCTGCCCTGCCCTTGCTCAGACTGTTGCC
 CCTTACTGCTCTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCCTCTCCAAGTTGCCCTCCCT
 TATTTCTCCCTGCTGCCAAAAAAATCTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACG
 CAGTCACTCATTACCCACCAACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCA
 GGTGTTGAAAGTGGAGGAATTAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAA
 GCACCATTCTAGTTGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGAAAAGTCAAATAA
 CTTCAGATTGGAATGTGTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTCAGG
 ACAAAAGTCAGGGAGGGCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATAACCAGCC
 CTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAAT
 GAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATGAGTTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGG
 GTCACAGGGCCTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAGGGATCCGGTGTGGAA
 AGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT
 GTCAGCAACCAGCTAGC

NTC9385R-TRAC(1k)DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 10)

CCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTGGCTTGTGTCACAACCGTTAACCTT
 AAAAGCTTAAAAGCCTTATATATTCTTTCTTATAAAACTTAAACCTTAG
 AGGCTATTAAAGTTGCTGATTATATTAAATTATTATTGTTCAAACATGAGAGCTTA
 GTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAG
 CCATGAGGGTTAGTCGTTAACATGAGAGCTTAGTACGTTAACATGAGAG
 CTTAGTACGTACTATCAACAGGTTGAACTGCTGATCCACGTTGTGGTAGAATT
 GGTAAAGAGAGTCGTAAAATATCGAGTCGCACATCTTGTGTGATTATT
 GATTTTGGCACCATTGATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTTAACCT
 AATGATTTGATAAAAATCATTAGGTACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCAT
 GCTTGCACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGACTTCCACACCCATG
 GACATTAAAACACAAACCTACGGAAACTGAAGAATGAGTCTCAGCACT
 AAGGAAAGCCTCCAGCAGCTCCTGCTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTG
 TGGCTCTGCATGACTCACTAGCACTCTACGGCCATATTCTGGCAGGGTCA
 GTGGCTCCAACTAACATTGTTGGTACTTTACAGTTATTAAATAGATGTTTAT
 ATGGAGAAGCTCTCATTTCTCAGAAGAGCCTGGCTAGGAAGGTGGATGA
 GGCACCATATTCAATTGCAAGGTGAAATTCTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTG
 ACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGCTTAGACGCA
 GGTGTTCTGATTATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGT
 AATGTGATAGATTCCCAACTTAATGCCAACATACCAAAACCTCCATTCTGC
 TAATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCCTCCAGATTCCAAGATGTACAGTT
 GCTTGCTGGCCTTTCCATGCCCTGCCTTACTCTGCCAGAGTTATATTG
 CTGGGGTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAAGT
 AGCCCTGCATTCAGGTTCTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACG
 TTCACTGAAATCATGGCCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCCTGTCCTG
 AGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTATTCCCGTATAAA
 GCATGAGACCGTGACTTGCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACT

GGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTC
 CTAACCCCTGATCCCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGT
 ACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTGAATT
 GGCTCCGGAGCCACTAACTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAG
 AAAACCCCGGTCTATGGCCACCGGCTCTAGAACAAAGCCTGCTGCTCGCTT
 TGGCCTGCTCTGCCATGTCTCCAAGAGGGATCTGCCGGCATTACACAG
 GCCCCTACATCTCAGATTCTGCCGCTGGCAGACGGATGACACTGAGATGCA
 CCCAGGACATGAGACACAACGCCATGTACTGGTATCGGCAGGACCTCGGCCT
 GGGACTGAGACTGATCCACTACTCTAATACCGCCGGCACCAACGGCAAAGGC
 GAAGTGCCTGATGGCTACTCCGTGTCAGGCCAATACCGACGACTTCCCAC
 TGACACTGGCCTTGCTGCTGCCAGCCTCCGTACTTCTGTGCTGAGC
 CAGCCTGTCCTTGGCACCGAGGCCTTTCGGCCAAGGCACAGACTGACC
 GTGGTGGAAAGATCTGAACAAAGTGTCCCTCAGAGGTGGCGTGTGAGC
 CTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGCTGGC
 TACCGGCTTCTCCCCGATCACGTGGAACTGTCTGGTGGCTAACGGCAA
 GAGGTGCACAGCGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTTGAAAGAACAGCCC
 GCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCCTGCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCA
 CCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTCAGATGCCAGGTCAGTTCTACGG
 CCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGAAAGAGAGCCAAGCCTGTGACACA
 GATCGTGTCTGCCAGGCCTGGGAGGCCAGAGCCATTGGCTTACCGCGTG
 TCATACCAGCAGGGCGTGCTGCTGCCACCACCTGTATGAGATCCTGCTCG
 GCAAGGCCACACTGTACGCTGTGCTGGTGTCTGGTGTGATGGCTAT
 GGTCAAGCGGAAGGACTTCCGGCCAAGCGGGCAGCGCGGCCACCAACTT
 CAGCCTGCTGAAGCAGGCCGCGACGTGGAGGAGAACCCGGCCCTATGGC
 CACAGGCAGCAGAACATCTCTGCTGCTGCCCTCGGACTGCTGTCTGCT
 TGGCTGCAAGAGGCTTCCGCCAGCAGAAAGAGGTGGAACAGAATAGCGGC
 CCTCTGAGCGTCCAGAAGGCCTATGCCAGCCTGAACCTACAGCG
 ATAGAGGCAGCCAGAGCTTCTGGTACAGACAGTACAGCGCAAGAGGCC
 CGAGCTGATCATGTTCATCTACAGCAACGGCGACAAAGAGGGACGGCGGTT
 ACAGCCCAGCTGAACAAGGCCAGCCAATACGTGTCCTGCTGATCAGAGATA
 GCCAGCCTAGCGACAGGCCACCTATCTGCGCCGTGAATTGGCGGG
 GAAAGCTGATCTTGGCCAGGGCACAGAGCTGAGCGTGAAGGCCAACATTCA
 GAACCCGATCCTGCTGTATCAGCTGCCGACAGCAAGAGCAGCGACAAG
 AGCGTGTGTTGTTCACCGATTGATTCTCAAACAAATGTCACAAAGTAAG
 GATTCTGATGTGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGA
 CTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTG
 CAAACGCCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTCCCCAGGCCA
 GGTAAAGGGCAGCTTGGCCTCGCAGGCTGTTCTGCTCAGGAATGG
 CCAGGTTCTGCCAGAGCTGCTGGCAATGATGTCATAAACCTCTTACTAAGAAACAGTG
 GGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCCCTTTTACTAAGAAACAGTG
 AGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAAATGACACGGAAAAAGCAGATGAAGAG
 AAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCTCCAAACTGAGTT
 CCTGCCTGCCTGCCCTTGCTCAGACTGTTGCCCTTAUTGCTCTTAGGCC
 TCATTCTAAGCCCCCTCTCCAAGTTGCCCTCCTTATTCTCCCTGCTGCCAA
 AAAATCTTCCCAGCTCACTAACAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAAACCCAC
 CAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAAGGTGTTGAAGTGGAGGAA
 TTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGG
 GAGCCCATCTGTCAGCTGGAAAAGTCCAAATAACTCAGATTGGAATGTGTT

TTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAGTCAGGGAGGG
 CTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGA
 GGACCCCTATAGAGGCCTGGGACAGGGAGCTCAATGAGAAAGGAGAAGAGCAG
 CAGGCATGAGTTGAATGAAGGAGGCAGGCCGGTCACAGGGCCTCTAGG
 CCATGAGAGGGTAGACAGGGATCCGGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG
 CAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGCTAGC
 NTC9385R-TRAC(1k)DTS_P2A.1G4.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO:
 11)

CCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTGGCTTGTGTCACAACCGTTAACCTT
 AAAAGCTTAAAGCCTTATATATTCTTTTTCTTATAAAACTTAAACCTTAG
 AGGCTATTAAAGTTGCTGATTATATTAAATTATTGTTCAAACATGAGAGCTTA
 GTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAG
 CCATGAGGGTTAGTCGTTAACATGAGAGCTTAGTACGTTAACATGAGAG
 CTTAGTACGTACTATCAACAGGTTGAACTGCTGATCCACGTTGTGGTAGAATT
 GGTAAAGAGAGTCGTGAAATATCGAGTCGACATCTTGTGTTGATTATT
 GATTTTGCGAAACCATTGATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTTAACCT
 AATGATTTGATAAAATCATTAGGTACCTGGTTGCTGACTATTGAGATGCAT
 GCTTGCATACTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGACTTCCACACCCCCATG
 GACATTAAAAACACAAAATCCTACGGAAACTGAAGAATGAGTCTCAGCACT
 AAGGAAAAGCCTCCAGCAGCTCCTGCTTGAGGGTAGAGGATAGACGCTG
 TGGCTCTGCATGACTCACTGACTCTATCACGGCCATATTCTGGCAGGGTCA
 GTGGCTCCAACATACTTGTGTTGGTACTTACAGTTATTAAATAGATGTTAT
 ATGGAGAACGCTCTCATTCTTCTCAGAACAGCCTGGCTAGGAAGGTGGATGA
 GGCACCATATTCACTTGAGGTGAAATTCTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTG
 ACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAACCGTAGTGCTGGGGCTAGACGCA
 GGTGTTCTGATTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGT
 AATGTGATAGATTCCCACCTTAATGCCAACATACCAAAACCTCCATTCTGC
 TAATGCCCAAGCCTAAGTGGGAGACCCTCAGATTCAAGATGTACAGTT
 GCTTGCTGGCCTTTCCATGCCTGCCTTACTCTGCCAGAGTTATATTG
 CTGGGGTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAGAATAAGCAGTATTATTAAAGT
 AGCCCTGCATTCAGGTTCCCTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCGTGAACG
 TTCACTGAAATCATGGCCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCCTGCCCTG
 AGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTATTCCCGTATAAA
 GCATGAGACCGTGACTTGGCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCTCACT
 GGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTC
 CTAACCCCTGATCCTCTTGTCCCCACAGATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGT
 ACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCATTGAAATT
 GGCTCCGGAGCCACTAACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAG
 AAAACCCCGGTCTATGGCCACCGGCTCTAGAACACAAGCCTGCTGCTCGCTT
 TGGCCTGCTCTGCCATGTCTCCAAGAGGGATCTGCCGGTGTCACTCAG
 ACCCCAAAATTCCAGGTCTGAAGACAGGACAGAGCATGACACTGCAGTGTG
 CCCAGGGATATGAACCATGAATACTGTCCTGGTATCGACAAGACCCAGGCAT
 GGGGCTGAGGCTGATTCACTCAGTTGGTGTGGTATCACTGACCAAGGA
 GAAGTCCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATCAACCACAGAGGGATTCCCGCT
 CAGGCTGCTGTCGGCTGCCCTCCAGACATCTGTACTTCTGTGCCAGC
 AGTTACGTCGGGAACACCCGGGAGCTGTTTTGGAGAAGGCTCTAGGCTGA
 CCGTACTGGAGGACCTGAACAAAGTGTCCAGAGGTGGCCGTGTTCGA
 GCCTCTGAGGCCAGATCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTCTG

GCTACCGGCTTCTCCCCGATCACGTGGAACTGTCTGGTGGGTCAACGGCA
AAGAGGTTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGC
CCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTCGCC
CACCTCTGGCAGAACCCAGAAACCACCTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTAC
GGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGAAGAGAGGCCAAGCCTGTGACA
CAGATCGTGTCTGCCAAGCCTGGGGCAGAGCCATTGAGCTTACCGAGCG
TGTCAACCAGCAGGGCGTGTCTGCCACCATCCTGTATGAGATCCTGCT
CGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGTGATGGCT
ATGGTCAAGCGGAAGGGACTTCCGGGCAAGCAGGGCAGCGGCCACCAAC
TTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCAGCTGGAGGGAGAACCCCGGCCATG
GCCACAGGCAGCAGAACATCTGCTGCTGGCCTCGGACTGCTGTGCTGC
CTTGGCTGCAAGAGGCTCCGCCAAACAGGAGGTGACGCAGATTCTGCAGC
TCTGAGTGTCCCAGAAGGAGAAAACCTGGTTCTCAACTGCAGTTCACTGATA
GCGCTATTACAACCTCCAGTGGTTAGGCAGGACCCCTGGGAAAGGTCTCAC
ATCTCTGTTGCTTATTCACTGAAGTCAGAGAGAGCAAACAGTGGAAAGACTTA
ATGCCTCGCTGGATAAATCATCAGGACGTAGTACTTTACATTGCAGCTTCT
CAGCCTGGTACTCAGCCACCTACCTCTGTGCTGTGAGGCCACATCAGGAG
GAAGCTACATACCTACATTGGAAGAGGAACCAGCCTTATTGTTCATCCGTAT
ATTCAAGAACCCGATCCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACAGCAAGAGCAGCG
ACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCA
GAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCAGACAAGACCGTGCTGGACATGCG
GAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCTGGTCCAACAAGAGCGAT
TTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTT
CCCAAGTCCTGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGA
GACAGACACCAACCTGAACCTCCAGAACCTGTCCGTGATGCCACTGGCTCCGCATC
CTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCTGAGACTGTGGT
CCAGCTGACTCGAGTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTC
CCCCGTGCCCTCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTCTAAT
AAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG
GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAAGACAATAGCAG
GCATGCTGGGATGCGGTGGCTCATGGCGCGCCGACCGATTGATT
CTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAA
CTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGCCCTG
GAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAACAAACAGCATTATTC
CAGAAGACACCTCTTCCCCAGCCCAGGTAAAGGGCAGCTTGGTGCCTTCGC
AGGCTGTTCCCTGCTTCAGGAATGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCA
ATGATGTCTAAACTCCTCTGATTGGTGGCTCGGCCATTCCATTGCCACCA
AAACCCCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTGTTCTGGCAGTCCAGAGAAT
GACACGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGC
CCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGAGTCCCTGCCCTGCCCTTGCTCAGACTG
TTGCCCTTACTGCTCTTAGGCCTCATTCTAACGCCCCCTCTCCAAGTTGC
CTCTCCTTATTCTCCCTGCTGCCAAAAAAATCTTCCCAGCTCACTAACGTCAG
TCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAA
TGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCC
AGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGAAAAGTC
CAAATAACTCAGATTGGAATGTGTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTAC
CTTCAGGACAAAGTCAGGGAAGGGCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATA
CCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCTATAGAGGCCTGGGACAGGAG

CTCAATGAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATGAGTTGAATGAAGGGAGGCAG GGCCGGGTACAGGGCCTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAGGGATCCGGT GTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCT CAATTAGTCAGCAACCAGCTAGC
Linear TRAC(1k)P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 12)
ACATTAACACAAAATCCTACGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAA GGAAAAGCCTCCAGCAGCTCCTGCTTCTGAGGGTAGAGGATAGACGCTGTG GCTCTGCATGACTCACTAGCACTATCACGCCATTCTGGCAGGGTCAGT GGCTCCAACTAACATTGTTGGTACTTACAGTTATTAAATAGATGTTATAT GGAGAACGCTCTCATTCTTCTCAGAAGAGCCTGGCTAGGAAGGTGGATGAG GCACCATATTCAATTGCAGGTGAAATTCTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGA CTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGCTAGACGCAG GTGTTCTGATTAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTA ATGTGATAGATTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCATTCTGCT AATGCCAGCCTAAGTGGGAGACCACTCCAGATTCAAAGATGTACAGTTG CTTGCTGGCCTTTCCCATTGCCTGCCTTACTCTGCCAGAGTTATTGCT GGGGTTTGAAGAACGATCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAAGTAG CCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCGTGAACGTT CACTGAAATCATGCCCTTGGCCAAGATTGATAGCTGTGCCTGTCCCTGAG TCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGTTCTAAGATGCTATTCCGTATAAACG ATGAGACCGTGAATTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCATTGTCCATCACTGG CATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCT AACCCCTGATCCTCTGTCCCACAGATATCCAGAACCCCTGCCGTGTAC CAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTGAAATTGG CTCCGGAGCCACTAACTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAA AACCCCGGTCTATGGCCACCGGCTCTAGAACAGCCTGCTCGCTGCTTGG GCCTGCTCTGCCATGTCTCCAAGAGGGATCTGCCGAAACGGGAGTTAC GCAGACACCAAGACACCTGGTATGGAATGACAAATAAGAACGTTCTTGAAT GTGAACACATCTGGGTCTAACGCTATGTATTGGTACAAGCAAAGTCTGTAAG AAGCCACTGGAGCTCATGTTGCTACAGTCTGAAGAACGGGTTAAAACAA CAGTGTGCCAAGTCGTTCTCACCTGAATGCCAACAGCTCTCACTTATTCC TTCACCTACACACCCCTGCAGCCAGAACGACTCGGCCCTGTATCTCGGCCAG CAGCCAGTCGAGGGGGCTCAGCAGTACTCGGGCCGGCACCAGGCTCAC GGTCACAGAGGACCTGAACAAAGTGTCCCTCCAGAGGTGGCGTGTGAG CCTCTGAGGCCAGATCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGCTGG CTACCGGCTTCTCCCCGATCACGTGAACTGTCTGGTGGGTCAACGGCAA AGAGGTGCACAGCGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGCC CGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGCC ACCTTCTGGCAGAACCCCCAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTACG GCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGAACAGAGGCCAGCCTGTGACAC AGATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTACAGCGT GTCATACCAGCAGGGCGTGTCTGCCACCATCCTGTATGAGATCCTGCTC GGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGTGATGGCTA TGGTCAAGCGGAAGGACTTCCGGGCCAGCAGGGCAGCGGCCACCAACT TCAGCCTGCTGAAGCAGGCCAGCTGGAGGAGAACCCCCGGCCATTGG CCACAGGCAGCAGAACATCTGCTGCTGGCCTCGGACTGCTGTGCTGCC TTGGCTGCAAGAGGGCTTCCGCCAGAAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGACC ACTCAGTGTCCAGAGGGAGCCATTGTTCTCTCAACTGCACCTACAGCAACA

<p> GTGCTTTCAATACTCATGTGGTACAGACAGTATTCCAGAAAAGGCCCTGAG TTGCTGATGTACACATACTCCAGTGGAACAAAGAAGATGGAAGGTTACAGC ACAGGTGATAAATCCAGCAAGTATATCTCCTGTTCATCAGAGACTCACAGC CCAGTGATTCAGCCACCTACCTCTGTCAATGAGTGAGGACTACAAGCTCAG CTTGGAGCCGGAACCACAGTAACTGTAAGAGCAAATATTCAAGAACCCGATC CTGCTGTATCAGCTGCGCGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGTT GTTCACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTGATGTT GTATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCA ACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCCTC AACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTCTCCAGGCCAGGTAAAGGGCA GCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCCCTGCTCAGGAATGCCAGGTTCTG CCCAGAGCTCTGGTCAATGATGCTAAAACCTCTGATTGGTGGCTCGGCC TTATCCATTGCCACCAAAACCCCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTCT GGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGGTGGCAG GAGAGGGCACGGGCCAGCCTCAGTCTCCAACTGAGTTCTGCCTGCCT GCCTTGCTCAGACTGTTGCCCTACTGCTCTAGGCCTCATTCTAACGC CCCTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTCTCCCTGCTGCCAAAAATCTTCC CAGCTCACTAACGTCAGTCAACGCACTCACTAACCCACCAATCACTGAT TGTGCCGGCACATGAATGCACCAAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAAAGTCA GATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGAGCCCACATCT GTCAGCTGGAAAAGTCAAATAACTCAGATTGGAATGTGTTTAACTCAGG GTTGAGAAAACAGTACCTCAGGACAAAAGTCAGGGAGGGCTCTGTGAAG AAATGCTACTTGAAGATACCAGCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCATA GAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATGAG TTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGGTACAGGCCCTCTAGGCCATGAGAGG GTAGACAG </p>
<p>NTC9385R-TRAC(1k)DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)</p>
<p> CGCGCTTAATGAGCGGGCTTTTTGGCTTGTCCACAACCGTTAACCTT AAAAGCTTAAAGCCTTATATATTCTTTCTTATAAAACTAAACCTTAG AGGCTATTAAAGTTGCTGATTATATTAAATTATTGTTCAAACATGAGAGCTT GTACGTGAAACATGAGAGCTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAG CCATGAGGGTTAGTCGTTAACATGAGAGCTTAGTACGTTAACATGAGAG CTTAGTACGTACTATCAACAGGTTGAAGTGTGATCCACGTTGTGTTAGAATT GGTAAAGAGAGTCGTGAAATATCGAGTTCGCACATCTGTTGTGTTAGATT GATTTTGCGAAACCATTGATCATATGACAAGATGTGTTACCTTAACCTTAACTT AATGATTTGATAAAATCATTAGGTACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCAT GCTTGCATACTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTCCACACCCATG GACATTAAAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACT AAGGAAAAGCCTCCAGCAGCTCCTGCTTGAGGGTGAAGGATAGACGCTG TGGCTGCATGACTCACTAGCACTTACACGGCCATATTCTGGCAGGGTCA GTGGCTCCAACTAACATTGTTGGTACTTACAGTTATTAAATAGATGTTTAT ATGGAGAAGCTCTCATTCTTCTCAGAAGAGCCTGGCTAGGAAGGTGGATGA GGCACCATATTCAATTGCAAGGTGAAATTCTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTG ACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGCTTAGACGCA GGTGTTCTGATTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGT AATGTGATAGATTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCATTCTGC TAATGCCAGCCTAAGTTGGGAGACCCTCAGATTCCAAGATGTACAGTTT </p>

GCTTTGCTGGCCTTTCCATGCCTGCCCTTACTCTGCCAGAGTTATATTG
CTGGGGTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGATAAGCAGTATTATAAGT
AGCCCTGCATTCAGGTTCCCTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACG
TTCACTGAAATCATGGCCTCTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCTG
AGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTATTCCCGTATAAA
GCATGAGACC GTGACTTGCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCATCACT
GGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTC
CTAACCCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCGTGACCGTGT
ACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTGCCTATTGAATTC
GGCTCCGGAGCCACTAACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAG
AAAACCCGGT CCTATGCCACCGGCTCTAGAACAAAGCCTGCTGCTCGCTT
TGGCCTGCTTGCCATGTCTCCAAGAGGGATCTGCCGAAACCGGAGTT
ACGCAGACACCAAGACACCTGGTATGGGAATGACAATAAGAAGTCTTGAA
ATGTGAACAACATCTGGGT CATAACGCTATGTATTGGTACAAGCAAAGTGCTA
AGAAGCCACTGGAGCTCATGTTGTCTACAGTCTTAAGAACAGGGTTGAAAAC
AACAGTGTGCCAAGTCGCTTCACCTGAATGCCAACAGCTCTCACTTATT
CCTCACCTACACACCCTGCAGCCAGAACAGACTCGGCCCTGTATCTGCGCC
AGCAGCCAGTCGAGGGGGCTCAGCAGTACTCAGGCCGGGACCAGGCTC
ACGGTCACAGAGGACCTGAACAAAGTGTCCCTCAGAGGGTGGCGTGT
AGCCTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACAGAAAGCCACACTCGTGT
GGCTACCGGCTTCTCCCGATCACGTGGAACTGTCTGGTGGTCAACGGC
AAAGAGGTGCACAGCGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGC
CCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGC
CACCTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTAC
GCCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGAACAGAGAGGCCAACGCTGT
CAGATCGTGTCTGCCAACGCTGGGAGAGCCATTGTGGCTTACAGCG
TGTCTACAGCAGGGCGTGTCTGCCACCATCCTGTATGAGATCCTGCT
CGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGT
ATGGTCAAGCGGAAGGACTTCCGGCCAAGCGGGCAGCGGCCACCAAC
TTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCAGCTGGAGGGAGAACCCGGCCATG
GCCACAGGCAGCAGAACATCTCTGCTGCTGGCCTCGGACTGCTGT
CTTGGCTGCAAGAGGCTTCCGCCAGAAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGAC
CACTCAGTGTCCAGAGGGAGCCATTGTTCTCAACTGCACCTACAGAAC
AGTGTGTTCAATACTCATGTGGTACAGACAGTATTCCAGAAAAGGCCCTGA
GTTGCTGATGTACACATACTCCAGTGGTAACAAAGAAGATGGAAGGTTACAG
CACAGGTCGATAAAATCCAGCAAGTATATCTCCTGTTCATCAGAGACTCACAG
CCCAGT GATTGCCACCTACCTCTGTGCAATGAGTGAGGACTACAAGCTCA
GCTTTGGAGCCGAACCACAGTAACTGTAAGAGCAAATATTCAAGAACCCGAT
CCTGCTGTGTATCAGCTGCCGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGT
TGTGTTCAACGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATG
TGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGC
AACAGTGTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCC
CAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTCTTCCCCAGGCCAGGTAAAGGCA
GCTTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCCCTGCTCAGGAATGGCAGGTTCTG
CCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACCTCTGATTGGTGGTCTCGGCC
TTATCCATTGCCACCAAAACCCCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGT
GGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGGTGGCAG
GAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCTCCA ACTGAGTTCCTGCCTGCC

GCCTTGCTCAGACTGTTGCCCTTACTGCTCTAGGCCTCATTCTAAGC CCCTTCTCCAAGTTCGCCTCTCCTTATTCCTCCGTCTGCCAAAAAAATCTTCC CAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGAT TGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAAAGTCA GATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGAGGCCATCT GTCAGCTGGAAAAGTCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTAACTCAGG GTTGAGAAAACAGTACCTTCAGGACAAAGTCAGGGAGGGCTCTGAAG AAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCATA GAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATGAG TTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGTCACAGGCCCTCTAGGCCATGAGAGG GTAGACAGGGATCCGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCCCTCAGCAGGCAGAAG TATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGCTAGC
pUCu-Kan TRAC(1k) P2A.Neo12.TRBC2opt.f-P2A.TRA(Va) (SEQ ID NO: 14)
GGTACCACATTAAAAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCA GCACTAAGGAAAAGCCTCAGCAGCTCCTGTTCTGAGGGTGAAGGATAGA CGCTGTGGCTCTGCATGACTCACTAGCACTCTACGCCATATTCTGGCAG GGTCAGTGGCTCCAACTAACATTGTTGGTACTTACAGTTATTAAATAGAT GTTTATATGGAGAACGCTCTCATTCTTCAGAAGAGCCTGGCTAGGAAGGT GGATGAGGCACCATATTCACTTCAGGTGAAATTCTGAGATGTAAGGAGCT GCTGTGACTTGCTCAAGGCCTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGCTTA GACGCAGGTGTTCTGATTATAGTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATC TCCTGGTAATGTGATAGATTCCCACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCC ATTCTGCTAATGCCAACGCTTAAGTTGGGAGACCCTCCAGATTCCAAGATGT ACAGTTGCTTGCTGGGCTTTCCATGCCCTTACTCTGCCAGAGT TATATTGCTGGGTTTGAGAACGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATT ATTAAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCC GTGAACGTTCACTGAAATCATGCCCTTGGCCAGATTGATAGCTTGCT GTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTATTCCC GTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTC CATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGTTGGGCAAAGAGGGAAATGAGA TCATGTCCTAACCCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCCTGACCCT GCCGTGTACCGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATT CGAATTGGCTCCGGAGCCACTAACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGAT GTTGAAGAAAACCCGGCTATGCCACCGGCTCTAGAACAGCAGCTGC TCGCTTTGGCTGCTGCCTGCCATGTCCTCCAGAGGGATCTGCCGAAAC GGGAGTTACGCAGACACCAAGACACCTGGTCATGGGAATGACAAATAAGAAG TCTTGAAATGTGAAACAACATCTGGTCATAACGCTATGTATTGGTACAAGCAA AGTGCTAACAGCCACTGGAGCTCATGTTGTCTACAGTCTGAAGAACGGGT TGAAAACAACAGTGTGCCAACGTCGCTTCTCACCTGAATGCCAACAGCTCTC ACTTATTCTTCACCTACACACCCCTGCAGCCAGAAAGACTCGGCCCTGTATCTC TGCAGCAGCCAGTCAGTGAGGGGGCTCAGCAGTACTTCGGGCCGGCACC AGGCTCACGGTCACAGAGGGACCTGAAAAACGTGTTCCCTCCAAAAGTGGCCG TGTCAGCCTCTGAGGCCAGATCAGCCACACAGAAAGCCACACTCGT GTGTCTGGCTACCGGCTTCTACCCGATCACGTGGAACGTCTGGTGGTC AACGGCAAAGAGGTGCACAGCGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGAAA GAACAGCCGCTCTGAAACGACAGCCGCTACTGCCGTAGCAGACTGAGAG TGTCCGCCACCTCTGGCAGAACCCAGAAACCACCTCAGATGCCAGGTCCA GTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGGCC

TGTGACACAGATCGTCTGCCGAAGCCTGGGCAGAGCCGATTGTGGCTT
 ACCAGCGAGTCATACCAGCAGGGCGTGTCTGCCACCATCCTGTATGAGA
 TCCTGCTCGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGCT
 GATGGCTATGGTCTCCCAGGGAGCGCATCCCCGAGGCCGGCCAAGCGGG
 GCAGCGGCCACCAACTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGG
 AGAACCCGGCCATGCCACAGGCAGCAGAACATCTCTGCTGCTGCCCT
 CGGACTGCTGTCTGCCCTGGCTGCAAGAGGCTCCGCCAGAAGGAGG
 GGAGCAGGATCCTGGACCACTCAGTGTCCAGAGGGAGCCATTGTTCTCTC
 AACTGCACCTACAGCAACAGTGTCTTCAATACTTCATGTGGTACAGACAGTAT
 TCCAGAAAAGGCCCTGAGTTGCTGTATGTACACATACTCCAGTGGTAACAAAGA
 AGATGGAAGGTTACAGCACAGGTCGATAATCCAGCAAGTATATCTCCTGT
 TCATCAGAGACTCACAGCCCAGTGATTCCAGGCCACCTACCTCTGTGCAATGAGT
 GAGGACTACAAGCTCAGCTTGGAGGCCAACAGTAACTGTAAGAGCAA
 ATATTCAAGACCCGATCCTGCTGTATCAGCTGCGCGACAGCAAGAGCAG
 CGACAAGAGCGTGTGTTGTCACCGATTGATTCTCAAACAAATGTGTCAC
 AAAGTAAGGATTCTGATGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACATGAGG
 TCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGCTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTT
 TGCATGTGCAAACGCCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTC
 CCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTGGCTGCCCTCGCAGGCTGTTCTGCTTC
 AGGAATGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAAGTCTC
 TGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCTCTTTACTAAGA
 AACAGTGAGCCTGTTCTGGCAGTCCAGAGAAATGACACGGGAAAAAGCAGA
 TGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCTCTCAA
 CTGAGTTCTGCCTGCCTGCCTTGCTCAGACTGTTGCCCTACTGCTCTT
 CTAGGCCTCATTCTAAGCCCCCTCTCCAAGTTGCCCTCCTTATTCTCCCTGT
 CTGCCAAAAAAATCTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACCGCAGTCACTCATT
 AACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGT
 GGAGGAATTAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTA
 GTTGGGGAGCCATCTGTCAGCTGGAAAAGTCAAATAACTCAGATTGG
 AATGTGTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAG
 GGAAGGGCTCTGTAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGC
 AGGGAGAGGACCCATAGAGGCCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGAGA
 AGAGCAGCAGGCATGAGTTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGTACAGGGCC
 TTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAGGCTAGCCGCGTTGCTGGCTTTCCA
 TAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGG
 TGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAAGGGCTTCCCCCTGGAGCT
 CCCTCGTGCCTCTGTTGCCACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCGCC
 CTTCTCCCTCGGGAAAGCGTGGCGTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATC
 TCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGCTGTGTCACGAACCCCC
 CGTTCAGCCCGACCCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGCTTGAGTCAAAC
 CCGGTAAGACACGACTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTA
 GCAGAGCGAGGTATGAGGCGGTGCTACAGAGTTGTAAGTGGTGGCCTAA
 CTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTGATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAG
 TTACCTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTGATCCGGCAAACAAACCACCGCT
 GGTAGCGGTGGTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGG
 ATCTCAAGAAGATCCTTGATCTTAGAAAAGTCATCGAGCATCAAATGAAAC
 TGCAATTATTATCAGGATTATCAATACCATATTTGAAAAAGCCGTTCT
 GTAATGAAGGAGAAAAGTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTG

GTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATAACACCTATTAAATTCCC CTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAAT CCGGTGAGAATGGCAAAGTTATGCATTCTTCAGACTTGTCAACAGGC CAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCAATT CGTGATTGCGCCTGAGCCAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAAT TACAAACAGGAATCGAATGCAACCCGGCGAGGAACACTGCCAGCGCATCAAC AATATTTCACCTGAATCAGGATATTCTTAATACCTGGAATGCTGTTTCC GGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGC TTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTAGTCTGACCATCTC ATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTGCATGTTTCAAGAAACAACCTG GCGCATCGGGCTTCCCATAACAGCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCGAC ATTATCGCGAGCCCATTATACCCATAAAATCAGCATCCATGTTGGAATTAA TCGCGGCCTCGACGTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTGTATTAC TGTTTATGTAAGCAGACAGTTTATTGTTCATGATGATATATTTATCTGTGC AATGTAACATCAGAGATTTGAGACAC	pUCu-Kan TRAC(1k) MNDZsGreen.f-P2A.LNGFRt.P2A (SEQ ID NO: 15)
GGTACCACATTAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCA GCACTAAGGAAAAGCCTCCAGCAGCTCCTGCTTCTGAGGGTGAAGGATAGA CGCTGTGGCTCTGCATGACTCACTAGCACTCTATCACGGCCATATTCTGGCAG GGTCAGTGGCTCCAACTAACATTGTTGGTACTTACAGTTATTAAATAGAT GTTTATATGGAGAACGCTCTCATTCTTCTCAGAAGAGCCTGGTAGGAAGGT GGATGAGGCACCATATTCAATTGCAAGGTGAAATTCTGAGATGTAAGGAGCT GCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGTGCTGGGCTTA GACGCAGGTGTTCTGATTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATC TCCTGGTAATGTGATAGATTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAACCTCCC ATTCTGCTAATGCCAGCCTAACGTTGGGAGACCCTCCAGATTCAAGATGT ACAGTTGCTTGCCTGGGCTTTCCATGCCTGCCTTACTCTGCCAGAGT TATATTGCTGGGTTTGAGAACAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATT ATTAAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCCTGGCC GTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCT GTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTATTCCC GTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTC CATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGTTGGGCAAAGAGGGAAATGAGA TCATGTCCTAACCTGATCCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCCTGACCC GCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATT CGAACAGAGAACAGGAGAATATGGGCCAACAGGGATATCTGTGGTAAGCAG TTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAACATGGCCA AACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCGCTCAGGGCCAAGAACAG ATGGTCCCCAGATGCGGTCGGCCCTCAGCAGTTCTAGAGAACCATCAGAT GTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCCTGTGCCTTATTGAACTAA CCAATCAGTCGCTTCTCGCTTCTGCGCGCTTGCTCCCCGAGCTCTA TATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGATGCCCTGGAGACGCCATCCA CGCTGTTTGACTCCATAGAAGGGGGCCGCCACCATGGCCAGTCC AAGCACGGCCTGACCAAGGAGATGACCATGAAGTACCGCATGGAGGGCTGC GTGGACGGCCACAAGTTCGTGTACCGCGAGGGCATCGCTACCCCTTC AAGGGCAAGCAGGCCATCACCTGTCGTTGGAGGGGGCCCTTGCCC TTCGCCGAGGACATCTGTCGCCGCTTCATGTACGGCAACCGCGTGTCA CCGAGTACCCCCAGGACATCGTGGACTACTTCAAGAACTCCTGCCCGCCGG	

ATACACCTGGGACCGCTCCTCCTGTTGAGGACGGGCCGTGTCATCTGC
 AACGCCGACATCACCGTCAGCGTGGAGGAGAACTGCATGTACCACGAGTCCA
 AGTTCTACGGCGTGAACTTCCCCGCCGACGGCCCCGTGATGAAGAAGATGAC
 CGACAACACTGGAGCCCTCCTGCGAGAAGATCATCCCCGTGCCAAGCAGGG
 CATCTTGAAGGGCGACGTCAGCATGTACCTGCTGTAAGGACGGTGGCCG
 CTTGCCTGCCAGTTGACACCGTGTACAAGGCCAAGTCCGTGCCCGCAAG
 ATGCCCAGTGGCACTTCATCCAGCACAAGCTGACCCGCCGAGGACCGCAGC
 GACGCCAAGAACAGAAGTGGCACCTGACCGAGCAGGCCATGCCCTCCGGC
 TCCGCCTGCCCGGGCCAAGCGGGGAGCGGGGCCACCAACTTCAGCCTG
 CTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCGGCCATGGGGGCAGG
 TGCCACCGGCCGCGCTATGGACGGGCCGCGCTGCTGTTGCTGCTTCT
 GGGGGTGTCCCTGGAGGTGCCAAGGAGGCATGCCACAGGCCTGTACAC
 ACACAGCGGTGAGTGCTGCAAAGCCTGCAACCTGGCGAGGGTGTGGCCA
 GCCTTGTGGAGCCAACCAGACCGTGTGAGGCCCTGCCCTGGACAGCGTGA
 GTTCTCCGACGTGGTGGCGACCGAGCCGTGCAAGCCGTGCAACCGAGTG
 CGTGGGGCTCCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGGAGGCCGACGACGCC
 TGTGCCGCTGCCCTACGGCTACTACCAGGATGAGACGACTGGCGCTGCG
 AGCGTGGCGCGTGTGCGAGGCGGGCTGGGCCCTGTGTTCTCTGCCAGG
 ACAAGCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGCCACGGCACGTATTCCGACG
 AGGCCAACCAACGTGGACCCGTGCCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCG
 AGGCCAGCTCCCGAGTGCACACGCTGGGCCGACGCCAGTGCAGGAG
 ATCCCTGCCGTTGGATTACACGGTCCACACCCCCAGAGGGCTGGACAGCA
 CAGCCCCCAGCACCCAGGAGCCTGAGGGCACCTCCAGAACAGACCTCATAG
 CCAGCACGGTGGCAGGTGTGGTGACCACAGTGTGGGCAGCTCCAGGCC
 TGGTGACCCGAGGCACCACCGACAAACCTCATCCCTGTCTATTGCTCCATCCT
 GGCTGCTGTGGTTGTGGGTCTTGTGGCCTACATAGCCTCAAGAGGGGCTCC
 GGAGCCACTAACTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAACC
 CCGGTCTTACCGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCT
 GATGTGTATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAA
 GAGCAACAGTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAAC
 GCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAACAGACACCTCTTCCCCAGGCCAGGTA
 GGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCTTGCTCAGGAATGGCCAGG
 TTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGCTAAAACCTCTGATTGGTGGTCT
 CGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCTCTTTACTAAGAACAGTGAGCCT
 TGGTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGT
 GGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGGTCTGC
 CTGCCTGCCCTTGCTCAGACTGTTGCCCTACTGCTCTTAGGCCTCATT
 CTAAGCCCCCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTCTCCCTGTCTGCCAAAAAAT
 CTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATC
 ACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAA
 AAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGAGC
 CCATCTGTCAGCTGGAAAAGTCAAATAACTCAGATTGGAATGTGTTAA
 CTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAAGGGCTCT
 CTGAAGAAATGCTACTTGAAGATAACCAGGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGAC
 CCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGG
 CATGAGTTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGTCACAGGGCTTCTAGGCCAT
 GAGAGGGTAGACAGGCTAGCCCGTTGCTGGCTTTCCATAGGCTCCGCC
 CCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC

GACAGGACTATAAAGATACCAGGCCTTCCCCCTGGAAAGCTCCCTCGTGCGC
 TCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTC
 GGGAAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTCGGTG
 TAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCG
 ACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATACGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACA
 CGACTTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG
 TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACA
 CTAGAAGAACAGTATTGGTATCTGCGCTTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGA
 AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTG
 GTTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAA
 GATCCTTGATCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTAT
 TCATATCAGGATTATCAATACCATATTGGAAAAAGCCGTTCTGTAATGAAG
 GAGAAAACCTACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTC
 TCGGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTCCCCTCGTCAA
 AATAAGGTTATCAAGTGAGAAATACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGA
 ATGGCAAAAGTTATGCATTCTTCAGACTTGTCAACAGGCCAGCCATTAC
 GCTCGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCTCGTGTGATTGC
 GCCTGAGGCCAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAG
 GAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAAACATATTTC
 ACCTGAATCAGGATATTCTCTAATACCTGGAATGCTGTTTCCGGGGATCG
 CAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTGATGGTC
 GGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAAC
 ATCATTGGCAACGCTACCTTGCCATGTTTCAGAAACAAACTCTGGCGCATCGG
 GCTTCCCATACAAGCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCGACATTATCGCGA
 GCCCATTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTAAATCGCGGCCTC
 GACGTTCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTGTATTACTGTTATGAA
 GCAGACAGTTTATTGTTCATGATGATATATTGTTCTTGCAATGTAACATC
 AGAGATTGAGACAC

Esqueleto pUCu somente (SEQ ID NO: 16)

GCTAGCCCGTTGCTGGCGTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT
 CACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
 GATACCAGGCAGTTCCCTGGAAAGCTCCCTCGTGCCTCTCGTGTGAC
 CCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCGCCCTTCTCCCTCGGGAGCGTGGCG
 CTTCTCATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTCGGTGTAGGTCGTTGCTC
 CAAGCTGGCTGTGTCACGAACCCCCGGTCAGCCGACCGCTGCGCCTT
 ATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATGCCAC
 TGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGAGGCGGTG
 CTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTA
 TTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTGGTAG
 CTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTGTTGCA
 AGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGATCTT
 AGAAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTATTCATATCAGGATTAT
 CAATACCATATTGGAAAAAGCCTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTACCGA
 GGCAGTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTCGGATTCCGACTCG
 TCCAACATCAATACAACCTATTAAATTCCCTCGTAAAAATAAGGTTATCAAG
 TGAGAAATCACCAGTGGACTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTAT
 GCATTCTTCCAGACTTGTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATAAAA
 TCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCTCGTATTGCGCCTGAGCCAGACG

AAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACC
 GGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATTTCACCTGAATCAGGATAT
 TCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCA
 TGATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGGCATAAATT
 CCGTCAGGCCAGTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTA
 CCTTGCCATGTTAGAAACAACTCTGGCGATCGGGCTCCATACAAGCG
 ATAGATTGTCGACCTGATTGCCGACATTATCGCGAGCCCATTATACCCAT
 ATAAATCAGCATCCATGTTGAAATTAAATCGCGGCCTCGACGTTCCGTTGA
 ATATGGCTCATAACACCCCTGTATTACTGTTATGTAAGCAGACAGTTTATT
 GTTCATGATGATATATTTTATCTTGCAATGTAACATCAGAGATTTGAGAC
 ACGGTACC

TRAC Braço de homologia 5' (SEQ ID NO: 17)

ACATTAAAAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAA
 GGAAAAGCCTCCAGCAGCTCCTGCTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTG
 GCTCTGCATGACTCACTAGCACTATCACGCCATTCTGGCAGGGTCAGT
 GGCTCCAACTAACATTGTTGGTACTTACAGTTATTAAATAGATGTTTATAT
 GGAGAAGCTCTCATTCTTCAGAAGAGCCTGGCTAGGAAGGTGGATGAG
 GCACCATATTCACTTGCAAGGTGAAATTCTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGA
 CTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGCTAGACGCAG
 GTGTTCTGATTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCCTGGTA
 ATGTGATAGATTTCCAACCTAATGCCAACATACCATAAACCTCCATTCTGCT
 AATGCCCAAGCCTAAGTGGGAGACCCTCAGATTCCAAGATGTACAGTTG
 CTTGCTGGCCTTTCCATGCCTGCCTTACTCTGCCAGAGTTATTGCT
 GGGGTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATAAGTAG
 CCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCGTGGCGTGAACGTT
 CACTGAAATCATGGCCTCTGGCCAAGATTGATAGCTTGCTGCCGTGAG
 TCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTATTCCGTATAAACG
 ATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCCGCCCTGTCCATCACTGG
 CATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCC
 AACCCCTGATCCTCTGTCCCACAGATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTAC
 CAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATT

TRAC Braço de homologia 3' (SEQ ID NO: 18)

ACCGATTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTAT
 ATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAG
 TGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCCTCAACA
 ACAGCATTATTCCAGAACGACACCTTCTCCCCAGGCCAGGTAAGGGCAGCTT
 GGTGCCTCGCAGGCTGTTCTTGCTTCAGGAATGCCAGGTTCTGCCAG
 AGCTCTGGCAATGATGCTAAAACCTCTGATTGGTGGCTCGCCCTTATC
 CATTGCCACCAAAACCCCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTCTGGCA
 GTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGA
 GGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCTCCAACTGAGTTCTGCCCTGCCCT
 TTGCTCAGACTGTTGCCCTTACTGCTCTAGGCCTCATTCTAACCCCCCTT
 CTCCAAGTTGCCCTCCTTATTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTCCAGCT
 CACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTG
 CGGCACATGAATGCACCAAGGTGTAAGTGGAGGAATTTAAAGTCAGATGA
 GGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGAGCCCCTGTCA
 CTGGGAAAAGTCCAATAACTCAGATTGGAATGTGTTAACTCAGGGTTGA
 GAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAGTCAGGGAAAGGGCTCTGAAGAAATG

CTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGC
 CTGGGACAGGAGCTAATGAGAAAGGAGAACGAGCAGGCATGAGTTGAAT
 GAAGGAGGGCAGGGCCGGGTACAGGGCCTTAGGCCATGAGAGGGTAGAC
 AG

[0357]Complexo de Ribonucleoproteína (RNP)

[0358]Os complexos RNP foram gerados usando CRISPR spCas9 como a nuclease (Aldevron, sNLS-SpCas9-sNLS Nuclease). Os sgRNAs foram sintetizados quimicamente (Synthego) e diluídos a partir de uma concentração de estoque de 600 μM para uma concentração de trabalho de 120 μM em tampão de eletroporação. Os sgRNAs foram complexados com a proteína Cas9 na relação molar de 1:6 Cas9: sgRNA e incubados por pelo menos 10 minutos em temperatura ambiente e depois mantidos frios (4° C ou em gelo) até o uso.

[0359]Os sgRNAs foram projetados incorporando uma sequência de gRNA dirigida a um sítio alvo de interesse (isto é, uma sequência de nucleotídeo definida dentro do alvo genômico endógeno) em uma estrutura de nucleotídeo de sgRNA contendo uma sequência crRNA e tracrRNA no mesmo nucleotídeo. Os sgRNAs aqui utilizados são apresentados abaixo com “(ps)” indicando uma ligação fosforotioato e “m” indicando uma base 2' O-metil.

[0360]SgRNA de TRAC-1 (SEQ ID NO: 19):

[0361][mG] (ps) [mA] (ps) [mG] (ps)
 AAUCAAAUCGGUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCU
 AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC [mU] (ps)

[0362]SgRNA de TRBC-2 (SEQ ID NO: 20):

[0363][mG] (ps) [mG] (ps) [mC] (ps)
 UCUCGGAGAAUGACGAGGUUUUAGAGCUAGAAAAGCAAGUUAAAAUAAGGC
 UAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC [mU] (ps) [mU]
 (ps) (m)]

[0364]Eletroporação / Nucleofecção

[0365]Um protocolo geral que descreve as condições de eletroporação que

foram usadas para edição de genes de células T é descrito abaixo:

Equipamento
Proteína Cas9
CRISPR sgRNA para eletroporação
Modelo de Reparo Homólogo
Lonza P3 Primary Cell 4D-Nucleofector® X Kit S (32 RCT) com: - Solução P3 Nucleofector - Suplemento (ou misturado com solução P3) - Vetor de controle pmaxGFP - Tira de Nucleocuvette de 16 poços
Células T humanas primárias isoladas
Placa de cultura de tecidos de 48 poços
Meio de cultura de células T (3% HS TexMACS com IL-7 e IL-15)
Tubos de tira de PCR de 200 µL, estéril
Sistema de nucleofecção Lonza com unidade X
Contador de células

[0366]Nota: 100 µL de cuvetas de nucleofecção (Cat # V4XP-3012 ou V4XP-3024) podem ser usadas em vez das cuvetas de 20 µL; caso no qual o número de células, a quantidade de reagente transfetado, e os volumes de plaqueamento devem ser ampliados. Um aparelho de eletroporação alternativo também pode ser usado (tampões e volumes substitutos consequentemente).

[0367]Procedimento:

[0368]1. Preparar uma placa de amostra adicionando 1 mL de meio de cultura de células T (TexMACS, soro humano a 3% contendo 12,5 ng / mL de IL-7 e IL-15 cada) a cada poço de uma placa de 48 poços (poços suficientes para cada amostra e controles [por exemplo, Mock e GFP], mais 1 meio somente, mais ~ 10% extra). Nota: Em variações do protocolo, as células foram cultivadas com meio contendo IL-2 no lugar de IL-7 e IL-15, conforme indicado abaixo.

[0369]2. Depois de bem misturado, aliquotar 1 mL de meio para os poços. Colocar a placa na incubadora a 37° C.

[0370]3. Adicionar um complemento de nucleofector à solução de nucleofector (4,5:1).

[0371]4. Montar os complexos de RNP nos tubos de tira de 200 µL, conforme descrito. Incluir um mock (somente tampão de nucleofecção) e um controle de

nucleofecção (por exemplo, 0,5 µg de plasmídeo GFP).

[0372]5. Adicionar a quantidade apropriada de HR DNA a cada tubo (normalmente 0,2 a 0,4 µg / µL).

[0373]6. Remover um pequeno volume de células (por exemplo, 20 µL para o celômetro) para contar e transferir o restante para um frasco cônico adequado para centrifugar as células.

[0374]7. Peletizar as células por 10 minutos em temperatura ambiente a 90 x g.

[0375]8. Contar as células.

[0376]9. Remover o sobrenadante das células peletizadas.

[0377]10. Ressuspender as células em tampão nucleofector suficiente, de modo que cada 20 µL de nucleocuvette tenha entre 0,5 e 1 milhão de células, levando em consideração o volume do pelete celular (~ 15 µL para 10 M de células).

[0378]11. Distribuir as células nos tubos de tira de 200 mL que contêm a amostra. Incubar as células de 0 a 45 minutos, geralmente menos de 10 minutos.

[0379]12. Transferir a reação de nucleofecção para as nucleocuvettes.

[0380]13. Colocar a tampa no lugar.

[0381]14. Remover a placa que contém o meio pré-aquecido da incubadora.

[0382]15. Programar a unidade 4D para usar o programa EO-115 e colocar o caso no 4D-X na orientação correta (A1 em cima com o recorte maior) e pressionar start.

[0383]16. Transferir lentamente ~ 100 µL do meio celular aquecido dos respectivos poços da placa para os poços da nucleocuvette (500 para a cuveta de 100 µL).

[0384]17. Transferir todos os ~ 120 µL de cada nucleocuvette para os respectivos poços na placa.

[0385]18. Incubar as células por 5 a 11 dias (isto é, dia de colheita 7-14) antes

da análise subsequente, por exemplo, para expressão de transgene, direcionamento genômico ou ensaios funcionais (por exemplo, morte de células T ou produção de citocinas). (observação: fenótipo de nocaute tipicamente observado em menos de 24 horas, fenótipo de nocaute tipicamente observado em 24 a 48 horas, com fenótipos estabilizando após 72 horas)

[0386]Análise de Citometria de Fluxo

[0387]As células foram avaliadas quanto à expressão de genes de interesse por citometria de fluxo. Para construtos ZsGreen, foi avaliada a fluorescência do construto ZsGreen (GFP). Para expressão de TCR, as células foram coradas usando anticorpos específicos para TCR (clone de anticorpo anti-TCR α / β humano IP26 Brilliant Violet 510, Biolegend). Para expressão de CD3, as células foram coradas usando anticorpos específicos para CD3 (clone SK7, Biolegend). Para estudos de células NK, foram utilizados CD5 (clone UCHT2, Biolegend) e CD56 (clone 5.1H11, Biolegend).

[0388]A menos que indicado de outra forma, as células T foram identificadas por FSC / SSC, singletos, células vivas (mancha quase IR), depois a identificação específica (por exemplo, CD8, dextrâmero, etc.). Onde indicado, complexos fluoróforo-MHC trímero dextrano (também chamados de “dextrâmeros”) foram usados para identificar o reconhecimento de TCR específico do antígeno e são descritos em mais detalhes por Bethune, e outros (BioTechniques 62: 123 a 130 Mar. 2017) e Bethune, e outros (eLife 5: 2016), cada um aqui incorporado por referência. Os dextrâmeros foram preparados usando estreptavidina marcada com fluorescência (Life Technologies, Carlsbad, CA). Os peptídeos utilizados para o reconhecimento de TCR específicos de antígeno foram: ELAGIGILTV (Mart-1 F5, SEQ ID NO: 5); YLTHRVDVI (Neo12, SEQ ID NO: 6); SLLMWITQV (NY-ESO 1G4, SEQ ID NO: 7).

[0389]Produção e Transdução Lentiviral

[0390]Os construtos de TCR NY-ESO (1G4) e MART-1 (F5) foram

subclonados em um vetor lentiviral baseado em pCCLc-MND (Add gene # 81071) no formato TCRA-F2A-TCRb-P2A-Myc271. Myc271 é um marcador de transdução quimérico compreendendo os domínios extracelulares transmembrana e truncados de CD271 (LNGFR) fundidos com uma etiqueta de epítopo cMyc extracelular. Os lentivírus que codificam NY-ESO (1G4) e MART-1 foram produzidos em células HEK-293T por transfecção transiente de vetores baseados em lentivírus e seus vetores de empacotamento (pMD2.G). 48 horas após a transfecção, o vírus foi coletado, filtrado através de um filtro de seringa de 0,45 µm e utilizado para infecção.

[0391]As células T CD3+ humanas foram isoladas a partir de PBMC de um doador saudável, estimuladas por 24 horas e depois cultivadas na presença de citocinas, como descrito acima. Após 48 horas, as células foram semeadas a 2×10^6 células por poço em 250 µL de meio com polibreno, ao qual 500 µL de meio (condição simulada) ou sobrenadante viral específico (pCCLc-MND-F5TCR-Myc271 ou pCCLc-MND-1G4TCR- Myc271) foram adicionados. As células T CD3+ foram centrifugadas na presença de vírus a 800 g, 90 min, 30º C, com aceleração lenta e sem freio. Após a centrifugação, 500 µL de meio foram removidos e 500 µL de meio fresco ou 500 µL de vírus foram adicionados. Após 4 dias, as células T humanas foram testadas quanto à expressão na superfície do TCR. Para testar a expressão na superfície, as células foram lavadas e coradas com anticorpos fluorescentes e multímeros de pHLa em tampão FACS, e analisadas por citometria de fluxo.

[0392]Análise de Viabilidade

[0393]A contagem e viabilidade celular foram medidas usando o Nucleocounter NC-200 (Chemometric). Este instrumento utiliza um cassete, Via-2, com uma pipeta incorporada para aspirar o volume da amostra, e corar a amostra com corantes fluorescentes acridina laranja (AO) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) imobilizados dentro do cassete que cora as populações total e de células mortas, respectivamente, enquanto viajam através dos canais fluídicos, precedendo a janela

de leitura do cassete. Uma vez que o cassete é carregado no instrumento, um protocolo projetado para amostras de PBMC foi usado e relatou a contagem total de células em células / mL (derivada de uma contagem de células que removeram a coloração de AO) e calcula a população de células vivas (células / mL) a partir da porcentagem de viabilidade que é extrapolada da fração da população que é positiva para o marcador DAPI.

[0394]Em variações do protocolo do ensaio de viabilidade, a viabilidade foi avaliada usando Acrímina Laranja / Iodeto de Propídio (AOPI) e um Celômetro (Nexcelom), como indicado abaixo.

[0395]Análise de Direcionamento Genômico

[0396]A técnica de PCR in-out foi usada para confirmar a integração genômica precisa de genes de interesse no lócus de TCR α por meio de dois pares de iniciadores: um par de iniciadores dirigido à junção a montante e um par de iniciadores de junção à jusante. A detecção de duas sequências amplificadas da massa correta após a PCR in-out de células T manipuladas confirmou a inserção correta do cassete de sequência neoTCR integrado no lócus genômico de TCR α .

[0397]Os iniciadores utilizados para a técnica de PCR in-out foram

[0398]Direto a montante: TGCTAACCTCCGGCAAACC (SEQ ID NO: 1)

[0399]Reverso a montante: TTCTTCAACATGCCAGCCT (SEQ ID NO: 2)

[0400]Direto à jusante: CAGCCATCTGTTGTTGCC (SEQ ID NO: 3)

[0401]Reverso à jusante: AGCTTCTGGCGTCCTAGAAT (SEQ ID NO: 4)

[0402]O DNA genômico foi isolado a partir de células T manipuladas e técnicas padrão de PCR foram usadas para amplificar as regiões genômicas de interesse e analisar os produtos de PCR por eletroforese em gel.

[0403]Cocultura de células T / Células Alvo para Análise Funcional

[0404]As células T modificadas (100.000) foram cocultivadas com células alvo (25.000) expressando HLA-A2 (relação Efetor / Alvo de 4:1) pulsadas com diferentes

concentrações do peptídeo específico (diluições em série de 10 vezes de 0,01 a 1000 nM). Em variações do protocolo, as células T (50.000) foram cocultivadas com células alvo (25.000) que expressam HLA-A2 a uma relação Efetor / Alvo de 2:1, como indicado abaixo. Os peptídeos liofilizados (Bio-Synthesis Inc, GenScript) foram reconstituídos em DMSO a 10 mM e depois diluídos em DMSO a um estoque de trabalho de 1 mM. A seguir, foram realizadas diluições em série de 10 vezes dos peptídeos usando uma solução inicial de 1 mM (1 µL de estoque de trabalho a 1 mM em 9 µL de DMSO) até que 0,01 nM fosse alcançado. As células alvo A2-K562 (concentração de célula total por peptídeo de 1M, 1×10^6 células / mL) foram pulsadas com 1 µL das diluições de peptídeos em série em um tubo cônico de 15 mL e incubadas por 1 hora a 37° C. Após a incubação, 9 mL de meio foram adicionados a cada tubo e depois centrifugados por 5 min a 1000 rpm. Os peletes celulares foram lavados uma vez com 10 mL de meio e depois ressuspensos em 4 mL de meio para experimentos de coincubação. Nenhum peptídeo foi utilizado para a condição “sem peptídeo” ou “0 peptídeo”.

[0405]As células alvo que expressam constitutivamente o peptídeo-HLA (pHLA) balanceado e não balanceado também foram usadas como controles para avaliar a especificidade, como indicado. As células alvo K562 foram transduzidas com vetores lentivirais que codificam uma molécula de peptídeo-HLA contendo peptídeo Neo12, MART1 ou NYESO1 com ZsGreen como marcador de transdução para células K562. As moléculas peptídeo-HLA expressas (MHC) são compostas de uma única cadeia de polipeptídeo com uma composição linear de domínios peptídicos antigênicos, β2-microglobulina, e domínios HLA-A2 via ligantes GS flexíveis e uma modificação de armadilha dissulfeto, conforme descrito em mais detalhes por Bethune, e outros (eLife 5: 2016), aqui incorporado por referência por todo que descreve.

[0406]Análise da Citotoxicidade de Células T

[0407]Após 48 horas de cocultura de células T e células alvo, as células foram coradas usando o kit de coloração de Células Vivas / Mortas (Live / Dead Near IR viability stain for flow, cat # NC0584313, ThermoFisher) por 20 minutos a 4º C no escuro. Nas células com membranas comprometidas, o corante reage com aminas livres, tanto no interior da célula quanto na superfície da célula, produzindo intensa coloração fluorescente. Nas células viáveis, a reatividade do corante é restrita às aminas da superfície celular, resultando em fluorescência menos intensa. A diferença de intensidade é geralmente maior que 50 vezes entre células vivas e mortas, permitindo fácil discriminação. Após a incubação, as células foram lavadas, fixadas com o tampão de fixação eBioscience IC (ThermoFisher, cat # 00-8222-49) e analisadas por citometria de fluxo.

[0408]Análise de Proliferação

[0409]As células T manipuladas foram pré-marcadas com Corante de Proliferação Celular e450 (ThermoFisher, cat # 65-0842-90) antes da cocultura. Esse corante fluorescente se liga a qualquer proteína celular que contenha aminas primárias e, à medida que as células se dividem, o corante é distribuído igualmente entre as células filhas, que podem ser medidas como metade sucessiva da intensidade de fluorescência do corante. O ensaio de cocultura foi realizado como descrito para o ensaio de citotoxicidade de células T. Após 72 horas de cocultura de células T e células alvo, as células foram fixadas com o tampão de fixação eBioscience IC (ThermoFisher, cat # 00-8222-49) e analisadas por citometria de fluxo.

[0410]Análise de Produção de Citocinas

[0411]A produção de citocinas foi avaliada no sobrenadante da cocultura usando o ensaio de microesferas em citocina (CBA, BEAD-BASED IMUNOASSAY a partir de BioSciences). O CBA é uma aplicação de imunoensaios baseados em microesferas multiplexadas por citometria de fluxo que permite a quantificação de múltiplas proteínas simultaneamente, usando microesferas revestidas com anticorpos

para capturar analitos com eficiência. Após 24 horas de cocultura de células T e células alvo, os sobrenadantes foram coletados e analisados quanto à secreção de IFN γ , IL-2 e TNF α .

[0412]Exemplo 2: Integração do Repórter no Lócus de TCR α

[0413]Um construto repórter ZsGreen foi integrado ao lócus de TCR α . A Figura 1 apresenta um esquema representando a estratégia geral de edição usada. Resumidamente, a estratégia geral de direcionamento do lócus de TCR α usou um modelo de reparo homólogo contendo uma sequência de codificação de ZsGreen sem promotor e LNGRF truncada, flanqueada por braços de homologia esquerdo e direito de 1 kb (“Braços de HR”) e separados por sequências P2A, bem como uma sequência 5’ P2A separando os cassetes ZsGreen e LNGRF das sequências de lócus de TCR α , codificadas em um nanoplasmídeo circular (ver SEQ ID NO: 8). A Figura 2 apresenta a linha de tempo geral de edição para a integração de ZsGreen. Resumidamente, as PBMCs foram descongeladas e as células T humanas primárias foram isoladas usando seleção negativa de CD3 e estimuladas com anti-CD3 / anti-CD28, como descrito acima. Um complexo de ribonucleoproteína (RNP) usando um sgRNA dirigido ao lócus de TCR α endógeno (também conhecido como lócus TRAC) foi formado, como descrito acima. Aqui, o sgRNA incorporou a sequência de direcionamento de TRAC gRNA GAGAATCAAAATCGGTGAAT (SEQ ID NO: 21). O modelo de HR, o complexo de RNP e as células T foram misturados e eletroporados, como descrito acima. Após a eletroporação, as células foram cultivadas com meio contendo IL-2 (20 ng / mL).

[0414]Como o repórter ZsGreen não tem promotor, apenas uma fusão precisa em quadro deve gerar um sinal detectável. Além disso, o direcionamento adequado do lócus de TCR α deve resultar em nocaute concomitante de TCR α e perda de complexo de TCR expresso em superfície. De fato, como mostrado na Figura 3, uma alta porcentagem (superior a 22%) de células positivas para ZsGreen / negativas para

TCR foi detectada quando o modelo de HR e o RNP foram incluídos (Figura 3 no painel direito “KO-KI”). Notavelmente, todos os ZsGreen positivos também foram negativos para TCR, sugerindo que o repórter ZsGreen estava se integrando adequadamente ao lócus de TCR α . Como um controle, a ausência de RNP não resultou em células positivas para ZsGreen ou células negativas para TCR acima dos níveis considerados de referência (Figura 3, painel esquerdo). A eficiência de edição nas várias condições testadas é quantificada na Tabela 5.

Tabela 5: Eficiência de edição de Células T Usando Repórter ZsGreen

	TCR+ GFP-	TCR+ GFP+	TCR- GFP-	TCR- GFP+
HR DNA + RNP	2,61	0,094	75	22,4
HR DNA somente	96,8	0,071	3,16	0,021
Mock	98,4	0,00948	1,6	0,00118
RNP somente	18,4	0,023	81,6	0,065
1 µg de modelo de DNA ZsGreen	73	25,6	1,8	0,36

[0415]Exemplo 3: Integração de TCR específicos de neoantígenos na estratégia de lócus de TCR α

[0416]Construtos de TCR específicos de neoantígenos (neoTCRs) foram integrados no lócus de TCR α . A Figura 4 apresenta um esquema representando a estratégia de direcionamento geral usada. Resumidamente, a estratégia geral de direcionamento do lócus de TCR α usou um modelo de reparo homólogo contendo uma sequência de codificação de neoTCR flanqueada por braços HR esquerdo e direito de 1 kb. Além disso, o lócus de TCR β endógeno é rompido, levando à expressão de apenas sequências de TCR codificadas pelo construto neoTCR. A estratégia geral foi aplicada usando modelos de HR circulares que eram nanoplasmídeos ou plasmídeos pUCu.

[0417]O projeto de construto de TCR específico para neoantígenos é diagramado na Figura 5. O lócus de TCR α alvo (“TRAC (C α)”) é mostrado junto com o modelo de HR do plasmídeo, e a sequência editada resultante e os produtos de mRNA / proteína à jusante são mostrados. O lócus alvo de TCR α (TRAC endógeno)

e seu sítio alvo CRISPR Cas9 (faixa horizontal, sítio de clivagem designado pela seta) são mostrados (Figura 5A, painel superior). O modelo de HR do plasmídeo circular com o polinucleotídeo codificando o neoTCR, que está localizado entre os braços de homologia esquerdo e direito (“LHA” e “RHA” respectivamente), é mostrado (Figura 5A, painel inferior). A região do TRAC introduzida pelo modelo de HR que foi códon-otimizado é mostrada (faixa vertical). O domínio constante de TCR β foi derivado de TRBC2, que é indicado como sendo funcionalmente equivalente a TRBC1. Outros elementos no cassete de neoTCR incluem: 2A = elemento de salto do ribossomo P2A; F = sítio de clivagem de furina a montante de 2A que remove a etiqueta 2A da proteína TCR β a montante; HGH = sequência sinal do hormônio de crescimento humano. O modelo de HR do cassete do gene de expressão neoTCR inclui dois braços de homologia de flanqueamento para direcionar a inserção no lócus genômico de TCR α dirigido pela CRISPR Cas9 nuclease RNP com o RNA guia de TCR α . Estes braços de homologia (LHA e RHA) flanqueiam as sequências de TCR específicas de neoE do cassete do gene de expressão de neoTCR.

[0418]Uma vez integrado ao genoma (Figura 5B, painel superior), o cassete do gene de expressão de neoTCR é transcrito como um único RNA mensageiro a partir do promotor endógeno de TCR α , que ainda inclui uma porção do polipeptídeo TCR α endógeno daquela célula T individual (Figura 5B, painel do meio). Durante a tradução do polipeptídeo ribossômico desse único RNA mensageiro de neoTCR, as sequências de PACT neoTCR são desvinculadas do polipeptídeo TCR α rompido por CRISPR endógeno por autoclivagem em uma sequência de salto do ribossomo P2A derivada do teschovírus-1 suíno (Figura 5B, painel inferior). Os polipeptídeos neoTCR α e neoTCR β codificados também são desvinculados um do outro através da clivagem pela protease de furina humana celular endógena e um segundo motivo de sequência P2A auto-clivável incluído no cassete do gene de expressão neoTCR (Figura 5B, painel inferior). Os polipeptídeos neoTCR α e neoTCR β são direcionados

separadamente por sequências líder sinal (derivadas do hormônio de crescimento humano, HGH) para o retículo endoplasmático para montagem de multímero e tráfego dos complexos de proteínas neoTCR para a superfície da célula T. A inclusão do sítio de clivagem da protease furina facilita a remoção da sequência 2A da cadeia de TCR β a montante para reduzir a potencial interferência na função de TCR β . A inclusão de um ligante gly-ser-gly antes de cada 2A (não mostrado) aumenta ainda mais a separação dos três polipeptídeos.

[0419] Além disso, três sequências de proteínas repetidas são códon divergentes dentro do modelo de HR para promover a estabilidade genômica. Os dois P2A são códon divergentes um em relação ao outro, bem como as duas sequências sinal de HGH entre si, dentro do cassete de genes TCR para promover a estabilidade das sequências de cassetes neoTCR introduzidas no genoma das células T manipuladas ex vivo. Da mesma forma, a extremidade 5' reintroduzida do TRAC éxon 1 (faixa vertical) reduz a probabilidade de o cassete inteiro ser perdido ao longo do tempo através da remoção da sequência interveniente de duas repetições diretas.

[0420] A Figura 6 apresenta a linha de tempo geral de edição para editar células T inserindo um construto de neoTCR. Resumidamente, as células T humanas primárias (frescas ou congeladas) foram cultivadas seguindo o procedimento de edição padrão, como descrito acima. Foi formado um complexo de ribonucleoproteína (RNP) usando um sgRNA dirigido ao lócus de TCR α endógeno (também chamado de lócus TRAC) com a sequência de direcionamento de TRAC gRNA GAGAATCAAAATCGGTGAAT (SEQ ID NO: 21), como descrito acima. Além disso, um complexo de RNP usando um sgRNA dirigido ao lócus endógeno de TCR β (também chamado de lócus TRBC) com a sequência de direcionamento de gRNA TRBC gGNACT GGCTCTCGGAGAATGACGAG (SEQ ID NO: 22) foi formado, como descrito acima. O modelo de HR, os complexos de RNP e as células T foram misturados e eletroporados, como descrito acima. As células T eletroporadas (isto é,

as células modificadas) foram então cultivadas na presença de citocinas, como descrito acima.

[0421]Exemplo 4: Integração de NeoTCR (MART-1)

[0422]Um MART-1 neoTCR foi integrado ao lócus de TCR α . As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto MART-1 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO: 9)

[0423]A técnica de PCR in-out foi usada para confirmar a integração genômica precisa do construto de neoTCR no lócus de TCR α por meio de dois pares de iniciadores: um par de iniciadores dirigido à junção a montante e um par de iniciadores de junção à jusante (esquema apresentado na Figura 7, painel superior). A detecção de duas sequências amplificadas por PCR da massa correta após PCR in-out de células T manipuladas foi usada para confirmar a inserção correta do cassete da sequência de neoTCR integrada no lócus genômico de TCR α . Como mostrado na Figura 7, não foi observada integração para células tratadas apenas com o modelo de HR de DNA do plasmídeo e sem nuclease (“DNA somente”). Os produtos amplificados para as junções a montante (Figura 7, painel esquerdo) e à jusante (Figura 7, painel direito) foram observados para células manipuladas em conjunto com TCR α nuclease somente (“KOKI”) ou nucleases de TCR α mais TCR β juntas (“KOKI KO”). Assim, os resultados demonstram que o construto de neoTCR foi adequadamente integrado e o TCR β endógeno foi rompido, quando apropriado.

[0424]As células T manipuladas foram avaliadas quanto à expressão de MART-1 neoTCR por citometria de fluxo. Como mostrado na Figura 8A, a expressão do MART-1neoTCR foi detectada pela coloração com dextrâmero específica para MART-1 tanto em pequenos (20 μ L, Figura 8A painel inferior esquerdo) quanto grandes (100 μ L, Figura 8A painel inferior direito) formatos de edição. Apenas os níveis de referência do sinal foram detectados quando apenas o modelo de HR sem

o RNP (Figura 8A no painel superior esquerdo) ou quando apenas o RNP sem o modelo de HR (Figura 8A no painel superior direito) foi usado. Resultados semelhantes foram vistos em vários pontos no tempo após o procedimento de edição. Os resultados da edição de genes no Dia 4 após o procedimento de edição são quantificados na Tabela 6 abaixo. Os resultados da edição de genes no Dia 7 após o procedimento de edição são quantificados na Tabela 7 abaixo. Os resultados da edição de genes no Dia 10 após o procedimento de edição são mostrados na Figura 8B, com neoTCRs integrados (listados) quando tanto um modelo de HR quanto um complexo de RNP foi fornecido. Assim, os resultados demonstram que o construto de neoTCR foi adequadamente expresso após a integração no lócus de TCRα quando um modelo de HR e o complexo de RNP foram fornecidos.

Tabela 6: Edição de TCR Dia 4

	TCR+ Dex-	TCR+ Dex+	TCR- Dex+	TCR- Dex-
20 ul HR + RNP	10,3	8,5	0,14	81,2
100 ul HR + RNP	12,1	11,6	0,45	76,1
RNP somente*				
20 ul HR	99	0,23	0	0,77
Mock	98,7	0,29	0	1,06

* Omitido da análise

Tabela 7: Edição de TCR Dia 7

	TCR+ Dex-	TCR+ Dex+	TCR- Dex+	TCR- Dex-
20 ul HR + RNP	8,4	17,4	0,4	73,8
100 ul HR + RNP	26,8	28	0,61	44,6
RNP somente	20,7	0,067	0,22	79
20 ul HR	98,2	0,78	0,00154	0,97
Mock	98,6	0,37	0,00297	1,07

[0425]As células T manipuladas foram avaliadas quanto à produção de citocinas específicas do antígeno. Conforme mostrado na Figura 9, as células T modificadas que expressam o MART-1 neoTCR produziram IFN γ e IL-2 quando coincubadas com células alvo HLA-A02 (K562) ou expressando constitutivamente (Figura 9, “K562 HLA-A02 / MART1”) ou pulsado com (Figura 9, “K562 HLA-A02 (10 μ M MART1)”) um peptídeo antigênico cognato MART-1 (relação E:T 2:1). A produção de citocinas não foi observada em um nível significativo quando coincubada com

células alvo HLA-A02 não pulsadas com peptídeo cognato (Figura 9, “K562 HLA-A02”) ou quando coincubada com células alvo expressando MHC HLA-A01 cognato (Figura 9, “K562 HLA-A01 (10 µM MART1)” e “K562 HLA-A01”, respectivamente). Assim, as células T manipuladas expressando o MART-1 neoTCR demonstraram produção de citocinas específicas para o antígeno.

[0426]As células T modificadas foram avaliadas quanto à proliferação específica de antígeno e morte mediada por célula T específica de antígeno. Como mostrado na Figura 10A, as células alvo K562 transduzidas expressando pHLAs específicos para peptídeos demonstraram pouca ou nenhuma proliferação quando coincubadas com células T que expressam o MART-1 neoTCR manipulado usando pequenos (Figura 10A, “MART-1”) ou grandes (Figura 10A, “MART-1 (Grande)”) formatos de edição (relação E:T 2:1). Por outro lado, as células alvo cresceram quando incubadas isoladamente (Figura 10A, “células alvo isoladamente”) ou coincubadas com células T que foram submetidas a um procedimento de edição mock, mas não foram manipuladas para expressar um neoTCR (isto é, eletroporadas sem um modelo de HR ou RNP) (Figura 10A, “Mock”). Conforme mostrado na Figura 10B, as células alvo foram mortas quando coincubadas com células T que expressam o MART-1 neoTCR manipulado usando pequenos (Figura 10B, “MART-1”) ou grandes (Figura 10B, “MART- 1 (Grande)”) formatos de edição (relação E:T 2:1). Por outro lado, foi observada uma morte mínima das células alvo quando incubadas isoladamente (Figura 10B, “células alvo isoladamente”) ou coincubadas com células T que foram submetidas a um procedimento de edição mock, mas não foram manipuladas para expressar um neoTCR (Figura 10B, “Mock”). Assim, as células T manipuladas que expressam o neoTCR MART-1 demonstraram a morte específica de antígeno das células alvo.

[0427]Exemplo 5: Comparação da eficiência de edição por eletroporação e transdução

[0428]As células T foram manipuladas para expressar um neoTCR no lócus de TCR α , seguindo o procedimento padrão de edição de HR mediada por eletroporação ou o procedimento de transdução lentiviral. Um construto de MART-1 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO: 9) foi usado para edição mediada por eletroporação. Como mostrado na Figura 11, as células T modificadas que expressam ou o MART-1 neoTCR ou NY-ESO neoTCR foram geradas usando o procedimento de transdução lentiviral (Figura 11, painéis superiores) e as células T modificadas que expressam o MART-1 neoTCR foram geradas usando edição de HR mediada por eletroporação usando pequenos ou grandes formatos (Figura 11, painéis inferiores). Assim, a edição de HR mediada por eletroporação gerou uma porcentagem de células T manipuladas comparável ou superior à transdução lentiviral.

[0429]As células T manipuladas foram avaliadas quanto à morte mediada por células T específicas de antígeno. Como mostrado na Figura 12, as células alvo HLA-A02 expressam constitutivamente (Figura 12, coluna inferior em cada grupo) ou pulsam com (Figura 12, segunda coluna de baixo em cada grupo) um MART-1 TCR (F5), peptídeo antigênico MART-1 cognato, foram comparativamente mortas quando coincubadas com células T expressando o MART-1 neoTCR (F5) manipulado usando edição mediada por HR (Figura 12, “MART1 TCR HR”) ou transdução lentiviral (Figura 12, “MART1 TCR lenti”) (relação E:T 2:1). Por outro lado, foi observada morte mínima das células alvo quando coincubadas com células T que expressam um NY-ESO TCR não cognato (Figura 12, “NY-ESO TCR lenti”) ou coincubadas com células T submetidas a um processo de edição mock, mas não foram manipuladas para expressar um neoTCR (Figura 12, “Mock”). Além disso, a morte não foi observada acima dos níveis de referência quando coincubadas com células alvo HLA-A02 não pulsadas com um peptídeo cognato (Figura 12, coluna do meio de cada grupo) ou quando coincubada com células alvo expressando MHC HLA-A01 não cognato

(Figura 12, duas colunas superiores de cada grupo, a segunda de cima pulsada com 10 µM MART1). A quantificação dos dados é apresentada na Tabela 8 abaixo. Assim, as células T manipuladas para expressar um neoTCR seguindo o procedimento padrão de edição de HR mediada por eletroporação ou o procedimento de transdução lentiviral, demonstraram morte comparável.

[0430]Tabela 8: Morte citotóxica após edição por eletroporação ou transdução

	K562 HLA-A01 Sem peptídeo	K562 HLA-A01 10 uM MART1	K562 HLA-A02 Sem peptídeo	K562 HLA-A02 10 uM MART1	K562 HLA-A02 / MART1
Mock	9,8	9,8	9,8	9,5	9,4
NY-ESO TCR lenti	8,1	8,3	8,6	8,7	8,4
MART1 TCR lenti	9,5	8,5	8,1	38,1	39,4
MART1 TCR HR	11,0	10,6	10,4	25,6	34,5

[0431]Exemplo 6: Comparação de eficiência de edição usando modelos de HR circulares ou lineares

[0432]A eficiência de edição relativa mediada por HR do uso de DNA de plasmídeo circular purificado e dsDNA linear gerado por PCR como modelos de HR foi testada. Um produto de PCR padrão (Figura 13A, parte superior), bem como um produto de PCR gerado usando iniciadores com extremidades 5' protegidas por nuclease (ligações do esqueleto de fosforotioato terminal 5') foi usado para gerar dsDNA linear padrão e dsDNA linear “semiprotegido” (Figura 13A parte inferior). Neo12 neoTCRs foram integrados no lócus de TCRα. As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediado por eletroporação padrão e inserindo um construto de Neo12 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13) ou o modelo de HR linear Linear_TRAC (1k) P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 12). A eficiência de edição foi avaliada pela porcentagem de células T que expressam o

neoTCR (Neo12), conforme determinado pela coloração com dextrâmero específica para Neo12. O uso do DNA de plasmídeo gerou um nível significativamente mais alto de edição (47,3%, Figura 13B coluna da esquerda) em comparação com os modelos de HR linear (14,3% e 14,4%, Figura 13B colunas do meio e da direita, respectivamente), mesmo quando testados em um faixa de concentrações (massa igual mostrada aqui). Em um teste separado, o DNA linear covalentemente fechado (dbDNA, Touchlight) foi testado e demonstrou um perfil semelhante ao produto de PCR linear aberto (dados não mostrados). Assim, os resultados suportam a conclusão de que os modelos de HR de DNA de plasmídeo circular contendo as mesmas sequências de direcionamento de HR que os modelos de HR lineares suportam uma eficiência de edição três vezes maior em relação ao DNA linear gerado por PCR.

[0433]Exemplo 7: Comparação de modelos de HR circulares produzidos a partir de diferentes fontes

[0434]A viabilidade foi testada no procedimento de edição mediada por eletroporação padrão usando modelos de HR circulares produzidos a partir de diferentes fontes. Neo12 neoTCRs foram integrados no lócus de TCRα. As células T foram editadas inserindo-se um construto de Neo12 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular pUCu-Kan TRAC (1k)_P2A.Neo12.TRBC2opt.f-P2A.TRA (Va) (SEQ ID NO: 14) que foi ou adquirido em uma forma purificada (Figura 14 “pUC57”, Nature Technology) ou purificado internamente com um kit de purificação de DNA (Figura 14 “pUC57 internamente”, kit Maxi Macherey Nagel). Como mostrado na Figura 14, as células T eram viáveis por contagem de células (Figura 14, painel da esquerda) e avaliadas por um ensaio de viabilidade (AOPI, Figura 14, painel da direita), com o modelo de HR purificado internamente atingindo mais de 60% de viabilidade e modelo de HR adquirido atingindo viabilidade superior a 80%.

[0435]Notavelmente, esses resultados discordam de um relatório publicado recentemente (Roth, e outros [Nature. 2018 Jul; 559 (7714): 405 a 409]) que

descreveu o uso de um modelo de HR circular de plasmídeo na edição mediada por eletroporação como levando a uma viabilidade reduzida de células T quando comparada a produtos lineares.

[0436]Exemplo 8: Integração de NeoTCR (Neo12)

[0437]Um Neo12 neoTCR foi integrado no lócus de TCRα. As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de Neo12 neoTCR codificado pelo modelo de eHR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13) As células T manipuladas foram avaliadas quanto à expressão de Neo12 neoTCR por citometria de fluxo. A expressão de Neo12 neoTCR foi detectada por coloração com dextrâmero específica para Neo12. Importante ressaltar, o construto Neo12 utilizado foi modificado de modo a não estar ligado pelo anticorpo pan-TCR. Como mostrado na Figura 15, 36,5% das células T expressaram o Neo12 neoTCR e não expressaram o TCR endógeno (Figura 15, painel da direita). Além disso, a expressão do TCR endógeno foi rompida para a grande maioria das células T (96%). Apenas os níveis de referência do sinal de expressão de neoTCR foram detectados quando a célula T foi submetida a um procedimento de edição mock (Figura 15, painel da esquerda).

[0438]Também foram realizados experimentos de edição adicionais inserindo um construto de Neo12 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13). As células T manipuladas foram avaliadas como acima. Como mostrado na Figura 16, 74,5% das células T expressaram o Neo12 neoTCR e não expressaram o TCR endógeno (Figura 16, painel da direita). Além disso, a expressão do TCR endógeno foi rompida para a grande maioria das células T (98,6%). Apenas os níveis de referência do sinal de expressão de neoTCR foram detectados quando as células T não foram tratadas com “mock” (Figura 16, painel da esquerda).

[0439]Exemplo 9: Integração de NeoTCR para vários NeoTCRs

[0440] Vários neoTCRs foram integrados no lócus de TCR α . As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto MART-1 neoTCR (F5) codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 10), um construto de Neo12 neoTCR (Neo12) codificado por NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13), ou um construto de NY-ESO neoTCR (1G4) codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.1G4.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO: 11). As células T manipuladas foram avaliadas quanto à expressão de seus respectivos neoTCRs por citometria de fluxo através de coloração com dextrâmero específica para neoTCR. Os construtos de neoTCR utilizados aqui foram modificados de modo a não serem ligados pelo anticorpo pan-TCR. Como mostrado na Figura 17, 39,6%, 36,5% e 28,5% das células T expressaram os neoTCRs MART-1 (F5), Neo12 e NY-ESO (1G4), respectivamente, e não expressaram o TCR endógeno (Figura 17, painéis da esquerda, do meio e da direita, respectivamente) Além disso, a expressão do TCR endógeno foi rompida para a grande maioria das células T (97,9%, 96% e 86,6%, respectivamente). Assim, as células T manipuladas usando diferentes neoTCRs geralmente produziram eficiências de edição semelhantes, suportando a conclusão de que as eficiências de edição são reproduzíveis através de diferentes construtos de expressão de TCR usando os métodos de edição de células T aqui descritos.

[0441] Exemplo 10: Integração de NeoTCR em células T derivadas de pacientes

[0442] Vários neoTCRs foram integrados no lócus de TCR α de células T saudáveis ou derivadas de pacientes (melanoma, câncer colorretal e câncer de pulmão, tipicamente usadas em Bio-options e Conversant Bio). As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de MART-1 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular

NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 10), um construto de Neo12 neoTCR codificado por NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13) ou um construto de neoTCR NY-ESO codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.1G4.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO: 11). As células T manipuladas foram avaliadas quanto à expressão de seus respectivos neoTCRs por citometria de fluxo através de coloração com dextrâmero específica para neoTCR.

[0443]Como mostrado na Figura 18A, as células T de amostras saudáveis ou amostras de pacientes foram editadas com eficiência semelhante para os construtos de Neo12 e MART-1. Além disso, a eficiência da edição foi semelhante nos vários construtos de neoTCR testados, além de demonstrar eficiência de edição reproduzível entre amostras. Como mostrado na Figura 18B, as células T de amostras saudáveis foram editadas inserindo o Neo12 neoTCR com eficiências próximas de 75%.

[0444]O Neo12 neoTCR foi adicionalmente testado e os resultados da eficiência de edição são apresentados na Tabela 9. Em particular, foram observadas eficiências de edição semelhantes para amostras duplicadas de células T derivadas do paciente 1 (36,2% para a réplica #1 e 36,4% para a réplica #2), demonstrando ainda mais a reproduzibilidade dos métodos de edição de células T aqui descritos. Assim, os resultados demonstram que os métodos de edição de células T aqui descritos são amplamente aplicáveis a vários construtos de expressão e reproduzíveis dentro de um cenário clínico.

Tabela 9: Eficiência de Edição de Neo12 para Células Derivadas de Doador

	Mock 1	Mock 2	Saudável 1	Saudável 2	Paciente1 #1	Paciente 1 #2	Paciente 2
% WT somente	93,2	93,5	1,6	17,6	6,6	8,4	14,4
% WT+Neo12	0,7	0,4	0,6	0,6	0,7	1,3	1
% No TCR	6,1	6,1	58,6	63,8	56,5	53,9	60,2
% Neo12 somente	0	0	39,2	17,2	36,2	36,4	24,4

Mock = foi submetido ao procedimento de edição mock.

[0445]Exemplo 11: Integração de NeoTCR em células T CD4 e CD8

[0446]A eficiência de edição das células T CD4 e CD8 foi avaliada. Um Neo12 neoTCR foi integrado no lócus de TCRα. As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de Neo12 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13). Importante ressaltar, o construto Neo12 aqui utilizado foi modificado de modo a não estar ligado pelo anticorpo pan-TCR. A edição das células T CD8 foi avaliada por expressão do Neo12 neoTCR (coloração com dextrâmero específica para Neo12). A coloração com dextrâmero não foi sensível o suficiente para detectar moléculas de neoTCR nas células T CD4, provavelmente devido à apresentação de peptídeos nas moléculas MHC classe I e o CD8 não está presente para estabilizar as interações MHC-I / TCR. Portanto, a edição das células T CD4 foi avaliada pela detecção de complexos CD3 que não se ligam ao anticorpo pan-TCR. Como mostrado na Figura 19, as células T CD8 e CD4 foram editadas com eficiências semelhantes. Assim, os resultados demonstram que os métodos de edição de células T aqui descritos são amplamente aplicáveis a diferentes populações de células T.

[0447]Exemplo 12: Níveis de expressão de NeoTCR

[0448]Os níveis de expressão na superfície de vários neoTCRs foram testados após a integração no lócus de TCRα. As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de MART-1 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 10), um construto de Neo12 neoTCR codificado por NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13) ou um construto de neoTCR NY-ESO codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.1G4.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO: 11). A expressão na superfície dos vários neoTCRs e do TCR endógeno foi avaliada por citometria de fluxo através da coloração com anti-

CD3.

[0449]Como mostrado na Figura 20, a expressão na superfície de neoTCRs integrados foi comparável aos níveis de expressão na superfície de TCR endógeno. Os gráficos de citometria de fluxo de intensidade média fluorescente (MFI) se sobrepujaram amplamente ao TCR endógeno (Figura 20A, histograma da esquerda) e ao Neo12 neoTCR TCR (Figura 20A, histograma da direita) corados usando o mesmo anticorpo (CD3). Os cálculos de MFI para todos os três neoTCRs testados são quantificados na Figura 20B, com cada expressão na superfície demonstrável comparável aos níveis de TCR endógeno. Assim, os resultados demonstram que os métodos de edição de células T aqui descritos resultam na expressão na superfície do TCR completo (isto é, tanto TCR α quanto TCR β) que codificam o cassete de expressão inserido em níveis comparáveis ao endógeno.

[0450]Exemplo 13: Integração de NeoTCR em células T não congeladas de grande formato

[0451]PBMCs recém-isoladas (isto é, não congeladas) foram coletadas em leukopak e células T usando a plataforma Prodigy. As células T foram editadas através da inserção de um construto de Neo12 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular pUCu-Kan TRAC (1k) _P2A.Neo12.TRBC2opt.f-P2A.TRA (Va) (SEQ ID NO: 14). A expressão do Neo12 neoTCR foi detectada por coloração com dextrâmero específica para Neo12.

[0452]Como mostrado na Figura 21, 41,6% das células T positivas para CD8 expressaram o construto de Neo12. Assim, os resultados demonstram que os métodos de edição de células T aqui descritos são aplicáveis em um ambiente clínico.

[0453]Exemplo 14: Células T editadas são funcionais

[0454]As células T editadas foram avaliadas quanto à sua funcionalidade. Mais especificamente, as células T foram avaliadas quanto à produção / secreção de citocinas, proliferação de células T e morte de células alvo específicas do antígeno

usando células alvo (células K562 expressando HLA-A02) ou pulsadas com peptídeo (ilustrado na Figura 22) ou manipuladas para expressar o peptídeo preformado em um complexo de HLA (pHLA, ilustrado na Figura 23).

[0455]As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de MART-1 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 10), um construto de Neo12 neoTCR codificado por NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13) ou um construto de NY-ESO neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.1G4.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO: 11).

[0456]As células T manipuladas foram avaliadas quanto à morte mediada por células T específicas de antígeno, como descrito. Como mostrado na Figura 24, as células alvo foram mortas quando coincubadas com células T quando as células alvo foram pulsadas com seus respectivos peptídeos cognatos de maneira dependente da concentração de peptídeo (Figura 24, 0 a 1000 ng / ml) ou manipuladas para expressar o complexo peptídeo/HLA (Figura 24, pHLA) (razão E:T 4:1). Notavelmente, as células alvo manipuladas para expressar o complexo peptídeo/HLA demonstraram morte quase completa em contraste com as células pulsadas por peptídeo, provavelmente devido à natureza transitória dos peptídeos pulsados sendo apresentados por HLAs, sugerindo contextos fisiologicamente mais relevantes (por exemplo, apresentação não transitória de peptídeos de antígeno) pode resultar em um alto nível de morte. Além disso, a morte de células T específica de antígeno também foi demonstrada usando células alvo manipuladas que expressam o complexo peptídeo/HLA coincubado com células T expressando Neo12 usando um ensaio de morte celular de Anexina V (Relação E:T 4:1, dados não mostrados). Assim, as células T manipuladas demonstraram a morte das células alvo específica de antígeno.

[0457]As células T manipuladas foram avaliadas quanto à proliferação de células T específicas de antígeno, como descrito. Como mostrado na Figura 25, as células T que expressam Neo12 se proliferaram quando coincubadas com células alvo pulsadas com um peptídeo cognato Neo12 de maneira dependente da concentração de peptídeo (Figura 25A e 25B, 0 a 1000 ng / ml) ou manipuladas para expressar o complexo de peptídeo/HLA (Figura 25B, pHLa) (relação E:T 2:1). A Figura 25A mostra um gráfico de histograma representativo demonstrando a proliferação com células em divisão percentual calculada na Figura 25B. Assim, as células T manipuladas demonstraram proliferação específica de antígeno quando coincubadas com células alvo apresentando peptídeo cognato.

[0458]As células T manipuladas foram avaliadas quanto à produção de citocinas específica de antígeno. Como mostrado na Figura 26, as células T que expressam Neo12 produzem citocinas quando coincubadas com células alvo pulsadas com um peptídeo cognato Neo12 de maneira dependente da concentração de peptídeo (Figura 26A-D, 0 a 1000 ng / ml) ou manipuladas para expressar a complexo de peptídeo/HLA (Figura 26A-D, pHLa) (relação E:T 4:1). Notavelmente, o perfil de citocinas demonstrou produção de citocinas pró-inflamatórias Th1 subtipos IFN γ , IL-2, TNF α , e pouca IL-6 (apresentada nas Figuras 26A-D, respectivamente), mas não demonstrou produção de citocinas Th2 subtipos IL-4 ou IL -10 (dados não mostrados). Assim, as células T manipuladas demonstraram um perfil de citocina Th1 pró-inflamatória específica de antígeno quando coincubadas com as células alvo.

[0459]Exemplo 15: As células T derivadas de doadores editadas são funcionais

[0460]As células T derivadas de doadores foram avaliadas quanto à sua funcionalidade após a edição. Um Neo12 neoTCR foi integrado no lócus de TCRA. As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de Neo12 neoTCR codificado pelo

modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13) As células T manipuladas foram avaliadas quanto à eficiência de edição por citometria de fluxo através da coloração com dextrâmero específica para neoTCR. Como mostrado na Figura 27A, as células T derivadas de doadores saudáveis e doadores pacientes foram editadas com eficiência semelhante.

[0461]As células T manipuladas foram avaliadas quanto à morte mediada por células T específica de antígeno, como descrito. Como mostrado na Figura 27B, as células alvo foram mortas quando coincubadas com células T expressando Neo12 editadas, derivadas de doadores saudáveis e doadores pacientes quando as células alvo foram pulsadas com seus respectivos peptídeos cognatos de maneira dependente da concentração de peptídeo (Figura 27B, 0 a 1000 ng / ml) ou manipuladas para expressar o complexo de peptídeo/HLA (Figura 27B, “Neo12 HLA”) (relação E:T 4:1). Notavelmente, as células alvo manipuladas para expressar um complexo de peptídeo/HLA não cognato não demonstraram morte significativa (Figura 27B, “MART1 HLA”). Além disso, a morte não foi observada ao usar células T submetidas ao procedimento de edição mock. Assim, as células T derivadas de doadores saudáveis e derivadas de pacientes, manipuladas, demonstraram a morte específica de antígeno das células alvo, demonstrando aplicabilidade dentro de um ambiente clínico.

[0462]As células T derivadas de doadores saudáveis e de doadores pacientes manipuladas foram avaliadas quanto à proliferação de células T específicas de antígeno, como descrito. Como mostrado na Figura 27C, as células T de doadores expressando Neo12 se proliferaram quando coincubadas com células alvo pulsadas com um peptídeo cognato Neo12 de maneira dependente da concentração de peptídeo (Figura 27B, 0 a 1000 ng / ml) ou manipuladas para expressar o complexo de peptídeo/HLA (Figura 27C, “Neo12 HLA”) (relação E:T 4:1). Notavelmente, as células alvo manipuladas para expressar um complexo de peptídeo não cognato/HLA

não demonstraram proliferação de células T (Figura 27C, “MART1 HLA”). Além disso, a proliferação de células T não foi observada quando as células T foram tratadas com mock. Assim, as células T derivadas de doadores saudáveis e de doadores pacientes manipuladas demonstraram proliferação específica de antígeno quando coincubadas com células alvo apresentando peptídeo cognato.

[0463]As células T derivadas de doadores saudáveis e de doadores pacientes manipuladas foram avaliadas quanto à produção de citocinas específicas de antígeno. Como mostrado na Figura 27D, as células T expressando Neo12 produziram citocinas quando coincubadas com células alvo pulsadas com peptídeo cognato Neo12 a 100nM (relação E:T 4:1). Notavelmente, o perfil de citocinas demonstrou produção de citocinas pró-inflamatórias Th1 subtipo IFN γ , IL-2, TNF α e pouca IL-6. Assim, as células T derivadas de doadores saudáveis e de doadores pacientes manipuladas demonstraram um perfil de citocina Th1 pró-inflamatória específica de antígeno quando coincubadas com células alvo.

[0464]Notavelmente, as células T derivadas de doadores manipuladas não foram classificadas antes do ensaio realizado demonstrando que as células T derivadas de doadores manipuladas eram funcionais sem etapas adicionais de enriquecimento.

[0465]Exemplo 16: As células T derivadas de doadores expressando vários neoTCRs são funcionais

[0466]As células T foram avaliadas quanto à sua funcionalidade após a edição. Um Neo12 neoTCR e um MART-1 neoTCR foram integrados no lócus de TCR α . As células T do mesmo doador foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de MART-1 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 10) ou um construto de Neo12 neoTCR codificado por NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA

(Va) opt (SEQ ID NO: 13). As células T manipuladas foram avaliadas quanto à eficiência de edição por citometria de fluxo através da coloração com dextrâmero específica para neoTCR. Como mostrado na Figura 28A, as células T derivadas do mesmo doador foram editadas com eficiência semelhante para os construtos de TCR Neo12 e MART-1 (“F5”).

[0467]Essas células T manipuladas foram então avaliadas quanto à morte mediada por células T específicas de antígeno, conforme descrito (relação E:T 4:1). Como mostrado na Figura 28B, as células alvo foram mortas quando coincubadas com células T editadas expressando Neo12 (quadrados abertos) ou MART-1 (quadrados preenchidos) quando as células alvo foram pulsadas com seus respectivos peptídeos cognatos de maneira dependente da concentração de peptídeo (0 a 1000 ng / ml) ou manipuladas para expressar o complexo de peptídeo/HLA (“Neo12 HLA” e “MART-1 HLA”) (relação E:T 4:1). Notavelmente, as células alvo manipuladas para expressar um complexo de peptídeo não cognato/HLA não demonstraram morte significativa, ou seja, as células T Neo12 não mataram as células expressando MART1 HLA e as células T MART-1 (“F5”) não mataram as células Neo12 HLA. As células T derivadas de doadores manipuladas foram avaliadas quanto à sua proliferação específica de antígeno, como descrito. Como mostrado na Figura 28C, as células T de doadores expressando Neo12 (quadrados abertos) ou MART-1 (quadrados preenchidos) se proliferaram quando coincubadas com células alvo pulsadas com seu respectivo peptídeo cognato de maneira dependente da concentração de peptídeo (0 a 1000 ng / ml) ou manipuladas para expressar o complexo de peptídeo/HLA (“Neo12 HLA” e “MART-1 HLA”) (relação E:T 4:1). Notavelmente, as células alvo manipuladas para expressar um complexo de peptídeo não cognato/HLA não demonstraram proliferação de células T, ou seja, as células T Neo12 não se proliferaram quando coincubadas com células expressando MART1 HLA e as células T MART-1 (“F5”) não se proliferaram quando coincubadas com

células Neo12 HLA. Assim, células T derivadas de doadores manipuladas demonstraram proliferação específica de antígeno quando coincubadas com células alvo apresentando peptídeo cognato demonstrando aplicabilidade dentro de um cenário clínico para múltiplos construtos de TCR.

[0468]Notavelmente, as células T derivadas de doadores manipuladas não foram classificadas antes do ensaio realizado demonstrando que as células T derivadas de doadores manipuladas eram funcionais sem etapas adicionais de enriquecimento.

[0469]Exemplo 17: As células T editadas mantêm a atividade funcional

[0470]A capacidade das células T manipuladas de manter sua funcionalidade para cultura estendida foi avaliada. Um Neo12 neoTCR e um MART-1 neoTCR foram integrados no lócus de TCR α . As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de MART-1 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 10) ou um construto de Neo12 neoTCR codificado por NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13).

[0471]Como mostrado na Figura 29, as células T modificadas Neo12 e MART-1 foram capazes de matar as células alvo, de maneira específica de antígeno, 14 dias (Figura 29, painel da esquerda) e 2 meses (Figura 29, painel da direita) após a fabricação com eficiência comparável. As células alvo foram mortas quando coincubadas com células T editadas, derivadas do mesmo doador, expressando Neo12 (círculos abertos) ou MART-1 (círculos preenchidos) quando as células alvo foram pulsadas com seus respectivos peptídeos cognatos de maneira dependente da concentração de peptídeo (0 a 1000 ng / ml) ou manipulados para expressar o complexo de peptídeo/HLA (“Neo12 HLA” e “MART-1 HLA”) (relação E:T 4:1). Notavelmente, as células alvo manipuladas para expressar um complexo de peptídeo

não cognato/HLA não demonstraram morte significativa, ou seja, as células T Neo12 não mataram as células que expressam MART1 HLA e as células T MART-1 ("F5") não mataram as células Neo12 HLA. As células foram mantidas em meio contendo IL7 e IL-15 (sem antígeno) e eram saudáveis em cultura. Assim, as células T editadas mantiveram a expressão de TCR e a atividade específica de antígeno por um período prolongado, demonstrando a aplicabilidade dentro de um ambiente clínico.

[0472]Notavelmente, as células T manipuladas não foram classificadas antes do ensaio realizado, demonstrando que as células T manipuladas eram funcionais sem etapas adicionais de enriquecimento.

[0473]Exemplo 18: Caracterização de células T editadas

[0474]As células T derivadas de doador (doador saudável) manipuladas foram avaliadas quanto à sua funcionalidade após a edição. Um Neo12 neoTCR e um MART-1 neoTCR foram integrados no lócus de TCRα. As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de MART-1 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 10) ou um construto de Neo12 neoTCR codificado por NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13).

[0475]A análise do secretoma de célula única foi realizada para células T manipuladas expressando neoTCR em uma base por célula (Isoplexis). A plataforma Isoplexis utilizou um microdispositivo de teste de citocina de célula única de 32 plex (chip de código de barras de célula única) para delinear a resposta das células T à estimulação específica de antígeno. Os subconjuntos de células T CD4+ e CD8+ foram separados usando microesferas anti-CD4 ou anti-CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). As células CD4 e CD8 foram estimuladas separadamente com peptídeo específico / células alvo (cocultivadas com células alvo pulsadas com peptídeo específico a 10 ou 100 nM ou com células alvo manipuladas para expressar

o complexo de peptídeo/HLA específico) ou controles por 19 a 21 horas a uma relação de 1:2 a 37° C, 5% de CO₂. A presença de células T CD4+ ou CD8+ foi confirmada por coloração com anticorpo anti-CD4 ou anti-CD8 conjugado Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Cell Therapy Systems, Waltham, MA) em temperatura ambiente por 10 minutos, lavado uma vez com solução salina tamponada com fosfato, e ressuspenso em meio a uma densidade de 1×10^6 células / mL. Aproximadamente 30 µL da suspensão de células foram carregados no microchip de código de barras de célula única para avaliação do secretoma de célula única. Para cada amostra, um ensaio de 32 plex mediou proteínas secretadas a partir de ~2000 células T. A microscopia bruta e as varreduras de microarranjo das amostras de células carregadas no chip de código de barras de célula única e os dados de secreção de proteínas foram analisados usando o software Isoplexis para determinar quais combinações de proteínas foram secretadas por cada célula individual.

[0476]Como mostrado na Figura 30, a análise de Isoplexis demonstrou perfis polifuncionais para células T CD4 e CD8. Os perfis são mostrados para CD4 (painéis da esquerda) e CD8 (painéis da direita) para células T modificadas que expressam Neo12 neoTCR (Figura 30A) e células T modificadas que expressam MART-1 neoTCR (“F5”) (Figura 30B). As células T CD8+ demonstraram um perfil polifuncional dose-dependente (secreção de múltiplas citocinas) com até 40% das células (representando a % de células editadas pelo TCR neste experimento, portanto, todas as células T editadas eram polifuncionais) produzindo mais de uma citocina tanto para as células T Neo12 neoTCR (Figura 30A, painel da direita) quanto para MART-1 (“F5”) (Figura 30B, painel da direita). As respostas de CD4 foram geralmente mais fracas que as respostas de CD8, provavelmente devido à ausência de CD8 estabilizando a interação MHC-I / TCR. Notavelmente, as células T CD4+ MART-1 neoTCR (“F5”) demonstraram um perfil polifuncional após a estimulação do antígeno com células alvo pulsadas com peptídeo (Figura 30B, painel da esquerda “10 nM” e “100 nM”) ou

manipuladas para expressar um complexo de peptídeo MART- 1/HLA (Figura 30B, painel da esquerda “MART1 HLA”). Por outro lado, as células T CD4+ Neo12 demonstraram um perfil polifuncional detectável quando estimuladas com células alvo manipuladas para expressar um complexo de peptídeo Neo12/HLA (Figura 30A, painel da esquerda “Neo12 HLA”), mas não demonstraram produção detectável de citocinas quando incubadas com células alvo pulsadas com peptídeo (Figura 30A, painel da esquerda “10 nM” e “100 nM”)), novamente provavelmente devido à ausência de CD8 estabilizando a interação MHC-I / TCR.

[0477]Além disso, como mostrado na Figura 30C, enquanto a maior contribuição das células T manipuladas é para os níveis gerais de IFN γ (Figura 30C, painel da esquerda), a porcentagem de células T que produzem IFN γ é menor do que o número de células (Figura 30C, painel da direita), como a eficiência de edição do gene Neo12 neoTCR e MART-1 neoTCR (F5) para este estudo foi de ~ 45% (dados não mostrados). Em contraste, a porcentagem de células T que produzem TNF α se correlaciona melhor com a eficiência de edição, isto é, a quantidade de TNF (~ 45%) correlacionada com a quantidade de edição de genes (~ 45%). (Figura 30C, painel da direita e dados não mostrados). Assim, os resultados de Isoplexis demonstraram que a secreção de TNF α pelas células T manipuladas pode ser melhor preditor de sua atividade de morte in vitro em comparação com a secreção de IFN γ .

[0478]Assim, a análise de Isoplexis demonstrou que as populações de células que expressam neoTCR manipuladas têm atividade polifuncional, importante mesmo na presença de baixa estimulação de antígeno (uma consideração importante para a eficácia in vivo).

[0479]Exemplo 19: Eficiência dos efeitos do tempo na eletroporação

[0480]O tempo da etapa de incubação dos complexos de RNP com células antes da eletroporação foi avaliado. Após a colheita de células T ativadas, centrifugação e ressuspensão no tampão de eletroporação, as células foram

misturadas com complexos de RNP e deixadas em temperatura ambiente por vários períodos de tempo (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutos e menos de 1 minuto) antes da eletroporação e cultura subsequente. As células foram analisadas por citometria de fluxo quanto à percentagem de células T editadas por coloração com dextrâmero específica para neoE e por % de viabilidade utilizando um contador de células. A viabilidade variou de ~ 20 a ~ 100% para períodos de incubação de 45 minutos ou menos, enquanto a incubação aos 60 minutos foi de quase 0% (dados não mostrados). A porcentagem de células T editadas corretamente (dextrâmero + / TCR-endógeno) foi superior a 20% para todos os pontos no tempo testados (dados não mostrados).

[0481]Exemplo 20: Edição de HSC

[0482]HSCs humanos (também chamados de HSPCs) foram editados para inserir um neoTCR. O fluxo de trabalho geral para a edição de HSC é apresentado na Figura 31. HSCs isolados (células CD34+) células CD34+ foram cultivadas em meio pré-estímulo por 48 horas (X-VIVO + 50 ng / ml de SCF, TPO, FL-3L e 20 ng / ml de IL-3). A nucleofecção foi realizada utilizando as condições descritas na Tabela 10 abaixo. As células eletroporadas (isto é, células primárias modificadas) foram plaqueadas em meio BBMM (IMDM, FBS a 20%, BSA a 35%, 5 ng / ml de IL3, 10 ng / ml de IL6, SCF: 25 ng / ml); o meio foi trocado regularmente, e as células colhidas 16 dias após a nucleofecção. As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de Neo12 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13).

Tabela 10: Condições de nucleofecção de HSC

Grupo	Células	Volume	Programa	RNP (Cas9/sgRNA, pmol)	DNA (μg)
1	0,5E6	20 uL	DZ100	1,33	2
2	0,5E6	20 μL	DZ100	1,33	4
3	0,5E6	20 μL	DZ100	1,33	6
4	0,5E6	20 μL	DZ100	1,33	0
5	0,5E6	20 μL	EK100	1,33	2
6	0,5E6	20 μL	EK100	1,33	4
7	0,5E6	20 μL	EK100	1,33	6
8	0,5E6	20 μL	EK100	1,33	0
9	0,5E6	20 μL	FA100	1,33	2
10	0,5E6	20 μL	FA100	1,33	4
11	0,5E6	20 μL	FA100	1,33	6
12	0,5E6	20 μL	FA100	1,33	0
13	0,5E6	20 μL	DZ100	0	0
14	0,5E6	20 μL	N/A	0	0

[0483] Para avaliar a edição, o gDNA foi extraído e PCR in-out realizada. Como mostrado na Figura 32, os grupos 5, 6, 7 e 10 demonstraram uma banda de PCR amplificada de 1Kb indicativa de integração adequada. Assim, os HSCs foram adequadamente editados no lócus de TCRα.

[0484] Para avaliar ainda mais a edição nos HSCs, o procedimento de edição foi realizado conforme acima, usando 4 μg de um modelo de HR contendo um Zgreen acionado por um promotor MND e sequência de codificação LNGRF truncada flanqueada por braços de homologia esquerdo e direito de 1 kb (“Braços de HR”) e separados por sequências P2A, codificadas em um plasmídeo circular (pUCu-Kan TRAC (1k) _MNDZsGreen.f-P2A.LNGFRt.P2A; SEQ ID NO: 15). Os HSCs ($0,4 \times 10^6$) foram eletroporados usando o programa EK100 em 20 μL usando 1,13 pmol de RNP (Cas9 / sgRNA). Conforme avaliado por microscopia de campo claro e fluorescente, as colônias de metil celulose no Dia 14 expressaram ZsGreen (dados não mostrados).

[0485] Exemplo 21: Edição do comprimento do braço de HR

[0486]Um MART-1 neoTCR foi integrado ao lócus de TCR α . As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de MART-1 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA com comprimentos de braço de HR que incluiu 300 pares de bases, 600 pares de bases, 1000 pares de bases (padrão) ou 2000 pares de bases.

[0487]As células T manipuladas foram avaliadas quanto à expressão de MART-1 neoTCR (coloração com dextrâmero específica para MART-1) e perda da expressão de TCR endógeno por citometria de fluxo. Conforme resumido na Tabela 11, a eficiência de edição para gerar células T editadas corretamente (dextrâmero+ / TCR- endógeno) foi maior ou igual a 17,6% para todos os comprimentos de braço testados e maior do que 20% para todos os comprimentos de braço de 600 pares de bases ou mais testados.

Tabela 11: Eficiência de edição usando vários comprimentos de braços de

HR

	TCR+ Dex-	TCR+ Dex+	TCR- Dex+	TCR- Dex-
Braços de HR #1 de 2000 bp	3,4	1,04	26,3	69,3
Braços de HR #2 de 2000 bp	5,81	1,18	25,5	67,5
Braços de HR de 1000 bp (Padrão)	1,64	0,6	22,7	75,1
Braços de HR de 600 bp #1	3,94	0,84	20,9	74,3
Braços de HR de 600 bp #2	2,32	0,87	21,5	75,3
Braços de HR de 300 bp #1	1,59	0,43	17,6	80,3
Braços de HR de 300 bp #2	1,1	0,52	20,4	78

[0488]Exemplo 22: Inibidor A151 melhora a viabilidade

[0489]As células T foram editadas seguindo o procedimento de edição mediada por eletroporação padrão e inserindo um construto de Neo12 neoTCR codificado pelo modelo de HR circular NTC9385R-TRAC (1k) DTS_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA (Va) opt (SEQ ID NO: 13). As células T manipuladas foram avaliadas quanto à expressão de Neo12 neoTCR por citometria de fluxo. A expressão de Neo12 neoTCR foi detectada por coloração com dextrâmero

específica para Neo12. Importante ressaltar, o construto Neo12 aqui utilizado foi modificado de modo a não estar ligado pelo anticorpo pan-TCR.

[0490]As células T foram editadas com várias concentrações de A151 adicionadas pré-incubação. Conforme resumido na Tabela 12, enquanto a eficiência de edição para gerar células T adequadamente editadas (dextrâmero+ / TCR-endógeno) não variou significativamente quando A151, a viabilidade celular (avaliada pelo número de células) melhorou com a adição de 0,1 µM ou 10 µM de A151.

[0491]As células T foram editadas com 0,1 µM de A151 adicionado em diferentes estágios do procedimento de edição. Conforme resumido na Tabela 13, enquanto a eficiência de edição para gerar células T editadas corretamente (dextrâmero+ / TCR- endógeno) não variou significativamente quando A151 nos diferentes estágios testados, a viabilidade celular das células editadas (avaliada pelo número de células editadas) melhorou com a adição de A151 durante a pré-incubação de RNPs e células, bem como a adição de A151 durante a pré-incubação e pós-eletroporação.

Tabela 12: Eficiência de edição e viabilidade usando várias concentrações de

A151

	Dex- TCR+	Dex+ TCR+	Dex+ TCR-	Dex- TCR-	Número total de células editadas
SC	6,71	0,67	56,2	36,4	2,55
0,01 uM de A151	3,8	0,63	57	38,6	2,47
0,1 uM de A151	3,48	0,81	65	30,7	2,94
1 uM de A151	5,41	0,88	60,2	33,5	2,53
10 uM de A151	10,6	0,71	54,6	34,1	2,77

TCR = anticorpo IP26, porcentagens expressas em porcentagem de células CD8+

Tabela 13: Eficiência de edição e viabilidade após a incubação de A151 em vários tempos

	Dex- TCR+	Dex+ TCR+	Dex+ TCR-	Dex- TCR-	Número total de células editadas
Condições padrão	2,98	0,63	42,4	54	13,45
	3,83	0,5	44,4	51,3	15,9
	7	0,59	40,6	51,8	13,04
Pré-incubação	1,02	0,51	46,1	524	22,8

	2,75	0,53	48,4	48,3	25,2
	1,98	0,53	50,3	47,2	23,41
Durante EP	5,84	0,37	41,9	51,9	10,65
	5,33	0,63	44,1	550	11,88
	9,4	0,4	32,8	57,4	9,16
Pós-incubação	2,53	0,52	45	51,9	15,18
	5,71	0,37	35,4	58,6	11,37
	6,72	0,58	39,5	53,2	12,89
Pré + Pós- incubação	4,59	0,45	36,4	58,6	18,41
	2,36	0,5	42,1	55	18,8

TCR = anticorpo IP26, porcentagens expressas em porcentagem de células CD8+

[0492]Exemplo 23: Eficácia de células T manipuladas em modelos de tumor

[0493]A eficácia *in vivo* de células T humanas manipuladas por TCR é avaliada contra células tumorais humanas que expressam as moléculas de neoantígeno e HLA específicas, tal como K562 transduzidas para expressar constitutivamente o antígeno específico e HLA ou células tumorais humanas primárias que expressam endogenamente o neoantígeno específico e HLA balanceado. As células tumorais (1×10^6 ou 3×10^6) são inoculadas subcutaneamente no flanco de camundongos NSG com 8 semanas de idade (Jackson Laboratory). O crescimento do tumor é monitorado medindo as dimensões do tumor (usando um paquímetro) 2 a 3 vezes por semana. O tamanho do tumor é calculado usando a seguinte fórmula: (Comprimento x Largura²) / 2. Quando os tumores atingem ~ 100 mm³ de tamanho, os camundongos recebem doses de 1×10^6 ou 5×10^6 células T humanas manipuladas por TCR (grupo de tratamento) ou com PBS ou células T mock (eletroporadas sem RNPs ou modelo de HR). O crescimento do tumor é monitorado ao longo do tempo e os camundongos são sacrificados quando os tumores atingem 2000 mm³ de tamanho. Uma coorte de camundongos de cada grupo é sacrificada no momento inicial (4 a 7 dias após a administração das células T). Sangue, baço e tumores são coletados. A presença das células T humanas editadas no sangue é avaliada por qPCR e citometria de fluxo. A presença / infiltração de células T humanas editadas no tumor é avaliada por qPCR, citometria de fluxo e por imuno-histoquímica.

[0494]Os resultados demonstram que a eficácia *in vivo* de células T humanas

manipuladas por TCR é avaliada contra células tumorais humanas.

[0495]Exemplo 24: Edição de NK

[0496]As células exterminadoras naturais humanas (células NK) foram editadas integrando um construto de repórter ZsGreen no lócus de TCR α . As células NK foram isoladas coletando primeiro o fluxo através de um isolamento de seleção positiva CD4 / CD8 (Miltenyi, CliniMACS). As células mononucleares foram isoladas usando Ficoll (procedimento padrão) e depois as células NK foram isoladas especificamente usando um kit de isolamento de células NK (Miltenyi). As células NK isoladas (1×10^6) foram ativadas em uma cultura contendo Meio Completo NK MACS (Miltenyi), hABS a 5% (Valley Biomedical), 200 ng / mL de IL-2 (Miltenyi), 12,5 ng / mL de IL-15 (Miltenyi), e microesferas de ativação de NK Miltenyi (microesferas de 5 uL / 10^6 células por instruções do fabricante). No dia 3 após a ativação, as células NK ativadas (3×10^6) foram eletroporadas em volumes de 100 μ L de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 14 abaixo. Um modelo de reparo homólogo contendo um ZsGreen acionado por um promotor MND e uma sequência de codificação LNGRF truncada, flanqueada por braços de homologia esquerdo e direito de 1 kb (“Braços de HR”) e separados por sequências P2A, codificadas em um plasmídeo circular (pUCu-Kan TRAC (1k) _MNDZsGreen .f-P2A.LNGFRt.P2A; SEQ ID NO: 15).

[0497]Os grupos foram avaliados quanto à expressão de GFP por citometria de fluxo nos Dias 4, 7 e 11. Como resumido na Tabela 14, a expressão de ZsGreen foi vista desde o Dia 4 (grupos 12 e 13). No Dia 11, mais de 20% das células eram ZsGreen usando os programas EN-138 e EK-100 (grupos 11, 12, 14 e 15). Um gráfico representativo demonstrando a expressão de ZsGreen no Dia 11 (grupo 12) é mostrado na Figura 33.

[0498]A análise molecular para integração usando a técnica de PCR in-out foi realizada para confirmar a integração genômica precisa do construto de expressão no lócus de TCR α . PCR usou o iniciador direto a montante usado na análise de

integração de TCR anterior (SEQ ID NO: 1), enquanto um iniciador reverso a montante específico para uma inserção de MND foi usado como iniciador reverso (AGGGTCATTCAGGTCTT, SEQ ID NO: 23), exceto o controle positivo que utilizou o gRNA de uma célula T editada e seu respectivo iniciador reverso (SEQ ID NO: 2). Como resumido na Tabela 14 e mostrado na Figura 34, os grupos 11 a 18 demonstraram uma banda de PCR amplificada de 1Kb indicativa de integração adequada. Assim, as células NK foram editadas adequadamente no lócus de TCRα. Notavelmente, a intensidade da banda de PCR correlacionou-se com a porcentagem de células que expressam ZsGreen, isto é, amostras com a maior porcentagem de ZsGreen produziram a banda de PCR mais brilhante.

Tabela 14: Resumo da edição de células NK

Grupo	Programa	RNP (Cas9/sgRNA, pmol / reação)	DNA (ug / reação)	% de Análise de Fluxo D4 ZsGreen+	% de Análise de Fluxo D7 ZsGreen+	% de Análise de Fluxo D11 ZsGreen+	Análise molecular: Intensidade da banda de PCR (D11)
11	EN-138	100 / 600	75	Células não suficientes	18,4	24,5	+++
12	EN-138	165 / 1000	75	28,3	32,8	34,3	++++
13	EN-138	165 / 1000	150	11,8	NP	NP	+
14	EK-100	100 / 600	75	Células não suficientes	NP	45,2	+++
15	EK-100	165 / 1000	75	Células não suficientes	NP	22,7	++
16	EK-100	165 / 1000	150	Células não suficientes	NP	NP	+
17	FA-100	100 / 600	75	Células não suficientes	NP	NP	++
18	FA-100	165 / 1000	75	0	NP	6,14	++
19	FA-100	165 / 1000	150	Células não suficientes	NP	NP	-
20	FA-100	sem RNPs	150	Células não suficientes	0	Células não suficientes	NP

NP = não realizado; n = 1 para todos os grupos

[0499]Exemplo 25: Edição de Células Primárias

[0500]As células primárias são editadas seguindo os procedimentos descritos acima. O procedimento, incluindo mas não limitado a alterações nas condições de eletroporação e reagentes, é ajustado dependendo da célula primária exata a ser editada. As células primárias incluem células-tronco, células-tronco humanas, células-tronco embrionárias e células imunes. Exemplos de células imunes incluem, mas não estão limitados a, células B, células T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células exterminadoras naturais.

[0501]Modalidades Adicionais e Incorporação de Referências

[0502]Embora a invenção tenha sido particularmente mostrada e descrita com referência a uma modalidade preferencial e várias modalidades alternativas, será entendido por pessoas versadas na técnica relevante que várias alterações na forma e nos detalhes podem ser feitas sem abandonar o espírito e o escopo da invenção.

[0503]Todas as referências, patentes emitidas e pedidos de patente citados dentro do corpo da presente especificação são incorporados por referência em sua totalidade, para todos os fins.

REIVINDICAÇÕES

1. Célula modificada, **CARACTERIZADA** pelo fato de que comprehende:

um polinucleotídeo circular compreendendo uma sequência de nucleotídeo exógena, a sequência de nucleotídeo exógena compreendendo:

 - a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene;
 - b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um locus alvo genômico endógeno; e
 - c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do locus alvo genômico endógeno,

as sequências de nucleotídeo idênticas às primeira e à segunda região do locus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no locus alvo genômico endógeno, e

a célula modificada está substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus.
2. Célula modificada compreendendo uma célula T, a célula T **CARACTERIZADA** pelo fato de que comprehende:
 - a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa;
 - b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta;
 - c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma primeira sequência de polipeptídeo ligante;
 - d) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência de polipeptídeo ligante;

em que a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-

beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são integradas em um locus de TCR-alfa endógeno,

a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeos ligantes são orientadas de modo que cada uma das sequências polipeptídica seja capaz de ser expressa como um único polipeptídeo, em que a segunda sequência de polipeptídeo ligante está posicionada entre a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta,

o primeiro e o segundo polipeptídeo ligante são polipeptídeos ligantes cliváveis capazes de serem clivados na célula T, de modo que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta formam um polipeptídeo separado, em que os polipeptídeos separados são capazes de se associarem juntos para formar um TCR funcional,

em que a célula modificada está substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus, e

em que um locus de TCR-beta endógeno é rompido.

3. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que comprehende adicionalmente uma sequência de nucleotídeo integrada, em que a sequência de nucleotídeo integrada comprehende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção do gene, a sequência de nucleotídeo integrada é integrada no locus alvo genômico endógeno, e a sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa.

4. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADA** pelo fato de que comprehende adicionalmente uma composição de nuclease capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida dentro do locus alvo

genômico endógeno.

5. Célula modificada compreendendo uma célula T, a célula T **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

- a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa;
- b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta;
- c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma primeira sequência de polipeptídeo ligante;
- d) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência de polipeptídeo ligante;

em que a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são integradas em um locus de TCR endógeno,

a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são orientadas de modo que cada uma das sequências de polipeptídeo seja capaz de ser expressa como um único polipeptídeo, em que a segunda sequência de polipeptídeo ligante é posicionada entre a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta, e

o primeiro e o segundo polipeptídeo ligante são polipeptídeos ligantes cliváveis capazes de serem clivados na célula T, de modo que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta formam um polipeptídeo separado, em que os polipeptídeos separados são capazes de se associarem juntos para formar um TCR funcional.

6. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que comprehende adicionalmente um polinucleotídeo circular compreendendo uma sequência de nucleotídeo exógena, a sequência de nucleotídeo exógena compreendendo:

a) uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante;

b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região do locus de TCR endógeno; e

c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do locus de TCR endógeno, e

as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do locus de TCR endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no locus de TCR endógeno.

7. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula modificada está substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus.

8. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que comprehende adicionalmente uma composição de nuclease capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida dentro do locus de TCR endógeno.

9. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que comprehende adicionalmente uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida.

10. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADA**

pelo fato de que a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região de codificação do gene selecionado a partir do grupo que consiste de: uma mutação de deslocamento de quadro resultando em uma mudança no quadro da proteína traduzida, uma mutação sem sentido que causa uma substituição de um aminoácido para um códon terminal, e uma mutação “missense” que resulta em uma substituição de um aminoácido para outro.

11. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região não codificante do gene selecionado a partir do grupo que consiste de: uma mutação que altera a expressão de um produto de mRNA codificado pelo gene, e uma mutação que altera a estabilidade de um produto de mRNA codificado pelo gene.

12. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente uma segunda composição de nuclease capaz de clivar a segunda sequência de nucleotídeo definida dentro da célula modificada.

13. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 4 ou qualquer uma das reivindicações 8 a 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição de nuclease compreende uma nuclease selecionada a partir do grupo que consiste de uma nuclease da família de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespacadas (CRISPR) ou um derivado da mesma, uma nuclease efetora semelhante a ativadores de transcrição (TALEN) ou derivado da mesma, uma nuclease dedo de zinco (ZFN) ou derivado da mesma, e uma endonuclease teleguiada (HE) ou derivado da mesma.

14. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a nuclease da família CRISPR é uma nuclease Cas9.

15. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 4 ou qualquer uma das

reivindicações 8 a 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição de nuclease compreende um complexo proteico preformado.

16. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 4 ou qualquer uma das reivindicações 8 a 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição de nuclease compreende um vetor de nucleotídeo capaz de expressar a nuclease dentro da célula modificada.

17. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 4 ou qualquer uma das reivindicações 8 a 16, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição de nuclease compreende um RNA CRISPR (crRNA) e um RNA CRISPR de transativação (tracrRNA).

18. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o crRNA compreende um RNA guia (gRNA), em que o gRNA é complementar à sequência de nucleotídeo definida.

19. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o crRNA e o tracrRNA estão em um único polinucleotídeo.

20. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o crRNA e o tracrRNA estão em polinucleotídeos separados.

21. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a expressão da sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene ou das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor endógeno dentro do locus alvo genômico endógeno ou do locus de TCR endógeno.

22. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a expressão da sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene ou das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor exógeno.

23. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADA**

pelo fato de que o promotor exógeno é selecionado a partir do grupo que consiste de promotores de mamíferos, promotores humanos, promotores virais, promotores derivados de repetição terminal longa (LTR) a partir de um retrovírus ou lentivírus, fusões de dois promotores, fusões de duas porções de promotores, promotores MMLV LTR, promotores HIV LTR, promotores MCMV LTR, EF1a, MND, CMV, SV40, PGK1, Ubc, beta-actina, CAG, promotores induzíveis de pequenas moléculas, promotores induzíveis de tetraciclina, promotores condicionais de pequenas moléculas, sistemas promotores condicionais Cre-LoxP, sistemas promotores condicionais Flp-FRT, e sistemas promotores condicionais de tamoxifeno.

24. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa ou a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta tem um comprimento igual ou superior a 100 bases.

25. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa ou a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta é maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 400 bases de comprimento, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 800 bases de comprimento, maior ou igual a 1500 bases de comprimento, maior ou igual a 2000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 4000 bases de comprimento.

26. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de nucleotídeos idênticas à primeira região do locus alvo genômico endógeno ou do locus de TCR endógeno são maiores ou iguais a 50 bases de comprimento, maiores ou iguais a 100 bases de

comprimento, maiores ou iguais a 200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 600 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento, ou maiores ou iguais a 2000 bases de comprimento.

27. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do locus alvo genômico endógeno ou do locus de TCR endógeno são maiores ou iguais a 50 bases de comprimento, maiores ou iguais a 100 bases de comprimento, maiores ou iguais a 200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 600 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento, ou maiores ou iguais a 2000 bases de comprimento.

28. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região do locus alvo genômico endógeno ou ao locus de TCR endógeno e as sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do locus alvo genômico endógeno ou do locus de TCR endógeno são maiores ou iguais a 600 bases de comprimento.

29. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 4 ou qualquer uma das reivindicações 8 a 28, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo definida é rompida após a integração das sequências de nucleotídeo.

30. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a expressão de um gene endógeno operacionalmente associado ao locus alvo genômico endógeno ou ao locus de TCR endógeno é rompida.

31. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente reagentes

adicionais que são capazes de aumentar as taxas de recombinação homóloga.

32. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 31, **CARACTERIZADA** pelo fato de que os reagentes adicionais que são capazes de aumentar as taxas de recombinação homóloga compreendem ativadores de vias de reparo de recombinação homóloga, inibidores de vias de reparo de junção de extremidade não homóloga (NHEJ), ou combinações dos mesmos.

33. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente reagentes adicionais que são capazes de aumentar a viabilidade da célula modificada.

34. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADA** pelo fato de que os reagentes adicionais que são capazes de aumentar a viabilidade da célula modificada compreendem inibidores das vias de detecção de ácido nucleico.

35. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 34, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as vias de detecção de ácido nucleico compreendem o grupo selecionado a partir de: vias de detecção de ácido nucleico TLR9, vias de detecção de ácido nucleico AIM2, vias de detecção de ácido nucleico IFI16, vias de detecção de ácido nucleico cGAS, vias de detecção de ácido nucleico cGAS, e vias de detecção de ácido nucleico citosólico.

36. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 34, **CARACTERIZADA** pelo fato de que os inibidores das vias de detecção de ácido nucleico compreendem um antagonista de oligonucleotídeo.

37. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 36, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o antagonista de oligonucleotídeo compreende a sequência TTAGGG ou repetições em tandem da mesma.

38. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou qualquer uma das reivindicações 6 a 33, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polinucleotídeo circular compreende um plasmídeo ou um nanoplasmídeo.

39. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 38, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o plasmídeo tem um esqueleto de vetor que é menor do que 500 bases, e em que o esqueleto de vetor é uma sequência de nucleotídeo que não é a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene, nem a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, nem a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, nem as sequências de nucleotídeo que codificam o primeiro e o segundo polipeptídeo ligante, e nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao primeiro locus genômico alvo endógeno ou locus de TCR endógeno, e nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao segundo locus genômico alvo endógeno ou locus de TCR endógeno.

40. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou qualquer uma das reivindicações 6 a 39, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polinucleotídeo circular não é um polinucleotídeo amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR).

41. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno ou o locus de TCR endógeno compreende uma região de codificação.

42. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno ou o locus de TCR endógeno compreende um ítron.

43. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno ou o locus de TCR endógeno compreende o locus do receptor de célula T (TCR)-alfa.

44. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 43, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene não funcional codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida é um gene de TCR-beta rompido.

45. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

42, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno ou o locus de TCR endógeno compreende o locus de TCR-beta.

46. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 45, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene não funcional codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida é um gene de TCR-alfa rompido.

47. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou qualquer uma das reivindicações 9 a 42, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o alvo genômico endógeno compreende um locus da via de sinalização imune.

48. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 47, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus da via de sinalização imune é selecionado a partir do grupo que consiste de PD-1, CTLA-4, BTLA, TIM3, LAG3 e VISTA.

49. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou qualquer uma das reivindicações 9 a 48, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene compreende uma sequência ligante.

50. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 49, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante codifica uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que um polipeptídeo codificado apenas por pelo menos uma porção do gene é produzido.

51. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 50, **CARACTERIZADA** pelo fato de que qualquer um dos polipeptídeos ligantes cliváveis compreende um sítio de clivagem de furina.

52. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 51, **CARACTERIZADA** pelo fato de que qualquer uma das sequências ligantes compreende um elemento de salto do ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de: T2A, E2A, P2A e F2A.

53. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a

52, **CARACTERIZADA** pelo fato de que qualquer um dos polipeptídeos ligantes cliváveis compreende um ligante Gly-Ser-Gly, opcionalmente em que o ligante Gly-Ser-Gly é um N terminal de um elemento de salto do ribossomo 2A e, opcionalmente, em que o ligante Gly-Ser-Gly está em uma orientação de sítio de clivagem de furina: ligante Gly-Ser-Gly: elemento de salto do ribossomo 2A do N terminal ao C terminal.

54. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 49, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES).

55. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 49, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante, ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem um promotor exógeno.

56. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 55, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante, ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem uma sequência acceptora de splice.

57. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 56, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene de TCR compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica um peptídeo sinal, em que o peptídeo sinal está operacionalmente ligado a um polipeptídeo codificado por pelo menos uma

porção do gene, a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene de TCR.

58. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 57, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o peptídeo sinal é um peptídeo sinal exógeno, opcionalmente em que o peptídeo sinal exógeno é um peptídeo sinal do hormônio de crescimento humano.

59. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 58, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem a mesma sequência de polipeptídeo ligante.

60. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 59, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica a segunda sequência de polipeptídeo ligante que codifica a mesma sequência de polipeptídeo ligante compreendem sequências de nucleotídeo de códons divergentes, e em que as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica o segundo polipeptídeo ligante são de códons divergentes.

61. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou qualquer uma das reivindicações 9 a 56, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene codifica uma região de codificação.

62. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 61, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a região de codificação é selecionada a partir do grupo que consiste de: um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T, e um inibidor de via de sinalização imune.

63. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4,

ou qualquer uma das reivindicações 9 a 56, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene codifica uma região não codificante.

64. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 63, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a região não codificante é selecionada a partir do grupo que consiste de: um shRNA, um siRNA, um miRNA, um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, e um fator que promove a função das células T.

65. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou qualquer uma das reivindicações 9 a 56, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene compreende pelo menos uma porção de um gene de TCR.

66. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 65, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene de TCR compreende:

- a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa;
- b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; e
- c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência ligante.

67. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 66, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou pelo menos uma porção do gene de TCR é selecionada a partir de o grupo que consiste de: pelo menos uma porção de um TCR murinizado, um TCR humanizado, um TCR de domínio trocado, um TCR com mutação pontual, um TCR manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR códon-otimizado para expressão em humanos, uma TCR

de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA, uma sequência de região variável do gene de TCR, um receptor de antígeno quimérico (CAR), e um TCR de cadeia única.

68. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 67, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene de TCR é manipulado para demonstrar uma maior associação com uma segunda sequência de polipeptídeo TCR exógena em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena, opcionalmente em que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta são modificadas para demonstrar uma associação maior entre si em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena.

69. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 68, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-alfa: segundo ligante: TCR-beta do N terminal ao C terminal.

70. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 68, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-beta: segundo ligante: TCR-alfa do N terminal ao C terminal.

71. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 70, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeos TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeos de TCR-beta, ou a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene de TCR comprehende uma sequência de nucleotídeo de códons divergentes, e em que a sequência de nucleotídeo de códons divergentes é códon divergente em relação a uma sequência

de nucleotídeo endógena.

72. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 71, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula modificada compreende uma célula imune.

73. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 72, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula imune compreende uma célula T.

74. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 73, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula T é selecionada a partir do grupo que consiste de: um linfócito T citotóxico (CTL), uma célula T CD8+, uma célula T CD4+, uma célula T primária, uma célula T infiltrada em tumor, uma célula T manipulada, uma célula T reguladora (Treg), uma célula T auxiliar, uma célula Th1, uma célula Th2, uma célula Th17, uma célula T alfa-beta, e uma célula T gama-delta.

75. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 72, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula imune compreende uma célula extermínadora natural.

76. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 72, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula imune é selecionada a partir do grupo que consiste de: uma célula B, um monócito, um macrófago, uma célula dendrítica, e uma célula T extermínadora natural.

77. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 71, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula modificada compreende uma célula-tronco.

78. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 78, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula-tronco compreende uma célula-tronco hematopoiética.

79. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 78, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula-tronco compreende uma célula-tronco embrionária.

80. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 79, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula modificada é uma célula primária.

81. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 81, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula modificada é uma célula isolada, em que a célula isolada é isolada a partir de um indivíduo.

82. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 81, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o indivíduo é conhecido ou suspeito de ter câncer.

83. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 82, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula modificada compreende uma célula humana ou uma célula derivada de humanos.

84. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 83, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula modificada é uma célula cultivada ex vivo.

85. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 84, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula cultivada ex vivo compreende uma célula estimulada.

86. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 85, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula estimulada compreende uma célula T estimulada por citocinas, opcionalmente em que a célula T estimulada por citocinas compreende uma célula T estimulada por CD3, uma célula T estimulada por CD28, ou uma célula T estimulada por CD3 e CD28.

87. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 86, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula T estimulada por citocinas é cultivada na presença de IL7, IL15, ou uma combinação dos mesmos.

88. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 86 ou 87, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula T estimulada por citocinas é cultivada na presença de IL2.

89. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 86 ou 87, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula T estimulada por citocinas é cultivada em meio substancialmente livre de IL2.

90. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 89, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula modificada está livre de um vírus integrado, em que o vírus integrado está operacionalmente associado aos componentes de entrega mediada por vírus.

91. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 89, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o MHC classe I na superfície da célula modificada está livre de peptídeos derivados de componentes de entrega mediada por vírus ou de um vírus integrado, em que o vírus integrado está operacionalmente associado aos componentes de entrega mediada por vírus.

92. Célula modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 89, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente um segundo polinucleotídeo circular compreendendo uma segunda composição de nucleotídeo exógena, a segunda composição de nucleotídeo exógena compreendendo:

a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um segundo gene;

b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um segundo locus alvo genômico endógeno; e

c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do segundo locus alvo genômico endógeno, e

as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do segundo locus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no segundo locus alvo genômico endógeno.

93. Célula modificada, de acordo com a reivindicação 92, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente uma segunda sequência de nucleotídeo integrada, em que a segunda sequência de nucleotídeo integrada compreende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção do segundo gene, a segunda sequência de nucleotídeo integrada é integrada no segundo

locus alvo genômico endógeno, e a segunda sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do segundo gene seja capaz de ser expressa.

94. População de células, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende qualquer uma das células modificadas de acordo com as reivindicações 3 a 93, em que mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60%, ou mais de 70% da população compreende a sequência de nucleotídeo integrada.

95. População de células, de acordo com a reivindicação 94, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as células modificadas não foram submetidas à classificação, seleção ou isolamento após a integração da sequência de nucleotídeo integrada.

96. População de células, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:
uma sequência de nucleotídeo integrada,
em que a sequência de nucleotídeo integrada compreende pelo menos uma porção de um gene, a sequência de nucleotídeo integrada é integrada em um locus alvo genômico endógeno, e a sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa,

em que a população de células está substancialmente livre de componentes de entrega mediada por vírus, e

em que mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60% ou mais de 70% das células T na população compreendem a sequência de nucleotídeo integrada.

97. População de células, de acordo com a reivindicação 96, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as células T não foram submetidas à classificação, seleção ou isolamento após a integração da sequência de nucleotídeo integrada.

98. População de células, de acordo com a reivindicação 96 ou 97, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente uma composição de nuclease capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida dentro do locus de TCR endógeno.

99. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 96 a 98, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente um polinucleotídeo circular compreendendo uma sequência de nucleotídeo exógena, a sequência de nucleotídeo exógena compreendendo:

a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene;

b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região do locus endógeno; e

c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do locus endógeno, e

as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do locus endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no locus endógeno.

100. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 96 a 99, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células é de pelo menos 1×10^6 células T, pelo menos 2×10^6 células T, pelo menos 5×10^6 células T, pelo menos 1×10^7 células T, ou pelo menos 5×10^7 células T.

101. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 96 a 100, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente uma mutação que produz um gene não funcional codificado por uma segunda sequência de nucleotídeo definida.

102. População de células, de acordo com a reivindicação 101, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região de codificação do gene selecionada a partir

do grupo que consiste de: uma mutação de deslocamento de quadro resultando em uma mudança no quadro da proteína traduzido, uma mutação sem sentido que causa uma substituição de um aminoácido para um códon terminal, e uma mutação "missense" que resulta em uma substituição de um aminoácido para outro.

103. População de células, de acordo com a reivindicação 101, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região não codificante do gene selecionada a partir do grupo que consiste de: uma mutação que altera a expressão de um produto de mRNA codificado pelo gene, e uma mutação que altera a estabilidade de um produto de mRNA codificado pelo gene.

104. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 103, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente uma segunda composição de nuclease capaz de clivar a segunda sequência de nucleotídeo definida dentro da população de células.

105. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 104, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição de nuclease compreende uma nuclease selecionada a partir do grupo que consiste de uma nuclease da família de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespacadas (CRISPR), uma nuclease efetora semelhante a ativadores de transcrição (TALEN) ou derivado da mesma, uma nuclease dedo de zinco (ZFN) ou derivado da mesma, e uma endonuclease teleguiada (HE) ou derivado da mesma.

106. População de células, de acordo com a reivindicação 105, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a nuclease da família CRISPR é uma nuclease Cas9.

107. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 106, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição de nuclease compreende um complexo proteico preformado.

108. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 106, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição de nuclease compreende um vetor de nucleotídeo capaz de expressar a nuclease dentro da população de células.

109. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 108, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição de nuclease compreende um RNA guia que dirige a clivagem mediada por nuclease na sequência de nucleotídeo definida.

110. População de células, de acordo com a reivindicação 109, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o RNA guia compreende um CRISPR RNA (crRNA) e um CRISPR RNA de transativação (tracrRNA).

111. População de células, de acordo com a reivindicação 110, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o crRNA e o tracrRNA estão em um único polinucleotídeo.

112. População de células, de acordo com a reivindicação 110, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o crRNA e o tracrRNA estão em polinucleotídeos separados.

113. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 112, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a expressão das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor endógeno dentro do locus alvo genômico endógeno.

114. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 112, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a expressão das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor exógeno.

115. População de células, de acordo com a reivindicação 114, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o promotor exógeno é selecionado a partir do grupo que consiste de promotores de mamíferos, promotores humanos, promotores

virais, promotores derivados de repetição terminal longa (LTR) a partir de um retrovírus ou lentivírus, fusões de dois promotores, fusões de duas porções de promotores, promotores MMLV LTR, promotores HIV LTR, promotores MCMV LTR, EF1a, MND, CMV, SV40, PGK1, Ubc, beta-actina, CAG, promotores induzíveis de pequenas moléculas, promotores induzíveis de tetraciclina, promotores condicionais de pequenas moléculas, sistemas promotores condicionais Cre-LoxP, sistemas promotores condicionais Flp-FRT, e sistemas promotores condicionais de tamoxifeno.

116. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 115, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é maior ou igual a 100 bases de comprimento.

117. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 96 a 115, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 400 bases de comprimento, maior igual ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 800 bases de comprimento, maior ou igual a 1500 bases de comprimento, maior ou igual a 2000 bases de comprimento ou maior ou igual a 4000 bases de comprimento.

118. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 117, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região do locus alvo genômico endógeno são maiores ou iguais a 50 bases de comprimento, maiores ou iguais a 100 bases de comprimento, maiores ou iguais a 200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 600 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento, ou maiores ou iguais a 2000 bases de comprimento.

119. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 118, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do locus alvo genômico endógeno são maiores ou iguais a 50 bases

de comprimento, maiores ou iguais a 100 bases de comprimento, maiores ou iguais a 200 bases de comprimento, maiores ou iguais a 300 bases de comprimento, maiores ou iguais a 600 bases de comprimento, maiores ou iguais a 1000 bases de comprimento ou maiores ou iguais a 2000 bases em comprimento.

120. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 119, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região do locus alvo genômico endógeno e as sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do locus alvo genômico endógeno são maiores ou iguais a 600 bases de comprimento.

121. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 120, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo definida é rompida após a integração das sequências de nucleotídeo.

122. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 121, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a expressão de um gene endógeno operacionalmente associado ao locus alvo genômico endógeno ou ao locus de TCR endógeno é rompida.

123. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 96 a 122, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente reagentes adicionais que são capazes de aumentar as taxas de recombinação homóloga.

124. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 123, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente reagentes adicionais que são capazes de aumentar a viabilidade da população de células.

125. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 124, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polinucleotídeo circular compreende um plasmídeo ou um nanoplasmídeo.

126. População de células, de acordo com a reivindicação 125,

CARACTERIZADA pelo fato de que o plasmídeo tem um esqueleto de vetor que é menos de 500 bases, e em que o esqueleto de vetor é uma sequência de nucleotídeo que não é a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene, nem a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, nem a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, nem as sequências de nucleotídeo que codificam o primeiro e o segundo polipeptídeo ligante, nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao primeiro locus alvo genômico endógeno ou locus de TCR endógeno, e nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao segundo locus alvo genômico endógeno ou locus de TCR endógeno.

127. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 126, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polinucleotídeo circular não é um polinucleotídeo amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR).

128. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 127, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno comprehende uma região de codificação.

129. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 127, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno comprehende um ítron.

130. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 129, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno comprehende o locus do receptor de células T (TCR)-alfa.

131. População de células, de acordo com a reivindicação 130, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene não funcional codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida é um gene de TCR-beta rompido.

132. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 129, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno comprehende o locus de TCR-beta.

133. População de células, de acordo com a reivindicação 132, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene não funcional codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida é um gene de TCR-alfa rompido.

134. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 129, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o alvo genômico endógeno compreende um locus da via de sinalização imune.

135. População de células, de acordo com a reivindicação 134, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus da via de sinalização imune é selecionado a partir do grupo que consiste de PD-1, CTLA-4, BTLA, TIM3, LAG3 e VISTA.

136. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 96 a 135, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene compreende uma sequência ligante.

137. População de células, de acordo com a reivindicação 136, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante codifica uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que um polipeptídeo codificado apenas por pelo menos uma porção do gene é produzido.

138. População de células, de acordo com a reivindicação 137, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polipeptídeo ligante clivável compreende um elemento de salto de ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de: T2A, E2A, P2A e F2A.

139. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 137 a 138, **CARACTERIZADA** pelo fato de que os polipeptídeos ligantes cliváveis compreendem um sítio de clivagem de furina.

140. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 137 a 139, **CARACTERIZADA** pelo fato de que os polipeptídeos ligantes cliváveis compreendem um ligante Gly-Ser-Gly, opcionalmente em que o ligante Gly-Ser-Gly é

N terminal de um elemento de salto de ribossomo 2A, e opcionalmente, em que o ligante Gly-Ser-Gly está em uma orientação de sítio de clivagem de furina: ligante Gly-Ser-Gly: elemento de salto de ribossomo 2A do N terminal ao C terminal.

141. População de células, de acordo com a reivindicação 136, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante compreende um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES).

142. População de células, de acordo com a reivindicação 136, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante compreende uma sequência promotora exógena.

143. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 136 a 142, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante compreende uma sequência acceptora de splice.

144. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 96 a 135, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene compreende uma primeira sequência de polipeptídeo ligante e uma segunda sequência de polipeptídeo ligante.

145. População de células, de acordo com a reivindicação 144, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem a mesma sequência de polipeptídeo ligante.

146. População de células, de acordo com a reivindicação 145, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica a segunda sequência de polipeptídeo ligante que codifica a mesma sequência de polipeptídeo ligante compreendem sequências de nucleotídeo de códons divergentes, e em que as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica o segundo polipeptídeo

ligante são códons divergentes um em relação ao outro.

147. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 146, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene codifica uma região de codificação.

148. População de células, de acordo com a reivindicação 147, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a região de codificação é selecionada a partir do grupo que consiste de: um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T, e um inibidor da via de sinalização imune.

149. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 146, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene codifica uma região não codificante.

150. População de células, de acordo com a reivindicação 149, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a região não codificante é selecionada a partir do grupo que consiste de: um shRNA, um siRNA, um miRNA, um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, e um fator que promove a função das células T.

151. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 146, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene compreende pelo menos uma porção de um gene de TCR.

152. População de células, de acordo com a reivindicação 151, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene de TCR compreende:

a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa;

- b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; e
- c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência ligante.

153. População de células, de acordo com a reivindicação 151 ou 152, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou pelo menos uma porção do gene de TCR é selecionada a partir do grupo que consiste de: pelo menos uma porção de um TCR murinizado, um TCR humanizado, um TCR de domínio trocado, um TCR com mutação pontual, um TCR manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR códon-otimizado para expressão em humanos, um TCR de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA, uma sequência de região variável do gene de TCR, um receptor de antígeno quimérico (CAR), e um TCR de cadeia única.

154. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 151 a 153, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de polipeptídeo TCR-beta ou um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene de TCR é manipulado para demonstrar uma maior associação com uma segunda sequência de polipeptídeo TCR exógena em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena, opcionalmente em que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta são projetadas para demonstrar uma associação maior entre si em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena.

155. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 152 a 154, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-alfa: segundo ligante: TCR-

beta.

156. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 152 a 154, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-beta: segundo ligante: TCR-alfa.

157. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 151 a 156, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene de TCR compreende uma sequência de nucleotídeo de códon divergente, e em que a sequência de nucleotídeo de códon divergente é um códon divergente em relação a uma sequência de nucleotídeo endógena.

158. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 157, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células compreende células humanas ou células derivadas de seres humanos.

159. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 158, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células compreende uma população de células imunes.

160. População de células, de acordo com a reivindicação 159, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células imunes compreende uma população de células T.

161. População de células, de acordo com a reivindicação 160, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células T é selecionada a partir do grupo que consiste de: um linfócito T citotóxico (CTL), uma célula T CD8+, uma célula T CD4+, uma célula T primária, uma célula T infiltrada em tumor, uma célula T manipulada, uma célula T reguladora (Treg), uma célula T auxiliar, uma célula Th1,

uma célula Th2, uma célula Th17, uma célula T alfa-beta, e uma célula T gama-delta.

162. População de células, de acordo com a reivindicação 159, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células compreende uma população selecionada a partir do grupo que consiste de: células B, monócitos, macrófagos, células dendríticas, e células T exterminadoras naturais.

163. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 158, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células compreende uma população de células-tronco.

164. População de células, de acordo com a reivindicação 163, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células-tronco compreende uma população de células-tronco hematopoiéticas.

165. População de células, de acordo com a reivindicação 163, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células-tronco compreende uma população de células-tronco embrionárias.

166. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 96 a 165, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células é uma célula primária.

167. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 166, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células é uma população de células isolada, em que a população de células isolada é isolada a partir de um indivíduo.

168. População de células, de acordo com a reivindicação 167, **CARACTERIZADA** pelo fato de que sabe-se que o indivíduo tem ou é suspeito de ter câncer.

169. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 168, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células compreende células cultivadas ex vivo.

170. População de células, de acordo com a reivindicação 169, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as células cultivadas ex vivo compreendem células estimuladas.

171. População de células, de acordo com a reivindicação 170, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as células estimuladas compreendem células T estimuladas por citocinas, opcionalmente em que as células T estimuladas por citocinas compreendem células T estimuladas por CD3, células T estimuladas por CD28, ou células T estimuladas por CD3 e CD28.

172. População de células, de acordo com a reivindicação 171, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as células T estimuladas por citocinas são cultivadas na presença de IL7, IL15, ou uma combinação das mesmas.

173. População de células, de acordo com a reivindicação 171 ou 172, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as células T estimuladas por citocinas são cultivadas na presença de IL2.

174. População de células, de acordo com a reivindicação 171 ou 172, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as células T estimuladas por citocinas são cultivadas em meios substancialmente livres de IL2.

175. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 174, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente uma segunda sequência de nucleotídeo integrada, em que a segunda sequência de nucleotídeo integrada compreende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção de um segundo gene, a segunda sequência de nucleotídeo integrada é integrada em um segundo locus alvo genômico endógeno, e a segunda sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do segundo gene seja capaz de ser expressa.

176. População de células, de acordo com a reivindicação 175, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente um segundo

polinucleotídeo circular compreendendo uma segunda composição de nucleotídeo exógena, a segunda composição de nucleotídeo exógena compreendendo:

- a) a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do segundo gene;
- b) a sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região do segundo locus alvo genômico endógeno; e
- c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do segundo locus alvo genômico endógeno,

em que as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do segundo locus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no segundo locus alvo genômico endógeno.

177. Método de tratamento para um indivíduo em necessidade do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar uma dose terapeuticamente eficaz das células modificadas ou da população de células de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 176.

178. Método de tratamento, de acordo com a reivindicação 177, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células modificadas ou a população de células são derivadas do indivíduo.

179. Método, de acordo com a reivindicação 177, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células modificadas ou a população de células são alogênicas com referência ao indivíduo.

180. Método para modificar geneticamente uma célula, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

- 1) fornecer uma composição de nucleotídeo compreendendo um único polinucleotídeo, o único polinucleotídeo compreendendo:
 - a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene;

b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um locus alvo genômico endógeno; e

c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do locus alvo genômico endógeno,

as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do locus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no locus alvo genômico endógeno,

a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa após a integração da composição no locus alvo genômico endógeno; e

2) fornecer uma composição de nuclease capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida dentro do locus alvo genômico endógeno;

3) colocar a célula em contato com a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease,

4) entregar a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease na célula por outros meios que não infectar a célula com um vírus.

181. Método, de acordo com a reivindicação 180, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente fornecer uma segunda composição de nuclease capaz de clivar uma segunda sequência de nucleotídeo definida dentro da célula, em que a segunda composição de nuclease é colocada em contato com a célula na etapa de contato e é entregue à célula na etapa de entrega.

182. Método, de acordo com a reivindicação 181, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a clivagem resulta em uma mutação que produz um gene não funcional codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida.

183. Método, de acordo com a reivindicação 182, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região de codificação do gene selecionada a partir do grupo que consiste de

uma mutação de deslocamento de quadro resultando em uma mudança no quadro da proteína traduzida, mutação sem sentido causando uma substituição de um aminoácido para um códon terminal, e uma mutação “missense” resultando na substituição de um aminoácido para outro.

184. Método, de acordo com a reivindicação 182, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região não codificante do gene selecionada partir do grupo que consiste de uma mutação que altera a expressão de um produto de mRNA codificado pelo gene, e uma mutação que altera a estabilidade de um produto de mRNA codificado pelo gene.

185. Método, de acordo com a reivindicação 181, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente:

fornecer uma segunda composição de nucleotídeo, a segunda composição compreendendo:

a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um segundo gene;

b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um segundo locus alvo genômico endógeno; e

c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do segundo locus alvo genômico endógeno,

em que todas as sequências de nucleotídeo estão em um único polinucleotídeo,

as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do segundo locus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no segundo locus alvo genômico endógeno,

a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é orientada de modo que pelo menos uma porção do segundo gene seja capaz de ser

expressa após a integração da composição no segundo locus alvo genômico endógeno, e

a segunda composição de nucleotídeo é colocada em contato com a célula na etapa de contato e é entregue à célula na etapa de entrega.

186. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 185, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de nuclease compreende uma nuclease da família de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespacadas (CRISPR), uma nuclease efetora semelhante a ativadores de transcrição (TALEN) ou derivado da mesma, uma nuclease dedo de zinco (ZFN) ou derivado da mesma, e uma endonuclease teleguiada (HE) ou derivado da mesma.

187. Método, de acordo com a reivindicação 186, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a nuclease da família CRISPR é uma nuclease Cas9.

188. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 187, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de nuclease compreende um complexo proteico preformado.

189. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 187, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de nuclease compreende um vetor de nucleotídeo capaz de expressar a nuclease dentro da célula.

190. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 189, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de contato é inferior a 60 minutos, inferior a 45 minutos, inferior a 30 minutos, inferior a 20 minutos, inferior a 15 minutos, inferior a 10 minutos, inferior a 5 minutos ou inferior a 1 minuto entre o contato da célula com a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease e a etapa de entrega.

191. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 190, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de entrega é selecionada a partir do grupo que consiste de eletroporação, transfecção, deformação da membrana celular por meios físicos, nanopartículas lipídicas (LNP), partículas semelhantes a vírus (VLP)

e sonicação.

192. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 190, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de entrega compreende eletroporação.

193. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 192, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a expressão das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor endógeno dentro do locus alvo genômico endógeno.

194. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 192, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a expressão das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor exógeno.

195. Método, de acordo com a reivindicação 194, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o promotor exógeno é selecionado a partir do grupo que consiste de promotores de mamíferos, promotores humanos, promotores virais, promotores derivados de repetição terminal longa (LTR) a partir de um retrovírus ou lentivírus, fusões de dois promotores, fusões de duas porções de promotores, promotores MMLV LTR, promotores HIV LTR, promotores MCMV LTR, EF1a, MND, CMV, SV40, PGK1, Ubc, beta-actina, CAG, promotores induzíveis de pequenas moléculas, promotores induzíveis de pequenas moléculas, promotores induzíveis de tetraciclina, promotores condicionais de pequenas moléculas, sistemas promotores condicionais Cre-LoxP, sistemas promotores condicionais Flp-FRT, e sistemas promotores condicionais de tamoxifeno.

196. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 195, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene é maior ou igual a 100 bases de comprimento.

197. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 195, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene é maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 400 bases de comprimento, maior ou

igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 800 bases de comprimento, maior ou igual a 1500 bases de comprimento, maior ou igual a 2000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 4000 bases de comprimento.

198. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 197, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região ou à segunda região do locus alvo genômico endógeno têm 50 bases de comprimento, 100 bases de comprimento, 200 bases de comprimento, 400 bases de comprimento, 600 bases de comprimento, 800 bases de comprimento, 1500 bases de comprimento, 2000 bases de comprimento ou 4000 bases de comprimento.

199. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 198, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo definida é rompida após a integração.

200. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 199, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a expressão de um gene endógeno operacionalmente associado ao locus alvo genômico endógeno é rompida.

201. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 200, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente reagentes adicionais que são capazes de aumentar as taxas de recombinação homóloga.

202. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 201, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo único é selecionado a partir do grupo que consiste de um plasmídeo circular, um fragmento de DNA linear, um minicírculo, e um ssDNA.

203. Método, de acordo com a reivindicação 202, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o plasmídeo circular tem um esqueleto de vetor que é menor do que 500 bases, em que o esqueleto de vetor compreende uma sequência de nucleotídeo que não é a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene, nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao primeiro locus alvo genômico endógeno, nem

a sequência de nucleotídeo idêntica ao segundo locus alvo genômico endógeno.

204. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 203, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo único não é um polinucleotídeo amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR).

205. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 204, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo único está substancialmente livre de contaminantes.

206. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 205, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo único está substancialmente livre de componentes que reduzem a viabilidade celular.

207. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 206, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno compreende uma região de codificação.

208. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 206, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno compreende um ítron.

209. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 208, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno é o locus do receptor celular (TCR)-alfa.

210. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 208, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno é o locus de TCR-beta.

211. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 208, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno é um locus da via de sinalização imune.

212. Método, de acordo com a reivindicação 211, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o locus da via de sinalização imune é selecionado a partir do grupo que

consiste de PD-1, CTLA-4, BTLA, TIM3, LAG3 e VISTA.

213. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 212, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene comprehende uma sequência ligante.

214. Método, de acordo com a reivindicação 213, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência ligante codifica uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que um polipeptídeo codificado apenas por pelo menos uma porção do gene é produzido.

215. Método, de acordo com a reivindicação 214, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo ligante clivável comprehende um elemento de salto do ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de T2A, E2A, P2A e F2A.

216. Método, de acordo com as reivindicações 214 ou 215, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo ligante clivável comprehende uma sequência de sítio de clivagem de furina.

217. Método, de acordo com a reivindicação 213, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência ligante comprehende um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES).

218. Método, de acordo com a reivindicação 213, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência ligante comprehende um promotor exógeno.

219. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 213 a 218, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência ligante comprehende adicionalmente uma sequência acceptora de splice.

220. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 219, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene codifica uma região de codificação.

221. Método, de acordo com a reivindicação 220, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região de codificação é selecionada a partir do grupo que consiste de: um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T, e um inibidor da via de sinalização imune.

222. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 219, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene codifica uma região não codificante.

223. Método, de acordo com a reivindicação 222, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região não codificante é selecionada a partir do grupo que consiste de: um shRNA, um siRNA, um miRNA, um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, e um fator que promove a função das células T.

224. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 219, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene compreende pelo menos uma porção de um gene de TCR.

225. Método, de acordo com a reivindicação 224, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene de TCR é selecionada a partir do grupo que consiste de pelo menos uma porção de um TCR murinizado, um TCR humanizado, um TCR de domínio trocado, um TCR com mutação pontual, um TCR manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR códon-otimizado para expressão em seres humanos, um TCR de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA, uma sequência de região variável do gene de TCR, um receptor de antígeno quimérico (CAR), e um TCR de cadeia única.

226. Método, de acordo com a reivindicação 224, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene de TCR compreende:

- a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa;
- b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; e
- c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência ligante.

227. Método, de acordo com a reivindicação 226, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa é selecionada a partir do grupo que consiste de um TCR-alfa murinizado, um TCR-alfa humanizado, um TCR-alfa de domínio trocado, um TCR-alfa com mutação pontual, um TCR-alfa manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR-alfa códon-otimizado para expressão em humanos, um receptor de antígeno quimérico (CAR), e uma TCR-alfa de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade de RNA.

228. Método, de acordo com a reivindicação 226 ou 227, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo TCR-beta é selecionada a partir do grupo que consiste de um TCR-beta murinizado, um TCR-beta humanizado, um TCR-beta de domínio trocado, um TCR-beta com mutação pontual, um TCR-beta manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR-beta códon-otimizado para expressão em seres humanos, um receptor de antígeno quimérico (CAR), e um TCR-beta de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA.

229. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 226 a 228, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-alfa: segundo ligante: TCR-beta.

230. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 226 a 228, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as sequências de polipeptídeo codificadas estão

em uma orientação de ligante: TCR-beta: segundo ligante: TCR-alfa.

231. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 226 a 230, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda sequência ligante compreende uma sequência de polipeptídeo ligante clivável.

232. Método, de acordo com a reivindicação 231, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo ligante clivável compreende um elemento de salto do ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de T2A, E2A, P2A e F2A.

233. Método, de acordo com a reivindicação 231 ou 232, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo ligante clivável compreende uma sequência de sítio de clivagem de furina.

234. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 226 a 230, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda sequência ligante compreende um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES).

235. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 226 a 230, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda sequência ligante compreende um promotor exógeno.

236. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 235, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene é selecionada a partir do grupo que consiste de um shRNA, um siRNA, um miRNA, um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T, e um inibidor da via de sinalização imune.

237. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 235, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma porção do segundo gene compreende pelo menos uma porção de um gene de TCR.

238. Célula modificada produzida pelo método, de acordo com qualquer uma

das reivindicações 180 a 237, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeo integrada, em que a sequência de nucleotídeo integrada compreende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção do gene, a sequência de nucleotídeo integrada é integrada no locus alvo genômico endógeno, e a sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa.

239. População de células produzida pelo método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 180 a 237, **CARACTERIZADA** pelo fato de que mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60%, ou mais de 70% das células da população compreendem uma sequência de nucleotídeo integrada, em que a sequência de nucleotídeo integrada compreende uma sequência idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos a porção do gene, a sequência de nucleotídeo integrada é integrada no lócus alvo genômico endógeno, e a sequência de nucleotídeo integrada é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa.

240. Célula ou população modificada de células, de acordo com a reivindicação 238 ou 239, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as células não foram submetidas à classificação, seleção ou isolamento após a integração da sequência de nucleotídeo integrada.

241. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 238 a 240, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a viabilidade da população de células após a etapa de entrega é de pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 40%, pelo menos 60% ou pelo menos 80%.

242. População de células, de acordo com a reivindicação 241, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a viabilidade é avaliada 4 dias após a etapa de entrega.

243. Método de tratamento para um indivíduo em necessidade do mesmo,

CARACTERIZADO pelo fato de que compreende administrar uma dose terapeuticamente eficaz das células ou população de células de acordo com qualquer uma das reivindicações 238 a 240.

244. Método de tratamento, de acordo com a reivindicação 243, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células ou a população de células são derivadas do indivíduo.

245. Método, de acordo com a reivindicação 243, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células ou a população de células são alogênicas com referência ao indivíduo.

246. Método para modificar geneticamente uma célula, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

1) fornecer uma composição de nucleotídeo, compreendendo:

a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene;

b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um locus alvo genômico endógeno; e

c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do locus alvo genômico endógeno,

em que pelo menos uma porção do gene tem 100 bases de comprimento, todas as sequências de nucleotídeo estão em um único polinucleotídeo, as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do locus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no locus alvo genômico endógeno,

a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa após a integração da composição no locus alvo genômico endógeno; e

2) fornecer uma composição de nuclease CRISPR / Cas9 capaz de clivar uma

sequência de nucleotídeo definida dentro do locus alvo genômico endógeno;

3) colocar a célula em contato com a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease CRISPR / Cas9, e

4) entregar a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease CRISPR / Cas9 à célula por eletroporação.

247. Método para gerar uma célula T modificada com um receptor de célula T definido, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

1) fornecer uma composição de nucleotídeo, compreendendo:

a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa;

b) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de uma sequência de polipeptídeo TCR-beta;

c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma primeira sequência de polipeptídeo ligante;

d) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência de polipeptídeo ligante;

e) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um locus de TCR endógeno; e

f) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do locus de TCR endógeno,

em que todas as sequências de nucleotídeos estão em um único polinucleotídeo,

as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do locus de TCR endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no locus de TCR endógeno,

a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica pelo

menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta, e as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante são orientadas de modo que cada uma das sequências de polipeptídeo seja capaz de ser expressa como um único polipeptídeo após a integração da composição no locus de TCR endógeno,

a primeira sequência de polipeptídeo ligante é posicionada antes de pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa, pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta, e a segunda sequência de polipeptídeo ligante,

a segunda sequência de polipeptídeo ligante está posicionada entre a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta, e

a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta formam um polipeptídeo separado, em que os polipeptídeos separados são capazes de se associar para formar um TCR funcional;

2) fornecer uma composição de nuclease capaz de clivar uma sequência de nucleotídeo definida dentro do locus de TCR endógeno;

3) colocar a célula T em contato com a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease, e

4) entregar a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease à célula T.

248. Método, de acordo com a reivindicação 247, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente fornecer uma segunda composição de nuclease capaz de clivar uma segunda sequência de nucleotídeo definida dentro da célula T, em que a segunda composição de nuclease é colocada em contato com a célula T na etapa de contato e é entregue à célula T na etapa de entrega.

249. Método, de acordo com a reivindicação 248, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a clivagem resulta em uma mutação que produz um gene não funcional

codificado pela segunda sequência de nucleotídeo definida.

250. Método, de acordo com a reivindicação 249, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região de codificação do gene selecionada a partir do grupo que consiste de uma mutação de deslocamento de quadro resultando em uma mudança no quadro da proteína traduzida, mutação sem sentido causando uma substituição de um aminoácido para um códon terminal, e uma mutação “missense” resultando na substituição de um aminoácido para outro.

251. Método, de acordo com a reivindicação 249, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a mutação que produz o gene não funcional compreende uma mutação em uma região não codificante do gene selecionada a partir do grupo que consiste de uma mutação que altera a expressão de um produto de mRNA codificado pelo gene, e uma mutação que altera a estabilidade de um produto de mRNA codificado pelo gene.

252. Método, de acordo com a reivindicação 249, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente:

fornecer uma segunda composição de nucleotídeo, a segunda composição compreendendo:

a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene;

b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um locus alvo genômico endógeno; e

c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do locus alvo genômico endógeno,

em que todas as sequências de nucleotídeos estão em um único polinucleotídeo,

as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do locus

alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no locus alvo genômico endógeno,

a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa após a integração da composição no locus alvo genômico endógeno, e

a segunda composição de nucleotídeo é colocada em contato com a célula T na etapa de contato e é entregue à célula T na etapa de entrega.

253. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 252, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de nuclease compreende uma nuclease selecionada a partir do grupo que consiste de uma nuclease da família de Repetções Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespacadas (CRISPR), uma nuclease efetora semelhante a ativadores de transcrição (TALEN) ou derivado da mesma, uma nuclease dedo de zinco (ZFN) ou derivado da mesma, e uma endonuclease teleguiada (HE) ou derivado da mesma.

254. Método, de acordo com a reivindicação 253, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a nuclease da família CRISPR é uma nuclease Cas9.

255. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 254, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de nuclease compreende um complexo proteico preformado.

256. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 254, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de nuclease compreende um vetor de nucleotídeo capaz de expressar a nuclease dentro da célula T.

257. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 256, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de contato é inferior a 60 minutos, inferior a 45 minutos, inferior a 30 minutos, inferior a 20 minutos, inferior a 15 minutos, inferior a 10 minutos ou inferior 5 minutos entre o contato da célula T com a composição de nucleotídeo e a composição de nuclease e a etapa de entrega.

258. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 257, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de entrega é selecionada a partir do grupo que consiste de eletroporação, transfecção, deformação da membrana celular por meios físicos, nanopartículas lipídicas (LNP), partículas semelhantes a vírus (VLP) e sonicação.

259. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 257, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de entrega compreende eletroporação.

260. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 259, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a expressão das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor endógeno dentro do locus alvo genômico endógeno.

261. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 260, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a expressão das sequências de polipeptídeo codificadas é dirigida por um promotor exógeno.

262. Método, de acordo com a reivindicação 261, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o promotor exógeno é selecionado a partir do grupo que consiste de promotores de mamíferos, promotores humanos, promotores virais, promotores derivados de repetição terminal longa (LTR) a partir de um retrovírus ou lentivírus, fusões de dois promotores, fusões de duas porções de promotores, promotores MMLV LTR, promotores HIV LTR, promotores MCMV LTR, EF1a, MND, CMV, SV40, PGK1, Ubc, beta-actina, CAG, promotores induzíveis de pequenas moléculas, promotores induzíveis de tetraciclina, promotores condicionais de pequenas moléculas, sistemas promotores condicionais Cre-LoxP, sistemas promotores condicionais Flp-FRT, e sistemas promotores condicionais de tamoxifeno.

263. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 262, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa ou a sequência de

nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta é maior ou igual a 100 bases de comprimento.

264. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 262, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa ou a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta é maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 400 bases de comprimento, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 800 bases de comprimento, maior ou igual a 1500 bases de comprimento, maior ou igual a 2000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 4000 bases de comprimento.

265. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 264, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região ou à segunda região do locus endógeno do TCR têm 50 bases de comprimento, 100 bases de comprimento, 200 bases de comprimento, 200 bases de comprimento, 400 bases em comprimento, 600 bases de comprimento, 800 bases de comprimento, 1500 bases de comprimento, 2000 bases de comprimento, ou 4000 bases de comprimento.

266. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 265, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo definida é rompida após a integração.

267. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 266, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a expressão de um gene endógeno operacionalmente associado ao locus de TCR endógeno é rompida.

268. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 267, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente reagentes adicionais que são capazes de aumentar as taxas de recombinação homóloga.

269. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 268,

CARACTERIZADO pelo fato de que o polinucleotídeo único é selecionado a partir do grupo que consiste de um plasmídeo circular, um fragmento de DNA linear, um minicírculo, e um ssDNA.

270. Método, de acordo com a reivindicação 269, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o plasmídeo circular tem um esqueleto de vetor inferior a 500 bases, em que o esqueleto de vetor é uma sequência de nucleotídeo que não é a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa, nem a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta, nem as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira e a segunda sequência de polipeptídeo ligante.

271. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 270, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo único não é um polinucleotídeo amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR).

272. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 271, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo único está substancialmente livre de contaminantes.

273. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 272, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o locus de TCR endógeno compreende uma região de codificação.

274. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 272, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o locus de TCR endógeno compreende um ítron.

275. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 274, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o locus de TCR endógeno compreende o locus de TCR-alfa.

276. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 274, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o locus de TCR endógeno compreende o locus

de TCR-beta.

277. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 276, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira sequência ligante compreende uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que um polipeptídeo codificado apenas pela codificação de pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-alfa, pelo menos uma porção da sequência de polipeptídeo TCR-beta, e a segunda sequência de polipeptídeo ligante é produzido.

278. Método, de acordo com a reivindicação 277, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo ligante clivável compreende um elemento de salto do ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de T2A, E2A, P2A e F2A.

279. Método, de acordo com as reivindicações 278 ou 279, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo ligante clivável compreende uma sequência de sítio de clivagem de furina.

280. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 276, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira sequência de polipeptídeo ligante compreende um IRES.

281. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 280, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira sequência ligante compreende uma sequência acceptora de splice.

282. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 281, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda sequência ligante compreende uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta formam um polipeptídeo separado, em que os polipeptídeos separados são capazes de se associar para formar um TCR funcional.

283. Método, de acordo com a reivindicação 277, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo ligante clivável compreende um elemento de salto do ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de T2A, E2A, P2A e F2A.

284. Método, de acordo com a reivindicação 282 ou 283, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo ligante clivável compreende uma sequência de sítio de clivagem de furina.

285. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 281, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda sequência ligante compreende um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES).

286. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 281, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda sequência ligante compreende um promotor exógeno.

287. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 286, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa é selecionada a partir do grupo que consiste de um TCR-alfa murinizado, um TCR-alfa humanizado, um TCR-alfa de domínio trocado, um TCR-alfa de mutação pontual, um TCR-alfa manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR-alfa códon-otimizado para expressão em seres humanos, um receptor de antígeno quimérico (CAR), e um TCR-alfa de sequência otimizada para uso de códon e remoção de elementos de instabilidade do RNA.

288. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 287, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo TCR-beta é selecionada a partir do grupo que consiste de um TCR-beta murinizado, um TCR-beta humanizado, um TCR-beta de domínio trocado, um TCR-beta de mutação pontual, um TCR-beta manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR-beta códon-otimizado para expressão em seres humanos, um

receptor de antígeno quimérico (CAR), e um TCR-beta de sequência otimizada para uso de códon e remoção de elementos de instabilidade do RNA.

289. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 288, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de primeiro ligante: TCR-alfa: segundo ligante: TCR-beta.

290. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 247 a 288, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-beta: segundo ligante: TCR-alfa.

291. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 248 a 290, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda sequência de nucleotídeo definida está dentro de um locus de TCR-beta endógeno se a sequência de nucleotídeo definida estiver dentro de um locus de TCR-alfa endógeno.

292. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 248 a 290, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda sequência de nucleotídeo definida está dentro de um locus de TCR-alfa endógeno se a sequência de nucleotídeo definida estiver dentro de um locus de TCR-beta endógeno.

293. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 248 a 290, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda sequência de nucleotídeo definida está dentro de um locus da via de sinalização imune.

294. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 252 a 293, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene é selecionada a partir do grupo que consiste de um shRNA, um siRNA, um miRNA, um miRNA, uma citocina, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T, e um inibidor da via de sinalização imune.

295. Composição de nucleotídeo para uso em dirigir a recombinação homóloga em um locus alvo genômico endógeno, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um polinucleotídeo circular compreendendo:

a) uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção de um gene;

b) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma primeira região de um locus alvo genômico endógeno; e

c) uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma segunda região do locus alvo genômico endógeno,

em que todas as sequências de nucleotídeo estão em um único polinucleotídeo,

as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira e à segunda região do locus alvo genômico endógeno são orientadas para facilitar a recombinação homóloga no locus alvo genômico endógeno,

a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é orientada de modo que pelo menos uma porção do gene seja capaz de ser expressa após a integração da composição no locus alvo genômico endógeno.

296. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é maior ou igual a 100 bases de comprimento.

297. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene é maior que ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 400 bases de comprimento, maior que ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 800 bases de comprimento, maior ou igual a 1500 bases de comprimento, maior ou igual a 2000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 4000 bases de comprimento.

298. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo

fato de que as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região do locus alvo genômico endógeno é maior ou igual a 50 bases de comprimento, maior ou igual a 100 bases de comprimento, maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 300 bases de comprimento, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 1000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 2000 bases de comprimento.

299. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do locus alvo genômico endógeno é maior ou igual a 50 bases de comprimento, maior ou igual a 100 bases de comprimento, maior ou igual a 200 bases de comprimento, maior ou igual a 300 bases de comprimento, maior ou igual a 600 bases de comprimento, maior ou igual a 1000 bases de comprimento, ou maior ou igual a 2000 bases de comprimento.

300. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de nucleotídeo idênticas à primeira região do locus alvo genômico endógeno e as sequências de nucleotídeo idênticas à segunda região do locus alvo genômico endógeno são maiores ou iguais a 600 bases de comprimento.

301. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polinucleotídeo circular compreende um plasmídeo ou um nanoplasmídeo.

302. Composição de nucleotídeo, de acordo com a reivindicação 301, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o plasmídeo tem um esqueleto de vetor que é menor do que 500 bases, e em que o esqueleto de vetor é uma sequência de nucleotídeo que não é a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma

porção do gene e nem a sequência de nucleotídeo idêntica ao primeiro locus genômico alvo endógeno.

303. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polinucleotídeo circular não é um polinucleotídeo amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR).

304. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno compreende uma região de codificação.

305. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno compreende um ítron.

306. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno ou o locus de TCR endógeno compreende o locus do receptor de célula T (TCR)-alfa.

307. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus alvo genômico endógeno ou o locus de TCR endógeno compreende o locus de TCR-beta.

308. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o alvo genômico endógeno compreende um locus da via de sinalização imune.

309. Composição de nucleotídeo, de acordo com a reivindicação 308, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o locus da via de sinalização imune é selecionado a partir do grupo que consiste de PD-1, CTLA-4, BTLA, TIMLA, TIM3, LAG3 e VISTA.

310. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene compreende uma sequência ligante.

311. Composição de nucleotídeo, de acordo com a reivindicação 310, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante codifica uma sequência de polipeptídeo ligante clivável, em que após a expressão, o polipeptídeo ligante clivável é clivado de tal modo que um polipeptídeo codificado apenas por pelo menos uma porção do gene é produzido.

312. Composição de nucleotídeo, de acordo com a reivindicação 311, **CARACTERIZADA** pelo fato de que qualquer um dos polipeptídeos ligantes cliváveis compreende um sítio de clivagem de furina.

313. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que qualquer uma das sequências ligantes compreende um elemento de salto do ribossomo 2A selecionado a partir do grupo que consiste de: T2A, E2A, P2A e F2A.

314. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que um dos polipeptídeos ligantes cliváveis compreende um ligante Gly-Ser-Gly, opcionalmente em que o ligante Gly-Ser-Gly é N terminal de um elemento de salto do ribossomo 2A e, opcionalmente, em que o ligante Gly-Ser-Gly está em uma orientação de sítio de clivagem de furina: ligante Gly-Ser-Gly: elemento de salto do ribossomo 2A do N terminal ao C terminal.

315. Composição de nucleotídeo, de acordo com a reivindicação 310, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES).

316. Composição de nucleotídeo, de acordo com a reivindicação 310, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem um promotor exógeno.

317. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência ligante, as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante ou as sequências de nucleotídeo que codificam a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem uma sequência acceptora de splice.

318. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica um peptídeo sinal, em que o peptídeo sinal está operacionalmente ligado a um polipeptídeo codificado pelo menos por uma porção do gene, a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de polipeptídeo TCR-beta ou um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene de TCR.

319. Composição de nucleotídeo, de acordo com a reivindicação 318, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o peptídeo sinal é um peptídeo sinal exógeno, opcionalmente em que o peptídeo sinal exógeno é um peptídeo sinal do hormônio de crescimento humano.

320. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a segunda sequência de polipeptídeo ligante compreendem a mesma sequência de polipeptídeo ligante.

321. Composição de nucleotídeo, de acordo com a reivindicação 320,

CARACTERIZADA pelo fato de que as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica a segunda sequência de polipeptídeo ligante que codifica a mesma sequência de polipeptídeo ligante compreendem sequências de nucleotídeo de códons divergentes, e em que as sequências de nucleotídeo que codificam a primeira sequência de polipeptídeo ligante e a sequência de nucleotídeo que codifica o segundo polipeptídeo ligante são códon divergentes uma em relação a outra.

322. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene codifica uma região de codificação.

323. Composição de nucleotídeo, de acordo com a reivindicação 322, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a região de codificação é selecionada a partir do grupo que consiste de: um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, um fator que promove a função das células T, e um inibidor da via de sinalização imune.

324. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene codifica uma região não codificante.

325. Composição de nucleotídeo, de acordo com a reivindicação 324, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a região não codificante é selecionada a partir do grupo que consiste de: um shRNA, um siRNA, um miRNA, um fator que modula o sistema imunológico, uma citocina, um fator que modula a função das células T, um fator que promove a sobrevivência das células T, e um fator que promove a função das células T.

326. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo

fato de que pelo menos uma porção do gene compreende pelo menos uma porção de um gene de TCR.

327. Composição de nucleotídeo, de acordo com a reivindicação 326, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene de TCR compreende:

- a) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-alfa;
- b) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de polipeptídeo TCR-beta; e
- c) uma sequência de nucleotídeo que codifica uma segunda sequência ligante.

328. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta ou pelo menos uma porção do gene de TCR é selecionada a partir do grupo que consiste de: pelo menos uma porção de um TCR murinizado, um TCR humanizado, um TCR de domínio trocado, um TCR com mutação pontual, um TCR manipulado com uma cisteína manipulada capaz de formar uma ligação dissulfeto, um TCR códon-otimizado para expressão em humanos, uma TCR de sequência otimizada para uso de códons e remoção de elementos de instabilidade do RNA, uma sequência de região variável do gene de TCR, um receptor de antígeno quimérico (CAR), e um TCR de cadeia única.

329. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de polipeptídeo TCR-beta ou um polipeptídeo codificado por pelo menos uma porção do gene de TCR é

manipulado para demonstrar uma maior associação com uma segunda sequência de polipeptídeo TCR exógena em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena, opcionalmente em que a sequência de polipeptídeo TCR-alfa e a sequência de polipeptídeo TCR-beta são modificadas para demonstrar uma associação maior entre si em relação a uma sequência de polipeptídeo TCR endógena.

330. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-alfa: segundo ligante: TCR-beta do N terminal ao C terminal.

331. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as sequências de polipeptídeo codificadas estão em uma orientação de ligante: TCR-beta: segundo ligante: TCR-alfa do N terminal ao C terminal.

332. Composição de nucleotídeo, de acordo com qualquer uma das composições de nucleotídeo reivindicadas anteriormente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção do gene, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-alfa, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de polipeptídeo TCR-beta, ou a sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma porção do gene de TCR compreende uma sequência de nucleotídeo de códon divergente, e em que a sequência de nucleotídeo de códon divergente é um códon divergente em relação a uma sequência de nucleotídeo endógena.

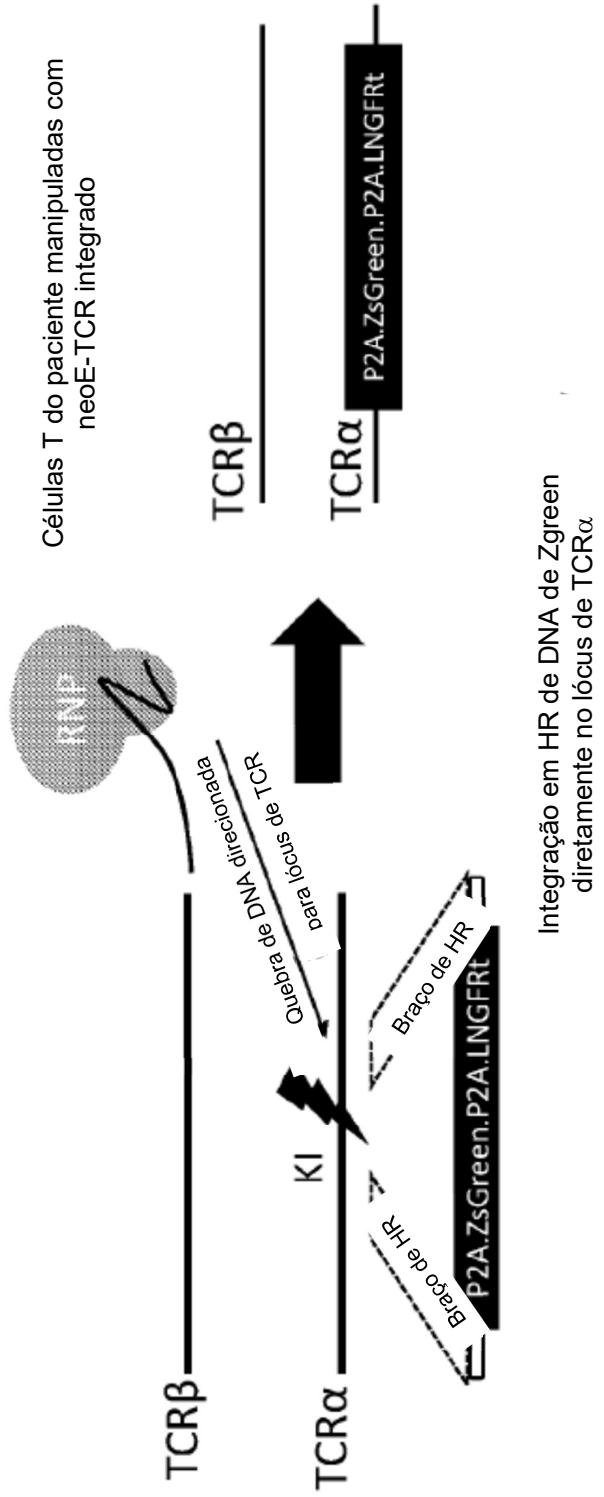


Fig. 1

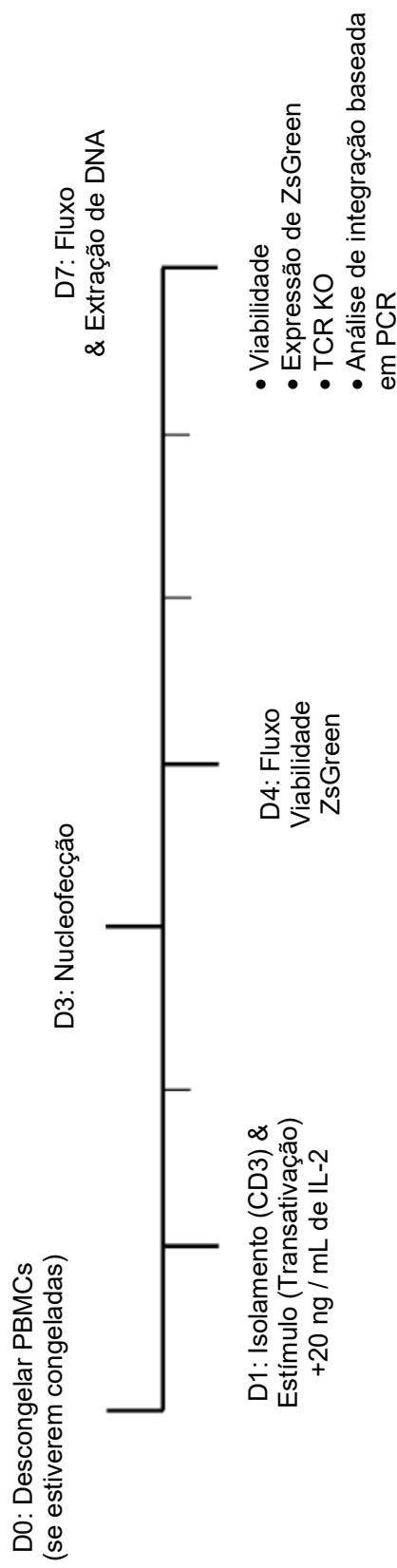
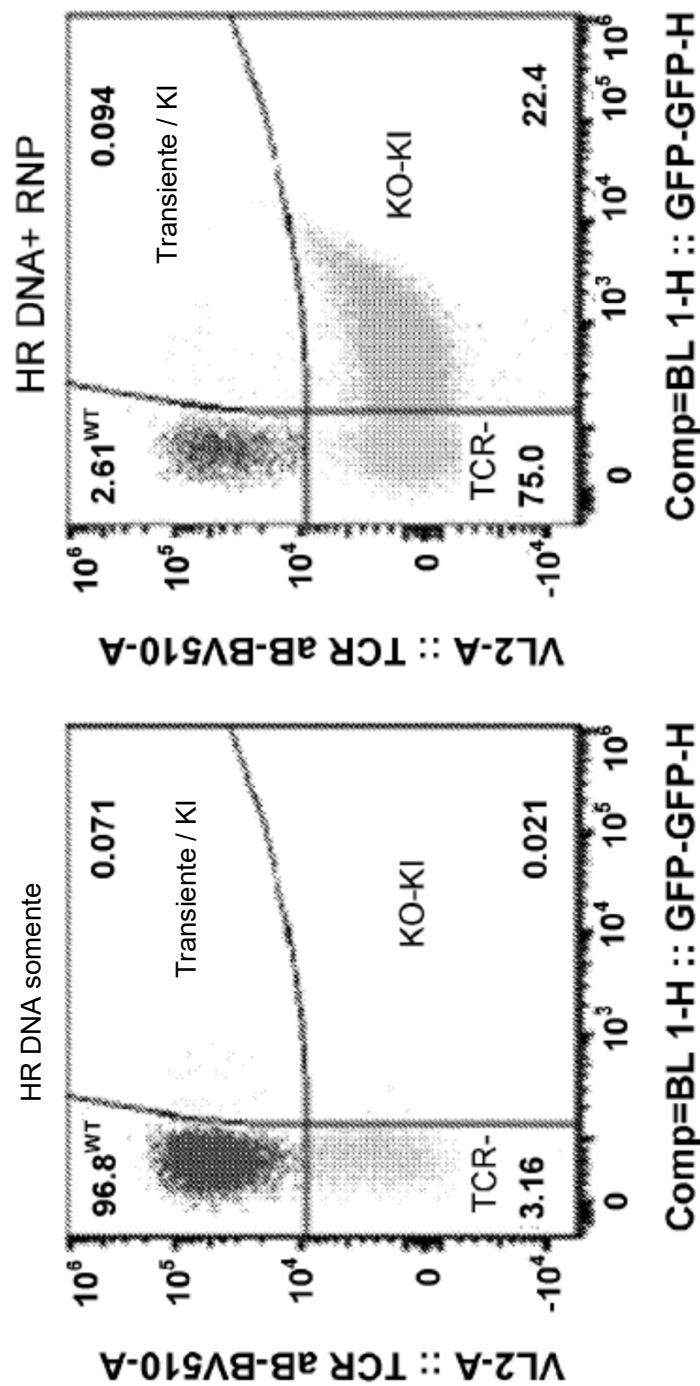


Fig. 2

**FIG. 3**

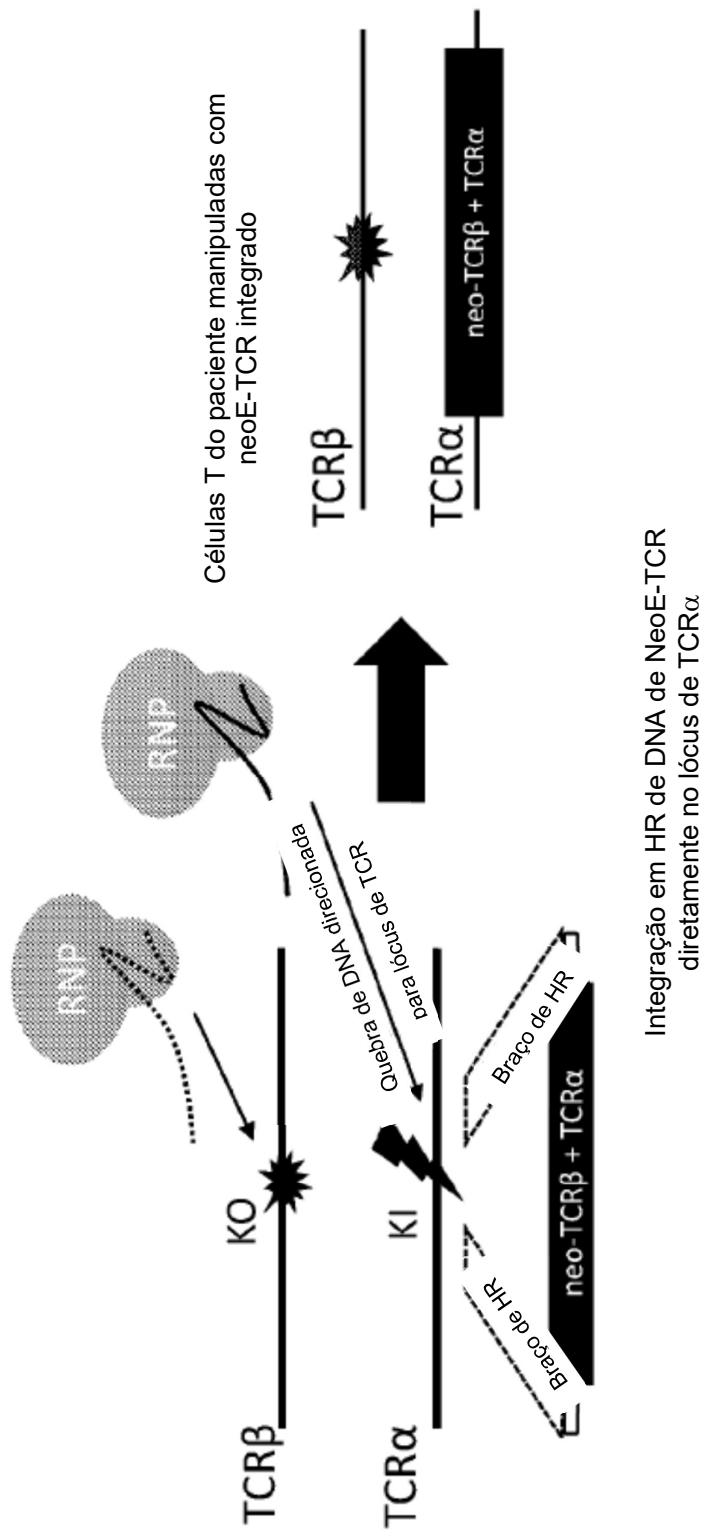


Fig. 4

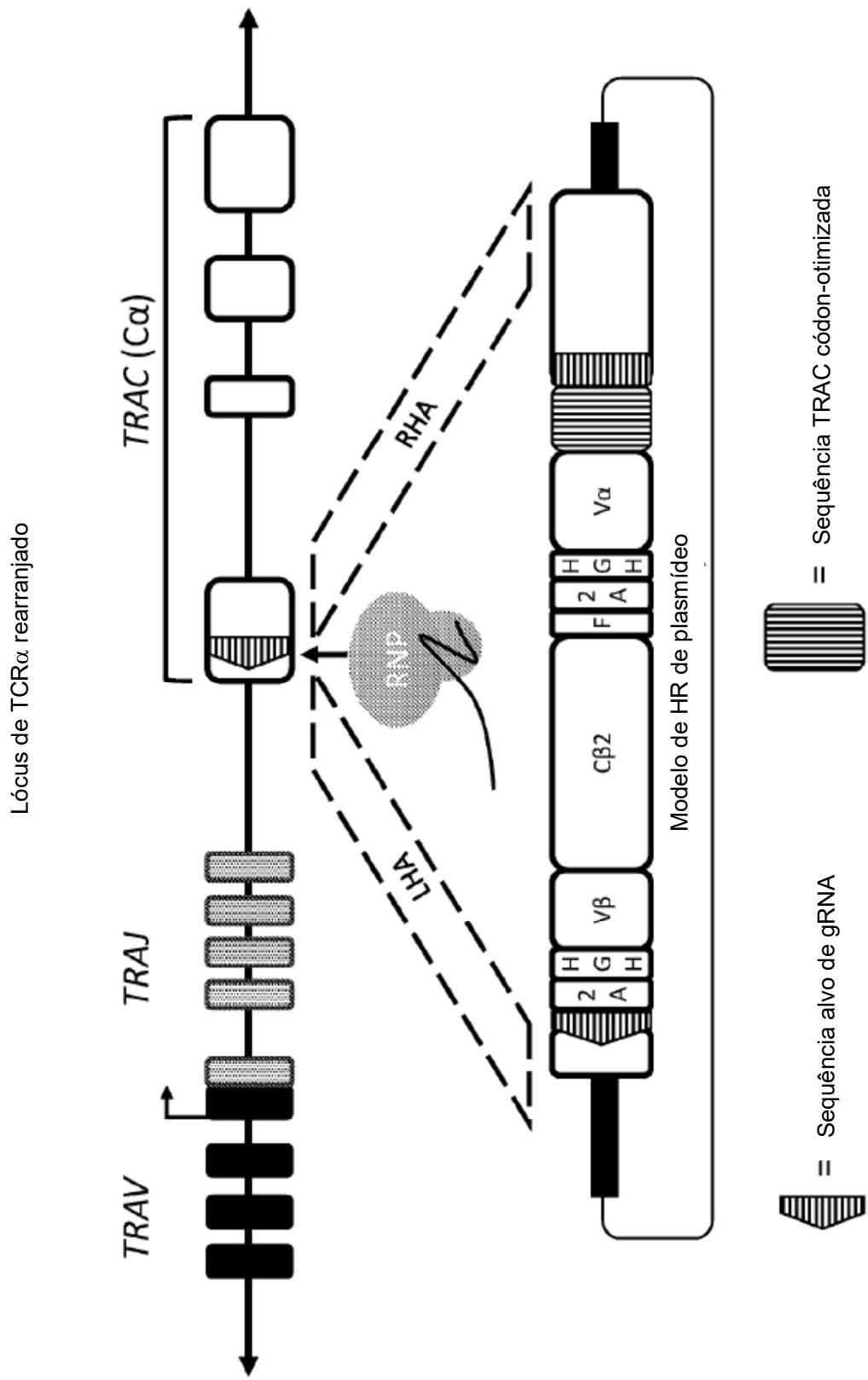


Fig. 5A

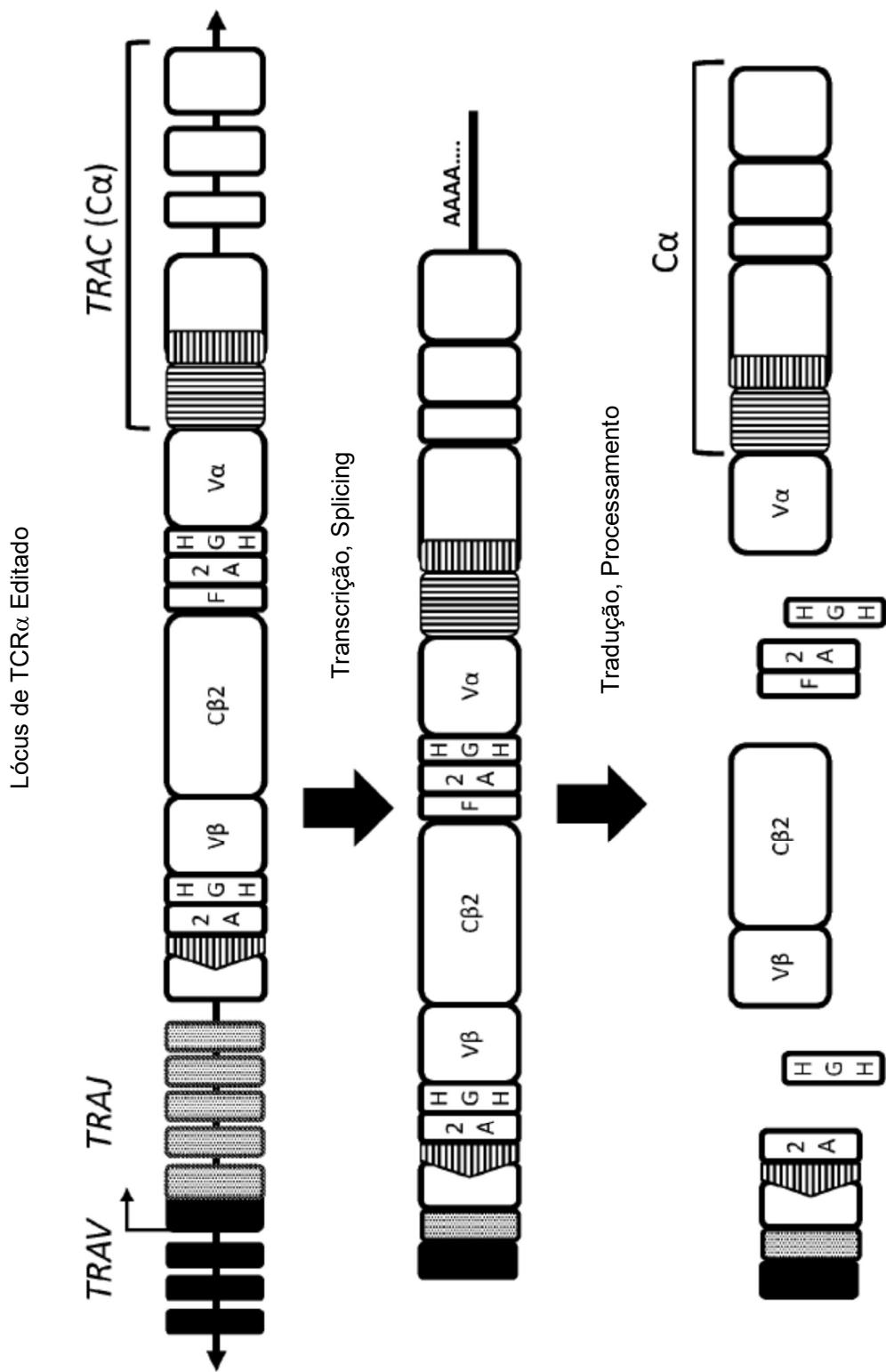


Fig. 5B

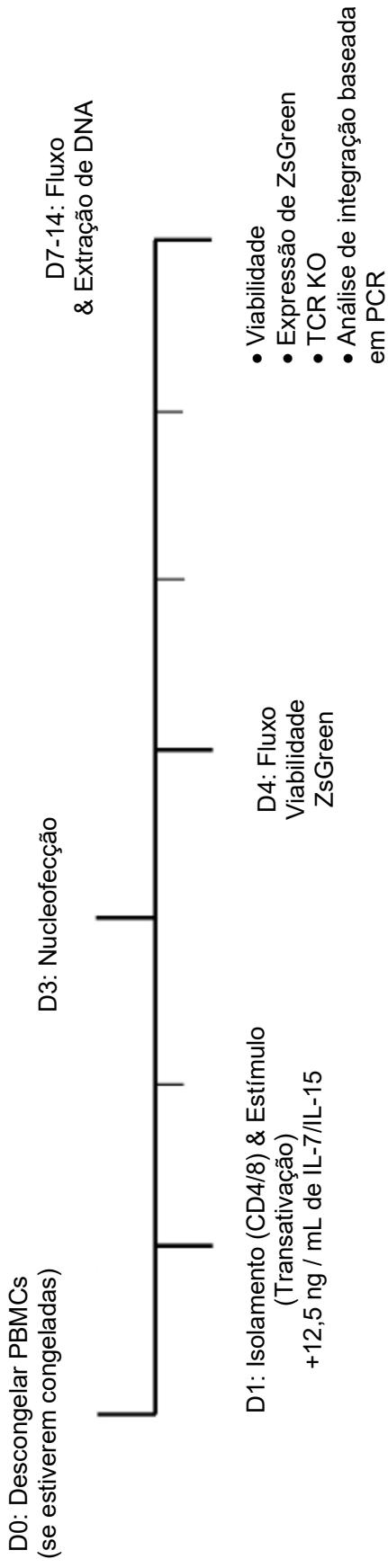


Fig. 6

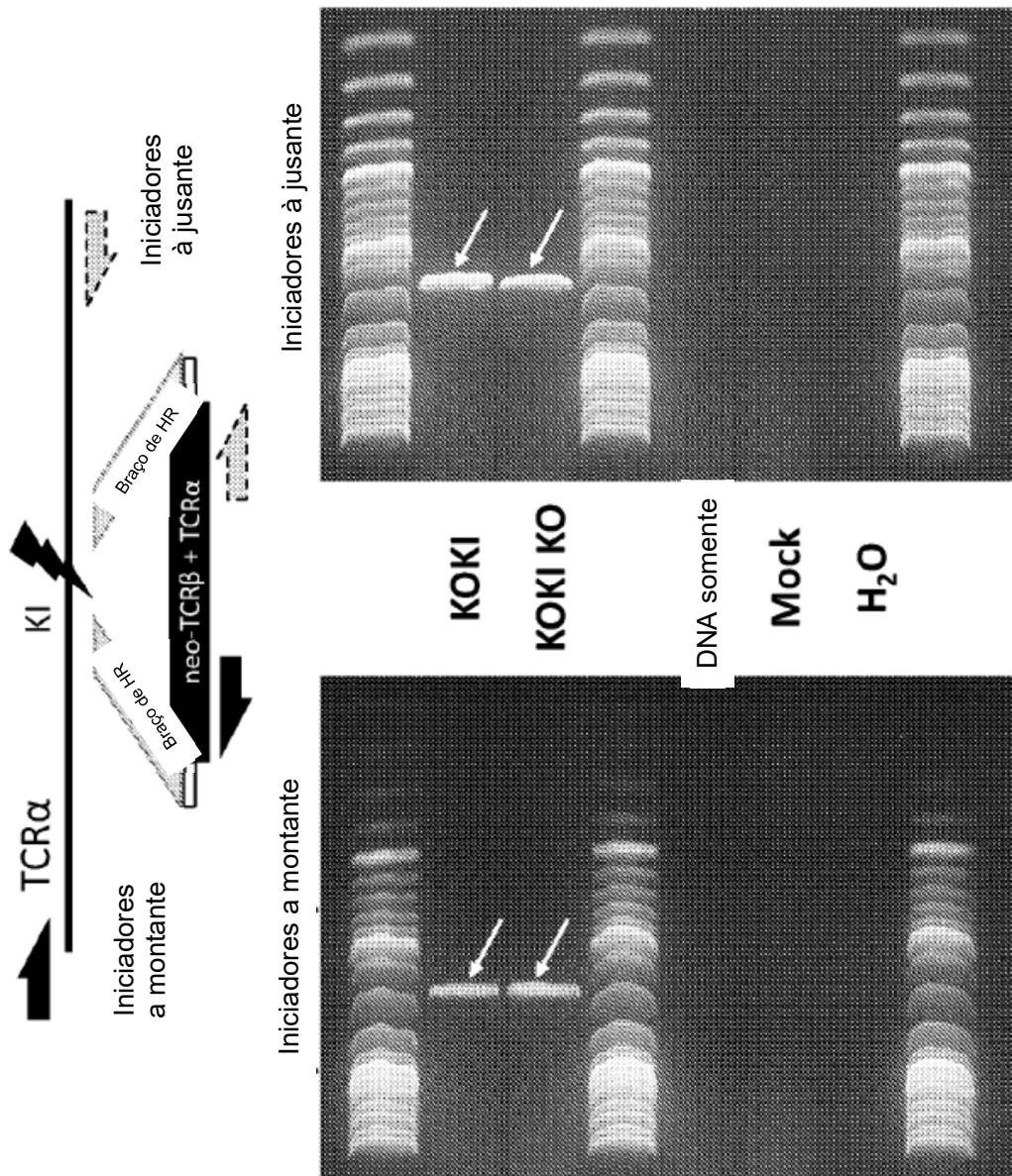
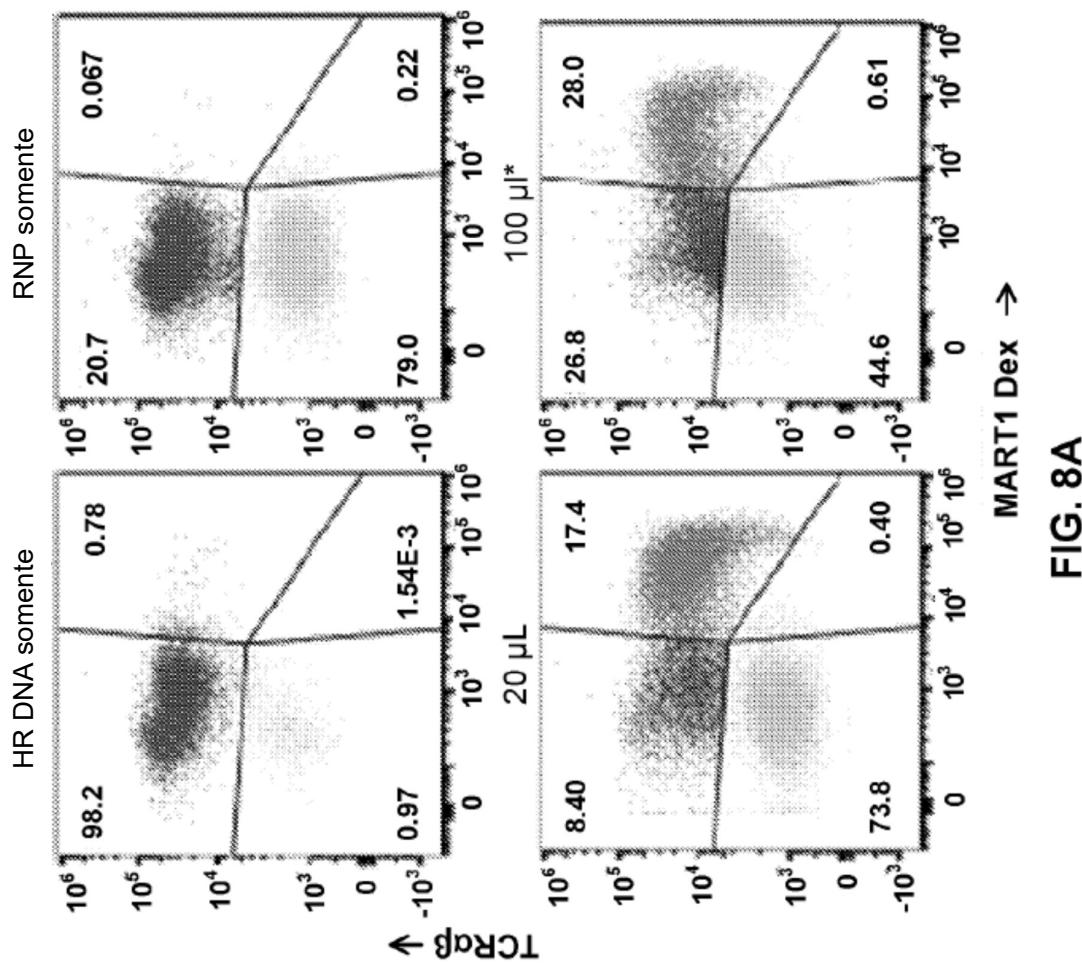
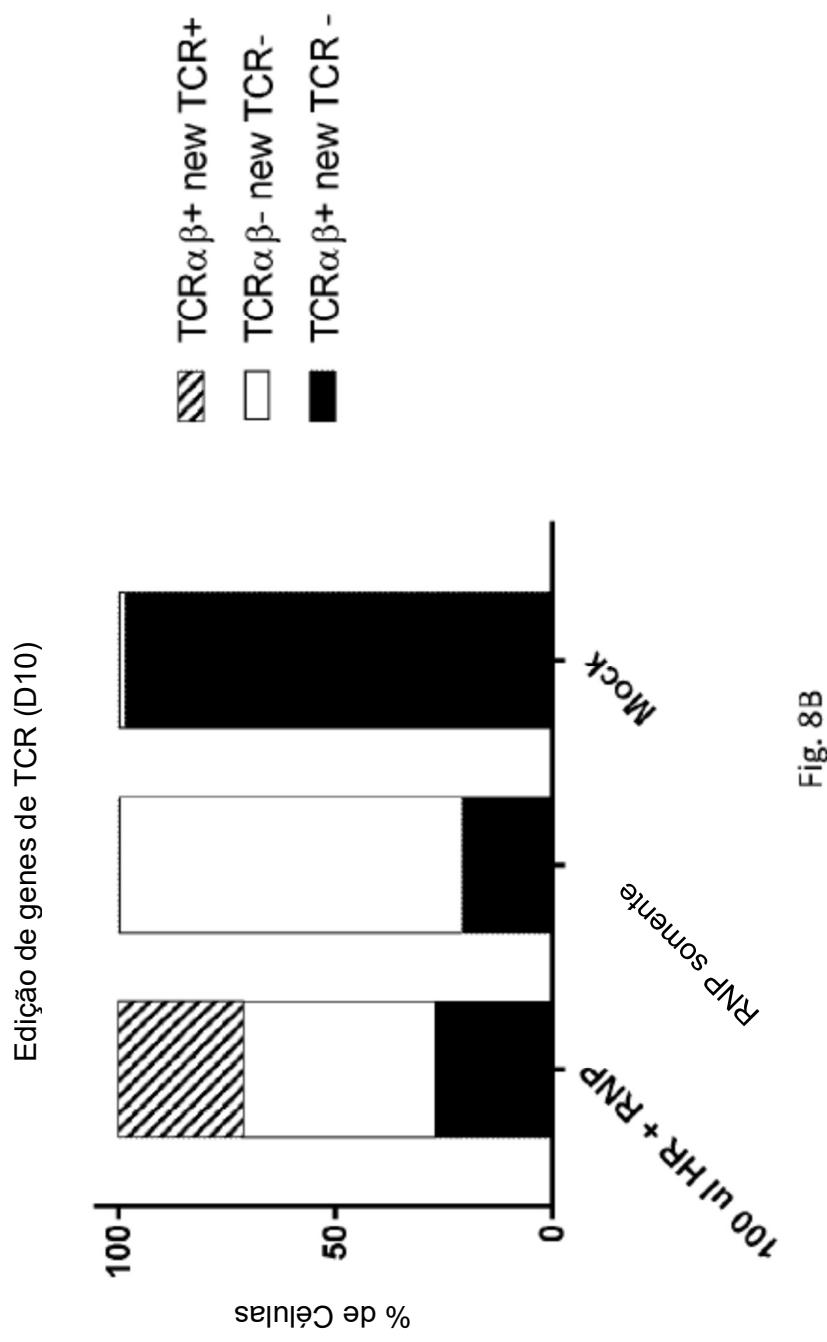


Fig. 7

**FIG. 8A**



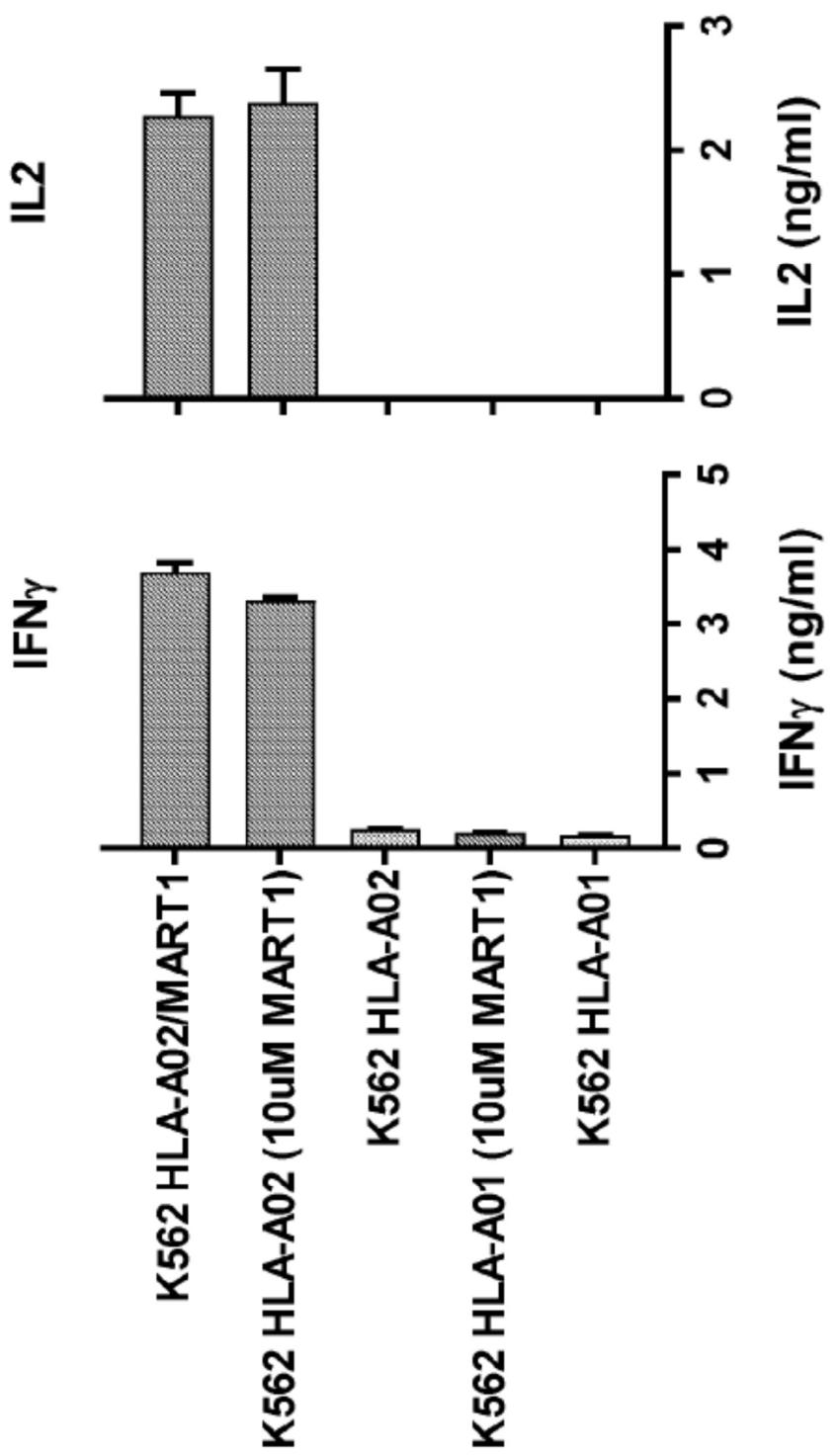


Fig. 9

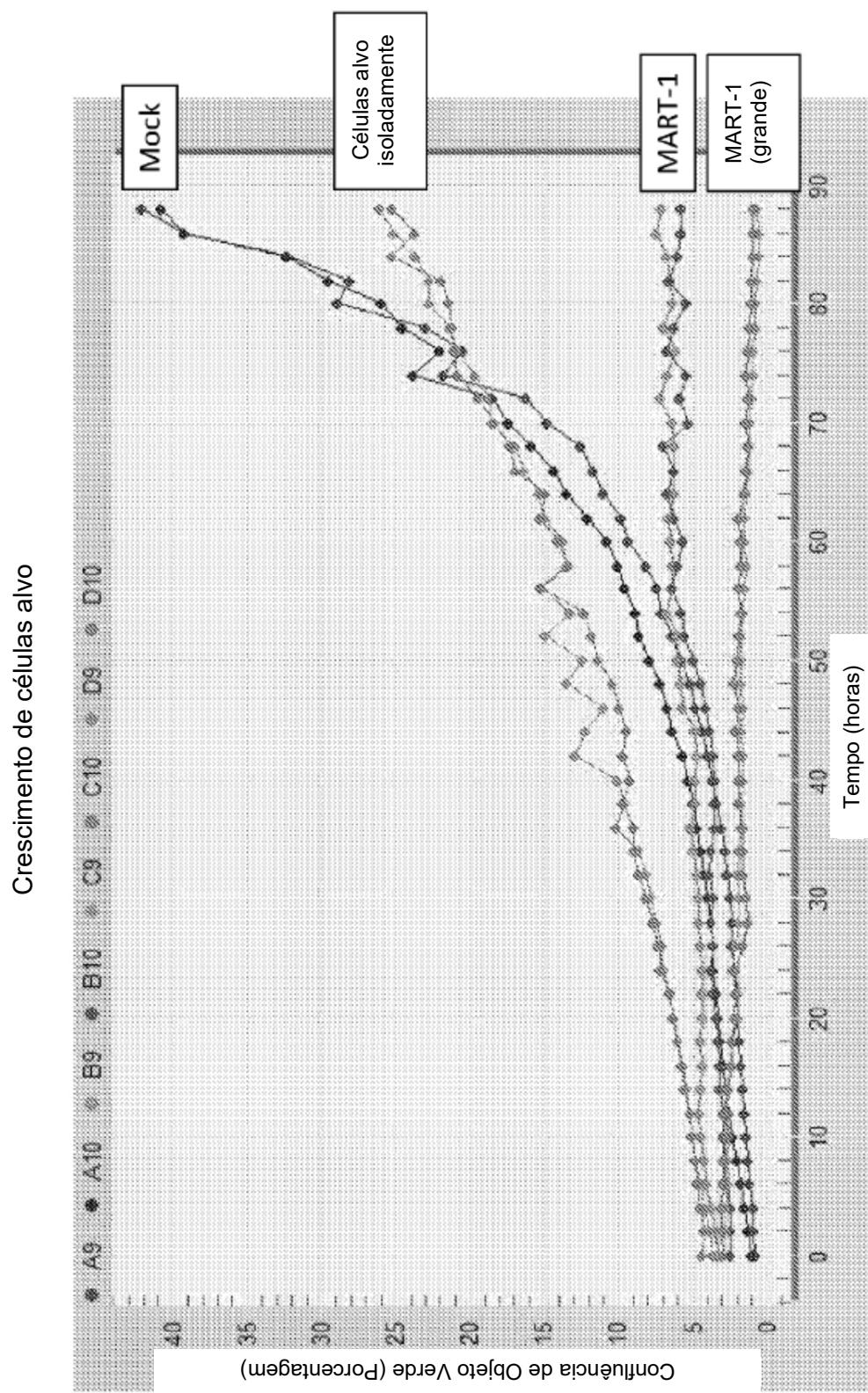


Fig. 10A

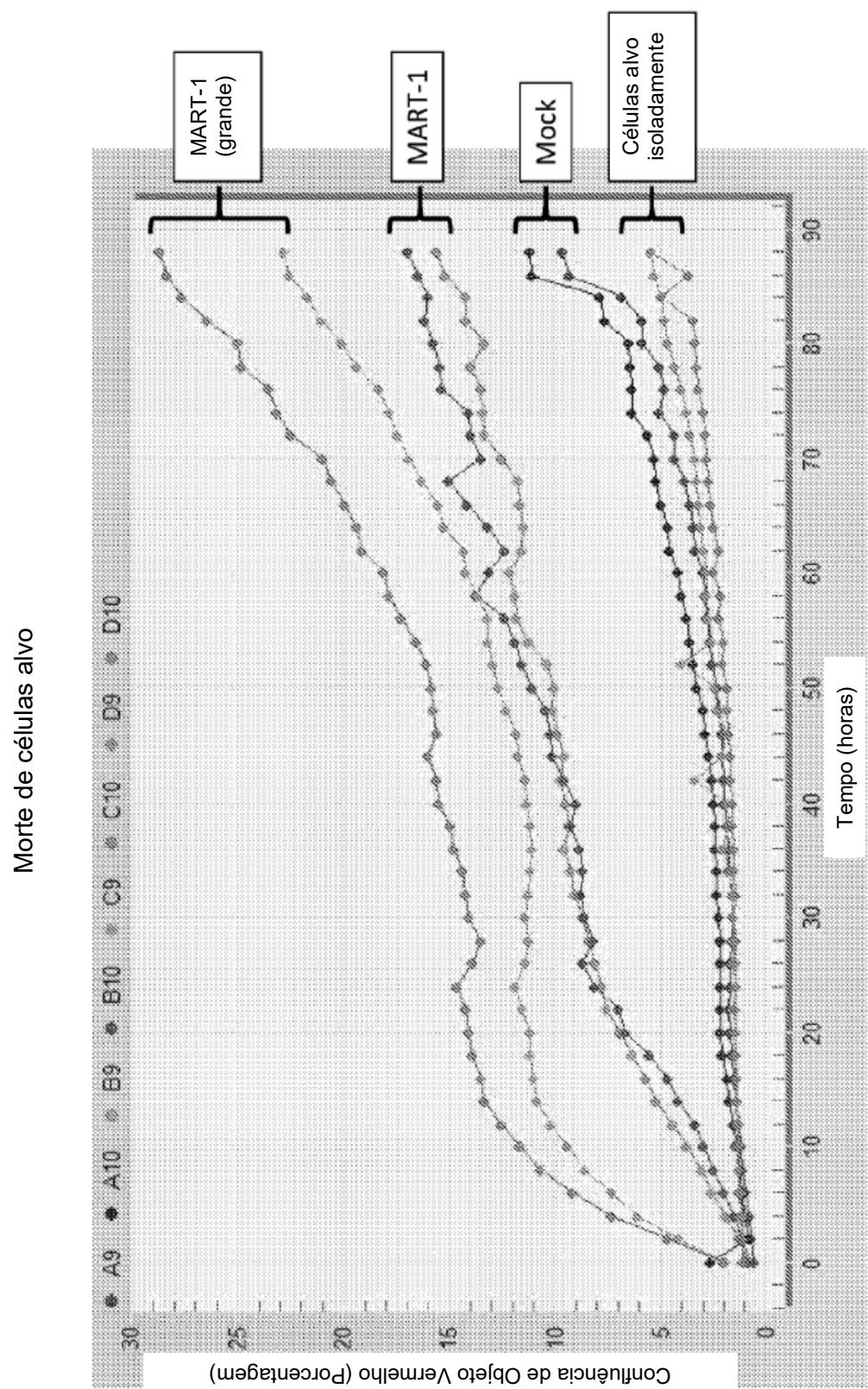


Fig. 10B

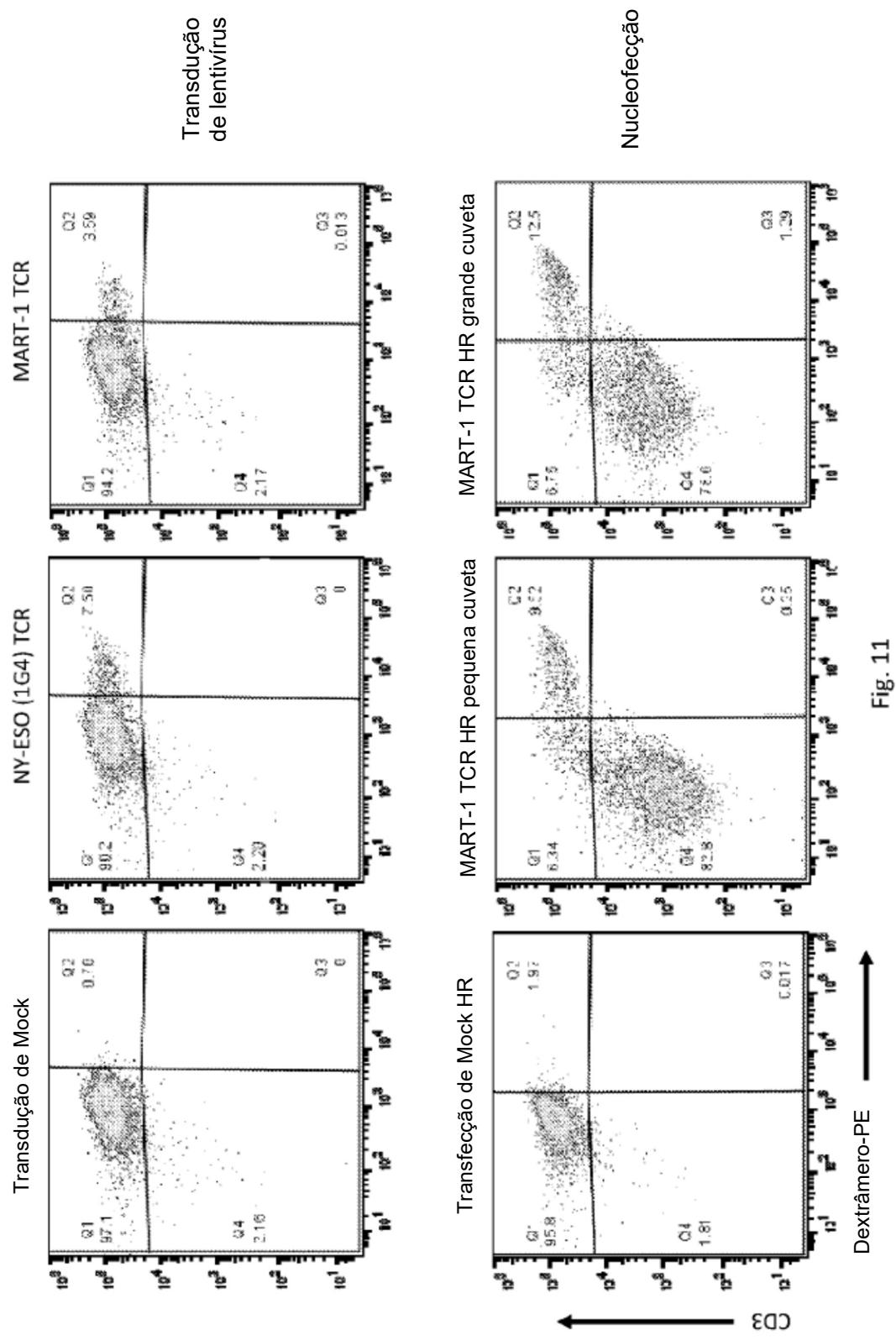


Fig. 11

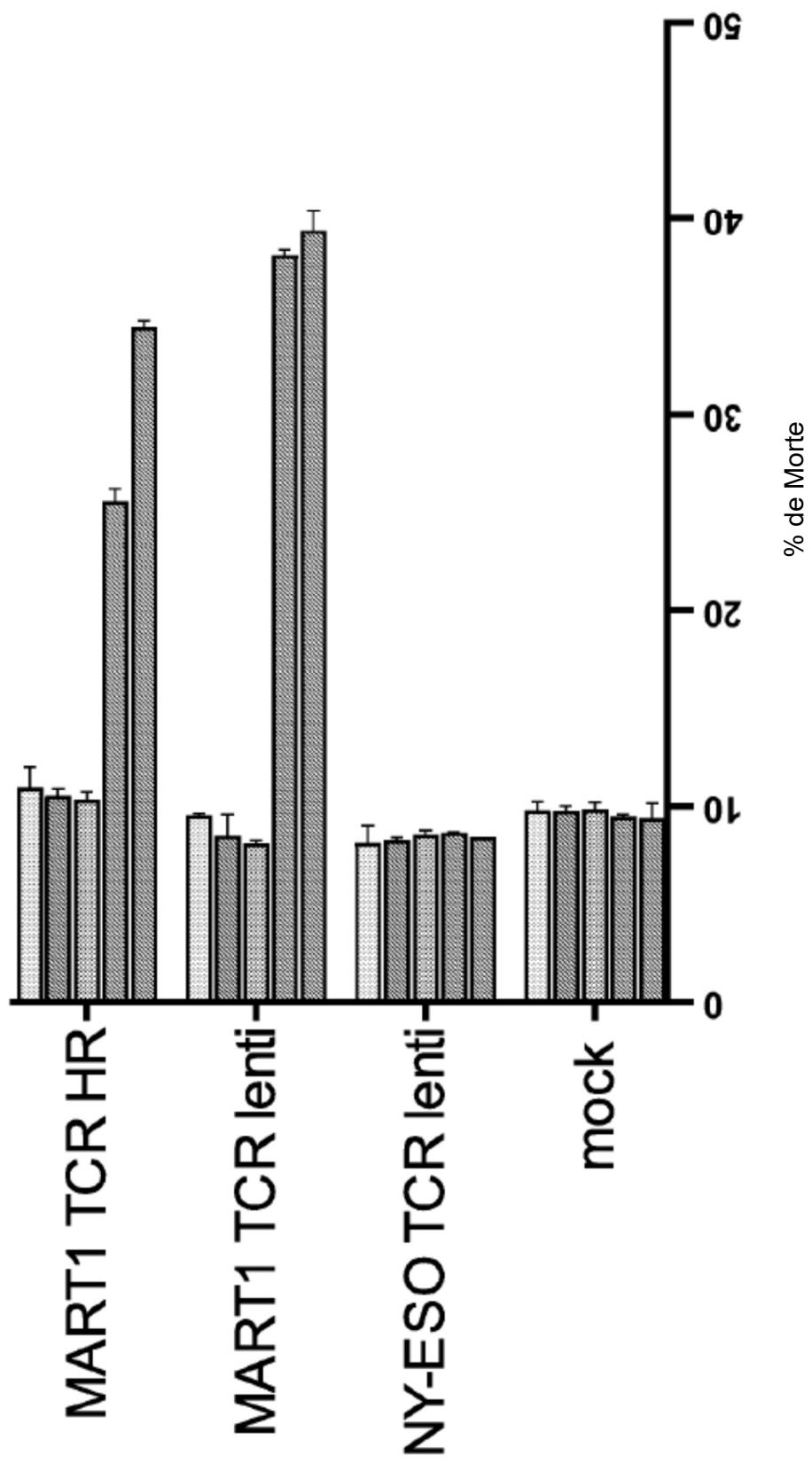
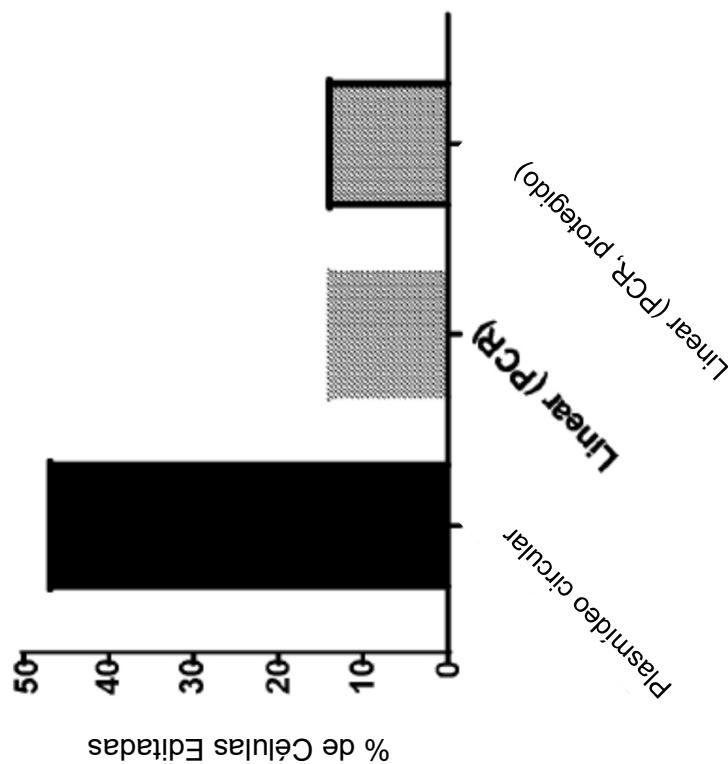
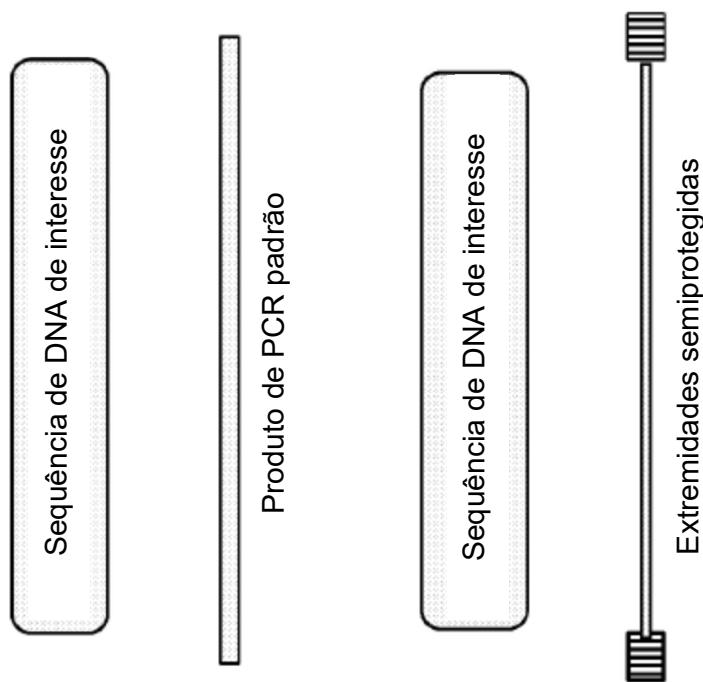


Fig. 12

**FIG. 13B****FIG. 13A**

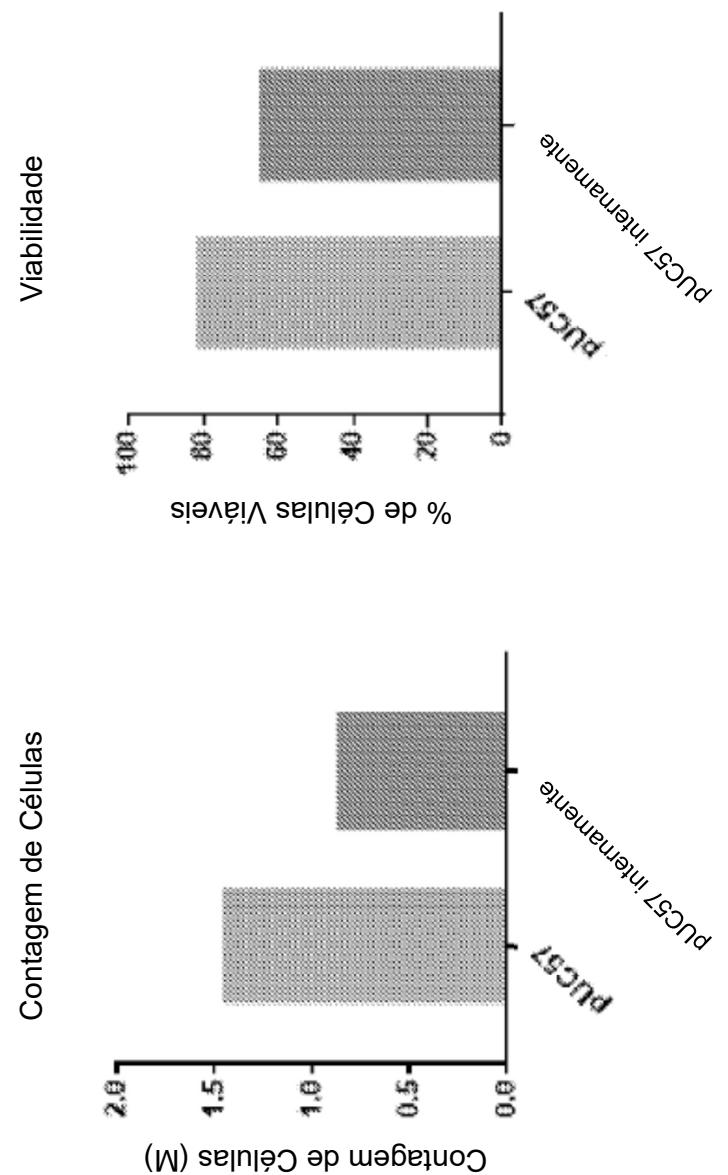


Fig. 14

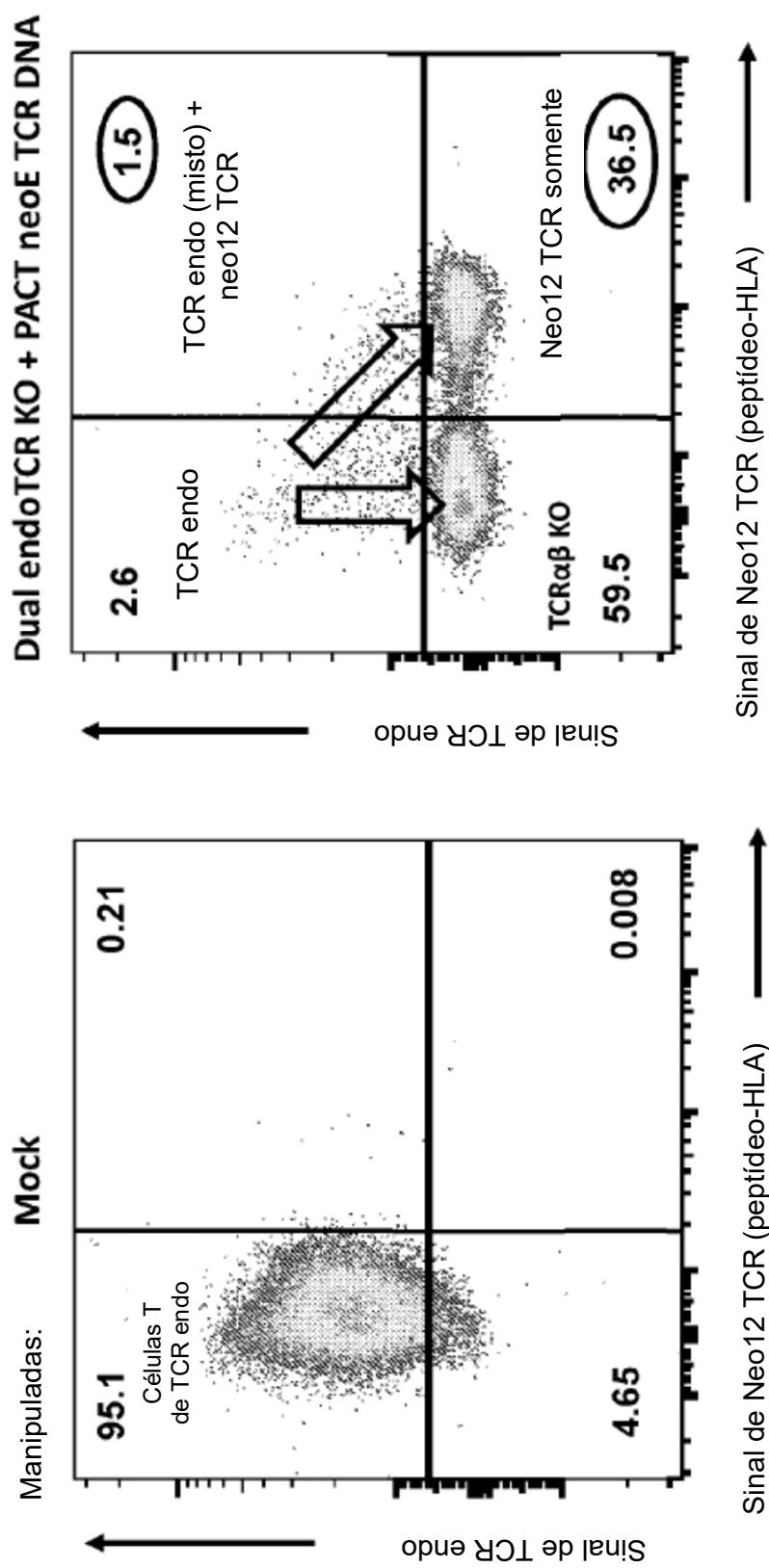


Fig. 15

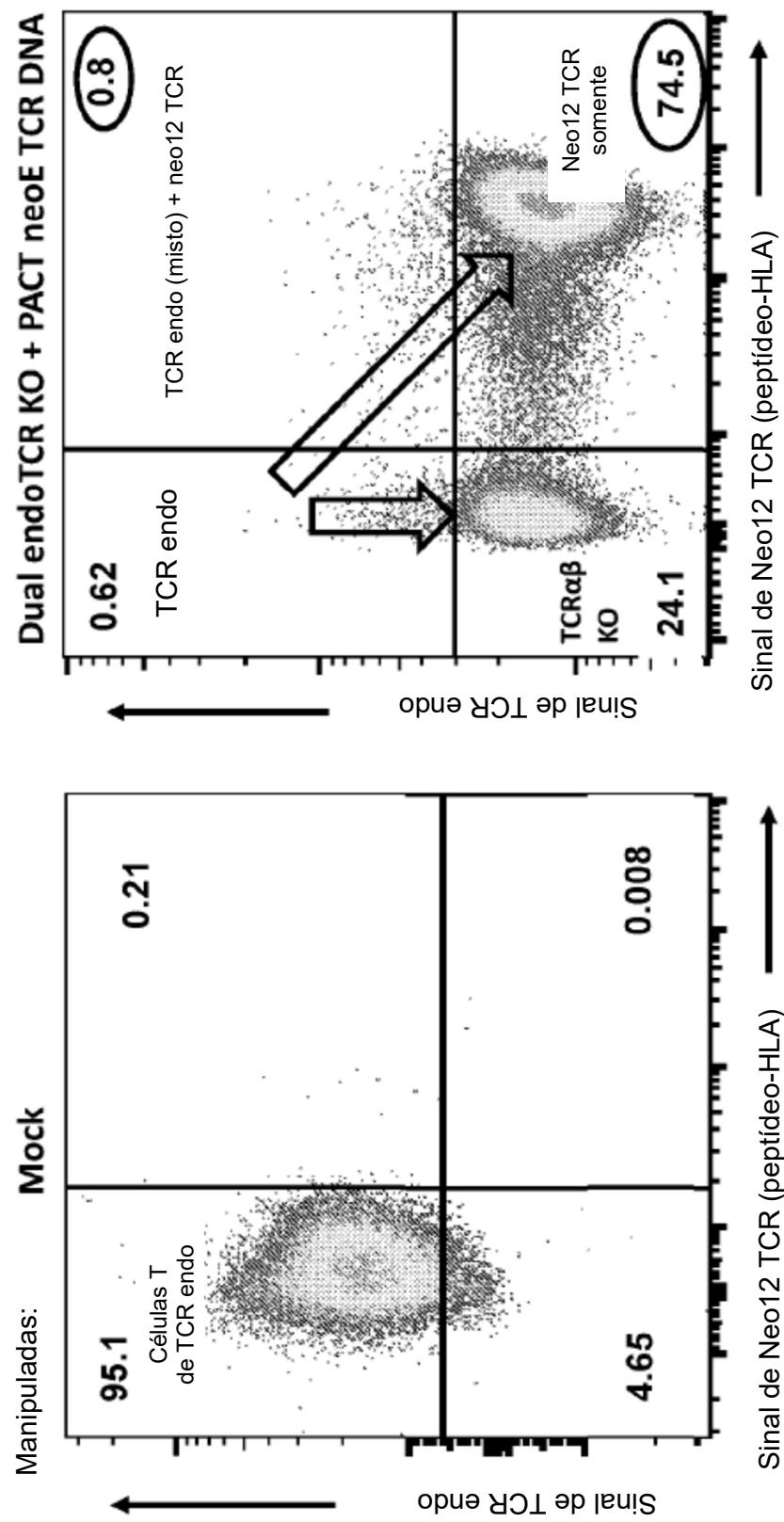


Fig. 16

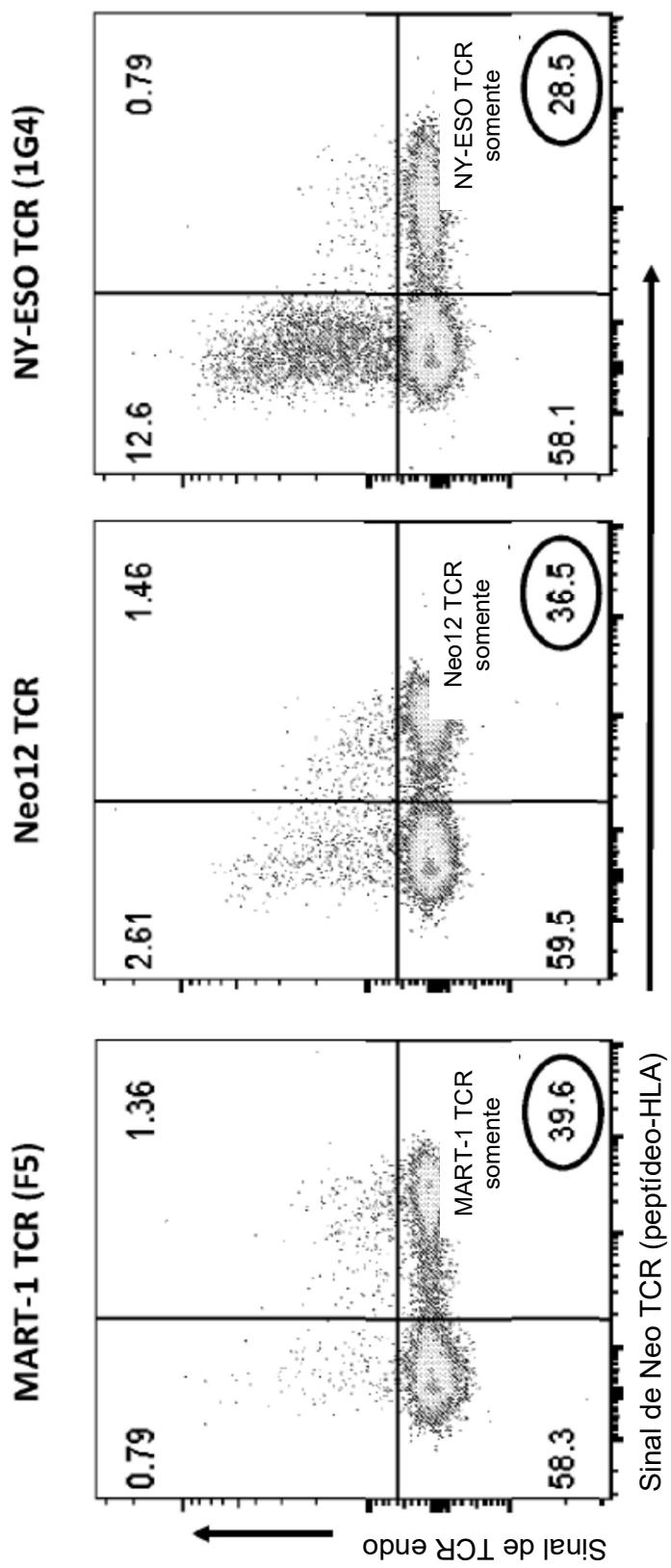


Fig. 17

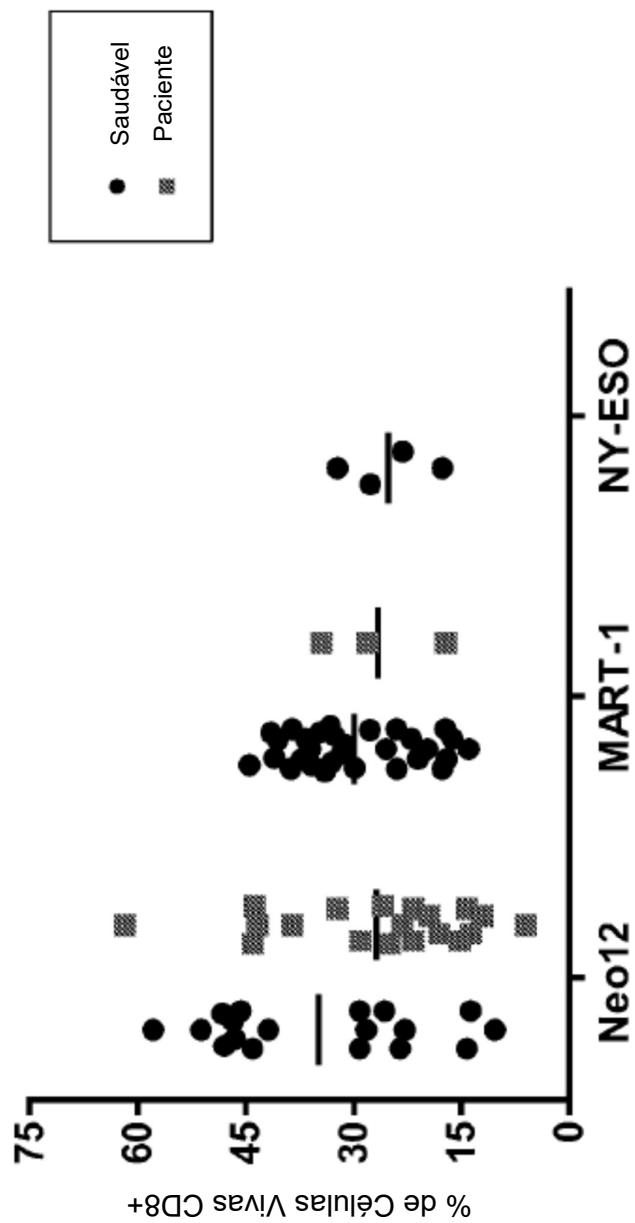


Fig. 18A

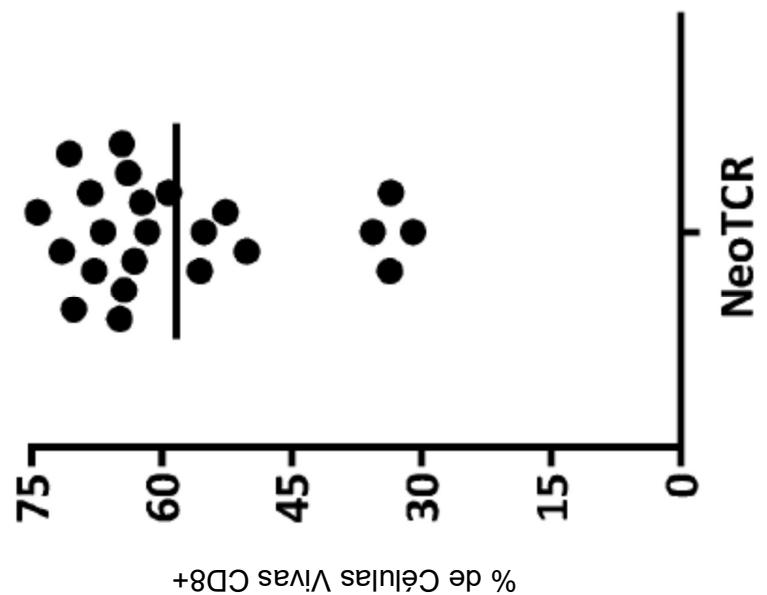


Fig. 18B

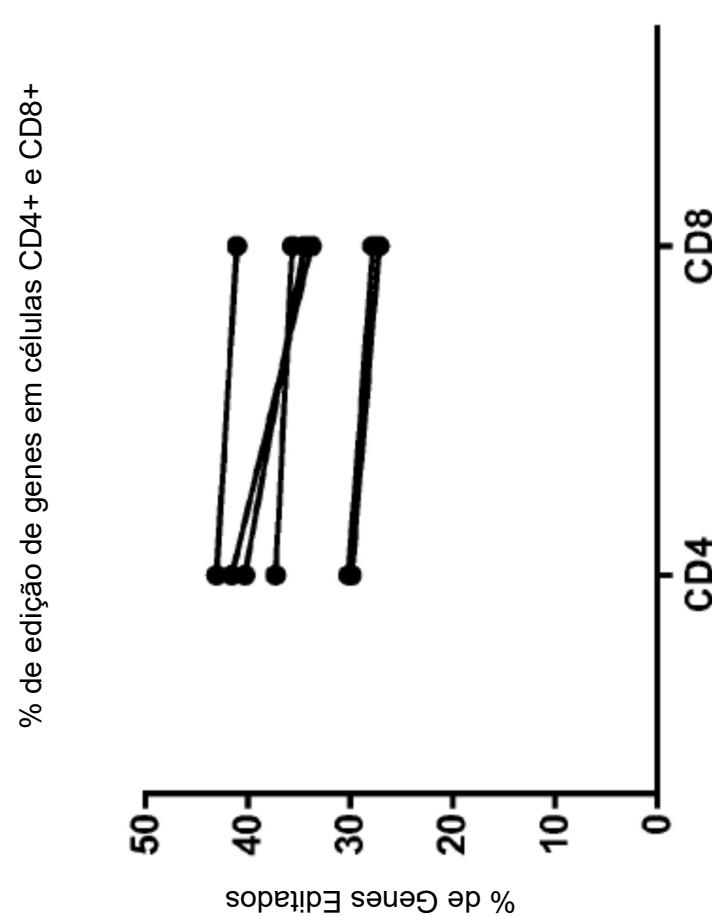


Fig. 19

Fig. 20A

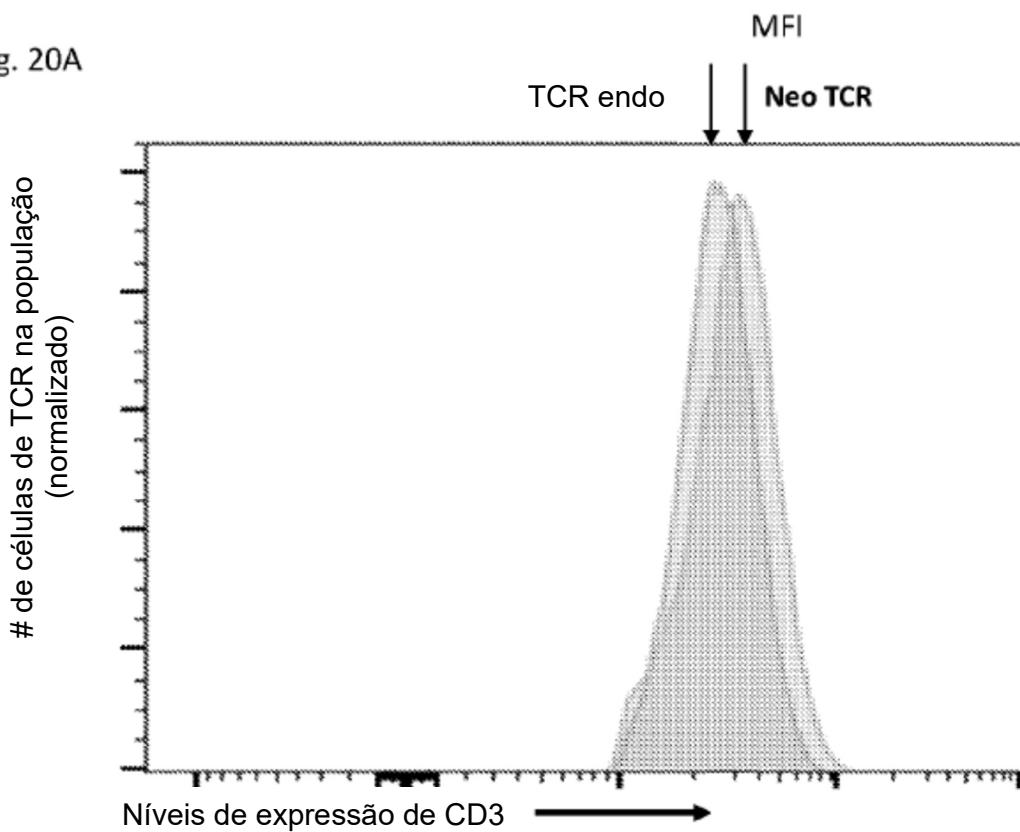
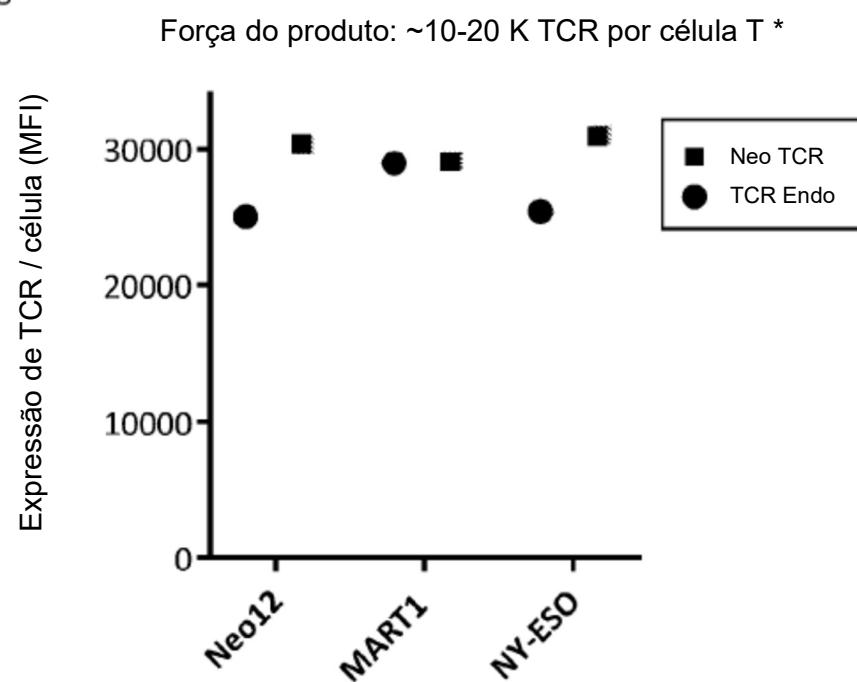


Fig. 20B



Edição de genes em LV: CD8s no Dia 6

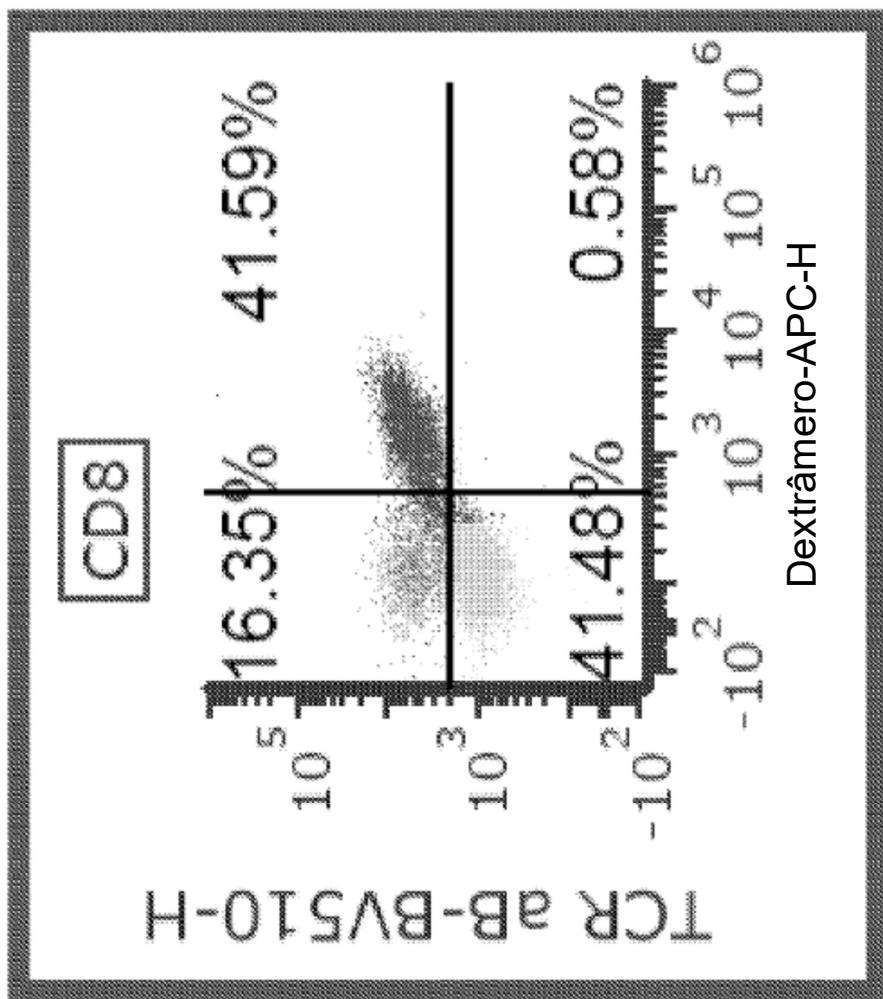


Fig. 21

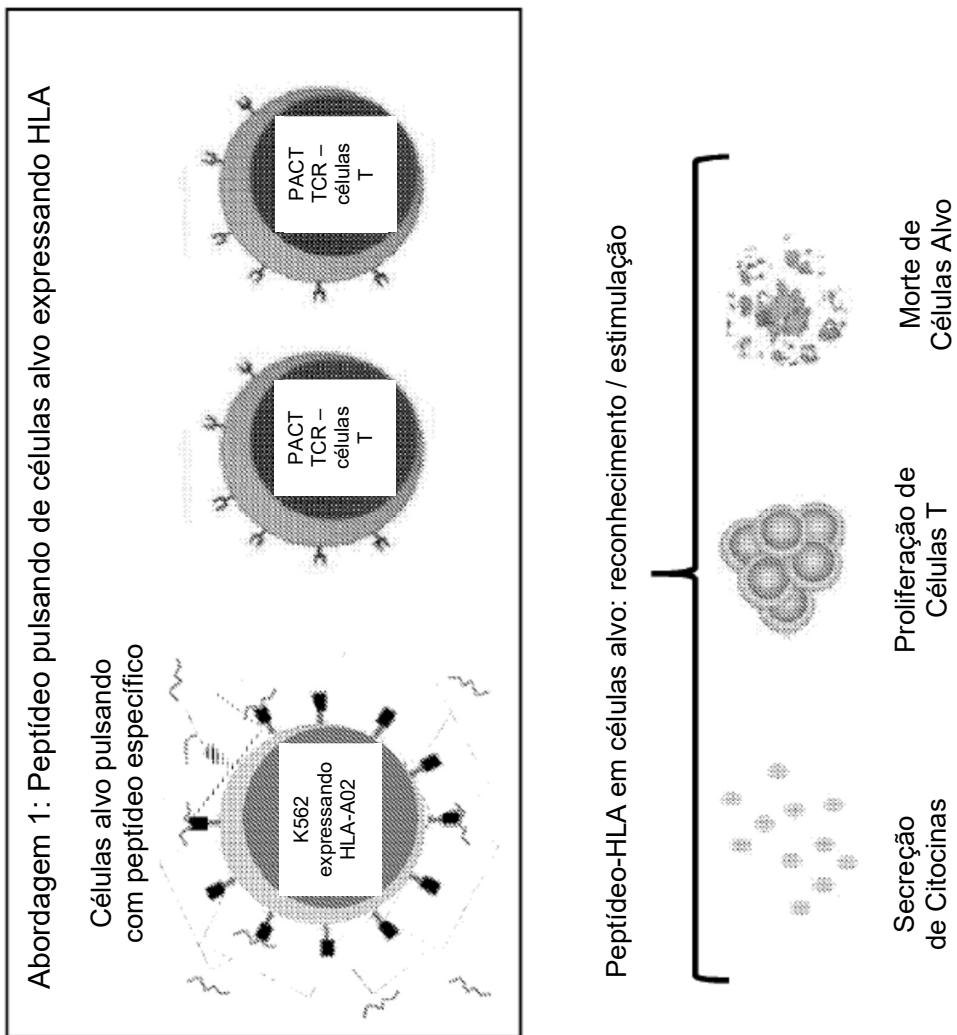


Fig. 22

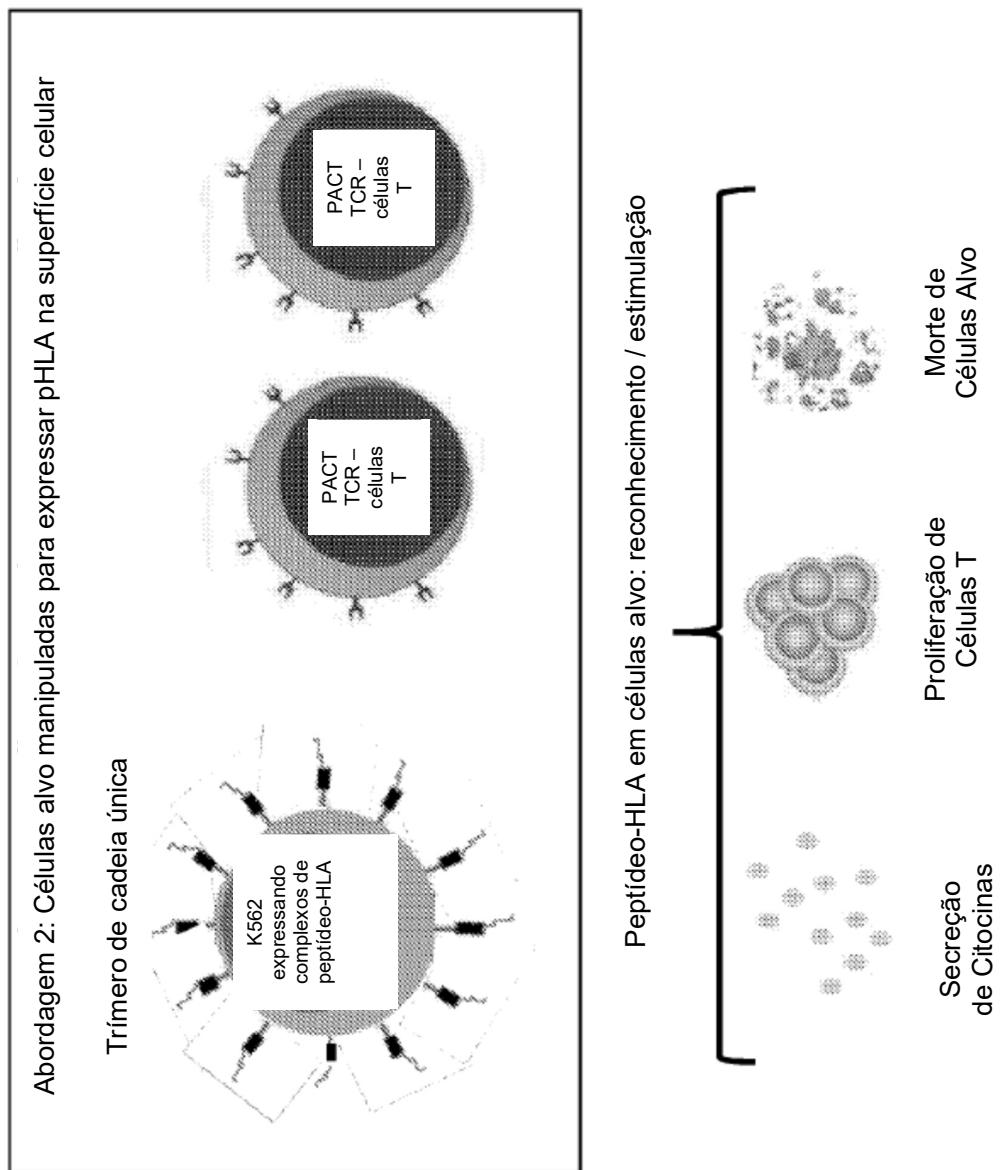


Fig. 23

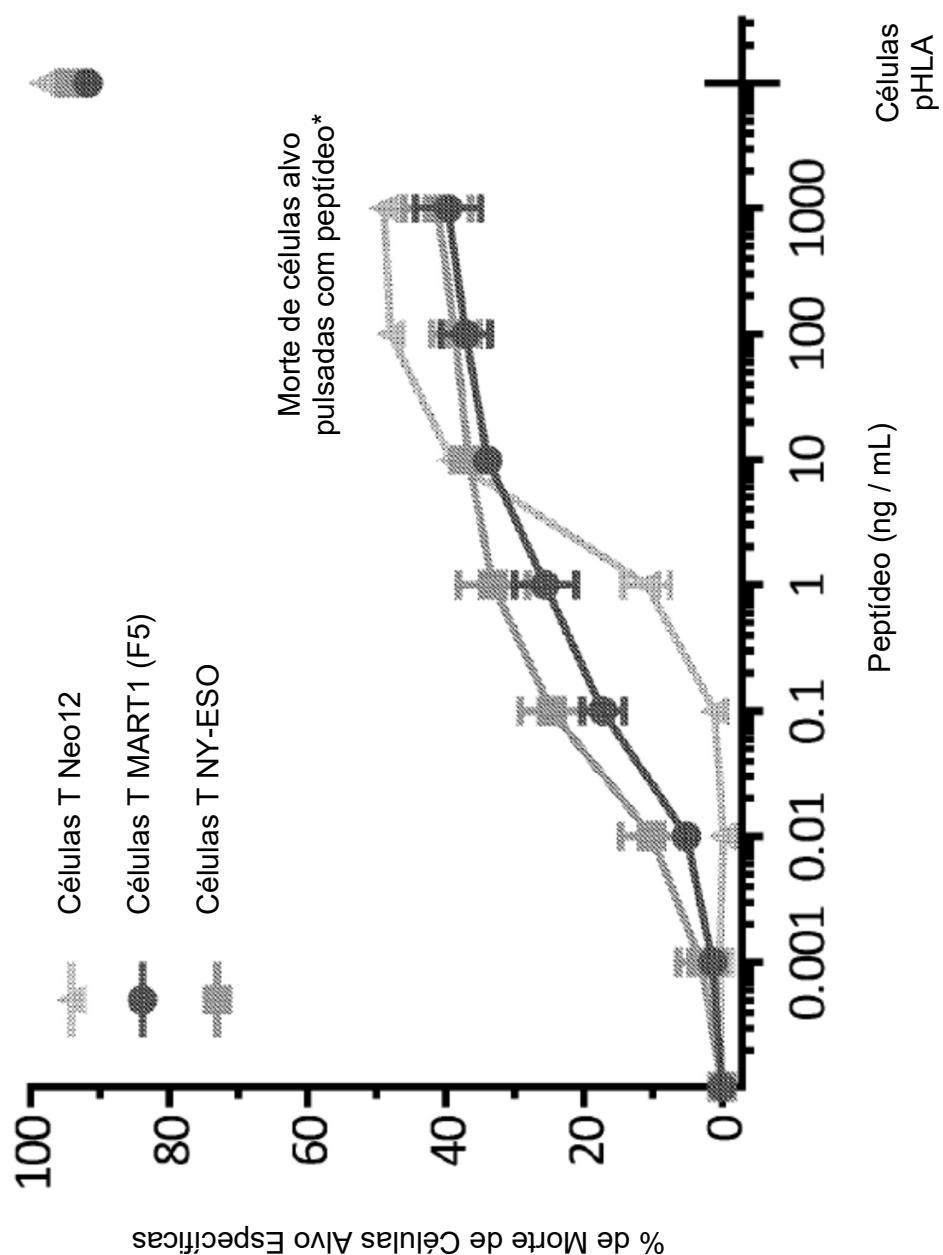


Fig. 24

Fig. 25A

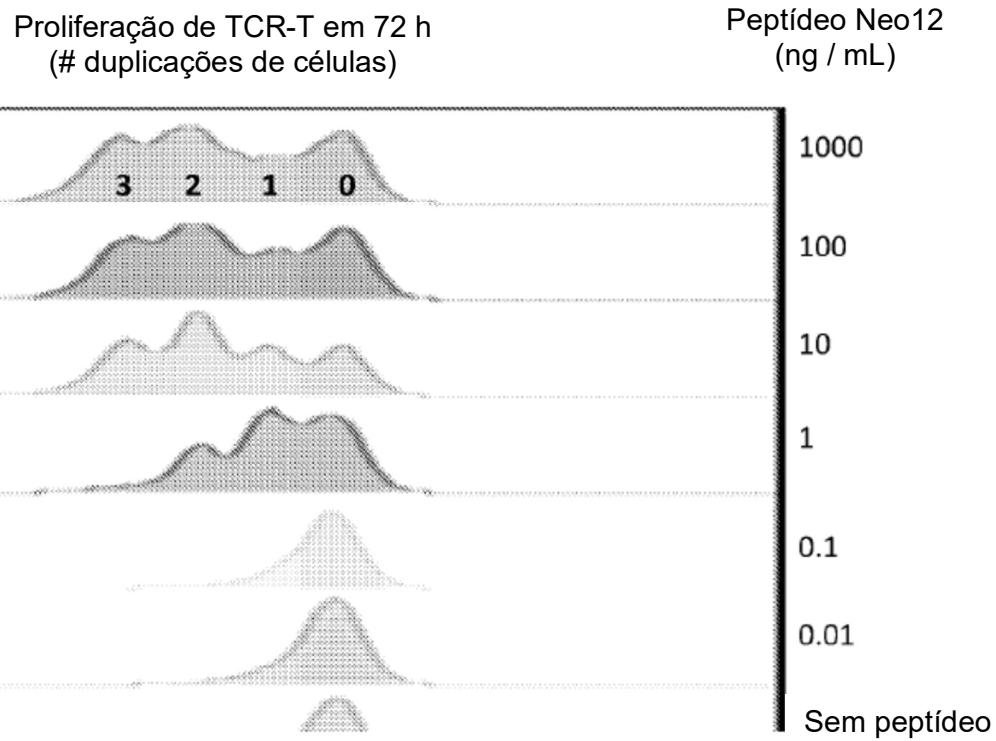
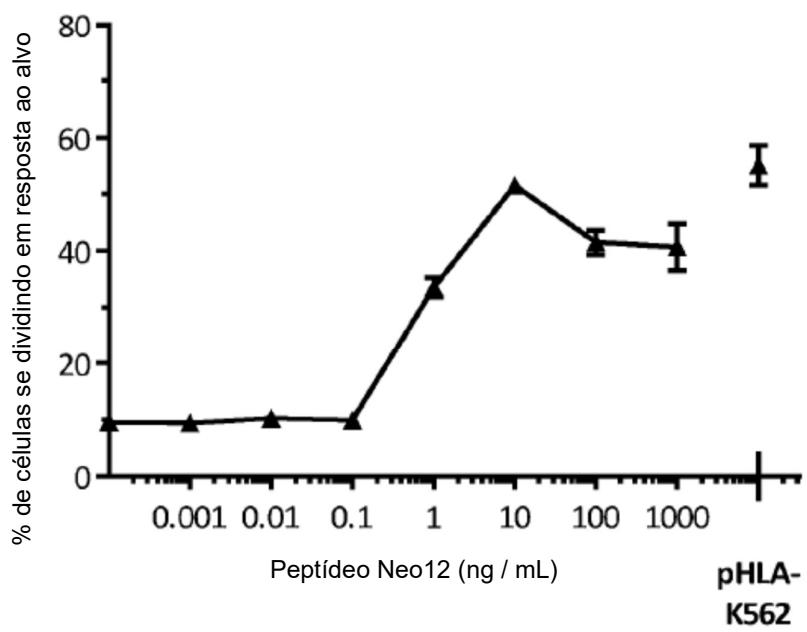


Fig. 25B



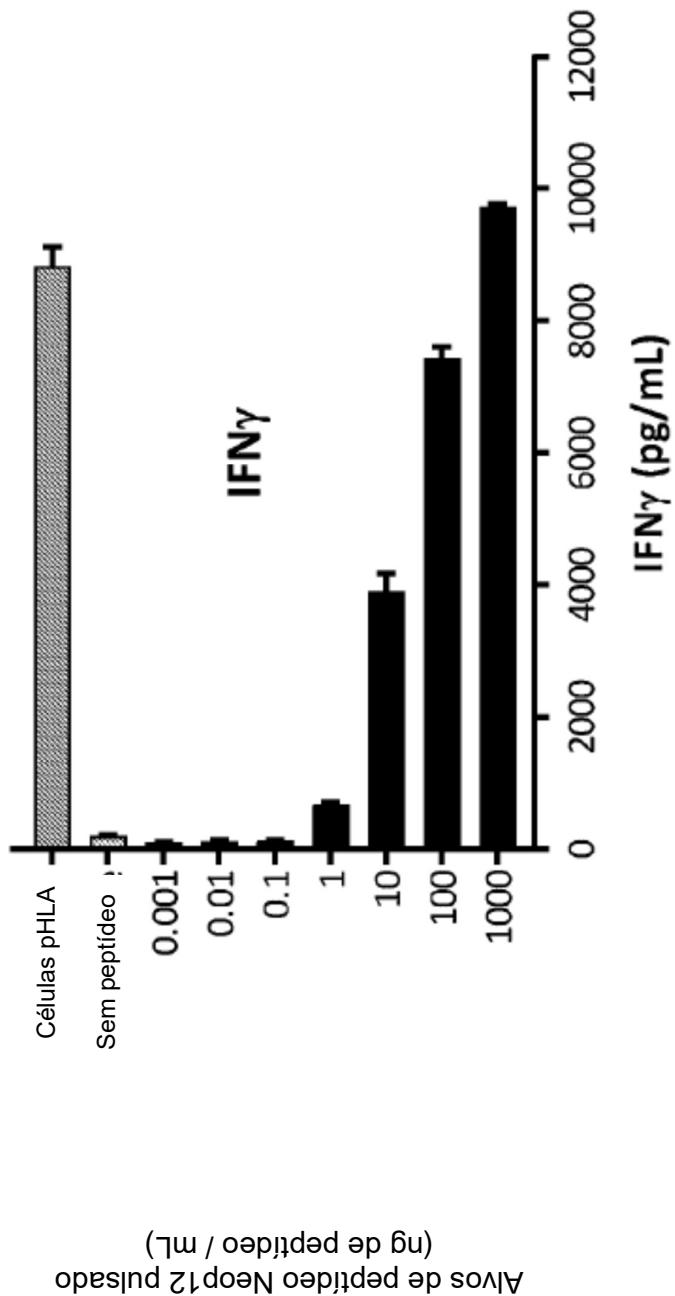


Fig. 26A

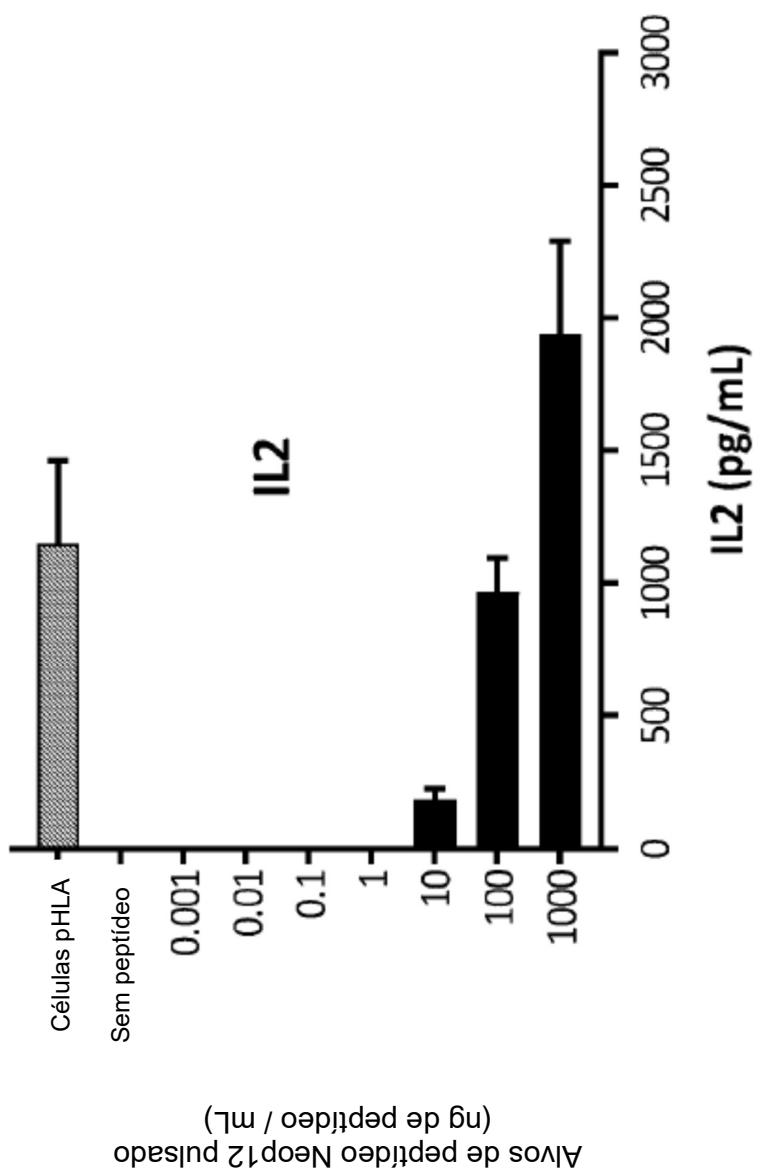


Fig. 26B

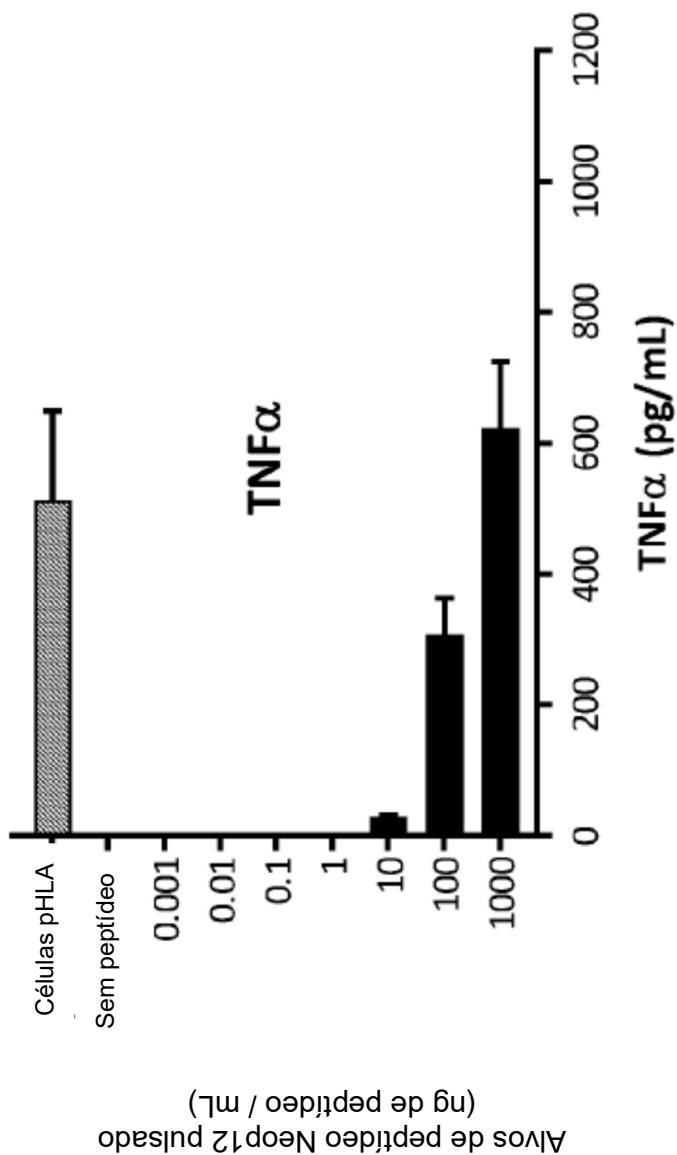


Fig. 26C

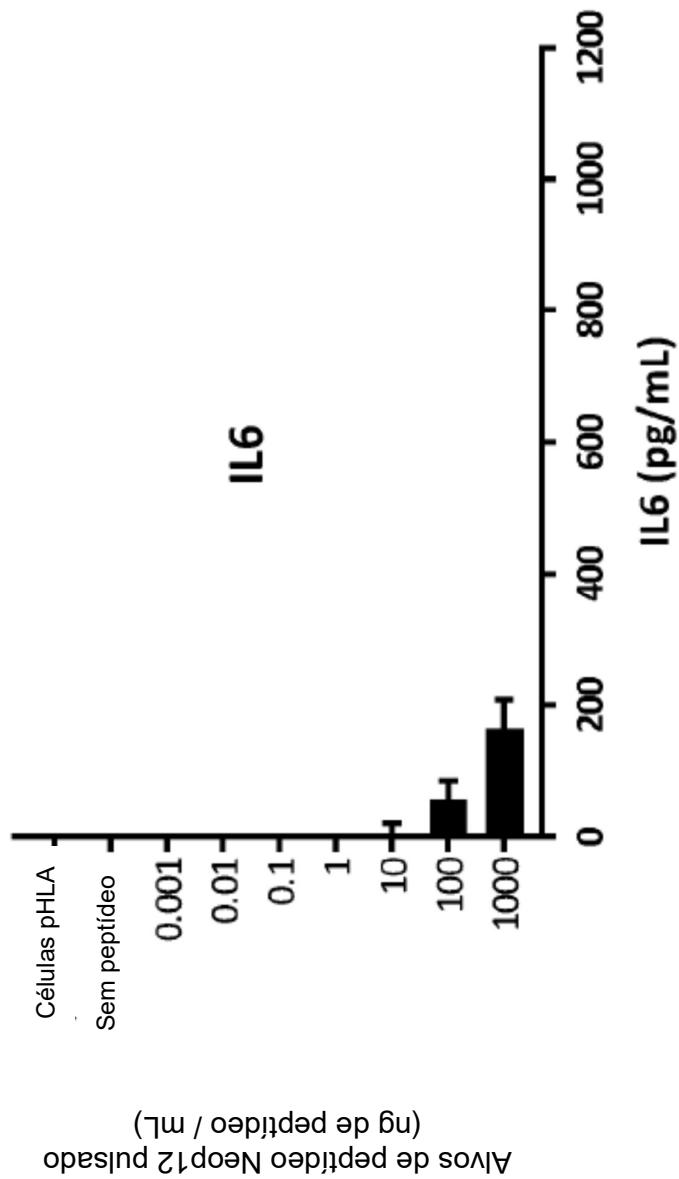


Fig. 26D

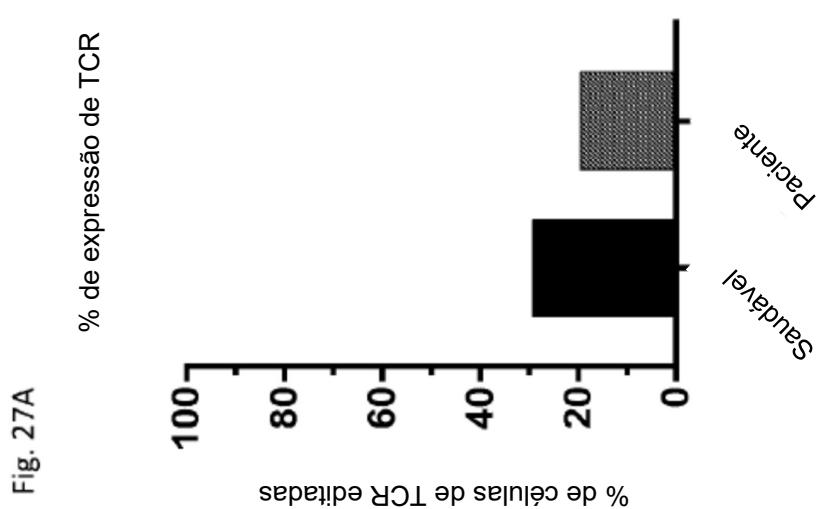


Fig. 27B

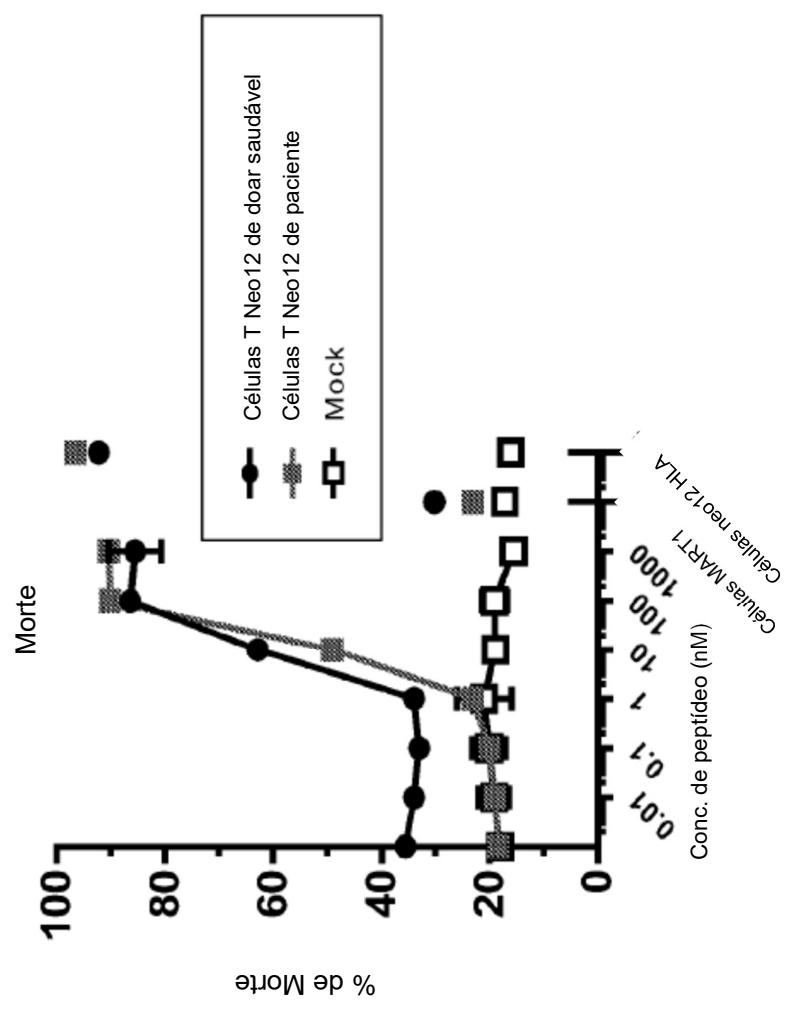


Fig. 27A

Fig. 27B

Fig. 27C

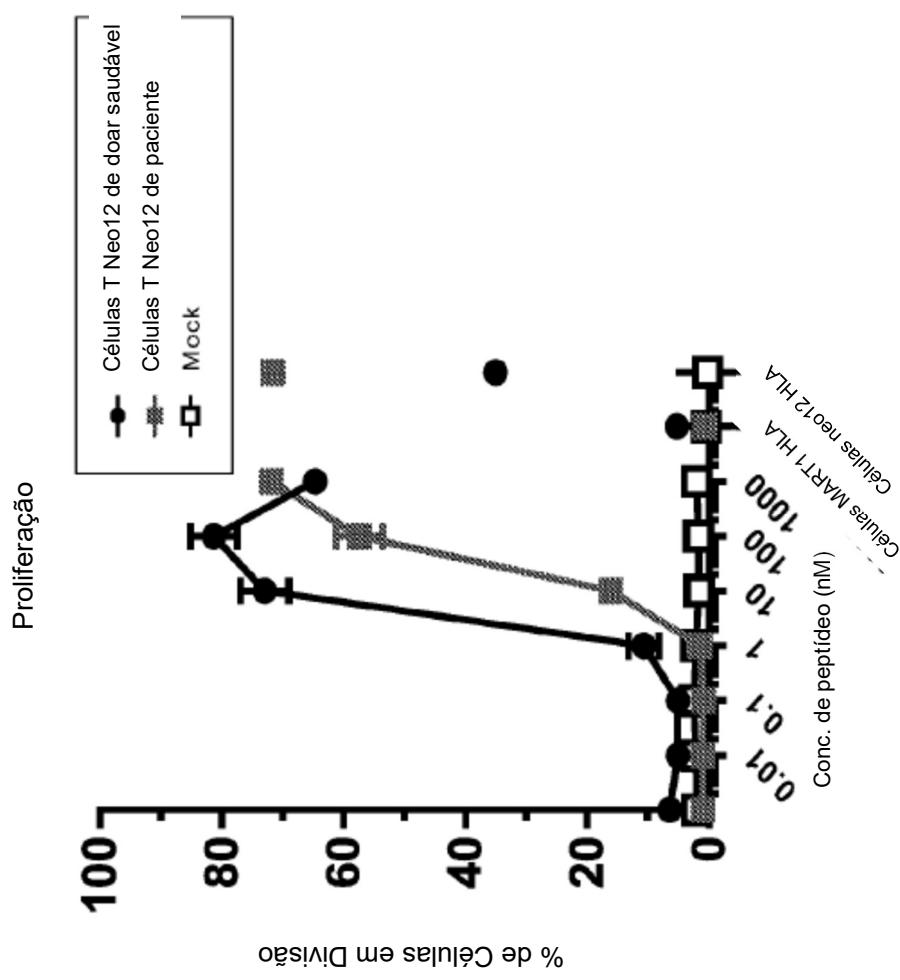
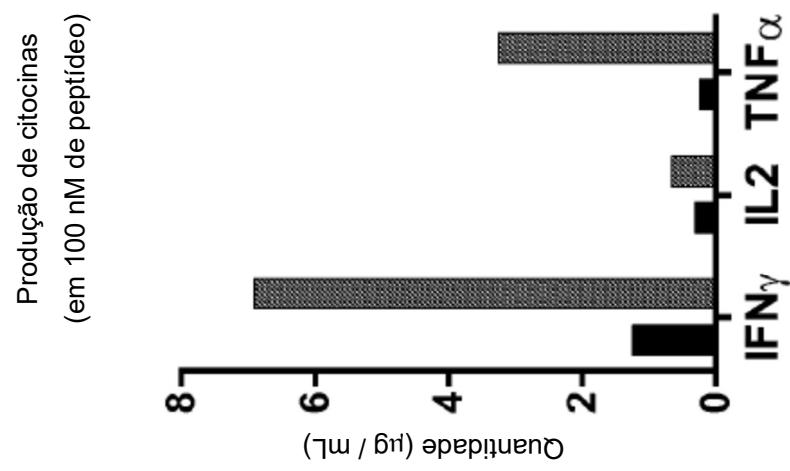


Fig. 27D



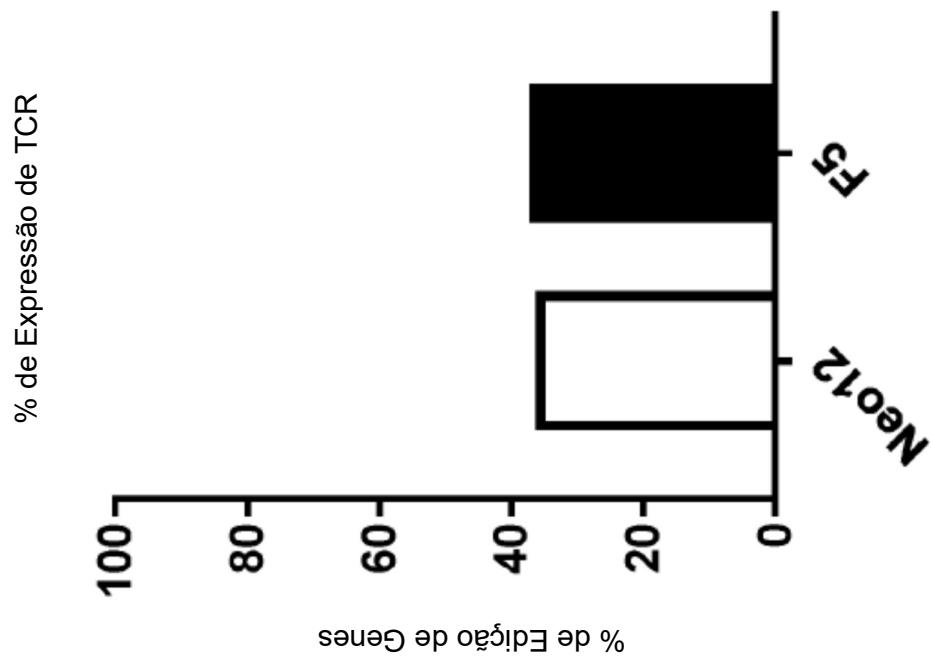


Fig. 28A

Fig. 28B

Ensaio de Morte de Células Alvo

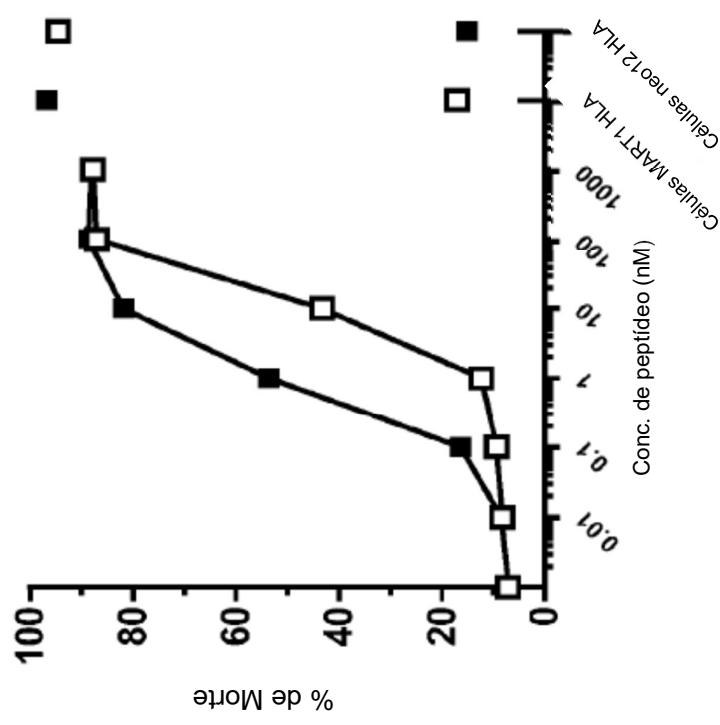


Fig. 28C

Ensaio de Proliferação

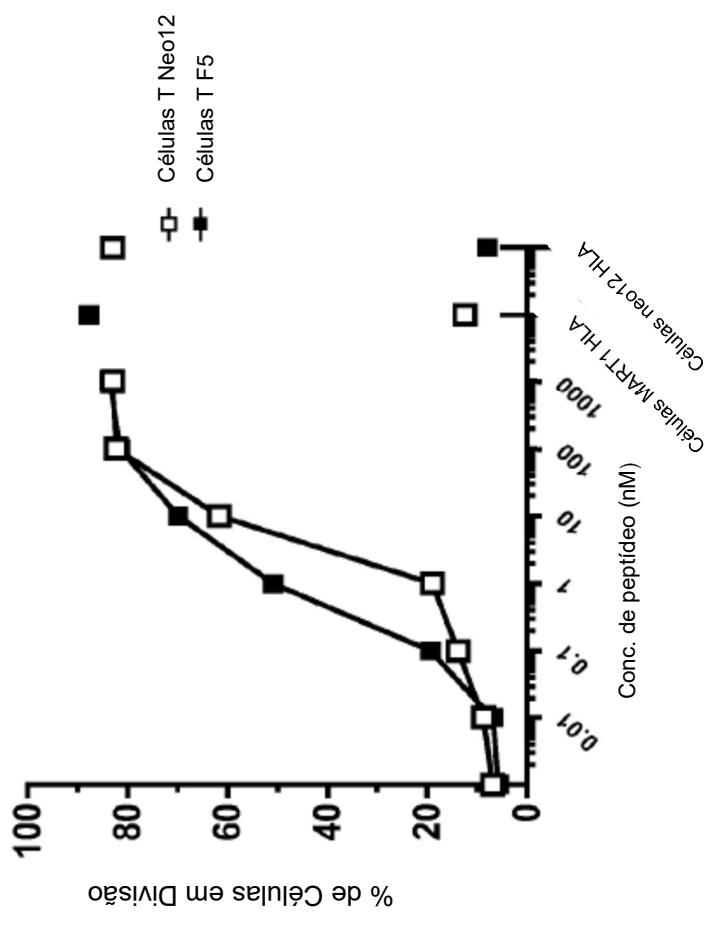


Fig. 28C

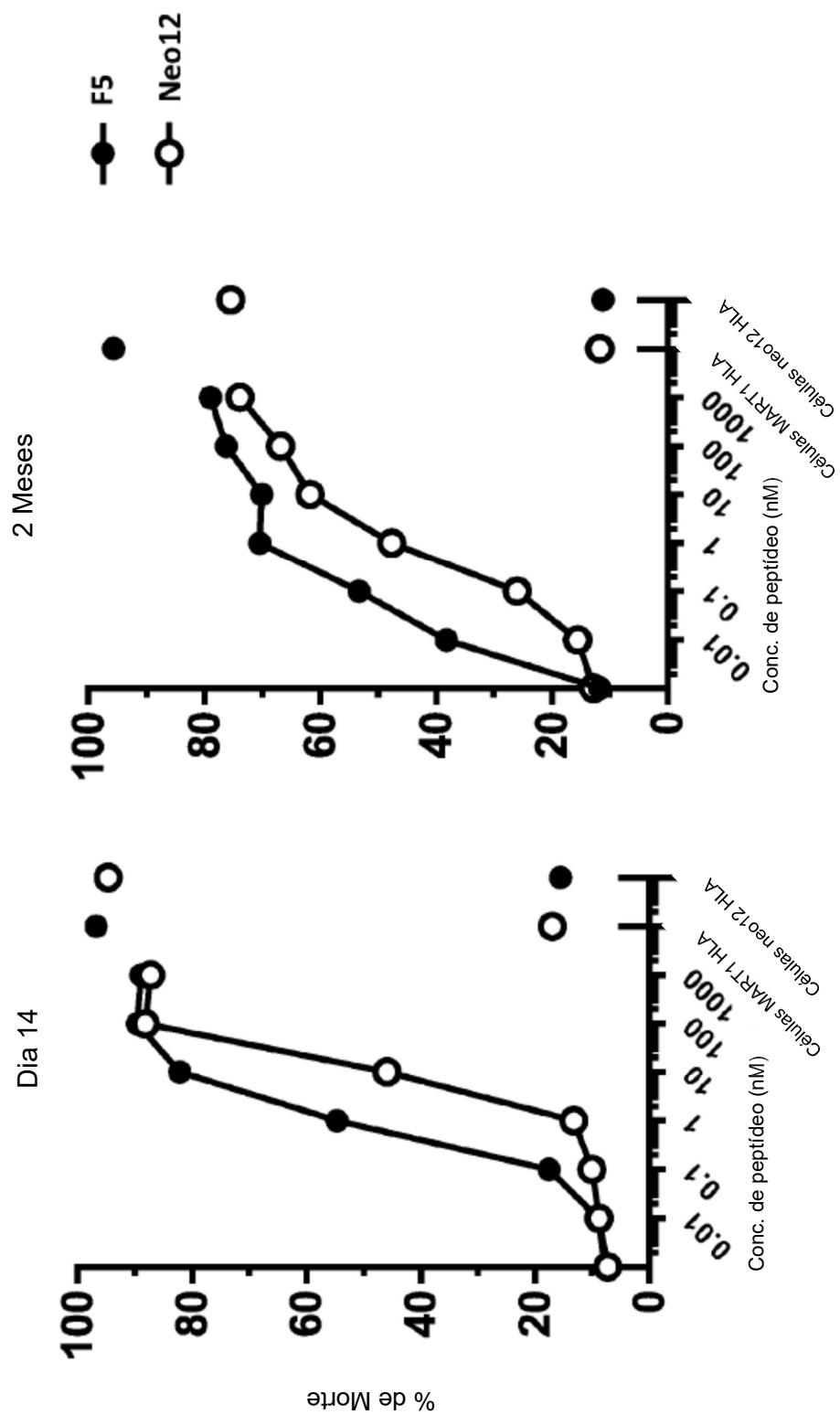
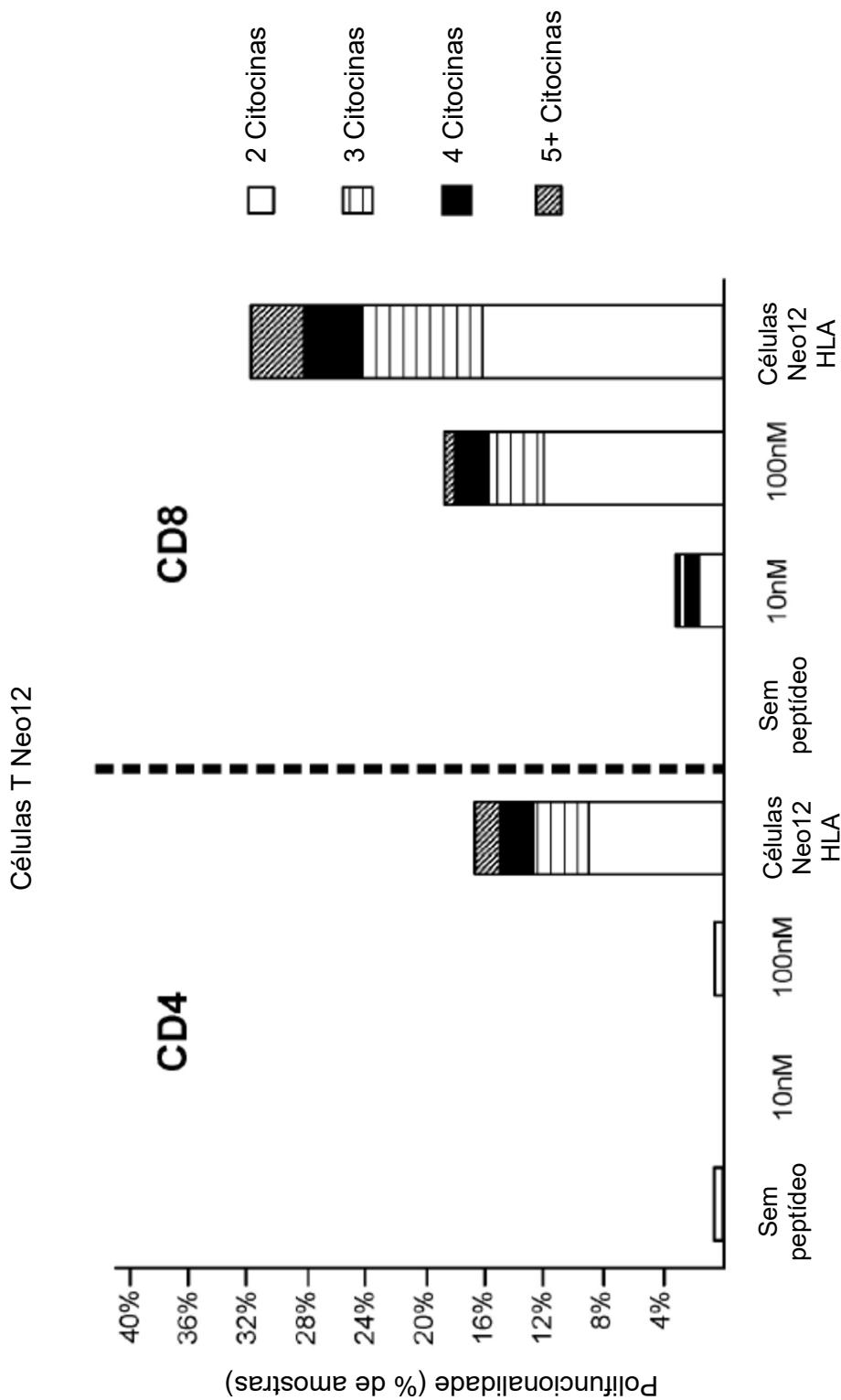
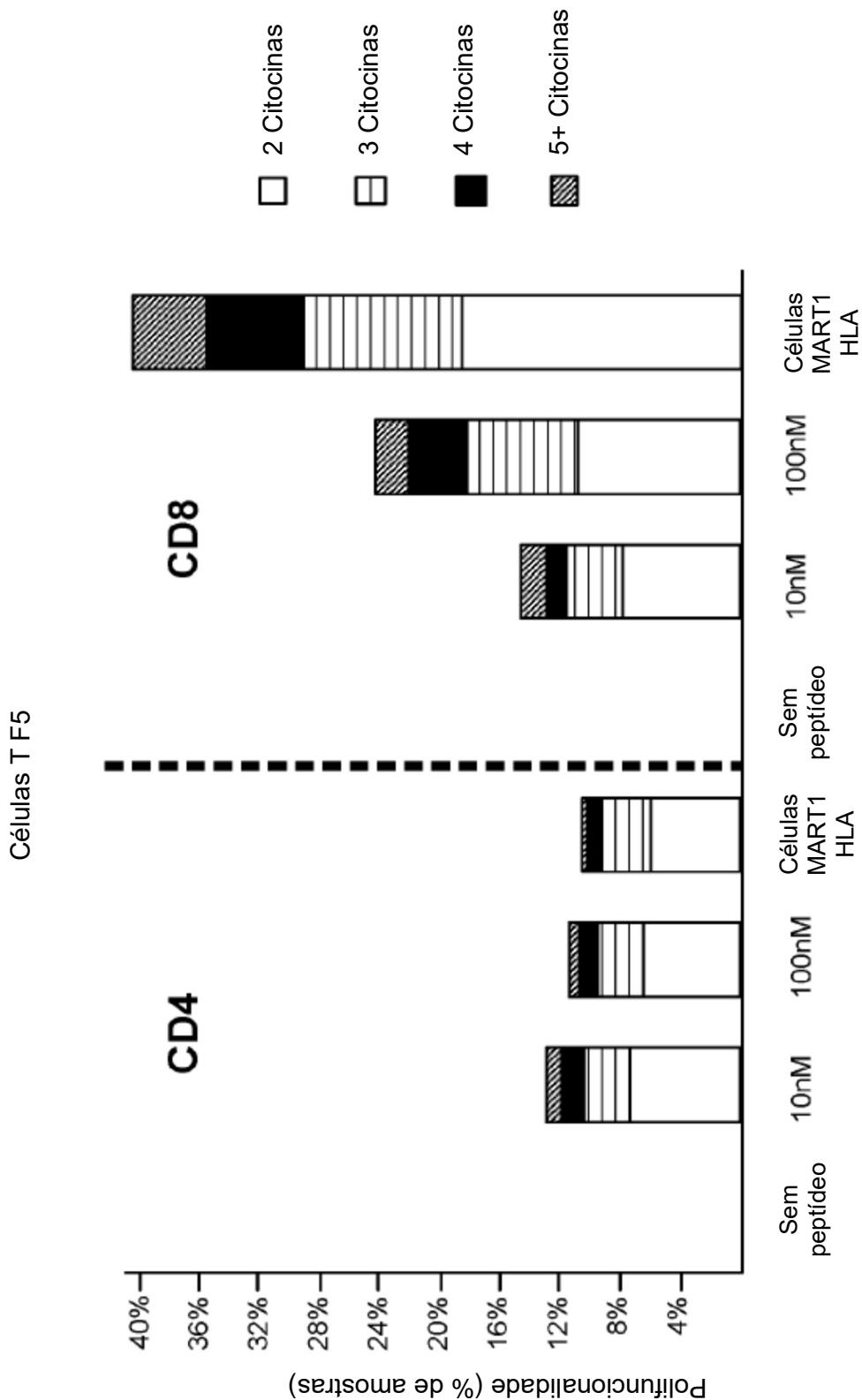


Fig. 29

**FIG. 30A**

**FIG. 30B**

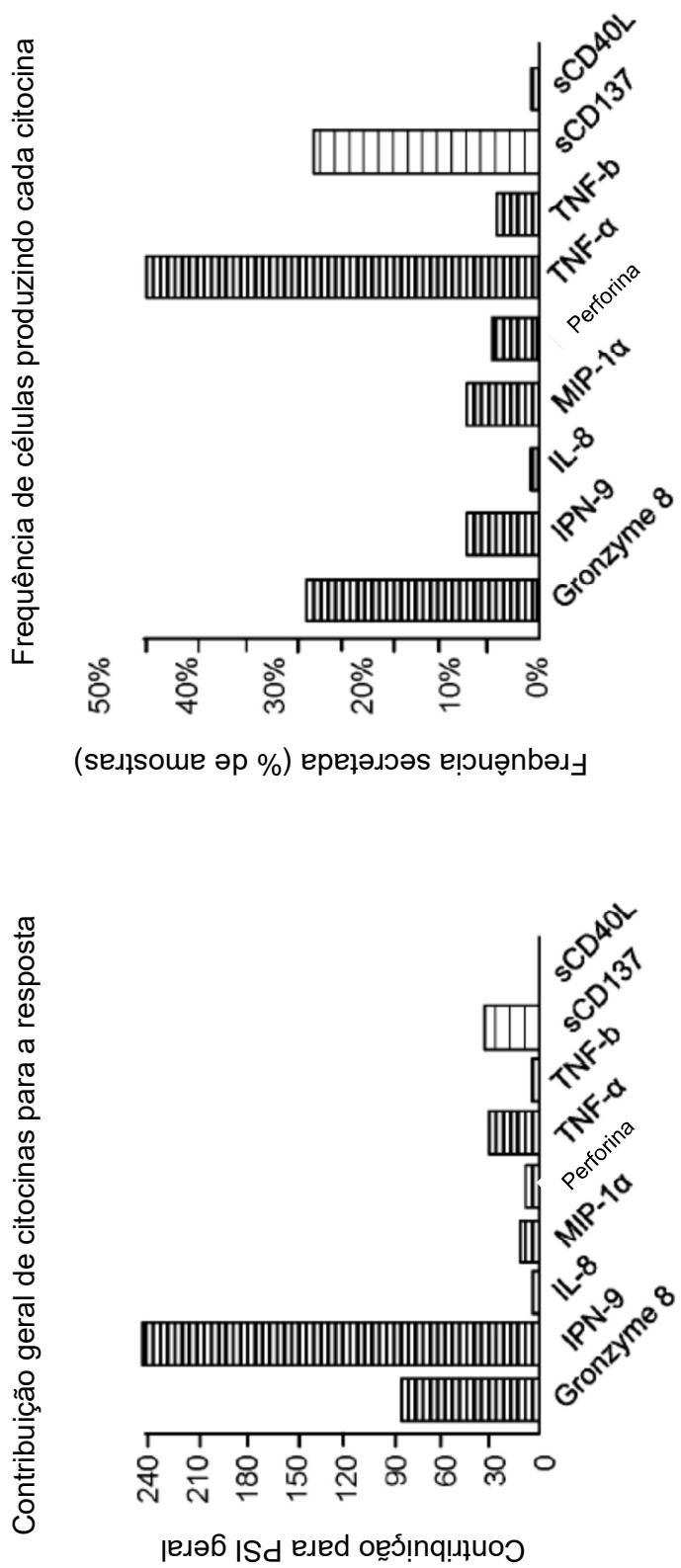


FIG. 30C

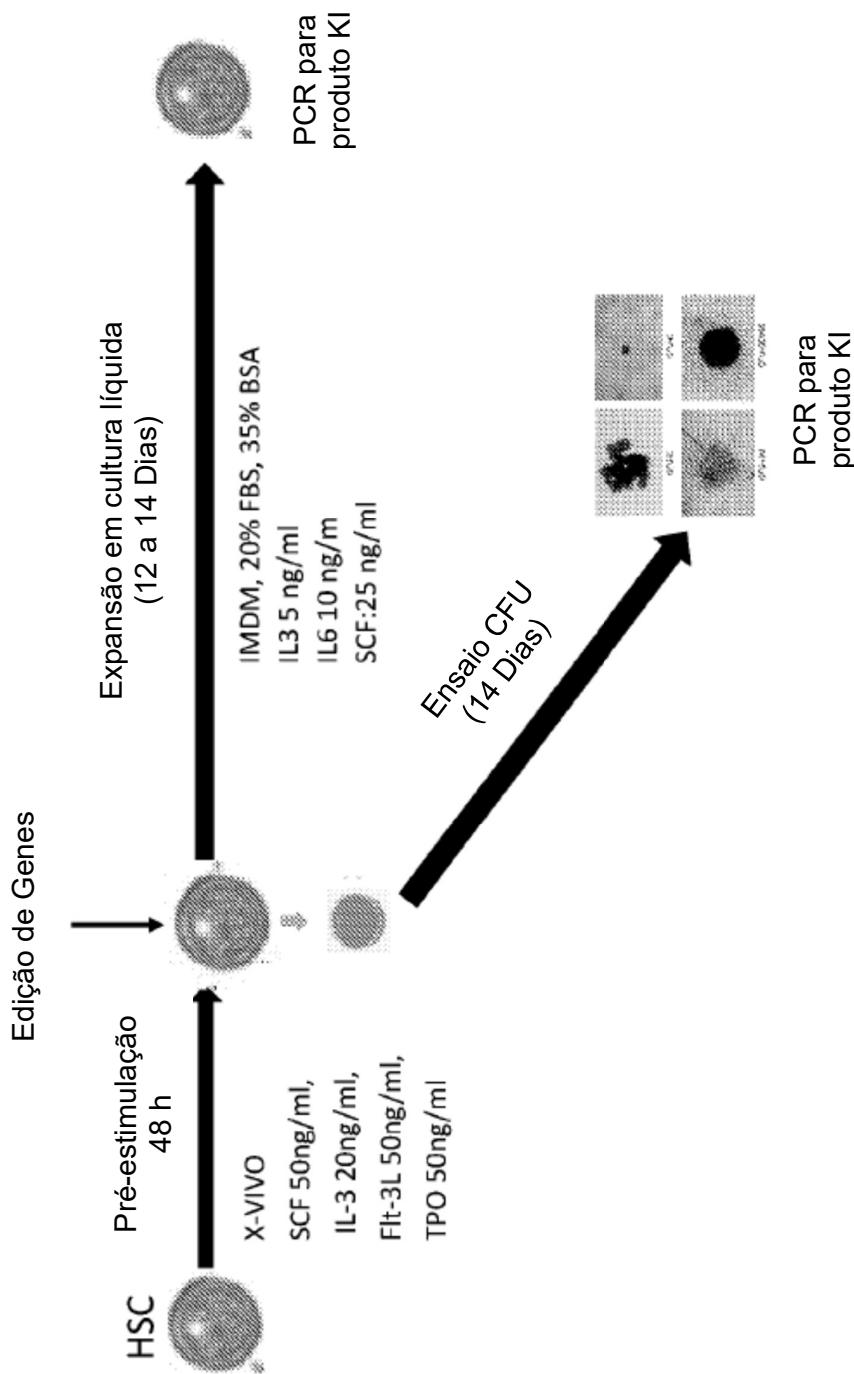


Fig. 31

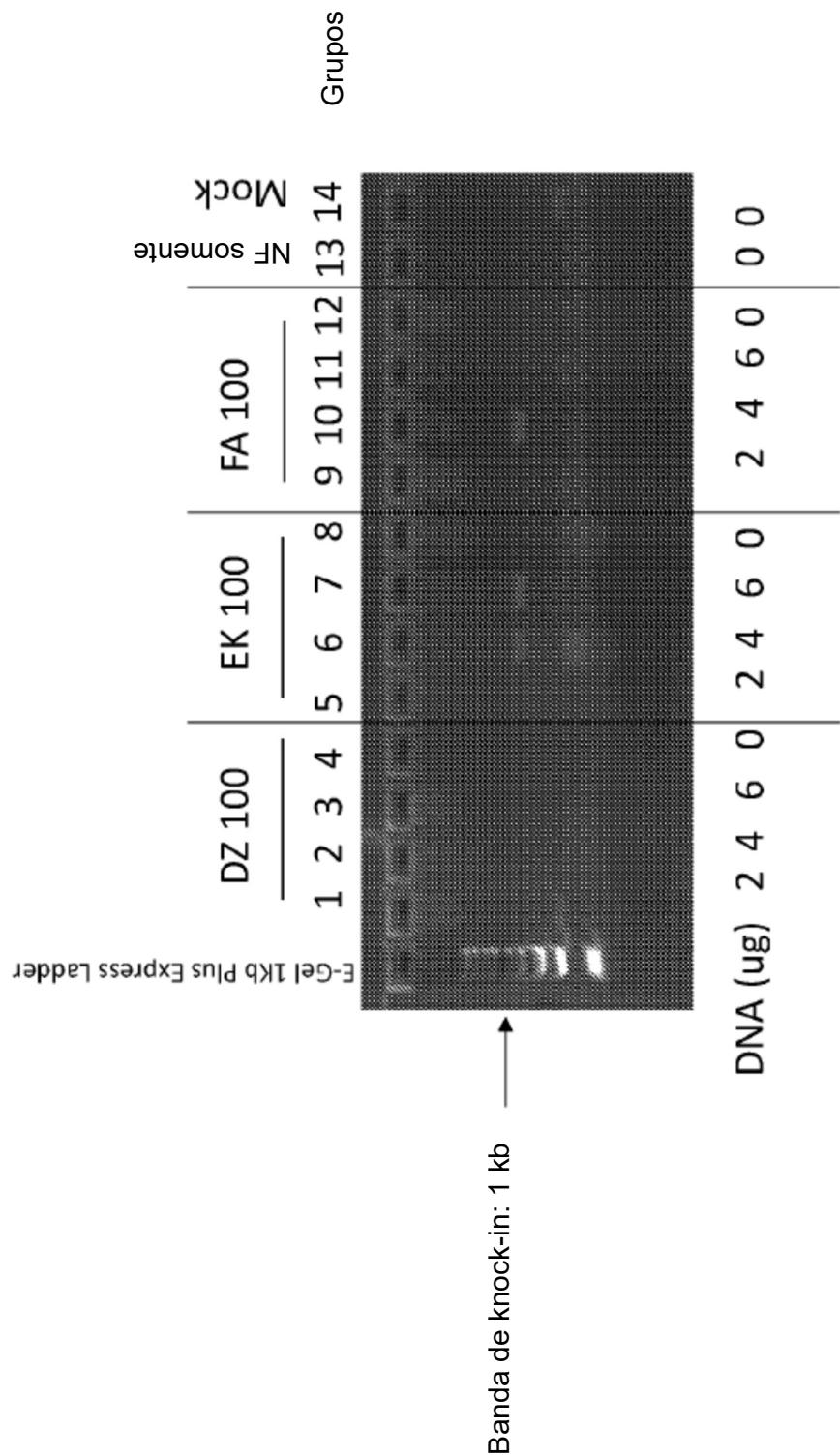


Fig. 32

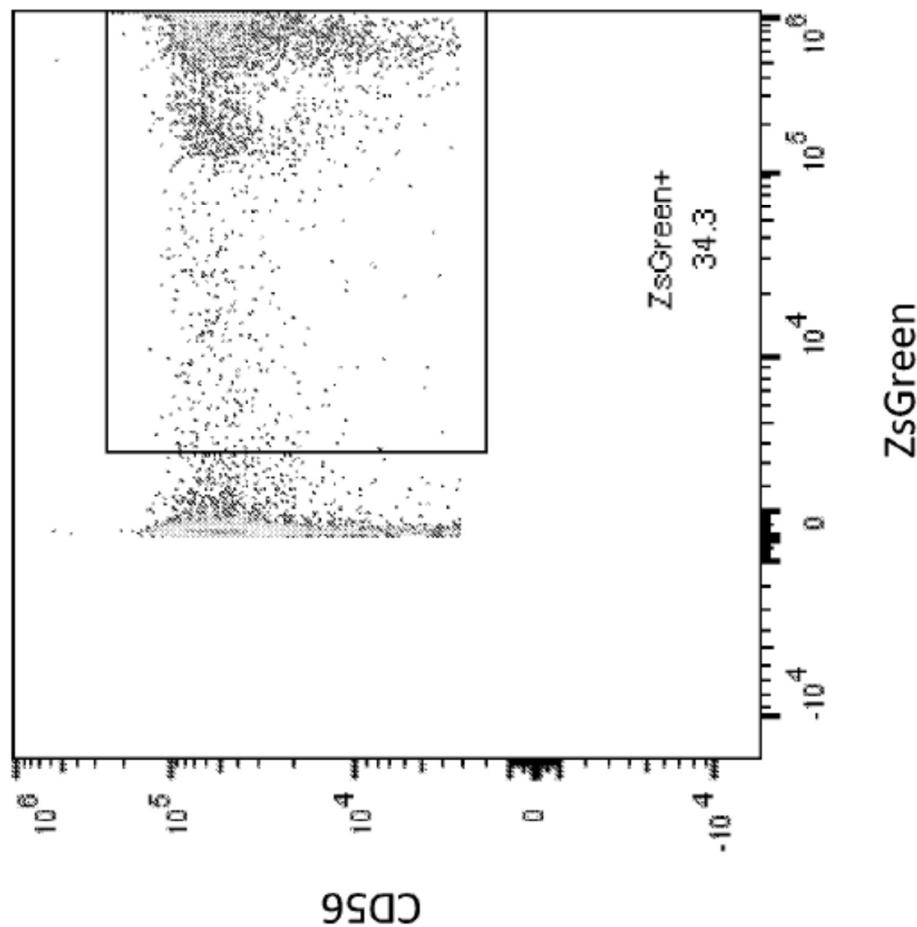


Fig. 33

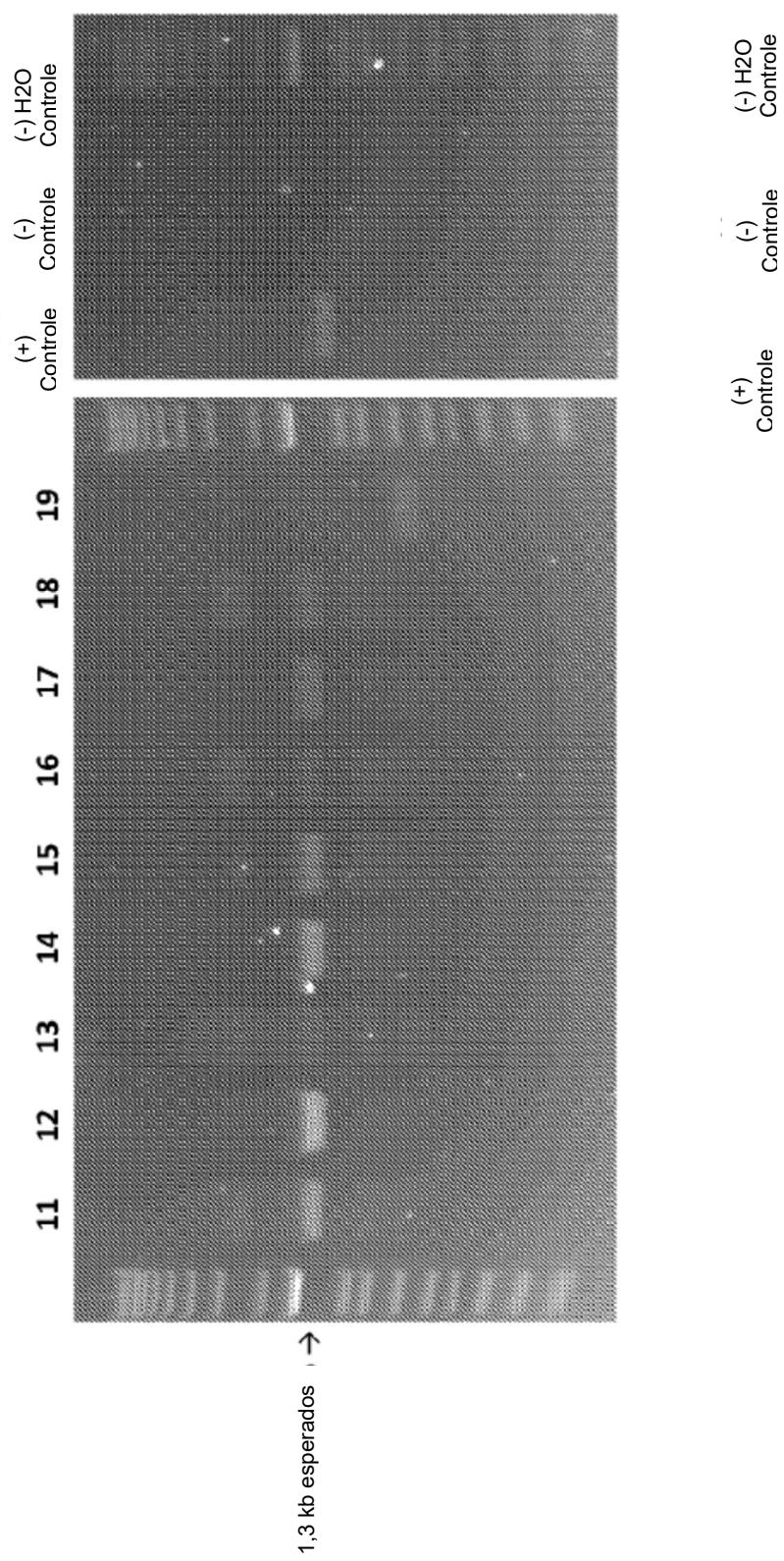


Fig. 34

RESUMO

“EDIÇÃO DE GENES DE CÉLULAS PRIMÁRIAS”

A presente invenção refere-se a métodos e composições que são fornecidos para edição de genes mediada por nuclease de células primárias sem o uso de entrega mediada por vírus. Métodos de tratamentos usando células primárias editadas também são fornecidos.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202.291-5 Listagem.TXT
- Data de Geração do Código: 24/06/2020
- Hora de Geração do Código: 16:48:01
- Código de Controle:
 - Campo 1: 62D505F93ADE376C
 - Campo 2: 9FA432D62FDAA493