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

(21) BR 112019026625-9 A2

(22) Data do Depósito: 15/06/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 30/06/2020

(54) Título: INSERÇÕES DE DNA NÃO VIRAL DIRECIONADAS

(51) Int. Cl.: A61K 48/00; C12N 9/22; C12N 15/00; C12N 15/11; C12N 15/113; (...).

(30) Prioridade Unionista: 15/06/2017 US 62/520,117; 30/08/2017 US 62/552,180.

(71) Depositante(es): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA.

(72) Inventor(es): THEODORE LEE ROTH; ALEXANDER MARSON.

(86) Pedido PCT: PCT US2018037919 de 15/06/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/232356 de 20/12/2018

(85) Data da Fase Nacional: 13/12/2019

(57) Resumo: São aqui fornecidos métodos e composições para a edição do genoma de uma célula. Em algumas modalidades, uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 200 nucleotídeos de comprimento é inserida em uma região alvo no genoma de uma célula.

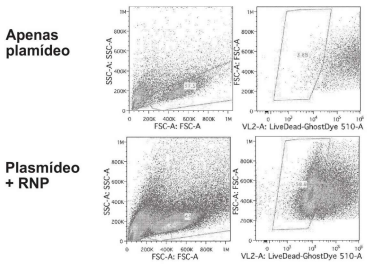


FIG. 1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"INSERÇÕES DE DNA NÃO VIRAL DIRECIONADAS".**

PEDIDOS ANTERIORES RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. Nº. 62/520.117 depositado em 15 de junho de 2017 e do Pedido Provisório U.S. Nº. 62/552.180 depositado em 30 de agosto de 2017, ambos dos quais são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

DECLARAÇÃO DOS DIREITOS ÀS INVENÇÕES CONSTITUÍDAS SOB PESQUISA E DESENVOLVIMENTO PATROCINADOS PELO GOVERNO FEDERAL

[0002] Esta invenção foi constituída com apoio do governo sob a concessão Nº P50 GM082250 concedida pelo National Institutes of Health. O governo possui certos direitos na invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] A capacidade de introduzir pequenas mutações (indels) em locais direcionados no genoma das células através da eletroporação de um complexo Cas9-gRNA (RNP) nas células foi desenvolvida. No entanto, uma vez que essas mutações são aleatórias e introduzidas por junções terminais não homólogas, elas podem fazer com que uma proteína seja neutralizada (Schumann et al. *PNAS* 112(33): 10437-10442 (2015)). Outros métodos foram desenvolvidos para introduzir uma sequência de DNA definida em um sítio alvo especificado no genoma através da eletroporação de um pequeno oligonucleotídeo ssDNA (ssODN) produzido pela síntese química. Isso leva em conta a integração de quantidades muito pequenas de DNA exógeno (geralmente de cerca de 1 par de base (bp) a cerca de 30 pares de base (bps)) por meio do Reparo Direcionado pela Homologia (denominado HDR), que é menos eficiente que o NHEJ, mas leva em

conta a sequência final a ser definida. No entanto, visto que o tamanho desses oligonucleotídeos é limitado ao comprimento do DNA que pode ser sintetizado quimicamente (< cerca de 200 bps), e uma grande fração disso é absorvida pelas forças da homologia, muitas aplicações não podem ser atendidas por esse método devido a o tamanho limitado das integrações. Além das limitações de tamanho, está bem estabelecido que a eletroporação de DNA nu, em particular DNA nu maior do que cerca de 200 bps, nas células muitas vezes leva à morte celular maciça devido à ativação do mecanismo intrínseco de defesa celular (Cornu et al. *Nat. Med. 23:* 415-423 (2017); Hornung and Latz, *Nature Reviews Immunology* 10: 123-130 (2010); Zhao et al., *Mol. Ther.* 13(1): 151-159 (2006)). Embora os vetores virais não integrantes, tais como vetores lentivirais defeituosos com integrase ou vetores virais adeno-associados (AAV), tenham sido utilizados para liberar grandes seqüências de ácidos nucleicos doadores às células, esses vetores requerem infecção viral e provocam efeitos inespecíficos. Portanto, as composições e métodos para inserção direcionada de grandes seqüências de nucleotídeo no genoma de uma célula são necessários.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0004] A presente invenção é direcionada às composições e métodos para editar o genoma de uma célula. Os inventores descobriram que grandes sequências de nucleotídeo, por exemplo, sequências com maiores do que cerca de 200 nucleotídeos de comprimento, podem ser inseridas em uma região direcionada no genoma de uma célula. Em alguns métodos, a integração de sequências maiores do que cerca de 200 nucleotídeos de comprimento ocorre enquanto reduz os efeitos inespecíficos e/ou reduz a perda da viabilidade celular.

[0005] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um método de edição do genoma de uma célula, o método compreendendo: a) o fornecimento de um complexo modelo de DNA do complexo de ribonucleoproteína Cas9 (RNP) compreendendo: (i) a RNP, em que a RNP compreende um domínio de nuclease Cas9 e um RNA guia, em que o RNA guia especificamente hibrida com uma região alvo do genoma da célula, e em que o domínio nuclease Cas9 cliva a região alvo para criar um sítio de inserção no genoma da célula; e (ii) um modelo de DNA de fita dupla ou fita simples, em que o tamanho do modelo de DNA é maior do que cerca de 200 nucleotídeos, em que as extremidades 5' e 3' do modelo de DNA compreendem sequências de nucleotídeo que são homólogas às sequências genômicas que flanqueiam o sítio de inserção, e em que a relação molar de RNP para o modelo de DNA no complexo é de cerca de 3:1 a cerca de 100:1; e b) a introdução do complexo modelo de RNP-DNA na célula.

[0006] Em algumas modalidades, o modelo de DNA é um modelo de DNA linear. Em alguns exemplos, o modelo de DNA é um modelo de DNA de fita simples. Em certas modalidades, o modelo de DNA de fita simples é um modelo de DNA de fita simples puro.

[0007] Em algumas modalidades, o complexo modelo de RNP-DNA é formado pela incubação da RNP com o modelo DNA durante cerca de um a cerca de trinta minutos, em uma temperatura ao redor de 20°C a 25°C. Em algumas modalidades, o complexo modelo de RNP-DNA e a célula são misturados antes da introdução do complexo modelo de RNP-DNA na célula.

[0008] Em algumas modalidades, a RNP compreende uma nuclease Cas9. Em algumas modalidades, a RNP compreende uma nickase Cas9. Em algumas modalidades, o complexo modelo de RNP-DNA compreende pelo menos dois complexos de RNP estruturalmente

diferentes. Em algumas modalidades, os pelo menos dois complexos de RNP estruturalmente diferentes contêm domínios de nuclease Cas9 estruturalmente diferentes. Em algumas modalidades, os pelo menos dois complexos de RNP estruturalmente diferentes contêm RNAs guia estruturalmente diferentes. Em algumas modalidades, em que os pelo menos dois complexos de RNP estruturalmente diferentes contêm RNAs guia estruturalmente diferentes, cada um dos complexos de RNP estruturalmente diferentes compreende uma nickase Cas9, e os RNAs guia estruturalmente diferentes hibridam com os filamentos opostos da região alvo.

[0009] Em algumas modalidades, a introdução do complexo modelo de RNP-DNA na célula compreende a eletroporação. Em algumas modalidades, a relação molar da RNP para o modelo de DNA é de cerca de 5:1 a cerca de 15:1. Em algumas modalidades, a relação molar da RNP para o modelo de DNA é de cerca de 5:1 a cerca de 10:1. Em algumas modalidades, a relação molar da RNP para o modelo de DNA é de cerca de 8:1 a cerca de 12:1. Em algumas modalidades, o modelo de DNA está em uma concentração de cerca de 2,5 pM a cerca de 25 pM. Em certas modalidades, o tamanho do modelo de DNA é maior do que cerca de 1 kb. Em certas modalidades, a quantidade de modelo de DNA é de cerca de 1 µg a cerca de 10 µg.

[0010] Em algumas modalidades, o complexo modelo de RNP-DNA é introduzido em cerca de 1 x 10^5 a cerca de 2 x 10^6 células. Em algumas modalidades, a célula é uma célula hematopoiética primária ou uma célula-tronco hematopoiética primária. Em algumas modalidades, a célula hematopoiética primária é uma célula imune. Em algumas modalidades, a célula imune é uma célula T. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T reguladora, uma célula T efetora ou uma célula T ingênua. Em algumas modalidades, a célula T

é uma célula T $CD8^+$. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T $CD4^+CD8^+$.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0011] O presente pedido inclui as seguintes figuras. As figuras destinam-se a ilustrar certas modalidades e/ou características das composições e métodos e para complementar quaisquer descrições das composições e métodos. As figuras não limitam o escopo das composições e métodos, a menos que a descrição escrita expressamente indique que esse é o caso.

[0012] A Figura 1 mostra baixa viabilidade celular após eletroporação de altas concentrações de DNA nu necessárias para obter uma eficiência de edição viável em uma célula.

[0013] A Figura 2 mostra que a complexação do modelo de DNA (plasmídeo) com a RNP, por uma breve incubação em temperatura ambiente antes da adição de células se submete à eletroporação, reduz a perda de viabilidade normalmente observada na eletroporação de uma quantidade de dsDNA plasmídeo longo.

[0014] A Figura 3 mostra que a complexação do modelo de DNA (modelo de DNA linear de fita dupla (dsDNA)) com a RNP, por uma breve incubação em temperatura ambiente antes da adição de células quando se submete à eletroporação, reduz a perda de viabilidade normalmente observada na eletroporação de DNA longo, linear e de fita dupla.

[0015] A Figura 4 mostra que uma relação molar exemplar de cerca de 10:1 de RNP para o modelo de DNA mantém tanto a eficiência da integração quanto a viabilidade pós-eletroporação.

[0016] A Figura 5 mostra que uma relação molar exemplar de cerca de 10:1 de RNP para o modelo de DNA equilibra os efeitos da perda de viabilidade e eficiência e maximiza o número de células positivas de integração.

[0017] A Figura 6 mostra que uma relação molar exemplar de cerca de 10:1 de RNP para o modelo de DNA leva em conta a inserção de alta eficiência de grandes modelos maiores do que a cerca de 750 pares de base.

[0018] A Figura 7 mostra que a inserção de modelos longos de DNA ainda pode resultar em uma quantidade de integração fora do alvo.

[0019] A Figura 8 mostra que a integração fora do alvo pode ser reduzida utilizando um modelo de DNA de fita simples longo (ssDNA) como um doador.

[0020] A Figura 9 mostra que as integrações não virais aqui divulgadas podem ser inseridas utilizando dois gRNAs e uma nickase Cas9 (D10A), que impede as quebras de dsDNA fora do alvo.

[0021] As Figuras 10A-F mostram que a co-eletroporação de CRISPR/RNP Cas9 reduz a perda de viabilidade induzida por dsDNA. (A) Um modelo de dsDNA linear (um modelo de reparo direcionado pela homologia, ~1350 bps de comprimento, que direciona uma fusão GFP para RAB11A, Figura 11A) submetido à eletroporação em células T humanas primárias provoca a perda de viabilidade acentuada com quantidades crescentes de modelo. A eletroporação da mesma quantidade de modelo de dsDNA juntamente com 100 pmols de RNP aumentou surpreendentemente a viabilidade. (B) Para os modelos de dsDNA tanto de plasmídeo quanto linear, a adição de uma RNP aumentou a viabilidade após a eletroporação. De importância, nenhuma perda de viabilidade foi observada com nucleotídeos doadores de ssDNA oligo curtos (ssODNs). (C) As RNPs devem ser liberadas simultaneamente com o DNA para obter maior viabilidade. As células T de dois doadores foram cada uma submetida à eletroporação duas vezes com um descanso de oito horas entre as eletroporações. Enquanto que duas eletroporações tão intimamente

intercaladas provocaram um alto grau de morte celular, a liberação do modelo de RNP e dsDNA linear pode ser liberada separadamente. No entanto, uma eletroporação inicial da RNP não aumentou a viabilidade quando um modelo de DNA foi subsequentemente submetido à eletroporação em comparação com as células que receberam o DNA em primeiro lugar e a RNP em segundo lugar. (D-F) Dado que a RNP e o DNA precisavam ser introduzidos simultaneamente, analisamos se a pré-incubação adicional antes da eletroporação aumentaria ainda mais a viabilidade. Nenhuma diferença na viabilidade foi observada com o aumento do tempo de pré-incubação (0 a 15 minutos), mas surpreendentemente se a RNP e as células foram misturadas primeiro e o modelo de DNA foi adicionado imediatamente antes da elecroporação (RNP + Células; + HDRT), a viabilidade foi aumentada (E). No entanto, em reservatórios onde a RNP e o modelo de DNA HDR foram misturados entre si antes da adição das células (RNP + HDRT; + Células), não importa quanto tempo a RNP e o modelo de DNA foram pré-incubados, houve um aumento drástico na porcentagem de HDR (células GFP+). A viabilidade foi medida 2 dias após a eletroporação e a expressão de GFP foi medida no dia 4. Os gráficos (B, D, F) mostram os dados de 2 doadores humanos saudáveis.

[0022] As Figuras 11A-F mostram o desenvolvimento de um direcionamento genético não viral grande eficiente. (A) A análise sistemática dos efeitos das condições de cultura e estimulação de células, formulações de modelo de RNP e DNA e condições de eletroporação por meio de eletroporações de 96 reservatórios de alto rendimento permitiu a rápida otimização da viabilidade celular (número total de células vivas em cultura) e a eficiência de HDR (% de células de GFP positivas). (B) Esquema de um modelo de dsDNA linear longo (1350 pb) que codifica uma sequência de GFP flanqueada por regiões

homólogas ao N-terminal do gene de manutenção RAB11A (não desenhado em escala). Quando uma quebra de dsDNA é induzida no N-terminal de RAB11A, a sequência de GFP pode ser introduzida sem interrupção por meio do reparo direcionado por homologia (HDR) para gerar uma proteína de fusão RAB11A-GFP endogenamente marcada. (C) As células T humanas primárias foram cultivadas durante 2 dias utilizando combinações variáveis de estimulação de receptores de células T (TCR) e citocinas antes da eletroporação de RAB11A que direciona o modelo de RNP e HDR, seguidas de condições de cultura variáveis durante 5 dias após a eletroporação. (D) Entre as concentrações de modelos de RNP e HDR testadas nesta invenção, a inserção ideal de GFP na RAB11A foi alcançada em concentrações intermediárias dos reagentes. Testes adicionais (Figura 16) reduziram as concentrações ideais para 50 pmols de RNP e 4 µg de dsDNA HDRT. (E) Os testes dispostos de condições de pulso de eletroporação mostraram que, em geral, as condições que produzem maior eficiência de HDR diminuíram a viabilidade. O EH115 foi selecionado para otimizar o HDR, enquanto ainda mantém viabilidade suficiente. (F) Com o uso dos parâmetros otimizados em C-D, a inserção de GFP de alta eficiência no gene RAB11A endógeno foi alcançada mediante o direcionamento não viral em ambas as células T $CD4^+$ e $CD8^+$ humanas primárias. A viabilidade e a eficiência foram avaliadas 3 dias (E) ou 5 dias (C, D e F) após a eletroporação. Pontos individuais representam doadores de sangue individuais (C e D) ou a média acrescida de desvio padrão em dois doadores individuais (E). Os destaques verdes indicam as condições escolhidas no final para o protocolo de direcionamento do gene não viral.

[0023] As Figuras 12A-B mostram que o direcionamento do gene não viral permite a engenharia genética rápida e eficiente em células T humanas primárias. (A) Linha do tempo diagramática do

direcionamento gênico não viral. Aproximadamente uma semana é necessária para projetar, solicitar de fornecedores comerciais e montar qualquer nova combinação de reagentes de edição genômica (gRNA junto com o modelo de reparo direcionado por homologia). Dois dias antes da eletroporação, células T humanas primárias isoladas do sangue ou de várias outras fontes (Figura 15) são estimuladas. Os modelos de dsDNA HDR podem ser produzidos facilmente por PCR seguida de uma purificação de SPRI para obter um produto altamente concentrado adequado para eletroporação. No dia da eletroporação, o gRNA complexo para uma RNP, o modelo de HDR e as células T estimuladas colhidas são misturadas e submetidas à eletroporação, um processo que leva aproximadamente uma hora e meia. Após a eletroporação, as células T planejadas podem ser facilmente expandidas durante mais duas semanas. (B) A viabilidade é utilizada para se referir à porcentagem de células vivas em relação a uma população equivalente que passou por todas as etapas do protocolo, exceto pela eletroporação real (sem controle de eletroporação). O depósito nas células vivas após a eletroporação foi determinada empiricamente para ocorrer dois dias após, e todas as medidas de viabilidade foram registradas naquele momento, a menos que indicado de outra forma. O termo eficiência é utilizado para se referir à porcentagem de células vivas em cultura que expressam a sequência exógena de "substituição gênica" (tal como GFP). Finalmente, o número total de células positivas para a integração desejada foi calculado através da multiplicação da eficiência pela contagem absoluta de células. As mudanças metodológicas que maximizavam a eficiência nem sempre eram ideais para o número total de células positivas, e vice-versa.

[0024] As Figuras 13A-D mostram a otimização da estimulação primária de células T humanas para o direcionamento de genes não

virais. (A) Condições alternativas de estimulação pré-eletroporação foram aplicadas durante dois dias antes da eletroporação. A estimulação ligada aos glóbulos CD3/CD28 juntamente com um coquetel de estimulação de citocinas de IL-2, IL-7 e IL-15 alcançaram maior viabilidade, taxas de edição e células positivas totais do que a estimulação com anticorpos ligados à placa. (B) Relações alternativas de glóbulos para células mostraram uma relação ideal de 1:1, juntamente com a remoção de glóbulos antes da eletroporação. (C) A estimulação de CD3/CD28/CD2 não baseada em glóbulos resultou em menor eficiência de edição do que os glóbulos CD3/CD28 na relação ideal. (D) O meio XVivo15 comercial alcançou viabilidade semelhante, mas maior eficiência de edição em comparação com o meio RPMI. De interesse, o meio Immunocult livre de soro também permitiu a edição de alta eficiência das células T CD3+ humanas primárias. A eficiência da inserção de GFP (dsDNA RAB11A-GFP HDRT) e a contagem absoluta de células GFP+ totais foram executadas 4 dias após a eletroporação. Dois pontos por condição representam os valores obtidos de dois doadores de sangue saudáveis.

[0025] As Figuras 14A-D mostram otimização da manipulação de células T humanas primária após a eletroporação. (A) A eletroporação de células T CD3+ de doadores humanos saudáveis no dia 2 ou 3 após a estimulação alcançou uma integração eficiente de GFP direcionada. As eletroporações duplas em ambos os dias, enquanto aumentavam um pouco a eficiência, reduziram drasticamente a viabilidade quando um modelo de DNA foi incluído nas duas eletroporações (Figura 10). (B) A estimulação adicional de CD3/CD28 após a eletroporação reduziu o potencial proliferativo. (C) Altas doses de IL-2 pós-eletroporação melhoraram tanto a eficiência quanto a viabilidade. Outra adição de IL-7 e IL-15, ao contrário da estimulação durante a pré-eletroporação (Figura 13), não contribuiu para melhorar a edição. (D) A densidade pós-cultura

possui poucos efeitos sobre a eficiência de inserção. A eficiência de inserção de GFP (dsDNA RAB11A-GFP HDRT) e a contagem absoluta de células GFP+ totais foram executadas 4 dias após a eletroporação. Dois pontos por condição representam os valores obtidos de dois doadores de sangue saudáveis.

[0026] As Figuras 15A-B mostram um direcionamento genético não viral eficiente em células T frescas e congeladas isoladas de múltiplas fontes. (A) Um modelo de dsDNA RAB11A-GFP HDR foi inserido em células T tanto frescas quanto congeladas de dois doadores saudáveis. Altas taxas de inserção de GFP foram observadas em ambas as condições, demonstrando a capacidade de adaptação de genes não virais direcionados a pesquisas ou protocolos clínicos que requerem congelamento de células. (B) Da mesma forma, altas eficiências de integração direcionada à GFP foram observadas em células T CD3+ humanas primárias isoladas do sangue total, uma aférese plasmática residual, bem como leucaférese.

[0027] As Figuras 16A-B mostram a otimização de formulações de modelo de RNP e HDR para direcionamento de genes não virais. (A) Através de três doadores, uma tendência consistente pareceu que a eletroporação de quantidades crescentes do modelo de dsDNA HDR (RAB11A-GFP) reduziu gradualmente a viabilidade celular, ao mesmo tempo em que aumentou a eficiência, mas que as concentrações intermediárias testadas tanto no modelo de HDR quanto na RNP deram o maior número total de células GFP+. (B) Outras séries de otimização direcionadas em três doadores adicionais produziram uma formulação ideal de 4 ugs de modelo de HDR submetido à eletroporação simultaneamente com 50 pmols de RNP. A eficiência da inserção de GFP e a contagem absoluta de células GFP+ totais foram executadas 4 dias após a eletroporação. Vários pontos por gráfico (B) representam réplicas técnicas.

[0028] As Figuras 17A-C mostram a otimização dos parâmetros de eletroporação para a liberação de grandes modelos de HDR não virais. (A) Os dados brutos mostrados aqui estão resumidos na Figura 11E. Variação sistemática das condições de eletroporação em uma tecnologia nucleofetora Lonza 4D. O código de pulso finalmente selecionado, EH115, era consistentemente o código mais eficiente quando se utiliza o tampão de eletroporação Lonza P3. Outros códigos alternativos, tais como o EO-148 otimizado para o total de células positivas. (B) O teste confirmatório de um subconjunto de condições de eletroporação também identificou o código de pulso EO-155 no tampão OMEM como uma eficiência moderada, mas uma combinação de células positivas totais elevadas. (C) A eletroporação de um volume total (RNP + HDRT + Células) de 24 µl efetuou uma grande contribuição à viabilidade celular e manteve alta eficiência. Volumes de eletroporação acima de 24 ul geralmente provocam falhas de eletroporação. Eficiência da inserção de dsDNA RAB11A-GFP (A, C) ou inserção de dsDNA BATF-GFP (B) e a contagem absoluta do total de células GFP+ foram executadas 4 dias após a eletroporação.

[0029] As Figuras 18A-D mostram as diversas aplicações do gene não viral direcionado em células T humanas primárias. (A) O genoma de alta eficiência direcionado às construções de fusão de GFP pode ser alcançado em múltiplos genes endógenos nas células T humanas primárias utilizando modelos de HDR não virais e RNPs correspondentes. (B) A microscopia confocal de células T humanas primárias vivas, 7 dias após a eletroporação do modelo de HDR indicado, confirmou a especificidade do direcionamento das proteínas de fusão. A barra de escala em cada imagem é de 5 µm. (C) O direcionamento não viral das construções de fusão de GFP aos genes RAB11A e CD4 em células T primárias humanas em massa. As fusões de RAB11A foram positivas para GFP nas células CD4+ e CD8+,

enquanto que as fusões de CD4+ foram positivas apenas nas células T CD4+ (citometria de fluxo representativa acima, quantificação abaixo). (D) As células T humanas primárias foram manipuladas para expressar a GFP fundida com o fator de transcrição endógeno, BATF. Em 11 dias após a eletroporação, os núcleos foram isolados e CUT&RUN foi executado. Os sítios de interação GFP-BATF e total de cromatina BATF foram identificados utilizando anticorpos anti-GFP ou anti-BATF. A citometria de fluxo para avaliar a viabilidade e eficiência foi executada 4 dias após a eletroporação (A, C, D). Os dados apresentados são representativos de pelo menos dois doadores diferentes.

[0030] As Figuras 19A-B mostram um gene não viral reproduzível direcionado através dos locais alvos. (A) Quatro dias após a eletroporação de um dos cinco modelos diferentes de GFP juntamente com uma RNP correspondente nas células T CD3+CD8+ primárias de seis doadores saudáveis, a expressão de GFP é observada tanto nos modelos quanto nos doadores. Observar a consistência nos níveis de expressão de GFP dentro das células positivas de GFP através de doadores para cada um dos cinco locais (maior nos marcadores TUBA1B e ACTB, menor nos marcadores RAB11A e FBL). (B) Resumo gráfico da porcentagem de inserção de GFP em (A).

[0031] As Figuras 20A-B mostram um gene não viral reproduzível direcionado a uma coorte de doadores saudáveis. (A) Um modelo constante de dsDNA RAB11A-GFP HDR e RNP foram submetidos à eletroporação utilizando as condições otimizadas desenvolvidas para direcionamento de genes não virais em células obtidas de uma coorte de doze doadores saudáveis. Embora houvesse variabilidade significativa na porcentagem de inserção de GFP entre os doadores individuais, todos alcançaram uma integração robusta de GFP (faixa de 22% a 57% nas células T CD8+). Um pouco de expressão de GFP

foi observado em células submetidas à eletroporação com o modelo de dsDNA RAB11A-GFP HDR com uma RNP fora do alvo que direciona o CXCR4 em comparação com os controles sem eletroporação. (B) Gráfico resumido das porcentagens de inserção de GFP em (A). Através das 12 coortes de doadores saudáveis, taxas ligeiramente mais elevadas de expressão de GFP foram observadas nas células T CD3+CD8+ (média de 42,0%) em comparação com as células T CD3+CD4+ (média de 35,2%).

[0032] A Figura 21 mostra a marcação endógena do fator de transcrição BATF para análise da ocupação de cromatina. Mapas de calor anti-BATF, anti-GFP e sem anticorpos dos dados de CUT&RUN obtidos de populações de células T humanas primárias submetidas à eletroporação com modelo de HDR de fusão GFP-BATF (células não marcadas não foram submetidas à eletroporação). Os perfis de ligação CUT&RUN alinhados para cada amostra foram centralizados nos picos BATF CUT&RUN em células não marcadas e ordenados pela intensidade máxima BATF nas células não marcadas.

[0033] As Figuras 22A-E mostram direcionamento de genes não virais combinatórios. (A) Eletroporação simultânea de modelos de HDR para criar fusões RAB11A-GFP e/ou RAB11A-mCherry em células T humanas primárias. Uma população distinta de células GFP+ mCherry+ duplas foi encontrada quando ambos os modelos são introduzidos simultaneamente, consistente com o direcionamento bi-alélico. (B) Os genótipos potenciais para células individuais nos quadrantes são definidos pela expressão dos dois fluoróforos. O nível observado de integrações bi-alélicas é mais elevado nas células que adquirem pelo menos uma integração do que o esperado por acaso (Figura 23). Os pontos individuais representam réplicas em que a combinação dos genes que codificam as proteínas fluorescentes foi variada (GFP + mCherry, GFP + BFP, mCherry + BFP), assim como

foi a quantidade de modelo de HDR (3 a 6 ugs). (C-D) Integração multiplexada de modelos de HDR em dois locais genômicos separados nas mesmas células T humanas primárias. 2 µg de cada modelo (total de 4 ug por eletroporação) foram submetidos à eletroporação juntamente com 25 pmols de cada RNP (total de 50 pmols). As células positivas para a integração em um sítio (por exemplo, GFP+) eram muito mais prováveis de ter uma integração no segundo sítio (por exemplo, também ser mCherry+) do que as células que carecem da primeira integração. (E) Gene não viral simultâneo direcionado de grandes inserções em três locais genômicos distintos. 1,5 ug de cada modelo (total de 4,5 ug) foram submetidos à eletroporação juntamente com 20 pmols de cada RNP correspondente (total de 60 pmols). Similarmente aos dois sítios de multiplexação, as células positivas para uma única integração (mCherry + em Q-II e GFP+ em Q-III) apresentaram maior probabilidade de ter uma segunda integração (BFP+) em comparação com aquelas sem (Q-I). As células positivas para duas integrações (GFP+ e mCherry+, Q-IV) são ainda mais propensas a terem uma integração do terceiro gene (BFP). Abaixo está uma quantificação em gráfico de barras de células que são únicas, duplas e triplas positivas para fluoróforos. Todas as leituras fluorescentes foram executadas 4 dias após a eletroporação. Os dados apresentados são representativos de pelo menos dois doadores diferentes, exceto o painel E (um doador).

[0034] As Figuras 23 A-G mostram modelagem e análise de integrações bi-alélicas de HDR através da inserção de múltiplas proteínas fluorescentes no mesmo local. (A) Os possíveis fenótipos celulares quando duas proteínas fluorescentes são inseridas no mesmo local. (B) Os genótipos de duas dessas populações fenotípicas são imediatamente conhecidos. As células sem qualquer inserção funcional (quadrante inferior esquerdo, genótipo A) devem ter um

genótipo NA/NA (onde NA indica um alelo sem HDR, incluindo alelos WT e alelos editados por NHEJ). As células fluorescentes duplas (quadrante superior direito, genótipo E) devem ter adquirido uma cópia de cada modelo (assumindo um local alvo autossômico e nenhuma integração inespecífica), e teriam um genótipo de GFP/RFP. As duas populações positivas únicas serão misturadas entre células heterozigotas para inserção de HDR (genótipos B e C) ou homozigotos, mas para duas cópias do mesmo modelo fluorescente (genótipos D e F). (C) A porcentagem total de células com integrações bi-alélicas de HDR deve ser a soma dos genótipos D, E e F. Enquanto que a proporção de células com o genótipo E (duplos positivos para o flúor) é imediatamente evidente nos fenótipos, os genótipos D e F não são. A aplicação de um modelo único de probabilidade leva em conta a deconvolução dos múltiplos genótipos nos fenótipos únicos positivos para flúor e, portanto, uma estimativa da porcentagem real de células homozigotas para HDR. (D) Análise de HDR bi-alélica aplicada através de uma variedade de permutações de fluoróforo inseridas na posição RAB11A. (E-F) Integrações bi-alélicas de fluorescência dupla foram observadas através dos locais alvo. Embora a porcentagem total das células com uma inserção variou com a eficiência de cada sítio alvo, o enriquecimento dobrado na porcentagem observada de células homozigotas acima do previsto por acaso foi consistente entre as posições. (G) Tentativa de integração de três fluoróforos distintos por HDR no mesmo local. Como no máximo duas inserções direcionadas são possíveis (nos dois alelos do local; assumindo um genoma diplóide), nenhuma célula positiva para todas as três posições deve ser observada (triplo positivo). De fato, embora um grande número de integrações únicas de fluoróforos é observado (únicos positivos), assim como células positivas para as várias permutações de dois flúores (duplos positivos), há uma redução de 30 vezes no número de

células triplas positivas em comparação com os duplos positivos. Todas as análises por citometria de fluxo da expressão de proteínas fluorescentes foram executadas 4 dias após a eletroporação. As exposições são representativas de várias réplicas técnicas de um (E, F) ou dois (D, G) doadores humanos saudáveis. Os gráficos de barra apresentam a média + desvio padrão.

[0035] As Figuras 24A-B mostram integrações multiplexadas apresentando que a aquisição da integração HDR em uma posição aumenta a probabilidade de HDR nas posições adicionais. (A) Duas permutações de modelo de HDR de um conjunto de seis modelos de dsDNA HDR (direcionados para RAB11A, CD4 e CLTA; cada sítio com GFP ou RFP) foram submetidas à eletroporação em células T CD3+ isoladas de doadores humanos saudáveis. Quatro dias após a eletroporação dos dois modelos de HDR indicados, juntamente com suas duas respectivas RNPs no alvo, a porcentagem de células positivas para cada modelo foi analisada quando se ativa as células positivas ou negativas para o outro modelo. Não foi possível apenas a multiplexação de dois modelos em uma variedade de combinações de modelos, mas a ativação de células positivas com relação a um modelo (células Modelo 1+) produziu uma população enriquecida de células com maior probabilidade de ser positiva com relação ao segundo modelo em comparação com células negativas para o primeiro (Modelo 1 - Células, Preto). 2 ug de cada modelo, juntamente com 30 pmols de cada RNP associada, foram submetidos à eletroporação para experimentos de multiplexação dupla. (B) A eletroporação de um modelo adicional leva em conta a multiplexação de 3 sítios utilizando uma variedade de combinações de modelos de HDR. As células positivas para o terceiro modelo podem ser enriquecidas ainda mais com a ativação de células positivas com relação aos outros dois modelos, quando se compara com as células

positivas únicas. Os dados apresentados são médias + desvio padrão de várias réplicas técnicas de dois doadores humanos saudáveis.

[0036] As figuras 25A-F mostram os modelos de HDR D10A nickase e ssDNA que reduzem as integrações inespecíficas. (A) As combinações de RNPs Cas9 e um modelo de HDR RAB11A-GFP dsDNA foram submetidas à eletroporação em células T humanas primárias. O modelo de dsDNA isoladamente, ou com uma RNP contendo um gRNA misturado que não corresponde a nenhuma sequência no genoma humano, produziu quantidades pequenas, mas detectáveis da expressão de GFP, que foi visivelmente aumentada quando um modelo de dsDNA é submetido à eletroporação com um gRNA que direciona um sítio diferente do sitio de integração RAB11A-GFP (a "RNP fora do alvo" possui como alvo o CXCR4 Éxon 1). (B) As integrações inespecíficas estavam presentes de forma consistente nas células de diferentes doadores quando o modelo de HDR de dsDNA RAB11A-GFP foi submetido à eletroporação com a RNP fora do alvo, e menos integrações inespecíficas ocorreram quando o modelo de HDR de dsDNA foi submetido à eletroporação. (C) As variantes de nuclease Cas9 D10A (nickase) e dCas9 inativa diminuíram significativamente as integrações inespecíficas quando um único gRNA CXCR4 fora do alvo foi utilizado, mas a nickase D10A (com um par "no alvo" de gRNAs em uma orientação PAM-out) levou à integração eficiente no alvo do modelo de HDR de dsDNA RAB11A. (D) A eletroporação de um modelo de HDR de ssDNA reduziu as integrações inespecíficas até o limite de detecção (comparável aos níveis sem modelo submetido à eletroporação) tanto sem adição de nuclease quanto nas quebras de dsDNA fora do alvo induzidas (gRNA fora do alvo + Cas9). (E-F) Para a integração da fusão GFP no sítio RAB11A, o uso de uma nickase D10A com um modelo de HDR de ssDNA reduziu o HDR no alvo (integração de GFP com gRNA no alvo)

em comparação com Cas9 com um modelo de dsDNA, mas reduziu fortemente integrações inespecíficas para níveis indetectáveis. Todas as leituras fluorescentes foram executadas 4 dias após a eletroporação. Os dados apresentados são representativos de pelo menos dois doadores diferentes (A e E) ou as médias de dois doadores diferentes (C, D e F) com o desvio padrão mostrado.

[0037] As Figuras 26A-D mostram a estimativa fluorescente e quantificação de eventos de integração inespecífica em vários modelos de HDR. (A) Diagrama de inserções mediadas por HDR no N-terminal de uma posição alvo (não desenhada em escala). Os ramos da homologia especificam a sequência exata em que a inserção (uma marca de GFP neste caso) será inserida, levando-se em conta a integração sem marcas de sequências exógenas. Quando uma proteína de fusão GFP é criada, a fluorescência de GFP será vista como um resultado dessa integração no alvo, dependente de um corte da RNP adjacente ao sítio de integração. (B) O DNA de fita dupla pode ser integrado através de mecanismos de reparo independentes da homologia em sítios fora do alvo por meio da integração aleatória em quebras de dsDNA de ocorrência natural ou potencialmente em quebras de fita dupla induzidas, tais como aquelas nos sítios de corte inespecíficos da RNP. Esse efeito pode ser aproveitado para permitir a integração direcionada de uma sequência de dsDNA em uma interrupção de dsDNA induzida (HITI) desejada em tipos de células senescentes que carecem da capacidade de produzir o HDR, mas crucialmente a totalidade do modelo de dsDNA está integrada, incluindo quaisquer ramos potenciais da homologia. No caso em que os ramos da homologia contêm uma sequência promotora (conforme para marcas de fusão no N-terminal), essas integrações inespecíficas podem conduzir a expressão observável da sequência inserida sem a inserção correta desejada de HDR. (C) As barras representam

porcentagens reais de GFP+ de células T CD3+ humanas submetidas à eletroporação com os componentes indicados. A citometria de fluxo para expressão de proteínas fluorescentes pode ser utilizada para avaliar rapidamente as integrações funcionais inespecíficas. O aumento da porcentagem de células fluorescentes sobre o limite de detecção quando o modelo isoladamente é submetido à eletroporação provavelmente representa integrações aleatórias nas quebras de dsDNA de ocorrência natural. Nem toda integração inespecífica irá produzir a expressão de proteína fluorescente, mas as diferenças relativas na expressão funcional fora do alvo entre diferentes modelos podem ser analisadas. A inclusão de um CXCR4 de direcionamento de RNP aumenta dramaticamente as integrações independentes da homologia inespecíficas observadas, provavelmente através de um evento de inserção do tipo HITI. O maior aumento (de 1% a > 30% nesse doador) ocorre através da eletroporação da inserção correta mediada pela RNP e HDR. (D) Comparações da expressão de GFP no alvo (coluna da direita) versus integrações funcionais inespecíficas (coluna do meio) em cinco modelos. A expressão média (barras) de dois doadores biológicos (pontos) é representada graficamente.

[0038] As Figuras 27A-B mostram a expressão de GFP através de um modelo de HDR versus matriz de gRNA. (A) A expressão de GFP foi analisada em células T humanas primárias CD3+CD4 + de um doador saudável 7 dias após a eletroporação de uma matriz de modelos de HDR de dsDNA e seus gRNAs correspondentes, juntamente com um gRNA CXCR4 e um controle sem RNP. Como esperado com um modelo de dsDNA, as integrações inespecíficas foram vistas nas combinações, mas para todos os gRNAs e modelos de HDR, a expressão GFP mais elevada foi vista na condição no alvo. (B) Resumo do mapa de calor dos dados da citometria de fluxo em (A). Um modelo de HDR, uma marca de fusão GFP do C-terminal no fator

nuclear FBL, tinha uma expressão fora do alvo consistentemente mais elevada entre os gRNAs.

[0039] As Figuras 28A-D mostram HDR eficiente em células T humanas primárias utilizando uma nickase Cas9. (A) Diagrama da posição genômica contendo o primeiro éxon de RAB11A. O uso de spCas9 com um único RNA guia (gRNA 1) juntamente com um modelo de HDR de dsDNA que integra uma GFP na estrutura com RAB11A diretamente após o códon de início resulta na expressão eficiente de GFP (Fig 11F). O uso de uma nickase Cas9 (variante D10A) com dois gRNAs pode reduzir as chances de corte fora do alvo. (B-C) Uma série de gRNAs únicos, assim como combinações duplas de gRNA foram testadas quanto à eficiência de inserção de GFP na posição N-terminal de RAB11A. Como esperado, nenhum gRNA apresentou níveis apreciáveis de inserção de GFP quando se utiliza um Cas9 morta por nuclease (dCas9). Vários gRNAs únicos cortados adjacentes ao sítio de inserção mostraram integração de GFP ao utilizar Cas9, mas nenhum tão eficientemente como o gRNA 1. A nickase D10A mostrou pouca ou nenhuma integração de GFP com guias únicos, mas com combinações de dois guias apresentou integração eficiente de GFP. Somente nas combinações de gRNA em que as duas sequências de PAM foram direcionadas de longe entre si (PAM Out) foi observada a integração de GFP. (D) Dados brutos apresentados na (Figura 25C) demonstrando níveis mais baixos de integrações funcionais inespecíficas quando se submete à eletroporação um gRNA fora do alvo (CXCR4 de direcionamento), provavelmente devido ao requisito para a nickase D10A ter dois gRNAs que se ligam nas proximidades para induzir uma quebra de dsDNA. Pontos em todas as apresentações (B-D) representam réplicas técnicas nos dois doadores saudáveis marcados.

[0040] As figuras 29A-H mostram frequências reduzidas de Treg e

capacidade supressora de Treg defeituosa em indivíduos com duas perdas de função de mutações IL2RA. (A) células T CD3+CD4+ de um doador saudável e de todos os membros da família, incluindo heterozigotos IL2RA (c.530 het 1, c.800 hets 1 a 3), assim como crianças heterozigotas compostas (Comp. Hets 1 a 3), com mutações de perda de função de IL2RA, foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar a presença de Tregs CD25hiCD127lo. (B) Em doadores saudáveis e hets únicos, as células T CD4+FoxP3+ são predominantemente CD25hiCD127lo. Nos heterozigotos compostos, uma população CD127lo CD4+FoxP3+ está presente, mas não expressa IL2RA. (C) A fenotipagem clínica executada em dois sítios separados confirma que os heterozigotos compostos possuem frequências normais de células CD127lo FoxP3+. (D) A deficiência na expressão da superfície de IL2RA no composto heterozigoto 3 levou à sinalização a jusante aberrante conforme medida pela expressão pStat5 após a estimulação com IL-2, mas não com IL-7 ou IL-15. (E) Devido à incapacidade de separar as Tregs CD25hi dos heterozigotos do composto deficiente em CD25, uma estratégia alternativa de ativação foi estabelecida para enriquecer as células FoxP3+ a partir de células T CD3+CD4+ utilizando os marcadores de superfície CD127loCD45RO+TIGIT+. A coloração intracelular de FoxP3 da população ativada indicada. (F) Embora esses "Tregs" potenciais de CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+ fossem altamente enriquecidos para FoxP3 e mostrassem alguma capacidade supressora quando cultivados com células T respondedoras estimuladas marcadas com CFSE (Tresps) de doadores saudáveis, as CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+ dos heterozigotos compostos não apresentaram nenhuma capacidade supressora. A população de Tresp estimulada (curvas sólidas), Tresp não estimulada (curva tracejada). (G) A correção de qualquer mutação CD25 nos

heterozigotos compostos individualmente ainda deixaria a outra mutação, deixando as células como heterozigotas únicas. Para confirmar que essa correção potencial resultaria em algum nível de supressão funcional, as Tregs CD4+CD25hiCD127lo dos membros da família heterozigota única c.530 e c.800 foram isoladas e sua capacidade supressora foi testada como em (F). (H) Sumários de gráficos de pontos da capacidade supressora de Treg em células de doadores saudáveis, heterozigotos compostos com deficiência de CD25 (F) e heterozigotos CD25+/- c.530 ou c.800 (G). Embora CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+ "Tregs" dos heterozigotos compostos não apresentaram nenhuma capacidade supressora, as Tregs CD4+CD25hiCD127lo convencionais dos membros da família heterozigota única mostraram alguma capacidade supressora, consistente com a falta de fenótipo clínico pronunciado em comparação com os hets compostos.

[0041] As Figuras 30A-E mostram mutação autoimune monogênica corrigida por direcionamento de gene não viral em células T humanas primárias. (A) Três irmãos em uma família carregam duas mutações diferentes de IL2RA (que codificam receptor de IL-2 de alta afinidade, CD25) (c.530A>G criando um códon de parada no IL2RA éxon 4; c.800delA, criando uma mutação frameshift em IL2RA éxon 8, que provoca quase 100 aminoácidos contínuos). (B) Estes três irmãos heterozigotos compostos apresentam expressão da superfície celular grandemente reduzida, mas não completamente ausente de IL2RA em suas células T primárias. O direcionamento gênico não viral da mutação c.530 por eletroporação de uma RNP Cas9 e um modelo de HDR de dsDNA contendo a sequência de IL2RA correta (juntamente com uma mutação silenciosa na sequência PAM direcionada) resgatou com sucesso a expressão da superfície celular de IL2RA em uma porção de células T de cada irmão heterozigoto composto 2 dias após

a eletroporação. (C) 7 dias após o direcionamento gênico não viral, as células T direcionadas apresentaram níveis aumentados de fosforilação de Stat5 após a estimulação com IL-2 em comparação com os controles não direcionados. (D) 9 dias após o direcionamento gênico não viral para corrigir a mutação c.530, as células T IL2RA+ dos três doadores heterozigotos compostos incluem um nível aumentado de células FoxP3+ em comparação com células não direcionadas ou células doadoras saudáveis. (E) O direcionamento gênico não viral e a correção da mutação c.530 são possíveis e eficientes utilizando um conjunto de reagentes terapêuticos otimizados (nickase D10A juntamente com o modelo de HDR de ssDNA). As células T de um doador heterozigoto composto foram coradas para a expressão da superfície de IL2RA após 9 dias de expansão *ex vivo* após a eletroporação (2 dias após a reestimulação).

[0042] As Figuras 31A-D mostram a identificação das mutações heterozigóticas do composto em IL2RA e o projeto de reagentes de direcionamento ao genoma CRISPR-Cas9 corretivo. (A) O teste genético inicial do probando utilizando um painel multigênico de sequenciamento de próxima geração direcionado interno com mais de 40 genes conhecidos de estarem envolvidos em formas monogênicas de diabetes foi negativo. O subsequente sequenciamento de exoma no trio de probandos e progenitores revelou duas mutações causativas no gene IL2RA. A mãe possuía uma única mutação heterozigótica (c.530G> A) no éxon 4 de IL2RA (SEQ ID Nº: 1) (AGACAAGGTRGACCCAGCC), resultando em um códon de parada prematuro. (B) O pai possuía uma única mutação heterozigótica (c.800delA) no éxon 8 de IL2RA (SEQ ID Nº: 2 (ACAGGAGGARRRKWRRARAA), resultando em uma mutação frameshift que resulta em um longo período de execução de 95 aminoácidos. O sequenciamento Sanger confirmou que o probando

era um heterozigoto composto para ambas as mutações. (C) Uma representação linear da proteína de IL2RA anotada com localizações aproximadas das duas mutações identificadas de IL2RA. SD1, domínio sushi 1; SD2, domínio sushi 2; TM, transmembrana; C citoplasmático. (D) As sequências genômicas incluindo as mutações especificadas ((SEQ ID Nº: 3) (CAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGTAGACCC) para o alelo c.530G>A e SEQ ID Nº: 4 (GACTTTGTTACACCACTACAGGAGGAGAGTA) para o alelo c.800delA)) foram utilizadas para projetar os reagentes de direcionamento do genoma CRISPR-Cas9 para corrigir as duas mutações IL2RA. Um gRNA foi projetado para cortar adjacente ao sítio de cada mutação, 8 bps de distância para a mutação c.530 e 7 bps de distância para c.800. Para cada mutação, um modelo de HDR ((SEQ ID Nº: 5) (ACAAGATGGACCC) para a mutação c.530 e (SEQ ID Nº: 6) (AGGAGAAAGAGTA para c.800)) foi designado incluindo a sequência corrigida assim como uma mutação silenciosa em uma base degenerada para interromper a sequência PAM ("NGG") para cada RNA guia. A sequência de interrupção do alelo corrigido + PAM silencioso para c.530 (CAAAATGACCCACGGGAAGACAAGATGGACCC) (SEQ ID Nº: 7) e c.800 (SEQ ID Nº: 8) (GACTTTGTTACACCACTACAGGAGAAAGAGTA) é mostrada. Regiões genômicas apresentadas (sem escala) para o sítio da mutação c.530 (hg38 ch10:6021526-6021557) e o sítio da mutação c800 (hg38 ch10:6012886-6012917). Os modelos de ssODN HDR (ssDNA com ramos de homologia de 60 pb) e modelos grandes de dsDNA ou ssDNA HDR (conforme apresentado, com ~300 pb de ramos de homologia).

[0043] As Figuras 32A-C mostram a correção mediada por HDR da mutação de perda de função IL2RA c.530A>G. (A) Ao contrário do

gRNA que direciona a mutação c.800delA no C-terminal de IL2RA, o gRNA que direciona a mutação c.530A>G (provocando um códon de parada em um éxon interior) resulta em uma eliminação substancial (~90%) de IL2RA em um doador saudável e heterozigotos únicos (c.800 Het 2 e 3) 2 dias após a eletroporação da RNP isoladamente (Azul) em células T CD3+. Embora partindo de uma porcentagem muito pequena de IL2RA+, a eliminação também foi observada em todos os três heterozigotos compostos, potencialmente porque uma pequena quantidade de proteína pode ser superficialmente expressa fora do alelo c.800delA. Esta expressão reduzida de CD25 pode ser parcialmente resgatada pela inclusão de um modelo ssODN HDR e ainda mais substancialmente resgatada utilizando um modelo grande de dsDNA HDR. Ambos os tipos de modelo continham a sequência corrigida, uma mutação silenciosa para remover a sequência PAM do gRNA e os ramos de homologia de 60 pb (ssODNs) ou ~300 pb (dsDNA grande) (Figura 32). Ao contrário do direcionamento da mutação c.800delA para correção, a expressão da superfície CD25 nas células T dos heterozigotos compostos é vista apenas quando um modelo de HDR é incluído. Nos três heterozigotos compostos, o modelo de HDR de dsDNA produziu maiores porcentagens de células CD25+. (B) Aumento da sinalização de pStat5 em resposta à estimulação de IL-2 (200 U/ml) 7 dias após a eletroporação nas células T CD3+ de pacientes heterozigotos compostos submetidos a correção de mutação mediada por HDR em comparação a nenhum controle de eletroporação ou apenas RNP. (C) Da mesma forma, proporções aumentadas de células CD25+ FoxP3+ são observadas 9 dias após a eletroporação nas condições de correção de HDR em pacientes heterozigotos compostos. Porcentagens mais baixas de correção foram observadas ao direcionar a mutação c.530 para a correção de HDR no composto heterozigoto 3, potencialmente devido ao estado

celular alterado associado à doença do paciente ou ao regime de fármacos imunossupressores do paciente. As eletroporações foram executadas de acordo com o protocolo de direcionamento de genoma não viral otimizado apresentado nos exemplos. Para eletroporações ssODN, 100 pmols em 1uL H2O foram submetidos à eletroporação.

[0044] As Figuras 33A-C mostram a correção mediada por não HDR da mutação de perda de função frameshift IL2RA c.800delA. (A) Histogramas de expressão da superfície CD25 em células T CD3+ em todas as crianças de uma família portadora de duas mutações de perda de função IL2RA, incluindo três heterozigotos compostos que expressam quantidades mínimas de IL2RA em sua superfície (sem eletroporação, Cinza). Dois dias após a eletroporação de uma RNP que contém um gRNA contra o sítio de uma das duas mutações, uma exclusão de um par de base no éxon final de IL2RA (c.800delA) provocando uma passagem contínua pelo códon de parada normal, células T CD3+ de um doador saudável e hets isolados (c.800 Het 2 e 3) mostram discreto aumento em células CD25- (somente RNP, Azul). A neutralização baixa é potencialmente devido ao gRNA que direciona o C-terminal da proteína, onde pequenas inserções ou deleções podem provocar perda menos pronunciada de expressão de proteína da superfície. Surpreendentemente, a RNP isoladamente resultou na expressão da superfície de CD25 em quase 50% das células T editadas nos três heterozigotos compostos. Os aumentos na porcentagem de células com correção de CD25 em comparação com a RNP isoladamente podem ser alcançados pela inclusão de uma sequência de modelo de ssODN HDR com a correção de mutação (RNP + ssODN, Roxo) e aumentados ainda quando se usa um modelo mais longo de HDR de dsDNA para corrigir a mutação (RNP + dsDNA HDRT, Verde) (Figura 32). (B) Fosfo sinalização Stat5 em resposta à estimulação de IL-2 em alta dose (200 U/ml) nas células T CD3+

editadas após 7 dias de expansão pós-eletroporação. Números aumentados de células pStat5+ correlacionaram-se com aumentos na expressão da superfície CD25 (A). (C) Após 9 dias de expansão pós-eletroporação, a coloração intracelular FoxP3 revela uma proporção dramaticamente aumentada de células CD25+ FoxP3+ nas células T CD3+ em comparação de nenhum controle de eletroporação, aproximando-se da proporção de células CD25+ FoxP3+ observadas em um doador saudável cultivadas de forma semelhante. As eletroporações foram executadas de acordo com o protocolo de direcionamento de genoma não viral otimizado (Exemplos). Para eletroporações ssODN, 100 pmols em 1 ul de H2O foram submetidos à eletroporação.

[0045] As Figuras 34A-B mostram potencial de HDR diminuído e fenótipo clínico alterado em paciente com perda de função heterozigótica composta IL2RA que recebe imunossupressores. (A) A análise citométrica de fluxo da expressão de GFP 6 dias após a eletroporação de um modelo positivo de RAB11A-GFP dsDNA de controle de HDR em células T CD3+ dos pacientes indicados revelou menor expressão de GFP nos três heterozigotos compostos em comparação com seus dois irmãos heterozigotos c.800. Comparado a uma coorte de doze doadores saudáveis editados de forma semelhante (Figura 20), ambos os heterozigotos c.800 assim como o composto het 1 e 2 estavam dentro da faixa geral observada através de doadores saudáveis, enquanto que o composto het 3 teve menor expressão de GFP do que qualquer outro saudável doador analisado. Note-se que, embora a correção mediada por HDR do composto het 3 na mutação c.530 tenha sido substancialmente mais baixa do que os outros dois compostos hets (Fig 31A), a expressão da superfície de CD25 após a eletroporação do c.800delA que direciona a RNP isoladamente foi semelhante. Ao contrário do reparo mediado por

HDR, uma correção frameshift mediada por NHEJ em c.800delA pode não exigir proliferação celular, consistente com o composto het 3 sendo o único paciente heterozigoto composto em imunossupressores ativos no momento da coleta de sangue e isolamento de células T. (B) O estado celular alterado associado com a doença do paciente também pode contribuir para a diminuição das taxas de HDR. Os níveis de expressão de TIGIT e CTLA4 em células T CD4+ isoladas não editadas de cada paciente indicado foram medidos por citometria de fluxo. Consistentes com o estado de ativação alterado, as células do composto het 3 tiveram um fenótipo distinto, com aumento da expressão de TIGIT e CTLA4 em comparação com doadores saudáveis, membros da família heterozigotos, assim como os outros dois irmãos heterozigotos compostos.

[0046] As Figuras 35A-B mostram vários métodos para produzir modelos longos de HDR de ssDNA. (A) Se uma quantidade bastante grande de sequência de DNA de fita simples longa puder ser produzida para eletroporação, as integrações inespecíficas poderão ser reduzidas sem comprometer excessivamente a eficiência no alvo. Um método envolve uma digestão seletiva de exonuclease em duas etapas que degrada especificamente uma fita de um produto de PCR que foi marcado pela fosforilação 5', facilmente adicionada a um iniciador de PCR antes da amplificação. (B) Um segundo método de produção de ssDNA baseado na reação de transcrição sequencial in vitro (IVT) e transcrição reversa (RT) também foi aplicado. Um produto de PCR com um promotor T7 curto anexado serve como um modelo de IVT para produzir um produto ssRNA. Após o recozimento de um iniciador de RT e a transcrição reversa, é formado um híbrido de RNA/DNA que pode ser facilmente transformado em um modelo de ssDNA longo através da incubação em hidróxido de sódio (seletivamente degrada a fita de RNA). (C) Aos 2 dias pós-

eletroporação, a viabilidade em células T CD3+ submetidas à eletroporação com apenas um modelo de ssDNA foi maior do que aquelas submetidas à eletroporação com apenas um modelo de dsDNA (Figura 11). (D) Um modelo de HDR de ssDNA RAB11A-GFP mostrou integração de GFP de alta eficiência semelhante aos modelos de dsDNA e manteve integrações de alta eficiência em quantidades molares mais elevadas de modelo, potencialmente devido ao aumento da viabilidade (C), assim como menor massa por mol de modelo de DNA. Pontos individuais representam pelo menos dois doadores saudáveis (C, D).

Definições

[0047] Conforme utilizado neste relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem referência plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[0048] O termo "ácido nucleico" ou "nucleotídeo" refere-se a ácidos desoxirribonucleicos (DNA) ou ácidos ribonucleicos (RNA) e seus polímeros, na forma de fita simples ou dupla. A menos que especificamente limitado, o termo abrange ácidos nucleicos contendo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que possuem propriedades de ligação semelhantes como o ácido nucleico de referência e são metabolizados de maneira semelhante aos nucleotídeos de ocorrência natural. A não ser que de outra maneira indicada, uma sequência de ácido nucleico particular também abrange implicitamente suas variantes conservativamente modificadas (por exemplo, substituições de códons degeneradas), alelos, ortólogos, SNPs e sequências complementares, assim como a sequência explicitamente indicada. Especificamente, as substituições de códons degeneradas podem ser obtidas através da geração de sequências nas quais a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou

todos) é substituída por resíduos de base misturada e/ou desoxinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); e Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). O termo ácido nucleico é utilizado de modo trocável com o gene, cDNA e mRNA codificado por um gene.

[0049] O termo "gene" pode se referir ao segmento de DNA envolvido na produção ou codificação de uma cadeia de polipeptídeo. Pode incluir regiões que precedem e seguem a região de codificação (líder e trailer), assim como as sequências intervenientes (íntrons) entre segmentos de codificação individuais (éxons). Alternativamente, o termo "gene" pode se referir ao segmento de DNA envolvido na produção ou codificação de um RNA não trasladado, tal como rRNA, tRNA, RNA guia (por exemplo, um pequeno RNA guia) ou micro RNA.

[0050] "Tratamento" refere-se a qualquer indício de sucesso no tratamento, melhora ou prevenção da doença, condição ou distúrbio, incluindo qualquer parâmetro objetivo ou subjetivo tal como redução; remissão; diminuição dos sintomas ou tornar a condição da doença mais tolerável para o paciente; retardo da taxa de degeneração ou declínio; ou tornando o ponto final da degeneração menos debilitante. O tratamento ou melhora dos sintomas pode ser baseado em parâmetros objetivos ou subjetivos; incluindo os resultados de um exame por um médico. Consequentemente, o termo "tratamento" inclui a administração dos compostos ou agentes da presente invenção para prevenir ou atrasar, aliviar ou interromper ou inibir o desenvolvimento dos sintomas ou condições associados com uma doença, condição ou distúrbio como aqui descrito. O termo "efeito terapêutico" refere-se à redução, eliminação ou prevenção da doença, sintomas da doença ou efeitos colaterais da doença no indivíduo. "Tratar" ou "tratamento" utilizando os métodos da presente invenção inclui a prevenção do aparecimento dos sintomas em um sujeito que pode estar em risco

aumentado de uma doença ou distúrbio associado a uma doença, condição ou distúrbio, conforme aqui descrito, mas ainda não experimenta ou apresenta sintomas, inibindo os sintomas de uma doença ou distúrbio (retardando ou interrompendo seu desenvolvimento), fornecendo alívio dos sintomas ou efeitos colaterais de uma doença (incluindo tratamento paliativo) e aliviando os sintomas de uma doença (provocando a regressão). O tratamento pode ser profilático (para prevenir ou retardar o início da doença, ou para impedir a manifestação de seus sintomas clínicos ou subclínicos) ou supressão terapêutica ou alívio dos sintomas após a manifestação da doença ou condição. O termo "tratamento", como aqui utilizado, inclui tratamento preventivo (por exemplo, profilático), curativo ou paliativo.

[0051] Um "promotor" é definido como uma ou mais sequências de controle de ácido nucleico que direcionam a transcrição de um ácido nucleico. Como aqui utilizado, um promotor inclui sequências necessárias de ácido nucleico próximas ao sítio inicial da transcrição, tal como, no caso de um promotor do tipo polimerase II, um elemento TATA. Um promotor também inclui opcionalmente elementos intensificadores ou repressores distais, que podem ser localizados até vários milhares de pares de base a partir do local inicial da transcrição.

[0052] "Polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são utilizados de modo trocável nesta invenção para se referir a um polímero de resíduos de aminoácidos. Como aqui utilizado, os termos abrangem cadeias de aminoácidos de qualquer comprimento, incluindo proteínas de comprimento total, em que os resíduos de aminoácidos estão ligados por ligações peptídicas covalentes.

[0053] Conforme utilizado nesta invenção, o termo "complementar" ou "complementaridade" refere-se ao emparelhamento específico de bases entre nucleotídeos ou ácidos nucleicos. Os nucleotídeos complementares são, geralmente, A e T (ou A e U) e G e C.

[0054] Como utilizado em toda parte, por sujeito significa um indivíduo. Por exemplo, o indivíduo é um mamífero, tal como um primata e, mais especificamente, um ser humano. Os primatas não humanos também são indivíduos. O termo indivíduo inclui animais domésticos, tais como gatos, cães, etc., gado (por exemplo, gado, cavalos, porcos, ovelhas, cabras etc.) e animais de laboratório (por exemplo, furão, chinchila, camundongo, coelho, rato, gerbil, porquinho da índia, etc.). Assim, usos veterinários e usos e formulações médicas são contemplados nesta invenção. O termo não indica uma idade ou sexo específico. Assim, indivíduos adultos e recém-nascidos, masculinos ou femininos, devem ser cobertos. Como aqui utilizado, paciente ou indivíduo pode ser utilizado de modo trocável e pode se referir a um indivíduo afetado por uma doença ou distúrbio.

[0055] O sistema "CRISPR/Cas" refere-se a uma classe difundida de sistemas bacterianos para defesa contra ácido nucleico estranho. Os sistemas CRISPR/Cas são encontrados em uma ampla faixa de organismos de eubactérias e arqueais. Os sistemas CRISPR/Cas incluem subtipos do tipo I, II e III. Os sistemas CRISPR/Cas tipo II do tipo silvestre utilizam uma nuclease mediada por RNA, a Cas9 em complexo com RNA guia e ativador para reconhecer e clivar o ácido nucleico estranho. Os RNAs guias que possuem a atividade tanto de um RNA guia quanto de um RNA ativadore também são conhecidos na técnica. Em alguns casos, esses RNAs guias de dupla atividade são referidos como RNA pequeno guia (sgRNA).

[0056] Os homólogos de Cas9 são encontrados em uma ampla variedade de eubactérias, incluindo, entre outras, as bactérias dos seguintes grupos taxonômicos: *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes-Chlorobi*, *Chlamydiae-Verrucomicrobia*, *Chlroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* e *Thermotogae*. Uma proteína Cas9 exemplar é a proteína Cas9 de

Streptococcus pyogenes. As proteínas Cas9 adicionais e seus homólogos são descritos em, por exemplo, Chylinksi, *et al*., RNA Biol. 2013 May 1; 10(5): 726–737 ; Nat. Rev. Microbiol. 2011 June; 9(6): 467-477; Hou, *et al*., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 24;110(39):15644-9; Sampson *et al*., Nature. 2013 May 9;497(7448):254-7; e Jinek, *et al*., Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21. O domínio da Cas9 nuclease pode ser otimizado com relação à atividade eficiente ou estabilidade aprimorada na célula hospedeira.

[0057] Como aqui utilizado, o termo "Cas9" refere-se a uma nuclease mediada por RNA (por exemplo, de origem bacteriana ou arqueal, ou seu derivado). As nuclases mediadas por RNA exemplares incluem as proteínas Cas9 anteriores e seus homólogos, e incluem, mas não são limitados a estas, CPF1 (Veja, por exemplo, Zetsche *et al*., Cell, Volume 163, Issue 3, pp. 759–771, 22 October 2015). Da mesma forma, conforme utilizado aqui, o termo complexo "ribonucleoproteína Cas9" e similares se refere a um complexo entre a proteína Cas9 e um crRNA (por exemplo, RNA guia ou RNA guia pequeno), a proteína Cas9 e um crRNA de ativação trans (tracrRNA), a proteína Cas9 e um RNA guia pequeno, ou uma combinação destes (por exemplo, um complexo contendo a proteína Cas9, um tracrRNA e um RNA guia do crRNA).

[0058] Como aqui utilizado, o termo "edição" no contexto da edição de um genoma de uma célula, refere-se à indução de uma alteração estrutural na sequência do genoma em uma região genômica alvo. Por exemplo, a edição pode assumir a forma de inserir uma sequência de nucleotídeo no genoma da célula. A sequência de nucleotídeo pode codificar um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo. Essa edição pode ser executada mediante a indução de uma quebra de fita dupla dentro de uma região genômica alvo ou um par de

cortes de fita simples em filamentos opostos e flanqueamento da região genômica alvo. Métodos para induzir quebras de fita simples ou dupla em ou dentro de uma região genômica alvo incluem o uso de um domínio de nuclease Cas9, ou um derivado desta, e um RNA guia, ou par de RNAs guia, direcionados para a região genômica alvo.

[0059] Como aqui utilizado, a frase "introdução" no contexto da introdução de um complexo modelo de RNP-DNA refere-se à translocação do complexo modelo de RNP-DNA de fora de uma célula para dentro da célula. Em alguns casos, a introdução refere-se à translocação do complexo modelo de RNP-DNA de fora da célula para dentro do núcleo da célula. Vários métodos de tal translocação são contemplados, incluindo, mas não são limitados a estes, eletroporação, contato com nanofios ou nanotubos, internalização mediada por receptor, translocação por meio de peptídeos penetrantes nas células, translocação mediada por lipossomas e similares.

[0060] Como aqui utilizada o termo "heterólogo" refere-se ao que normalmente não é encontrado na natureza. O termo "sequência heteróloga" refere-se a uma sequência normalmente não encontrada em uma dada célula na natureza. Como tal, um nucleotídeo heterólogo ou sequência de proteína pode ser: (a) estranho à sua célula hospedeira (isto é, é exógeno à célula); (b) naturalmente encontrado na célula hospedeira (isto é, endógena), mas presente em uma quantidade não natural na célula (isto é, maior ou menor quantidade do que a encontrada naturalmente na célula hospedeira); ou (c) encontrado naturalmente na célula hospedeira, mas posicionado fora de sua posição natural.

[0061] Como aqui utilizada, a frase "primária" no contexto de uma célula primária ou célula-tronco primária refere-se a uma célula que não foi transformada ou imortalizada. Essas células primárias podem ser cultivadas, subcultivadas ou passadas um número limitado de

vezes (por exemplo, cultivadas 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 vezes). Em alguns casos, as células primárias são adaptadas às condições de cultura *in vitro*. Em alguns casos, as células primárias são isoladas de um organismo, sistema, órgão ou tecido, opcionalmente classificadas e utilizadas diretamente sem cultivo ou subcultivo. Em alguns casos, as células primárias são estimuladas, ativadas ou diferenciadas. Por exemplo, as células T primárias podem ser ativadas através do contato com (por exemplo, cultivo na presença de) agonistas CD3, CD28, IL-2, IFN-γ ou uma combinação destes.

[0062] Como aqui utilizado, a frase "célula-tronco hematopoiética" refere-se a um tipo de célula-tronco que pode dar origem a uma célula sanguínea. As células-tronco hematopoiéticas podem dar origem a células das linhagens mielóides ou linfóides, ou uma combinação destas. As células-tronco hematopoiéticas são predominantemente encontradas na medula óssea, embora possam ser isoladas do sangue periférico, ou de sua fração. Vários marcadores da superfície celular podem ser utilizados para identificar, classificar ou purificar células-tronco hematopoiéticas. Em alguns casos, as células-tronco hematopoiéticas são identificadas como c-kit^{+} e lin^{-}. Em alguns casos, as células-tronco hematopoiéticas humanas são identificadas como CD34^{+}, CD59^{+}, Thy1/CD90^{+}, CD38$^{lo/-}$, C-kit/CD117^{+}, lin^{-}. Em alguns casos, as células-tronco hematopoiéticas humanas são identificadas como CD34^{-}, CD59^{+}, Thy1/CD90^{+}, CD38$^{lo/-}$, C-kit/CD117^{+}, lin^{-}. Em alguns casos, as células-tronco hematopoiéticas humanas são identificadas como CD133^{+}, CD59^{+}, Thy1/CD90^{+}, CD38$^{lo/-}$, C-kit/CD117^{+}, lin^{-}. Em alguns casos, as células-tronco hematopoiéticas de camundongo são identificadas como CD34$^{lo/-}$, SCA-1^{+}, Thy1$^{+/lo}$, CD38^{+}, C-kit^{+}, lin^{-}. Em alguns casos, as células-tronco hematopoiéticas são CD150^{+}CD48^{-}CD244^{-}.

[0063] Como aqui utilizado, a frase "célula hematopoiética" refere-se a uma célula derivada de uma célula-tronco hematopoiética. A célula hematopoiética pode ser obtida ou fornecida através do isolamento de um organismo, sistema, órgão ou tecido (por exemplo, sangue ou sua fração). Alternativamente, uma célula-tronco hematopoiética pode ser isolada e a célula hematopoiética obtida ou fornecida pela diferenciação da célula-tronco. As células hematopoiéticas incluem células com potencial limitado para se diferenciarem de outros tipos de células. Tais células hematopoiéticas incluem, mas não são limitadas a estas, células progenitoras multipotentes, células progenitoras restritas a linhagem, células progenitoras mielóides comuns, células progenitoras de granulócitos-macrófagos ou células progenitoras de megacariócitos-eritróides. As células hematopoiéticas incluem células das linhagens linfóides e mielóides, tais como linfócitos, eritrócitos, granulócitos, monócitos e trombócitos. Em algumas modalidades, a célula hematopoiética é uma célula imune, conforme uma célula T, célula B, macrófago, uma célula exterminadora natural (NK) ou célula dendrítica. Em algumas modalidades, a célula é uma célula imune inata.

[0064] Como aqui utilizado, a frase "célula T" refere-se a uma célula linfóide que expressa uma molécula receptora de células T. As células T incluem, entre outras, células T ingênuas, células T estimuladas, células T primárias (por exemplo, não cultivadas), células T cultivadas, células T imortalizadas, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T de memória, células T reguladoras, células T exterminadoras naturais, suas combinações ou subpopulações. As células T podem ser $CD4^+$, $CD8^+$ ou $CD4^+$ e $CD8^+$. As células T podem ser células auxiliares, por exemplo, células auxiliares do tipo T_h1, T_h2, T_h3, T_h9, T_h17 ou T_{FH}. As células T podem ser células T citotóxicas. As células T reguladoras podem ser $FOXP3^+$ ou $FOXP3^-$. As células T

podem ser células T alfa/Beta ou células T gama/delta. Em alguns casos, a célula T é uma célula T reguladora $CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{lo}$. Em alguns casos, a célula T é uma célula T reguladora selecionada do grupo que consiste em células T restritas Tr1, Th3, CD8+CD28-, Treg17 e Qa-1 ou uma combinação ou subpopulação destas. Em alguns casos, a célula T é uma célula T $FOXP3^{+}$. Em alguns casos, a célula T é uma célula T efetiva $CD4^{+}CD25^{lo}CD127^{hi}$. Em alguns casos, a célula T é uma célula T ingênua $CD4^{+}CD25^{lo}CD127^{hi}CD45RA^{hi}CD45RO^{-}$.

[0065] Uma célula T pode ser uma célula T recombinante que foi geneticamente manipulada. Em alguns casos, a célula T recombinante possui um receptor de célula T recombinante (por exemplo, submetido à mutação ou heterólogo) ou um receptor de antígeno quimérico (CAR). Por exemplo, o receptor de células T pode ter uma ou mais mutações em uma região determinante de complementaridade de um receptor de células T para alterar a especificidade do antígeno. Como outro exemplo, o receptor de células T pode ser submetido à mutação (por exemplo, no endodomínio) para aumentar ou diminuir a sinalização. Como ainda outro exemplo, o receptor de células T pode ser substituído por um receptor de células T heterólogo. Como mais outro exemplo, o receptor de células T pode ser substituído por um polipeptídeo tendo um domínio receptor diferente, tal como um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em alguns casos, o receptor de células T é um receptor quimérico contendo um domínio de direcionamento (por exemplo, um fragmento de anticorpo), um domínio da transmembrana e um domínio intracelular ou endodomínio. O endodomínio pode conter um ou mais domínios de sinalização e/ou domínios adaptadores para fornecer ativação robusta de células T e atividade antiantígeno.

[0066] Como aqui utilizado, o termo "junção de extremidade não

homóloga" ou NHEJ refere-se a um processo celular no qual as extremidades cortadas ou lascadas de uma fita de DNA são diretamente ligadas sem a necessidade de um ácido nucleico modelo homólogo. A NHEJ pode levar à adição, exclusão, substituição ou uma combinação destas, de um ou mais nucleotídeos no sítio de reparo.

[0067] Como aqui utilizado, o termo reparo direcionado à homologia (HDR) refere-se a um processo celular no qual as extremidades cortadas ou lascadas de uma fita de DNA são reparadas pela polimerização a partir de um ácido nucleico modelo homólogo. Assim, a sequência original é substituída com a sequência do modelo. O ácido nucleico modelo homólogo pode ser fornecido por sequências homólogas em outras partes do genoma (cromátides irmãs, cromossomos homólogos ou regiões repetidas no mesmo ou em diferentes cromossomos). Alternativamente, um ácido nucleico modelo exógeno pode ser introduzido para obter uma alteração específica induzida por HDR da sequência no sítio alvo. Dessa maneira, as mutações específicas podem ser introduzidas no sítio do corte.

[0068] Como aqui utilizado, um modelo de DNA de fita simples ou um modelo de DNA de fita dupla refere-se a um oligonucleotídeo de DNA que pode ser utilizado por uma célula como um modelo de HDR. Geralmente, o modelo de DNA de fita simples ou um modelo de DNA de fita dupla possui pelo menos uma região de homologia com um sítio alvo. Em alguns casos, o modelo de DNA de fita simples ou modelo de DNA de fita dupla possui duas regiões homólogas que flanqueiam uma região que contém uma sequência heteróloga a ser inserida em um sítio de corte alvo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0069] A seguinte descrição recita vários aspectos e modalidades das presentes composições e métodos. Nenhuma modalidade particular se destina a definir o escopo das composições e métodos.

Em vez disso, as modalidades meramente fornecem exemplos não limitativos de várias composições e métodos que são pelo menos incluídos dentro do escopo das composições e métodos divulgados. A descrição deve ser lida a partir da perspectiva de uma pessoa de habilidade prática na técnica; portanto, informações bem conhecidas do especialista versado não são necessariamente incluídas.

[0070] São fornecidas nesta invenção composições e métodos para a edição do genoma de uma célula. Os inventores descobriram surpreendentemente que grandes sequências de nucleotídeo, por exemplo, sequências de nucleotídeo maiores do que 200 nucleotídeos ou pares de bases de comprimento podem ser inseridas no genoma de uma célula, na ausência de um vetor viral. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeo maior do que 200 nucleotídeos ou pares de bases de comprimento pode ser inserida no genoma de uma célula imune primária, na ausência de um vetor viral.

[0071] A integração de ácidos nucleicos grandes, por exemplo, ácidos nucleicos maiores do que 200 nucleotídeos de tamanho, nas células, pode ser limitada pela baixa eficiência da integração, efeitos inespecíficos e/ou perda da viabilidade celular. São descritos nesta invenção métodos e composições para alcançar a integração de uma sequência de nucleotídeo, por exemplo, uma sequência de nucleotídeo maior do que cerca de 200 nucleotídeos de tamanho, no genoma de uma célula. Em alguns métodos, a eficiência da integração é aumentada, os efeitos inespecíficos são reduzidos e/ou a perda da viabilidade celular é reduzida.

Métodos

[0072] Os métodos para editar o genoma de uma célula podem incluir a) fornecer um complexo modelo de DNA do complexo de ribonucleoproteína Cas9 (RNP) compreendendo: (i) a RNP, em que a RNP compreende um domínio de nuclease Cas9 e um RNA guia, em

que o RNA guia especificamente hibrida com uma região alvo do genoma da célula, e em que o domínio nuclease Cas9 cliva a região alvo para criar um sítio de inserção no genoma da célula; e (ii) um modelo de DNA de fita dupla ou fita simples, em que o tamanho do modelo de DNA é maior do que cerca de 200 nucleotídeos, em que as extremidades 5' e 3' do modelo de DNA compreendem sequências de nucleotídeo que são homólogas às sequências genômicas que flanqueiam o sítio de inserção, e em que a relação molar de RNP para o modelo de DNA no complexo é de cerca de 3:1 a cerca de 100:1; e b) introduzir o complexo modelo de RNP-DNA na célula.

[0073] Em algumas modalidades, os métodos aqui descritoso fornecem uma eficiência de liberação do complexo modelo de RNP-DNA de pelo menos cerca de 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, 99,5%, 99% ou superior. Em alguns casos, a eficiência é determinada em relação às células que são viáveis após a introdução do modelo de RNP-DNA na célula. Em alguns casos, a eficiência é determinada em relação ao número total de células (viáveis ou não viáveis) nas quais o modelo de RNP-DNA é introduzido na célula.

[0074] Como outro exemplo, a eficiência de liberação pode ser determinada pela quantificação do número de células editadas pelo genoma em uma população de células (em comparação com o total de células ou o total de células viáveis obtidas após a etapa de introdução). Vários métodos para quantificar a edição do genoma podem ser utilizados. Esses métodos incluem, mas não são limitados a estes, o uso de uma nuclease específica de ligação imperfeita, tal como a endonuclease T7 I; sequenciamento de uma ou mais posições alvo (por exemplo, através do sequenciamento sanger de fragmentos de amplificação da posição alvo clonados); e sequenciamento profundo de alto rendimento.

[0075] Em algumas modalidades, a perda de viabilidade celular é reduzida em comparação com a perda de viabilidade celular após a introdução de DNA nu em uma célula ou a introdução de DNA em uma célula utilizando um vetor viral. A redução pode ser uma redução de pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ou qualquer porcentagem entre essas porcentagens. Em algumas modalidades, os efeitos inespecíficos da integração são reduzidos em comparação com a integração inespecífica após a introdução de DNA nu em uma célula ou introdução de DNA em uma célula utilizando um vetor viral. A redução pode ser uma redução de pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ou qualquer porcentagem entre essas porcentagens.

[0076] Em alguns casos, os métodos descritos nesta invenção fornecem alta viabilidade celular das células às quais o modelo de RNP-DNA foi introduzido. Em alguns casos, a viabilidade das células às quais o modelo de RNP-DNA foi introduzido é de pelo menos cerca de 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, 99,5%, 99% ou superior. Em alguns casos, a viabilidade das células nas quais o modelo de RNP-DNA foi introduzido é de cerca de 20% a cerca de 99%, de cerca de 30% a cerca de 90%, de cerca de 35% a cerca de 85% ou 90% ou superior, de cerca de 40% a cerca de 85% ou 90% ou superior, de cerca de 50% a cerca de 85% ou 90% ou superior, de cerca de 50% a cerca de 85% ou 90% ou superior, de cerca de 60% a cerca de 85% ou 90% ou superior, ou de cerca de 70% a cerca de 85% ou 90% ou superior.

[0077] Nos métodos aqui fornecidos, a relação molar de RNP para modelo de DNA pode ser de cerca de 3:1 a cerca de 100:1. Por exemplo, a relação molar pode ser de cerca de 5:1 a 10:1, de cerca de 5:1 a cerca de 15:1, 5:1 a cerca de 20:1; 5:1 a cerca de 25:1; de cerca

de 8:1 a cerca de 12:1; de cerca de 8:1 a cerca de 15:1, de cerca de 8:1 a cerca de 20:1 ou de cerca de 8:1 a cerca de 25:1.

[0078] Em algumas modalidades, o modelo de DNA está em uma concentração de cerca de 2,5 pM a cerca de 25 pM. Por exemplo, a concentração do modelo de DNA pode ser de 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25 pM ou qualquer concentração entre essas concentrações. Em algumas modalidades, o tamanho ou comprimento do modelo de DNA é maior que cerca de 200 bp, 250 bp, 300 bp, 350 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp, 550 bp, 600 bp, 650 bp, 700 bp, 750 bp, 800 bp, 850 bp, 900 bp, 1kb, 1,1 kb, 1,2 kb, 1,3 kb, 1,4 kb, 1,5 kb, 1,6 kb, 1,7 kb, 1,8 kb, 1,9 kb, 2,0 kb, 2,1 kb, 2,2 kb, 2,3 kb, 2,4 kb, 2,5 kb, 2,6 kb, 2,7 kb, 2,8 kb, 2,9 kb, 3 kb, 3,1 kb, 3,2 kb, 3,3 kb, 3,4 kb, 3,5 kb, 3,6 kb, 3,7 kb, 3,8 kb, 3,9 kb, 4,0 kb, 4,1 kb, 4,2 kb, 4,3 kb, 4,4 kb, 4,5 kb, 4,6 kb, 4,7 kb, 4,8 kb, 4,9 kb, 5,0 kb ou qualquer tamanho de modelo de DNA entre esses tamanhos. Por exemplo, o tamanho do modelo de DNA pode ser de cerca de 200 pb a cerca de 500 pb, cerca de 200 pb a cerca de 750 pb, cerca de 200 pb a cerca de 1 kb, cerca de 200 pb a cerca de 1,5 kb, cerca de 200 pb a cerca de 2,0 kb, cerca de 200 pb a cerca de 2,5 kb, cerca de 200 pb a cerca de 3,0 kb, cerca de 200 pb a cerca de 3,5 kb, cerca de 200 pb a cerca de 4,0 kb, cerca de 200 pb a cerca de 4,5 kb, cerca de 200 pb a cerca de 4,5 kb, cerca de 200 pb a cerca de 5,0 kb. Em algumas modalidades, a quantidade de modelo de DNA é de cerca de 1 µg a cerca de 10 µg. Por exemplo, a quantidade de modelo de DNA pode ser de cerca de 1 µg a cerca de 2 µg, cerca de 1 µg a cerca de 3 µg, cerca de 1 µg a cerca de 4 µg, cerca de 1 µg a cerca de 5 µg, cerca de 1 µg a cerca de 6 µg, cerca de 1 µg a cerca de 7 µg, cerca de 1 µg a cerca de 8 µg, cerca de 1 µg a cerca de 9 µg, cerca de 1 µg a cerca de

10 µg. Em algumas modalidades, a quantidade de modelo de DNA é de cerca de 2 µg a cerca de 3 µg, cerca de 2 µg a cerca de 4 µg, cerca de 2 µg a cerca de 5 µg, cerca de 2 µg a cerca de 6 µg, cerca de 2 µg a cerca de 7 µg, cerca de 2 µg a cerca de 8 µg, cerca de 2 µg a cerca de 9 µg, ou 2 µg a cerca de 10 µg. Em algumas modalidades, a quantidade de modelo de DNA é de cerca de 3 µg a cerca de 4 µg, cerca de 3 µg a cerca de 5 µg, cerca de 3 µg a cerca de 6 µg, cerca de 3 µg a cerca de 7 µg, cerca de 3 µg a cerca de 8 µg, cerca de 3 µg a cerca de 9 µg ou cerca de 3 µg a cerca de 10 µg. Em algumas modalidades, a quantidade de modelo de DNA é de cerca de 4 µg a cerca de 5 µg, cerca de 4 µg a cerca de 6 µg, cerca de 4 µg a cerca de 7 µg, cerca de 4 µg a cerca de 8 µg, cerca de 4 µg a cerca de 9 µg, ou cerca de 4 µg a cerca de 10 µg. Em algumas modalidades, a quantidade de modelo de DNA é de cerca de 5 µg a cerca de 6 µg, cerca de 5 µg a cerca de 7 µg, cerca de 5 µg a cerca de 8 µg, cerca de 5 µg a cerca de 9 µg ou cerca de 5 µg a cerca de 10 µg. Em algumas modalidades, a quantidade de modelo de DNA é de cerca de 6 µg a cerca de 7 µg, cerca de 6 µg a cerca de 8 µg, cerca de 6 µg a cerca de 9 µg ou cerca de 6 µg a cerca de 10 µg. Em algumas modalidades, a quantidade de modelo de DNA é de cerca de 7 µg a cerca de 8 µg, cerca de 7 µg a cerca de 9 µg ou cerca de 7 µg a cerca de 10 µg. Em algumas modalidades, a quantidade de modelo de DNA é de cerca de 8 µg a cerca de 9 µg, ou cerca de 8 µg a cerca de 10 µg. Em algumas modalidades, a quantidade de modelo de DNA é de cerca de 9 µg a cerca de 10 µg. Em alguns casos, o tamanho do modelo de DNA é grande o bastante e em quantidade suficiente para ser letal como o DNA nu. Em algumas modalidades, o modelo de DNA codifica uma proteína heteróloga ou um fragmento desta. Em algumas modalidades, o modelo de DNA inclui sequências reguladoras, por exemplo, uma sequência promotora e/ou uma sequência intensificadora para regular

a expressão da proteína heteróloga ou seu fragmento após inserção no genoma de uma célula.

[0079] Em alguns casos, o modelo de DNA é um modelo linear de DNA. Em alguns casos, o modelo de DNA é um modelo de DNA de fita simples. Em alguns casos, o modelo de DNA de fita simples é um modelo de DNA de fita simples puro. Como utilizado nesta invenção, por "DNA de fita simples puro" significa DNA de fita simples que carece substancialmente da outra ou fita oposta do DNA. Por "carece substancialmente de" significa que o DNA de fita simples puro carece de pelo menos 100 vezes mais de uma fita do que outra fita de DNA.

[0080] Em alguns casos, o complexo modelo de RNP-DNA é formado pela incubação da RNP com o modelo de DNA durante menos do que cerca de um minuto a cerca de trinta minutos, em uma temperatura de cerca de 20°C a cerca de 25°C. Por exemplo, a RNP pode ser incubada com o modelo de DNA durante cerca de 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 20 segundos, 25 segundos, 30 segundos, 35 segundos, 40 segundos, 45 segundos, 50 segundos, 55 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 11 minutos, 12 minutos, 13 minutos, 14 minutos, 15 minutos, 16 minutos, 16 minutos, 17 minutos, 18 minutos, 19 minutos, 20 minutos, 21 minutos, 22 minutos, 23 minutos, 24 minutos, 25 minutos, 26 minutos, 27 minutos, 28 minutos, 29 minutos ou 30 minutos ou qualquer período de tempo entre esses tempos, em uma temperatura ao redor de 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C ou 25°C. Em outro exemplo, a RNP pode ser incubada com o modelo de DNA durante menos do que cerca de um minuto a cerca de um minuto, durante menos de um minuto a cerca de 5 minutos, durante menos de 1 minuto a cerca de 10 minutos, durante cerca de 5 minutos a 10 minutos, durante cerca de 5 minutos a 15 minutos, durante cerca de 10 a cerca de 15 minutos, durante cerca de

10 minutos a cerca de 20 minutos ou durante cerca de 10 minutos a cerca de 30 minutos, em uma temperatura de cerca de 20°C a cerca de 25°C. Em algumas modalidades, o complexo modelo de RNP-DNA e a célula são misturados antes da introdução do complexo modelo de RNP-DNA na célula.

[0081] Em algumas modalidades, a introdução do complexo modelo de RNP-DNA compreende eletroporação. Métodos, composições e dispositivos para a eletroporação de células para introduzir um complexo modelo de RNP-DNA podem incluir aqueles descritos nos exemplos nesta invenção. Métodos, composições e dispositivos adicionais ou alternativos para a eletroporação de células para introduzir um complexo modelo de RNP-DNA podem incluir aqueles descritos na WO/2006/001614 ou Kim, J.A. *et al*. Biosens. Bioelectron. 23, 1353–1360 (2008). Métodos, composições e dispositivos adicionais ou alternativos para a eletroporação de células para introduzir um complexo modelo de RNP-DNA podem incluir aqueles descritos no Ped. de Patente U.S. Publ. 2006/0094095; 2005/0064596; ou 2006/0087522. Métodos, composições e dispositivos adicionais ou alternativos para a eletroporação de células para introduzir um complexo modelo de RNP-DNA podem incluir aqueles descritos em Li, L.H. *et al*. Cancer Res. Treat. 1, 341–350 (2002); Patentes U.S. Nos.: 6.773.669; 7.186.559; 7.771.984; 7.991.559; 6485961; 7029916; e Ped. de Patente U.S. Publ. Nºs.: 2014/0017213; e 2012/0088842. Métodos, composições e dispositivos adicionais ou alternativos para eletroporação de células para introduzir um complexo modelo de RNP-DNA podem incluir os descritos em Geng, T. *et al*.. J. Control Release 144, 91–100 (2010); e Wang, J., *et al*. Lab. Chip 10, 2057–2061 (2010).

[0082] Em algumas modalidades, a proteína Cas9 pode estar em uma forma ativa de endonuclease, de tal modo que quando ligada ao

ácido nucleico alvo como parte de um complexo com um RNA guia ou parte de um complexo com um modelo de DNA, ocorre uma quebra de fita dupla introduzida no ácido nucleico alvo. A quebra de fita dupla pode ser reparada pelo NHEJ para introduzir mutações aleatórias, ou HDR para introduzir mutações específicas. Várias nucleases Cas9 podem ser utilizadas nos métodos aqui descritos. Por exemplo, uma nuclease Cas9 que requer um motivo adjacente ao protospacer NGG (PAM) imediatamente 3' da região direcionada pelo RNA guia pode ser utilizada. Tais nucleases Cas9 podem ser direcionadas para qualquer região de um genoma que contenha uma sequência de NGG. Como outro exemplo, as proteínas Cas9 com requisitos de motivo PAM ortogonais podem ser utilizadas para direcionar sequências que não possuem uma sequência NGG PAM adjacente. As proteínas Cas9 exemplares com especificidades de sequência PAM ortogonais incluem, mas não são limitados a estas, CFP1, aquelas descritas em Nature Methods 10, 1116–1121 (2013), e aquelas descritas em Zetsche *et al*., Cell, Volume 163, Issue 3, p759–771, 22 October 2015.

[0083] Em alguns casos, a proteína Cas9 é uma nickase, tal que, quando ligada ao ácido nucleico alvo como parte de um complexo com um RNA guia, uma quebra ou lasca de fita simples é introduzida no ácido nucleico alvo. Um par de nickases Cas9, cada uma ligada a um RNA guia estruturalmente diferente, pode ser direcionado para dois sítios proximais de uma região genômica alvo e, assim, introduzir um par de quebras de fita simples única proximais na região genômica alvo. Os pares de nickase podem fornecer especificidade acentuada porque os efeitos inespecíficos provavelmente resultam em lascas únicas, que geralmente são reparadas sem lesão pelos mecanismos de reparo por excisão de base. As nickases Cas9 exemplares incluem nucleases Cas9 tendo uma mutação D10A ou H840A.

[0084] Em algumas modalidades, a RNP compreende uma

nuclease Cas9. Em algumas modalidades, a RNP compreende uma nickase Cas9. Em algumas modalidades, o complexo modelo de RNP-DNA compreende pelo menos dois complexos de RNP estruturalmente diferentes. Em algumas modalidades, os pelo menos dois complexos de RNP estruturalmente diferentes contêm domínios de nuclease Cas9 estruturalmente diferentes. Em algumas modalidades, os pelo menos dois complexos de RNP estruturalmente diferentes contêm RNAs guia estruturalmente diferentes. Em algumas modalidades, em que os pelo menos dois complexos de RNP estruturalmente diferentes contêm RNAs guia estruturalmente diferentes, cada um dos complexos de RNP estruturalmente diferentes compreende uma nickase Cas9, e os RNAs guia estruturalmente diferentes hibridam com filamentos opostos da região alvo.

[0085] Em alguns casos, uma pluralidade de modelos de RNP-DNA compreendendo complexos de ribonucleoproteínas estruturalmente diferentes é introduzida na célula. Por exemplo, uma proteína Cas9 pode ser complexada com uma pluralidade (por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou mais, por exemplo, 2 a 10, 5 a 100, 20 a 100) de RNAs guia estruturalmente diferentes para direcionar a inserção de um modelo de DNA em uma pluralidade de regiões genômicas alvo estruturalmente diferentes.

[0086] Nos métodos e composições aqui fornecidos, as células incluem, mas não são limitados a estas, células eucarióticas, células procarióticas, células animais, células vegetais, células fúngicas e similares. Opcionalmente, a célula é uma célula de mamífero, por exemplo, uma célula humana. A célula pode ser *in vitro, ex vivo* ou *in vivo*. A célula também pode ser uma célula primária, uma célula germinativa, uma célula-tronco ou uma célula precursora. A célula precursora pode ser, por exemplo, uma célula-tronco pluripotente ou uma célula-tronco hematopoiética. Em algumas modalidades, a célula

é uma célula hematopoiética primária ou uma célula-tronco hematopoiética primária. Em algumas modalidades, a célula hematopoiética primária é uma célula imune. Em algumas modalidades, a célula imune é uma célula T. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T reguladora, uma célula T efetora ou uma célula T ingênua. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T CD4+. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T CD8+. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T $CD4^+CD8^+$. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T $CD4^-$ $CD8^-$. Populações de qualquer uma das células modificadas por qualquer um dos métodos aqui descritos também são fornecidas. Em algumas modalidades, os métodos compreendem ainda a expansão da população de células modificadas.

[0087] Em alguns casos, as células são removidas de um indivíduo, modificadas utilizando qualquer um dos métodos descritos nesta invenção e administradas ao paciente. Em outros casos, qualquer uma das construções aqui descritas é liberada ao paciente *in vivo*. Ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº. 9737604 e Zhang et al. "Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy," *NPG Asia Materials* Volume 9, page e441 (2017).

[0088] Em algumas modalidades, o complexo modelo de RNP-DNA é introduzido em cerca de 1 x 10^5 a cerca de 2 x 10^6 células. Por exemplo, o complexo modelo de RNP-DNA pode ser introduzido em cerca de 1 x 10^5 a cerca de 5 x 10^5 células, cerca de 1 x 10^5 a cerca de 1 x 10^6, 1 x 10^5 a cerca de 1,5 x 10^6, 1 x 10^5 a cerca de 2 x 10^6, cerca de 1 x 10^6 a cerca de 1,5 x 10^6 células ou cerca de 1 x 10^6 a cerca de 2 x 10^6.

[0089] Em alguns casos, os métodos e composições descritos nesta invenção podem ser utilizados para geração, modificação, uso ou controle de células T recombinantes, tais como células T do

receptor de antígeno quimérico (células T CAR). Essas células T CAR podem ser utilizadas para tratar ou prevenir câncer, uma doença infecciosa ou doença autoimune em um indivíduo. Por exemplo, em algumas modalidades, um ou mais produtos gênicos são inseridos ou penetrados em uma célula T para expressar uma proteína heteróloga (por exemplo, um receptor de antígeno quimérico (CAR)).

Composições

[0090] Também é aqui fornecida uma pluralidade de células, em que o genoma de pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou mais das células compreendem uma inserção direcionada de um modelo de DNA heterólogo, em que o modelo de DNA tem pelo menos ao redor de 200 bps de tamanho. Em algumas modalidades, a pluralidade de células compreende células hematopoiéticas primárias ou células-tronco hematopoiéticas primárias. Em algumas modalidades, as células hematopoiéticas primárias são células imunes. Em algumas modalidades, as células imunes são células T. Em algumas modalidades, as células T são células T reguladoras, células T efetoras ou células T ingênuas. Em algumas modalidades, as células T são células T CD8+. Em algumas modalidades, as células T são células T CD4+CD8+.

[0091] São divulgados materiais, composições e componentes que podem ser utilizados, podem ser utilizados em conjunto, podem ser utilizados na preparação ou são produtos dos métodos e composições divulgados. Estes e outros materiais são aqui divulgados, e entende-se que quando as combinações, subconjuntos, interações, grupos etc. desses materiais são divulgadas, embora a referência específica de cada uma das várias combinações e permutações individuais e coletivas desses compostos não possa ser explicitamente divulgada, cada um é especificamente aqui contemplado e descrito. Por exemplo, se um método for divulgado e examinado e várias modificações que

podem ser feitas em uma ou mais moléculas, incluindo o método, são examinadas, cada uma e todas as combinações e permutações do método e as modificações possíveis são especificamente contempladas, a menos que seja especificamente indicado o contrário. Da mesma forma, qualquer subconjunto ou combinação destes também é especificamente contemplado e divulgado. Este conceito se aplica a todos os aspectos desta divulgação incluindo, mas não limitado a estes, etapas de métodos que utilizam as composições divulgadas. Assim, se houver uma variedade de etapas adicionais que possam ser executadas, entende-se que cada uma dessas etapas adicionais pode ser executada com qualquer etapa específica do método ou combinação de etapas do método dos métodos divulgados, e que cada uma dessas combinações ou subconjuntos de combinações é especificamente contemplada e deve ser considerada divulgada.

[0092] As publicações citadas nesta invenção e o material para o qual são citadas são aqui especificamente incorporadas por referência em sua totalidade.

EXEMPLOS

[0093] Os seguintes exemplos são fornecidos apenas com objetivo de ilustração e não a título de limitação. Aqueles de habilidade na técnica irão reconhecer facilmente uma variedade de parâmetros não críticos que podem ser alterados ou modificados para produzir essencialmente os mesmos resultados ou resultados semelhantes.

Exemplo I

[0094] Os dados fornecidos no Exemplo I foram gerados conforme delineado no protocolo abaixo.

- Protocolos clínicos/consentimento dos doadores foram estabelecidos.

- O isolamento das PBMCs foi executado com SepMate utilizando o protocolo do fabricante.
- O isolamento de células T em volume foi executado com o EasySep utilizando o protocolo do fabricante.
- O congelamento foi excutado com o meio Bambanker utilizando o protocolo do fabricante.
    - 20 milhões de células por ml
- Descongelamento.
    - 1 ml de Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) adicionado sobre a parte superior das células descongeladas, que foram então combinadas e lavadas em meio.
    - As células descansaram no meio somente durante a noite antes da estimulação.

Cultura de Células T Primárias

- Meio
    - RPMI + FBS 10%
    - XVivo15 + FBS 5%; ou
    - Imunocultura (sem soro)
        - Útil para o cultivo das células em um ambiente livre de soro
- Estimulação
    - Dynabeads magnéticos CD3/CD28 1:1
        - Relações de 0,25:1 até 2:1 podem ser utilizadas
        - A remoção de glóbulos magnéticos antes da eletroporação pode melhorar a eficiência
- Citocinas
        - Pré-eletroporação
        - IL-2 em 200 U/ml (essencial)
        - IL-7 em 5 ng/ml (não essencial)
        - IL-15 em 5 ng/ml (não essencial)

○ Pós-eletroporação

■ IL-2 em 500 U/ml (essencial)

● Densidade da cultura

○ Pré-eletroporação

■ 1 x 10^6 células por ml de meio de cultura

● Geralmente 1 ml em placas de 24 reservatórios, 30 ml no frasco T75 ou 70 ml no balão T175

○ Pós-eletroporação

■ Dia 0 - 0,25 10^6 células submetidas à eletroporação em 1 reservatório de placa de fundo redondo de 96 reservatórios em meio de 200 µl

■ Dia 2 - Os reservatórios foram enchidos até em cima com 100 µl de meio fresco (com citocinas pós-eletroporação na concentração 3X)

■ Dia 4 - Transferido para dentro do meio de 500 µl em placas de 48 reservatórios com citocinas frescas para outra expansão, subsequentemente dividido a cada 2 a 3 dias para manter em ~1 x 10^6 células por ml de cultura, a cada vez adicionando citocinas frescas

Produção de RNP

● 160 uM de crRNA misturado 1:1 com 160 uM de tracrRNA

○ estoques em alíquotas armazenados a -80°C

■ RNA liofilizado colocado novamente em suspensão em Tris-HCL (7,4 pH) com MgCl 150 mM

○ crRNA e tracrRNAs adquiridos da Dharmacon ou IDT, tracrRNA do respectivo fabricante sempre utilizado com seus crRNAs

● Incubado durante 30 minutos a 37°C

○ produz gRNA de 80 uM

● RNAm de 80 uM misturado 1:1 com Cas9 de 40 uM

○ Tubo misturado por punção lateral até que o precipitado de Cas9 entre em solução

● Incubado durante 15 minutos a 37°C

- Produz RNP 20 uM

● A RNP pode ser utilizada imediatamente, armazenada brevemente a 4°C antes do uso ou armazenada a longo prazo a -80°C e utilizada após o descongelamento

Produção de modelo de reparo direcionado à homologia (HDRT)

● Construção

- As sequências de HDRT foram construídas a partir de produtos da PCR e GeneBlocks (IDT) utilizando Gibson Assemblies para colocar o HDRT final, incluindo os ramos da homologia 5' e 3' e a inserção desejada em um vetor de clonagem para futura propagação

● Produção

- As sequências lineares do HDRT de dsDNA foram produzidas através da amplificação por PCR de alto rendimento (polimerase Kapa Hotstart)
- Os produtos amplificados de PCR foram purificados por SPRI e concentrados em um volume final de 4 µl de H_2O por 100 µl de entrada da reação de PCR
- As concentrações de HDRTs foram analisadas por nanodrop com uma diluição de 1:20
- A pureza foi avaliada por eletroforese em gel

Eletroporações de Células T Primárias

● Parâmetros de eletroporação

- Número de células - 1.000.000 (caindo para 200.000 ou tão alto quanto 2.000.000 irá funcionar)
- Volume celular - 20 µl (essa quantidade pode variar entre cerca de 10 µl e cerca de 20 µl)
  - As células giraram durante 10 minutos a 90G, aspiradas e colocadas novamente em suspensão no tampão de eletroporação imediatamente antes da eletroporação

○ Tampão de eletroporação - P3

■ Tampões alternativos, incluindo P2 e OMEM também funcionam, mas têm diferentes códigos de pulso ideais

■ O tampão P2 produz maior viabilidade com eficiência mais baixa, mas número total semelhante de células positivas

■ O tampão OMEM com código de pulso ideal (EO155) produz viabilidades e eficiências semelhantes como P3 com seu código de pulso ideal

○ Volume de RNP - ao redor de 5 µl (50 pmoles)

■ Caindo para 1 µl (20 pmoles) e tão elevado quanto 5 µl (100 pmoles) produzem efeito

■ A quantidade ideal de RNP varia com a quantidade de HDRT, no entanto, uma relação molar exemplar de aproximadamente 10:1 RNP para HDRT funciona.

○ Volume Total de HDRT - ao redor de 1 µl

■ Os volumes podem variar entre cerca de 0,5 µl e cerca de 2 µl.

○ Quantidade Total de HDRT - ao redor de 5 pmoles

■ Quantidades mais baixas e mais elevadas são possíveis com eficiências variáveis

○ Volume total de eletroporação - ao redor de 24 µl

○ Código de pulso - EH115

■ Muitos outros códigos de pulso são possíveis, mas o EH115 provou ser o mais eficiente

● Protocolo de Eletroporação

○ Em primeiro lugar, os HDRTs foram divididos em alíquotas nos reservatórios de uma placa de polipropileno em fundo V de 96 reservatórios correspondendo aos reservatórios da placa de eletroporação de 96 reservatórios

○ A RNP indicada foi então adicionada de maneira semelhante à placa de fundo V de polipropileno de 96 reservatórios

○ HDRTs e RNPs foram incubados juntos na RT durante 5 minutos

■ Apenas 30 segundos não mostram diferença na eficácia

■ É importante que o HDRT e a RNP sejam incubados juntos antes das células serem adicionadas

○ Finalmente, as células foram colocadas novamente em suspensão no tampão de eletroporação e 20 µL de células foram adicionadas a cada reservatório da placa de polipropileno em fundo V de 96 reservatórios e misturadas com pipeta para cima e para baixo três vezes com o HDRT e a RNP já no reservatório

○ 24 µl de mistura Célula+RNP+HDRT foram transferidos de cada reservatório para dentro do reservatório correspondente da placa de eletroporação de 96 reservatórios para eletroporação

● Manipulação pós-eletroporação

○ Imediatamente após a eletroporação, 80 µl de meio pré-aquecido foram adicionados a cada reservatório da placa de eletroporação

○ A placa foi incubada em uma incubadora a 37 ºC durante 15 minutos

■ Nenhuma incubação pós-eletroporação foi ligeiramente menos eficiente. Incubações de ao redor de 15 minutos a cerca de 60 minutos são possíveis sem perda de eficiência.

○ As células foram transferidas da placa de eletroporação para as placas de cultura nas densidades descritas acima

■ Geralmente, a placa de eletroporação foi dividida em 4 placas idênticas de 96 reservatórios com fundo redondo, pré-carregadas de meio e citocinas.

Resultados

[0095] Seria útil criar construções de DNA mais longas, por exemplo, utilizando a PCR para produzir construções lineares de

dsDNA que levam em conta grandes tamanhos de inserção (> 1 kb). Isso pode ser feito com alto rendimento, no entanto, até a presente invenção, isso não foi possível porque a introdução do DNA é altamente tóxica e leva à morte celular maciça. Como mostrada na Figura 1, nas concentrações necessárias de DNA nu para obter uma eficiência de edição viável, a viabilidade celular é tão baixa que o método não é viável.

Modelos de DNA longo complexantes com as RNPs resgatando a viabilidade celular

[0096] Quando a eletroporação de uma quantidade de dsDNA longo (dsDNA plasmídeo ou linear) que provoca grandes quantidades de morte celular, os inventores descobriram que complexar o DNA com uma RNP para formar um complexo modelo de RNP-DNA (por uma breve incubação na temperatura ambiente, antes da adição de células quando da eletroporação) reduz a perda de viabilidade. Isso era verdade para modelos de plasmídeo (Figura 2) e modelos lineares de dsDNA (Figura 3). À medida que a quantidade de DNA submetida à eletroporação aumenta, a quantidade de RNP também aumenta para manter a viabilidade (Figura 3).

Relações de Cas9 para o modelo de DNA com relação à viabilidade e eficiência da integração

[0097] Uma relação molar ao redor de 10:1 de RNP para modelo de DNA manteve tanto a eficiência da integração quanto a viabilidade pós-eletroporação (Figura 4). No entanto, as relações que variam de 3:1 a cerca de 100:1 também funcionaram. O uso de uma relação ao redor de 10:1 de RNP para o modelo de DNA equilibrou os efeitos da perda de viabilidade e eficiência e alcançou o número máximo de células positivas para integração (Figura 5). Essa relação também levou em conta a inserção de alta eficiência de modelos grandes (> 750 bps) (Figura 6).

Os modelos dsDNA possuem algumas integrações inespecíficas, que são reduzidas utilizando modelos de ssDNA

[0098] A inserção de modelos de DNA longos pode resultar em uma pequena quantidade de integração inespecífica (Figura 7), que é semelhante à integração inespecífica observada quando se utiliza um AAV como modelo doador. No entanto, alguns dos métodos aqui fornecidos utilizam um modelo de ssDNA longo como o doador, o que resulta em integrações inespecíficas reduzidas (Figura 8).

Uso de um Nickase Cas9 evita quebras de dsDNA fora do alvo

[0099] Outro problema, além das integrações inespecíficas, são as quebras de dsDNA fora do alvo (que podem ser reparadas pelo NHEJ como mutações) introduzidas pela Cas9. Conforme mostrado nesta invenção, as integrações não virais de alta eficiência aqui divulgadas podem ser inseridas utilizando dois gRNAs e uma nickase Cas9 (D10A) (Figura 9), que evita quebras de dsDNA fora do alvo.

Exemplo II

Isolamento de Células T Primárias Humanas para o Direcionamento de Genes

[00100] As células T humanas primárias foram isoladas de doadores humanos saudáveis de amostras de sangue total frescas, resíduos de câmaras de leucorredução após Trima Apheresis (Blood Centers of the Pacific) ou produtos de leucaférese (StemCell). As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas de amostras de sangue total por centrifugação Ficoll utilizando tubos SepMate (STEMCELL, de acordo com as instruções do fabricante). As células T foram isoladas das PBMCs de todas as fontes de células através da seleção magnética negativa utilizando um EasySep Human T Cell Isolation Kit (STEMCELL, de acordo com as instruções do fabricante). Salvo indicação em contrário, as células T isoladas foram estimuladas e utilizadas diretamente (frescas). Quando as células

congeladas foram utilizadas, as células T previamente isoladas que foram congeladas em meio de congelamento Bambanker (Bulldog Bio) de acordo com as instruções do fabricante foram descongeladas, cultivadas em meio sem estimulação durante 1 dia e, em seguida, estimuladas e manipuladas como descrito para amostras recentemente isoladas. Doadores de sangue humanos saudáveis frescos foram consentidos sob protocolo aprovado pelo UCSF Committee on Human Research (CHR). As amostras de pacientes para a edição de genes foram obtidas sob um protocolo aprovado pelo Yale Internal Review Board (IRB).

Cultura de Células T Primárias

[00101] A menos que indicado de outra forma, as células T em volume foram cultivadas em meio XVivo15 (STEMCELL) com soro bovino fetal a 5%, 2-mercaptoetanol 50 mM e N-acetil L-cistina 10 mM. Meios livres de soro (meio de expansão de células T ImmunoCult XF, STEMCELL) sem aditivos, assim como RPMI + FBS 10%, foram utilizados nas experiências indicadas (Figura 15). Imediatamente após o isolamento, as células T foram estimuladas durante 2 dias com Dynabeads magnéticos CD3/CD28 anti-humanos (ThermoFisher) em uma concentração de glóbulos para células de 1:1, juntamente com um coquetel de citocinas de IL-2 em 200 U/ml (UCSF Pharmacy), IL-7 em 5 ng/ml (ThermoFisher) e IL-15 em 5 ng/ml (Life Tech). Após a eletroporação, as células T foram cultivadas em meio com IL-2 em 500 U/ml. Durante toda a cultura, as células T foram mantidas em uma densidade aproximada de 1 milhão de células por ml de meio. A cada 2 a 3 dias após a eletroporação, meio adicional foi adicionado, juntamente com IL-2 fresca adicional para levar a concentração final para 500 U/ml, e as células foram transferidas para vasos de cultura maiores conforme necessário para manter uma densidade de 1 milhão de células/ml.

Produção de RNP

[00102] As RNPs foram produzidas pelo recozimento de um gRNA de dois componentes na Cas9, como descrito anteriormente (7, 16). Resumidamente, os crRNAs e os tracrRNAs foram quimicamente sintetizados (Dharmacon, IDT) e Cas9-NLS, D10A-NLS ou dCas9-NLS recombinante foram produzidos e purificados recombinantemente (QB3 Macrolab). O RNA liofilizado foi colocado novamente em suspensão em Tris-HCL (pH 7,4) com KCl 150 mM em uma concentração de 160 uM e armazenado em alíquotas a -80°C. As alíquotas de crRNA e tracrRNA foram descongeladas, misturadas 1:1 em volume e incubadas a 37°C durante 30 min para formar uma solução de gRNA a 80 uM. A Cas9 recombinante e variantes, armazenadas em 40 uM em HEPES-KOH 20 mM, pH 7,5, KCl 150 mM, glicerol a 10%, DTT 1 mM, foram então misturadas 1:1 em volume com o gRNA 80 uM (relação molar de gRNA para Cas9 2:1) a 37°C durante 15 min para formar uma RNP em 20 µM. As RNPs foram geralmente submetidas à eletroporação imediatamente após a complexação.

Produção de HDRTde dsDNA

[00103] Sequências de HDRT de DNA de fita dupla foram geradas a partir de produtos da PCR. Novas sequências de HDR foram construídas utilizando Gibson Assemblies para colocar a sequência modelo de HDR, que consiste do ramos da homologia (comumente sintetizados como gBlocks da IDT) e da inserção desejada (tal como GFP) em um vetor de clonagem para confirmação de sequência e futura propagação. Estes plasmídeos foram utilizados como modelos para amplificação por PCR de alto rendimento (polimerase Kapa Hotstart). Os produtos amplificados da PCR (o HDRT de dsDNA) foram purificados por SPRI (1,0X) e eluídos para um volume final de 3 µl de H_2O por 100 µL de entrada da reação PCR. As concentrações de

HDRTs foram analisadas por nanodrop com uma diluição de 1:20. O tamanho do HDRT amplificado foi confirmado por eletroforese em gel em um gel de agarose a 1,0%.

Produção de HDRT de ssDNA por Digestão de Exonuclease

[00104] Para produzir ssDNA longo como doadores de HDR, o DNA de interesse foi amplificado por meio da PCR utilizando um iniciador de PCR regular não modificado e um segundo iniciador de PCR fosforilado. A fita de DNA que será amplificada utilizando o iniciador fosforilado será a fita que será degradada utilizando esse método. Isto permite preparar um DNA de sentido positivo de fita simples ou antissentido de fita simples utilizando o respectivo iniciador de PCR fosforilado. Para produzir a fita de ssDNA de interesse, a fita fosforilada do produto de PCR foi degradada por meio do tratamento subsequente com duas enzimas, Strandase Mix A e Strandase Mix B, durante 5 minutos (por 1 kb) a 37°C, respectivamente. As enzimas foram desativadas por uma incubação de 5 minutos a 80°C. Os modelos de HDR de ssDNA resultantes foram purificados por SPRI (1,0X) e eluídos em H2O. Um protocolo mais detalhado para o Guide-it™ Long ssDNA Production System (Takara Bio USA, Inc. #632644) pode ser encontrado no site da Internet do fabricante.

Produção de HDRT de ssDNA através da Síntese Inversa

[00105] Doadores de ssDNA foram sintetizados por transcrição reversa de um intermediário de RNA seguido pela hidrólise da fita de RNA no produto híbrido RNA:DNA resultante, conforme descrito em (28). Resumidamente, o doador de HDR desejado foi em primeiro lugar clonado a jusante de um promotor de T7 e a sequência de doador de T7-HDR amplificada por PCR. O RNA foi sintetizado pela transcrição in vitro utilizando a RNA polimerase HiScribe T7 (New England Biolabs) e transcrito reversamente utilizando TGIRT-III (InGex). Após a transcrição reversa, NaOH e EDTA foram adicionados

em 0,2 M e 0,1 M, respectivamente, e a hidrólise do RNA foi realizada a 95°C durante 10 min. A reação foi suprimida com HCl, o produto final de ssDNA purificado usando glóbulos magnéticos Ampure XP (Beckman Coulter) e eluído em H2O livre de RNAse estéril. A qualidade do ssDNA foi analisada por eletroforese capilar (Bioanalyzer, Agilent).

Eletroporações de Células T Primárias

[00106] As RNPs e os modelos de HDR foram submetidos à eletroporação 2 dias após a estimulação inicial das células T. As células T foram colhidas de seus vasos de cultura e as Dynabeads CD3/CD28 magnéticas foram removidas mediante a colocação das células em um ímã durante 2 minutos. Imediatamente antes da eletroporação, as células que não formaram glóbulos foram centrifugadas durante 10 minutos em 90 g, aspiradas e colocadas novamente em suspensão no tampão de eletroporação Lonza P3 em 20 µl de tampão por milhão de células. Para uma edição ideal, um milhão de células T foram submetidas à eletroporação por reservatório utilizando um sistema de eletroporação Lonza 4D de 96 reservatórios com código de pulso EH115. Concentrações de células alternativas de 200.000 a 2 milhões de células por reservatório apresentaram eficiências mais baixas. Tampões de eletroporação alternativos foram utilizados conforme indicado, mas tinham configurações de pulso ideais diferentes (EO155 para tampão OMEM). A menos que indicado de outro modo, 2,5 µl de RNPs (50 pmoles no total) foram submetidos à eletroporação, juntamente com 2 µl de modelo de HDR em 2 µg/µL (4 µg de Modelo de HDR total).

[00107] A ordem da adição de células, RNP e HDRT parecia ter importância (Figura 10). Para experimentos de 96 reservatórios, os HDRTs foram divididos em alíquotas em reservatórios de uma placa de fundo em V de 96 reservatórios de polipropileno. As RNPs foram

então adicionadas aos HDRTs e deixados incubar entre si na RT durante pelo menos 30 segundos. Finalmente, células colocadas novamente em suspensão em tampão de eletroporação foram adicionadas, misturadas rapidamente por pipeta com HDRT e RNP, e 24 µl de volume total (células + RNP + HDRT) foram transferidos para uma placa de cubeta de eletroporação com 96 reservatórios. Imediatamente após a eletroporação, 80 µl de meio pré-aquecido (sem citocinas) foram adicionados a cada reservatório e as células foram deixadas em repouso durante 15 minutos a 37 °C em uma incubadora de cultura de células enquanto permanecem nas cubetas de eletroporação. Após 15 minutos, as células foram movidas para os vasos de cultura final.

Citometria de Fluxo

[00108] A análise citométrica de fluxo foi executada em um Attune NxT Accustic Focusing Cytometer (ThermoFisher). Coloração de superfície por CD3-APC-eFluor 780 (SK7, eBiosciences), CD4-PerCP (SK3, Tonbo), CD8-PE-Cy7 (SK1, BD), IL2RA/CD25-APC (BC96, Tonbo). A coloração de fosforilação intracelular foi executada utilizando pStat5(Y694)-PacBlue (clone 47, BD). A coloração de citocina intracelular para FoxP3 foi executada utilizando FoxP3-AF488 (206D, Biolegend).

Microscopia Confocal

[00109] As amostras foram preparadas pela fundição em gotas de 10 µl de solução de células T colocada em suspensão em uma lâmina de microscópio 3x1" em que uma lamela de 25 mm2 foi colocada. A formação de imagens foi executada em um microscópio confocal de varredura a laser Nikon A1r de configuração vertical. A excitação foi alcançada através de um laser OBIS de 488 nm (coerente). Uma objetiva de imersão em água 60X Plan Apo 1.20 NA de longa distância de trabalho (LWD) foi utilizada com zoom digital adicional obtido

através do software NIS-Elements. As imagens foram adquiridas sob as configurações de espelho "Galvano" com a média de linha de 2x ativada e exportada como TIFF para ser analisada no FIJI (ImageJ, NIH).

CORTE E EXECUÇÃO

[00110] CUT&RUN foi executado nas células T primárias humanas marcadas com epítopo 11 dias após a eletroporação e 4 dias após a re-estimulação com glóbulos anti-CD3/anti-CD28 (as células não marcadas não foram submetidas à eletroporação). Aproximadamente 20% e 10% das células submetidas à eletroporação apresentaram expressão de GFP-BATF conforme determinado por citometria de fluxo nas amostras de doador 1 e doador 2, respectivamente. O CUT&RUN foi executado conforme descrito em (18) utilizando anticorpos anti-GFP (ab290), anti-BATF (sc-100974) e anticamundongo de coelho (ab46540). Resumidamente, 6 milhões de células (30 milhões de células para anti-GFP CUT&RUN em células contendo GFP-BATF) foram coletadas e lavadas. Os núcleos foram isolados e incubados em rotação com anticorpo primário (GFP ou BATF) durante duas horas a 4°C. As amostras BATF CUT&RUN foram incubadas uma hora adicional com anticorpo anticamundongo de coelho. Em seguida, os núcleos foram incubados com nuclease de proteína A-micrococica (gentilmente fornecida pelo laboratório Henikoff) durante uma hora a 4°C. Os núcleos foram equilibrados a 0°C e a digestão com MNase foi deixada prosseguir durante 30 minutos. Os fragmentos CUT&RUN da cromatina solubilizada foram isolados e purificados. As bibliotecas de sequenciamento de extremidade pareada foram preparadas e executadas em máquinas Illumina Nextseq e os dados de sequenciamento foram processados conforme descrito em Skene and Henikoff, "An efficient targeted nuclease strategy for high resolution mapping of DNA binding sites,"

Elife 6 (2017) doi: 10.7554/eLife.21856. Para chamadas de pico e geração de mapa de calor, o mapeamento de leituras para centrômeros foi filtrado.

Sequenciamento de TLA e análise

[00111] O sequenciamento de TLA foi executado por Cergentis, conforme descrito anteriormente[16]. Da mesma forma, a análise de dados dos sítios de integração e fusões de transgene foi executada por Cergentis, conforme descrito anteriormente[16]. O sequenciamento de TLA foi executado em dois doadores saudáveis, cada um editado na posição RAB11A com um modelo de HDR de dsDNA ou ssDNA para integrar uma fusão de GFP. As leituras de sequenciamento que mostram evidências de dímeros de iniciador ou influência de iniciador (isto é, mais de 99% das leituras observadas vieram de conjunto de iniciadores) foram removidas.

Ensaio de supressão de Treg in vitro

[00112] As células T CD4+ foram enriquecidas utilizando o kit de enriquecimento de células T CD4+ EasySep Human (STEMCELL Technologies). As células enriquecidas com Treg CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+ de indivíduos com deficiência de IL2RA e HD, assim como as Tregs CD3+CD4+CD25hiCD127lo de indivíduos CD25+/- foram classificadas por citometria de fluxo. As células T respondedoras CD3+CD4+CD25-CD127+ (Tresps) foram marcadas com CellTrace CFSE (Invitrogen) em 5 μM. Tregs e HD Tresps foram cocultivados na relação de 1:1 na presença de glóbulos carregados com anti-CD2, anti-CD3 e anti-CD28 (Treg Suppression Inspector; Miltenyi Biotec) na relação de 1 glóbulo: 1 célula. Nos dias 3,5 a 4,5, as coculturas foram analisadas por FACS com relação à diluição de CFSE. A % de inibição é calculada utilizando a seguinte fórmula: 1 - (% de proliferação com Tregs /% de proliferação de Tresps estimuladas sem Tregs).

Classificação e análise TSDR de Tregs corrigidos

[00113] As células Tregs e efetoras T ex vivo expandidas de um controle saudável e um paciente com mutações heterozigotas do composto IL2RA (D6) foram descongeladas e coradas. As células vivas foram classificadas com base na expressão dos marcadores CD25 e CD62L diretamente em ZymoResearch M-digestion Buffer (2x) (cat# D5021-9) suplementado com proteinase K. O lisado foi incubado a 65°C durante mais de duas horas e depois congelado. A conversão de bissulfito e a pirosequenciamento das amostras foram executadas por EpigenDx (ensaio ID ADS783-FS2) para interrogar o status de metilação de 9 sítios CpG no íntron 1 do gene FOXP3, abrangendo -2330 a -2263 a partir de ATG.

Modelo de previsão da integração heterozigoto/homozigoto

[00114] Uma estimativa da porcentagem de células com inserções bi-alélicas em uma posição genômica autossômica isolada (dois alelos em potencial) pode ser efetuada apenas de fenótipos fluorescentes se dois modelos de HDR que integram as proteínas fluorescentes diferentes no mesmo local forem introduzidos na célula (submetidos à eletroporação). Um modelo de probabilidade simples requer apenas duas admissões.

Admissão 1: Não existe nenhuma integração inespecífica em outros sítios além da posição alvo que contribuem para os fenótipos fluorescentes.

Admissão 2: A integração de uma segunda proteína fluorescente específica (isto é, RFP) não depende de qual proteína fluorescente foi integrada no outro alelo da célula (isto é, integrações de GFP ou RFP no primeiro alelo são igualmente prováveis de ter uma integração de RFP no segundo).

[00115] Após a marcação na Figura 26A-C, as porcentagens de quatro populações fenotípicas diferentes são conhecidas:

- % GFP^-RFP^-
- % GFP^+RFP^-
- % GFP^-RFP^+
- % GFP^+RFP^+

[00116] Destes, imediatamente dois genótipos são conhecidos:

1) Genótipo A = NA/NA = % GFP-RFP-

2) Genótipo E = GFP/RFP =% GFP^+RFP^+

[00117] Os quatro genótipos remanescentes se somam aos dois fenótipos de flúor únicos positivos remanescentes:

3) Genótipo B + Genótipo D = GFP/NA + GFP/GFP = % GFP^+RFP^-

4) Genótipo C + Genótipo F = RFP/NA + RFP/RFP = % GFP^-RFP^+

[00118] As probabilidades de que uma célula RFP+ também seja GFP+ e vice-versa, também são conhecidas dos fenótipos:

5) Probabilidade de ser GFP^+ sendo RFP^+ = P (GFP|RFP) = (% GFP^+RFP^+) / (% RFP^+ + % GFP^+RFP^+)

6) Probabilidade de ser RFP^+ sendo GFP^+ = P (RFP|GFP) = (% GFP^+RFP^+) / (% GFP^+ + % GFP^+RFP^+)

[00119] Após a admissão 2, se a probabilidade de que uma célula recebe uma integração GFP em seu segundo alelo for independente da primeira integração que foi uma GFP ou RFP, então uma conexão entre os genótipos positivos únicos pode ser determinada (Fig.26):

7) D = P(GFP|RFP) * B

8) F = P(RFP|GFP) * C

[00120] A inserção das equações 7 e 8 nas equações 3 e 4, respectivamente, e simplificar as resoluções para os genótipos remanescentes em termos dos fenótipos conhecidos:

9) B = % GFP^+RFP^- / (1 + (% GFP^+RFP^+) / (% RFP^+ + %GFP^+RFP^+))

10) C = % GFP^-RFP^+ / (1 + (% GFP^+RFP^+) / (% GFP^+ + %GFP^+RFP^+))

11) D = % GFP^+RFP^-- B

12) F = % GFP^-RFP^+ - C

[00121] A partir dos genótipos conhecidos, a % observada de células que possuem inserções mono-alélicas ou bi-alélicas, assim como outras estatísticas, pode ser facilmente calculada:

- % de células heterozigotas observadaa = B + C
- % de células homozigotas observadas = D + E + F
- % de células observadas com pelo menos 1 inserção = B + C + D + E + F = 1 - A = 1 - % GFP-RFP-
- % de alelos observados que possuem GFP = (B + E + 2D) / 2
- % de alelos observados que possuem RNP = (C + E + 2F) / 2
- % de alelos observados com uma inserção = % de $Alelos_{GFP}$ + % de $Alelos_{RFP}$

[00122] Uma % esperada de células homozigotas se os alelos de HDR foram distribuídos aleatoriamente (em essência no Hardy-Weinberg Equilibrium), pode ser calculada a partir da % observada de células com pelo menos uma inserção (HDR):

- p = alelo de HDR (GFP ou RFP)
- q = alelo não HDR (NA)
- X = % de células observadas de ter pelo menos um HDR

13) $p + q = 1$

14) $p^2 + 2*p*q + q^2 = 1$

[00123] Como qualquer célula que possua um alelo de HDR (GFP ou RFP) irá mostrar o fenótipo (neste caso, GFP+ ou RFP+):

15) $X = p^2 + 2*p*q$

[00124] Substituição de X na equação 14 e simplificação:

16) $q = (1 - X)^{½}$

17) $p = 1 - q$

18) $p = 1 - (1 - X)^{½}$

p2 dará então a % esperada de células homozigotas para a integração de HDR se a inserção do modelo de HDR for aleatória entre os alelos alvo:

19) $p^2 = 2 - 2 (1 - X)^{½} - X$

[00125] Visto que o X é conhecido, a % esperada de células homozigotas pode ser calculada diretamente da % total observada de células com pelo menos um HDR e, em seguida, pode ser comparada a % observada de células homozigotas calculadas, levando em consideração as informações fornecidas através da integração de dois fluoróforos separados.

Histórico Clínico de Família com Autoimunidade/Desregulação Imune

[00126] O probando é um bebê caucasiano que se apresentou com 15 semanas de idade após que vômitos, agitação e taquipnéia a levou a uma avaliação médica que revelou cetoacidose diabética grave e nível de glicose no soro de 920 mg/dL. Uma semana após o diagnóstico, o teste para GAD65, IA-2 e autoanticorpos insulínicos foi negativo; no entanto, o diabetes autoimune foi confirmado quando testes repetidos de anticorpos aos 5 a 7 meses de idade em três laboratórios diferentes mostraram resultados positivos para autoanticorpos IA-2 e insulina, assim como níveis muito altos de anticorpos GAD65 em dois dos laboratórios [42,8 nmol/L (< 0,02) nos Mayo Laboratories e 896 IU/mL (0,0 a 5,0) no Barbara Davis Center]. Os testes para disfunção tireoidiana e doença celíaca foram negativos, mas níveis de IgA levemente baixos sugerem deficiência parcial de IgA. O teste do C-peptídeo foi repetidamente de forma completa indetectável, inclusive aos 7 meses de idade, quando medido 90 minutos após uma

alimentação com um nível sérico de glicose de 202 mg/dL, momento em que a pró-insulina também era indetectável. Após a DKA ter sido tratada com insulina intravenosa, ele recebeu alta das múltiplas injeções diárias de insulina subcutânea (glargina e lispro) inicialmente e depois transitada para uma bomba de insulina com monitoramento contínuo da glicose. Ele exigiu consistentemente uma alta dose de reposição de insulina na faixa de 0,8 a 0,9 unidades/kg/dia (48% basal aos 7 meses de idade). Ele foi liberado da c-seção repetida com 37 semanas de gestação, com um peso de nascimento de 3.629 kg (percentil 75), sem complicações, e não houve preocupações sobre seu progresso no desenvolvimento e seu histórico médico não era digno de nota. Seus pais têm ascendência caucasiana díspar e negaram consanguinidade.

[00127] Informações clínicas sobre membros da família são fornecidas na Tabela 1. Informações mais detalhadas são as seguintes:

1. Mãe (37):

a. Pneumonia quando criança - explicada como viral

b. Infecções de ouvido em crianças tratadas com antibióticos

c. Problemas dentários (talvez relacionados a antibióticos)

d. O pai dela desenvolveu diabetes dependente de insulina aos 30 anos. Ele tinha um baixo WBC e também apresentava dermatite numular do couro cabeludo.

e A mãe dela tinha lúpus

2. Pai (44)

a. Descendência marroquina

b. Sem grandes problemas médicos

c. Alguma preocupação possível é que seu tempo de resposta a infecções virais comuns possa ser prolongado.

3. Criança afetada (14)

a. Púrpura trombocitopênica imune: (+ anticorpos antiplaquetários)

b. Neutropenia (anti-neutrófilo Ab)

c. Anemia hemolítica auto-imune (DAT + isto é, Coombs direto+)

d. Dermatite numular do couro cabeludo

e. Medula óssea hipercelular: relação CD4/CD8 invertida (0,36).

f. Úlceras na boca

g. Infecções do ouvido tratadas com tubos

h. Diarréia quando criança

i. 46XX - nenhuma anormalidade cromossômica conhecida

j. Citometria de fluxo do sangue periférico: 82,7% das células CD45+ são CD3+ e 5,9% são CD19+. As células CD19+CD5+ são as células B deficientes. 43,6% das células CD45+ são CD8+ com uma relação CD4/CD8 invertida (0,6). Há um aumento relativo nos linfócitos T TCR (alfa beta)+ CD3+ CD4- CD8- (26% das células TCR alfa beta+ CD3+ e 5% dos leucócitos CD45+).

k) Foi tratado com imunossupressão, incluindo prednisona (20 mg), IgG-pro-IgA, pulverização nasal com Flonase e esteróides tópicos e Symbicort. Também tratado com Neupogen.

4. Criança afetada

a. 3+ autoanticorpos para diabetes (anti-GAD, MIAA, ICA, ZnT8 negativo e ICA512/IA-2) OGTT normal

b. Infecções de ouvido tratadas com tubos a 1 ano.

c. Eczema no inverno

5. Filha não afetada (15)

a. Alergias, mas saudáveis

6. Filho afetado (4)

a. Eczema no inverno

b. Teste positivo para HSV

c. Diabetes dependente de insulina no primeiro ano de vida, peptídeo C < 0,1 na apresentação, anti-GAD ab+ (> 30 (nl <1U/ml) 1 ano após dx, mas negativo em dx, ICA512 Ab+ (1,3 (nl <1,0)) 1 ano após dx, mas negativo em dx.

7. Filha não afetada (9)

a. Asma

Teste Genético para Identificar Mutações IL2RA

[00128] O teste genético inicial do probando utilizando um painel multigênico de sequenciamento de próxima geração direcionado interno de mais de 40 genes conhecidos de estar envolvido em formas monogênicas de diabetes foi negativo. O sequenciamento subsequente do exoma no trio de probando pf e nos pais revelou as mutações heterozigotas do composto causativo no gene IL2RA. Dois irmãos carregam apenas uma mutação, mas os outros dois com ambas as mutações possuem evidência de autoimunidade: um irmão mais velho do sexo masculino (aos 4 ou 5 anos de idade) apresentou autoanticorpos positivos para diabetes na ausência de hiperglicemia e um irmão mais velho do sexo feminino foi diagnosticado com pancitopenia mediada autoimune aos 11 anos de idade. A expressão de CD25 foi marcadamente reduzida nas três crianças heterozigotas compostas.

Fenotipagem Clínica de Pacientes com IL2RA

[00129] As crianças com deficiência de CD25 possuem uma perda quase completa da expressão da superfície celular de IL2-RA nas células T e, portanto, praticamente nenhuma Treg CD3+CD4+CD25hiCD127lo detectável em seu sangue, enquanto que os familiares parentes que carregam a mutação heterozigótica de

IL2RA apresentam uma expressão diminuída de CD25 diminuída no seus Tregs (Figura 34). No entanto, as frequências de células T CD3+CD4+CD127loFOXP3+ em indivíduos com deficiência de CD25 se assemelham àqueles em indivíduos HD e CD25+/-, sugerindo assim que as Tregs podem se desenvolver na ausência da função de IL2-Ra (Figura 34). Utilizando uma estratégia para isolar Tregs sem expressão de CD25, descobrimos que células enriquecidas com CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+ Treg de indivíduos com deficiência de CD25 apresentaram uma capacidade defeituosa de suprimir a proliferação de células T respondedoras (Tresps) em comparação com as contrapartes de HD (Figura 34). Por outro lado, Tregs de parentes com uma única mutação heterozigótica de IL2RA podem inibir a proliferação de Tresp, embora com capacidade abaixo do ideal (Figura 34). Portanto, a correção da expressão funcional de IL2-Ra na superfície das células T FOXP3+ desses pacientes pode representar uma abordagem valiosa para o desenvolvimento de uma terapia gênica *ex vivo*.

Resultados

[00130] As células T humanas podem ser purificadas a partir do sangue, manipuladas ex vivo e depois retornadas à circulação através de transplante autólogo. As células T planejadas estão sendo desenvolvidas para tratar o câncer e as doenças infecciosas (Fesnak et al. "Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy," Nat. Rev. Cancer 16, 566–581 (2016); e Esensten et al. "Engineering Therapeutic T Cells: From Synthetic Biology to Clinical Trials," Annu. Rev. Pathol. 12, 305–330 (2017)).

[00131] Esses tratamentos baseados em células dependem da capacidade de reprogramar geneticamente as células T, por exemplo, aumentar sua capacidade de reconhecer e atacar antígenos específicos (Roybal et al. "Synthetic Immunology: Hacking Immune

Cells to Expand Their Therapeutic Capabilities," *Annu. Rev. Immunol.* 35, 229–253 (2017). As terapias baseadas em células que envolvem células T reguladoras modificadas (Tregs) projetadas para suprimir a inflamação estão sendo desenvolvidas para doenças autoimunes e transplante de órgãos (Bluestone et al. "Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells," *Sci. Transl. Med.* 7, 315ra189 (2015).

[00132] Uma variedade de abordagens tem sido utilizada para modificar os genomas das células T humanas primárias. Sequências longas de DNA (múltiplas quilobases) podem ser inseridas utilizando vetores lentivirais, mas os sítios de integração não são direcionados (Verhoeyen et al. in Methods in Molecular Biology (2009), pp. 97-114). Os lentivírus têm sido o principal meio para introduzir construções genéticas tais como receptores de antígeno quiméricos (CARs) (Kalos et al.,"T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia" Sci. Transl. Med. 3, 95ra73 (2011). Para neutralizar os genes endógenos específicos, nucleases específicas da sequência tais como Cas9, TALEN ou nuclease de dedo de zinco (ZFN) podem ser submetidas à eletroporação em células T (Schumann et al., "Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribo nucleoproteins," *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 112, 10437–10442 (2015); e Perez et al. "Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases," *Nat. Biotechnol.* 26, 808–816 (2008)) gerando quebras de fita dupla que resultam em um espectro não aleatório de inserções e mutações de exclusão por meio da junção final não homóloga (NHEJ) (van Overbeek et al., "DNA Repair Profiling Reveals Nonrandom Outcomes at Cas9-Mediated Breaks," *Mol. Cell.* 63, 633–646 (2016). Co-delivery of small (<200 bp) chemically synthesized ssDNA oligos

(ssODNs) that have homology to the sequences flanking a specific nuclease cleavage site has been used to modify short DNA sequences via homology directed repair (Schumann et al. (2015)).

[00133] A integração direcionada de seqüências de DNA muito mais longas permitiria aplicações mais diversas. Isso foi recentemente alcançado através da eletroporação de uma nuclease específica da sequência seguida de infecção com um vetor adeno-associado (AAV) deficiente em integrase contendo um modelo de HDR (Sather et al., "Efficient modification of CCR5 in primary human hematopoietic cells using a megaTAL nuclease and AAV donor template," *Sci. Transl. Med.* 7, 307ra156 (2015); e Hubbard et al. "Targeted gene editing restores regulated CD40L function in X-linked hyper-IgM syndrome." *Blood* 127, 2513-2522 (2016)). Essa abordagem de eletroporação e infecção permitiu novas estratégias terapêuticas de planejamento de células T (Eyquem et al., "Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection," *Nature* 543, 113–117 (2017)), mas provoca integrações inespecíficas, requer uma infecção viral potencialmente indesejável e é limitada no rendimento devido a desafios na produção viral.

[00134] Condições de cultura de células, concentrações de modelos de RNPs Cas9 e HDR e parâmetros de eletroporação foram testados para desenvolver métodos para o direcionamento genômico não viral de alta eficiência. As condições em que altas concentrações de RNPs Cas9 e modelos de DNA longos (> 1 Kb) podem ser co-liberadas em múltiplas posições nas células T humanas primárias com efeitos limitados na viabilidade celular foram identificadas.

[00135] O direcionamento não viral pode ser utilizado para corrigir uma mutação patogênica que provoca disfunção de Treg e doença autoimune monogênica. É aqui descrita uma família em que duas crianças desenvolveram doença autoimune de início precoce e uma

terceira possui autoanticorpos, sugerindo um risco muito alto de diabetes tipo 1 (T1D) e identificou as mutações causais de perda de função em IL2RA por meio do sequenciamento de exoma. O IL2RA é crítico para a função reguladora das células T e a homeostase imune. Com os métodos de direcionamento do genoma CRISPR não viral aqui fornecidos, a correção eficiente da mutação, que restaurou a expressão da superfície celular de IL2RA juntamente com a sinalização funcional a jusante foi alcançada. O direcionamento do genoma não viral nas células imunes humanas primárias permitirá estudos funcionais e correção de mutações nas células dos pacientes. As terapias celulares aliadas com o direcionamento genético aprimorado (modelos não virais, alta eficiência e especificidade e construções de direcionamento longo) nutrem enorme promessa com relação ao tratamento de doenças autoimunes, assim como deficiências imunológicas, doenças infecciosas, transplante de órgãos e imunoterapia contra o câncer.

Desenvolvimento do direcionamento do genoma de células T humanas não virais

[00136] Uma grande limitação para o direcionamento do genoma nas células T humanas tem sido que a liberação do DNA leva à morte celular (Cornu et al., "Refining strategies to translate genome editing to the clinic," *Nat. Med.* 23, 415-423 (2017)). Embora a introdução de modelos de HDR de oligodesoxinucleotídeo de fita simples curta (ssODN) não provoque perda significativa de viabilidade nas células T, modelos lineares maiores de dsDNA levaram a uma toxicidade extensiva (Y. Zhao et al., "High-Efficiency Transfection of Primary Human and Mouse T Lymphocytes Using RNA Electroporation," Mol. Ther. 13, 151–159 (2006); e Hornung et al. "Intracellular DNA recognition," I10, 123–130 (2010)).

[00137] Como mostrado nesta invenção, modelos de dsDNA

lineares longos (> 1kb) foram menos tóxicos quando eles foram co-submetidos à eletroporação com uma ribonucleoproteína CRISPR-Cas9 (RNP Cas9) (Fig.10). Isto sugeriu que a co-liberação de uma mistura apropriada de RNPs Cas9 e dsDNA longo permitiria HDR e preservaria a viabilidade celular.

[00138] O direcionamento do genoma não viral foi otimizado em células T humanas primárias. O protocolo foi ajustado quanto à eficiência da integração específica, viabilidade celular e o número total de células positivas para a integração (Figura 11A e Figura 12). As RNPs Cas9 foram submetidas à eletroporação juntamente com um modelo de HDR de dsDNA projetado para introduzir uma fusão de GFP N-terminal no gene de manutenção RAB11A (Figura 11B). A citometria de fluxo de alta produtividade, executada 3 a 5 dias após a eletroporação, foi utilizada para monitorar a integração e a viabilidade celular. Em primeiro lugar, a estimulação e tratamentos com citocinas, tanto antes quanto depois da eletroporação, que aumentaram acentuadamente as taxas de direcionamento de genes (Figura 11C e Figura 13 e 14) foram identificados. Essas condições permitiram um direcionamento eficiente nas células T primárias frescas ou congeladas isoladas de uma variedade de fontes (Figura 15). As relações variáveis de RNP Cas9 e as concentrações de modelo de HDR foram testadas em diferentes quantidades nessas células T bem estimuladas (Figura 11D e Figura 16), e as concentrações apropriadas foram identificadas que permitiram o direcionamento eficiente do gene. Finalmente, as condições de eletroporação para maximizar o direcionamento do gene enquanto preserva altos níveis de viabilidade celular (Figura 11E e Figura 17) foram testadas. O direcionamento genético não viral pode alcançar a introdução de uma fusão de GFP no gene de manutenção endógeno RAB11A em mais de 50% das células em ambas as células T CD4+ e CD8+ humanas primárias (Figura 11F).

Aplicações rápidas e combinatórias de direcionamento de genes

[00139] A simplicidade e velocidade da aplicação de direcionamento de genes não virais dos métodos aqui fornecidos através de sítios genômicos e doadores de sangue humano (Figura 18 e Figura 12). As construções que codificam fusões de GFP com sequências de flanqueamento homólogas foram direcionadas de maneira eficiente e reproduzível a uma variedade de sítios em todo o genoma (Figura 18A e Figura 19). Essas fusões de GFP direcionadas marcaram uma variedade de estruturas subcelulares (Leonetti et al. "A scalable strategy for high-throughput GFP tagging of endogenous human proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E3501–8 (2016)). A microscopia confocal confirmou a especificidade das proteínas de fusão produzidas pelo direcionamento de diversos genes e também demonstrou que o direcionamento de genes endógenos com GFP possibilitou a formação de imagens da localização da proteína em células T humanas vivas (Figura 18B). Nas células de uma coorte de uma dúzia de doadores humanos saudáveis, as integrações de GFP de direcionamento em diversos genes mostraram-se altamente reproduzíveis em células T humanas primárias (Figura 19 e 20). A especificidade das integrações direcionadas e o padrão de expressão específico do tipo de célula dos genes marcados foram confirmados ainda através da marcação do receptor de superfície CD4 codificado de forma endógena com GFP. Uma conexão linear entre a expressão de CD4 e GFP especificamente nas células T CD4+ marcadas, mas não nas células T CD8+ (Figura 18C), foi observada. Tomados em conjunto, essas descobertas estabelecem que o direcionamento genômico não viral pode ser utilizado para modificar genes endógenos, através da inserção de grandes sequências de DNA em sítios direcionados no genoma.

[00140] As marcas de fusão não apenas permitiram a formação de

imagens de proteínas endógenas, mas também podem ser utilizadas para o direcionamento bioquímico de proteínas específicas. Por exemplo, ChIP-Seq, e mais recentemente, CUT & RUN (Skene and Henikoff, "An efficient targeted nuclease strategy for high resolution mapping of DNA binding sites," Elife 6(2017), doi:10.7554/eLife.21856.), são amplamente utilizados para mapear sítios de ligação ao fator de transcrição; no entanto, estes ensaios são frequentemente limitados pela disponibilidade de anticorpos eficazes e específicos. Como uma prova de princípio, anticorpos anti-GFP foram usados para executar CUT & RUN nas células T primárias, onde o gene endógeno que codifica BATF, um TF crítico, foi direcionado para gerar uma fusão de GFP. Os sítios de ligação identificados com anti-GFP CUT & RUN coincidiram com os sítios identificados com o anticorpo anti-BATF (Figura 18D e Figura 21).

[00141] O direcionamento de dois alelos do mesmo gene com dois fluoróforos distintos forneceria uma maneira de quantificar e enriquecer as células com modificações genéticas bi-alélicas. Duas proteínas fluorescentes distintas que direcionam o mesmo sítio no gene RAB11A (Figura 22A e Figura 23) foram introduzidas e mostraram que > 5% das células tiveram integrações bi-alélicas bem-sucedidas. É importante ressaltar que o número de células que expressam ambas as proteínas fluorescentes subestima a porcentagem de células com integrações bi-alélicas porque algumas células terão recebido GFP ou mCherry em ambos alelos. Um modelo foi construído para considerar as integrações homozigotas da mesma proteína fluorescente (Figura 22B, Figura 23). Este modelo estima que houve integrações bi-alélicas no gene RAB11A em até ~10% das células. Isso sugere que as células com uma integração RAB11A são mais prováveis de sofrer uma segunda integração direcionada, e esse efeito foi observado em três posições genômicas (Figura 23). A co-

liberação de três marcas fluorescentes que direcionam à posição RAB11A demonstrou taxas muito baixas de células que expressam todos os três fluoróforos, consistente com baixas taxas de integrações inespecíficas nessas experiências (Figura 23G). Em resumo, o uso de múltiplas construções não virais para direcionar a mesma posição permite a identificação da edição do genoma bi-alélico nas células T humanas.

[00142] A edição multiplicadora de conjuntos combinatórios de sítios genômicos ofereceria pesquisa expandida e aplicações terapêuticas. Foi testado se vários modelos de HDR não virais poderiam ser co-liberados com várias RNPs para gerar células primárias com mais de uma posição modificada. Observou-se que não apenas é possível o direcionamento genético diversificado (Figura 22C), mas as células com duas modificações foram enriquecidas através da obstrução nas células que tiveram uma modificação (Figura 22D e Figura 24) (Agudelo et al., "Marker-free coselection for CRISPR-driven genome editing in human cells", *Nat. Methods.* 14, 615–620 (2017)). O direcionamento triplo do gene também foi alcançado e pode significativamente enriquecer as células que tiveram uma terceira modificação através da obstrução nas células com duas inserções direcionadas (Figura 22E e Figura 24). No geral, o direcionamento genético não viral pode ser utilizado para permitir modificações genéticas complexas de células T primárias que podem ser utilizadas para uma variedade de aplicações de pesquisa e terapêuticas.

Modelos de HDR de D10A nickase e ssDNA reduzem as integrações inespecíficas

[00143] Uma das principais preocupações com o uso de modelos HDR, especialmente para aplicações terapêuticas, é o potencial para integrações inespecíficas. Isso foi observado mesmo quando os AAVs deficientes em integrase foram utilizados como modelos de doadores

(Dever et al., "CRISPR/Cas9 β-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells," *Nature* 539, 384–389 (2016)). Evidências similares de integrações inespecíficas funcionais utilizando um modelo linear de dsDNA para o direcionamento genético não viral foram aqui encontradas. Modelos de DNA de fita dupla podem se integrar de maneira independente do HDR em locais de quebras de dsDNA de ocorrência natural (Murnane et al. "Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells", *Nucleic Acids Res.* 18, 2733-2738 (1990)), assim como nas quebras específicas de dsDNA induzidas por nucleases direcionadas tais como Cas9, um efeito chamado Homology-Independent Targeted Integration ((Auer et al. "Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair", *Genome Res.* 24, 142–153 (2014); e Suzuki et al. "In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration", *Nature* 540, 144–149 (2016)). Integrações não homólogas inesperadas utilizando uma construção de fusão GFP-RAB11A N-terminal que continha a sequência promotora RAB11A endógena dentro de seu ramo de homologia 5' foram esperadas; essa construção pode conduzir a expressão de GFP nos sítios de integração inespecífica (Figura 25A e Figura 26). Observou-se que integrações inespecíficas funcionais estavam presentes nas células de diferentes doadores biológicos (Figura 25B) e foram observados em experimentos com diferentes sequências alvo e modelos de HDR (Figura 26 e 27). As integrações inespecíficas devem ser minimizadas nas células destinadas para uso terapêutico para garantir que as sequências integradas permaneçam sob regulação endógena apropriada e que os sítios fora do alvo não sejam interrompidos.

[00144] Para reduzir as integrações inespecíficas provocadas pelo corte Cas9 fora do alvo, o direcionamento genético não viral foi

executado utilizando a variante de nickase D10A Cas9. Essa variante requer que dois gRNAs se liguem e fiquem próximos para produzir uma quebra de fita dupla, reduzindo assim o número de quebras de dsDNA fora do alvo (Miyaoka et al., "Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing", *Sci. Rep.* 6 (2016), doi:10.1038/srep23549; Vriend et al., "Distinct genetic control of homologous recombination repair of Cas9-induced double-strand breaks, nicks and paired nicks," *Nucleic Acids Res.* 44, 5204–5217 (2016); e Bothmer et al., "Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus", *Nat. Commun.* 8, 13905 (2017)). Uma série de combinações de gRNA na posição RAB11A para a integração de GFP foi testada, um conjunto de guias "PAM-Out" que apresentaram introdução eficiente de GFP quando se utiliza a nickase D10A (Figura 28), foi observada. Como esperado, o uso de D10A com um único guia fora do alvo mostrou integrações inespecíficas funcionais marcadamente reduzidas quando comparado com a Cas9, equivalente ao nível observado quando a dCas9 incompetente por nuclease foi utilizada (Figura 25C).

[00145] Mesmo utilizando a nickase D10A, os modelos de HDR de dsDNA ainda deram origem a integrações fora do alvo raras, mas observáveis (comparáveis com a taxa observada sem a nuclease Cas9), talvez em quebras de dsDNA de ocorrência natural (Figura 25A e C). Foi raciocinado que as integrações inespecíficas remanescentes podem ser eliminadas mediante a substituição dos modelos de HDR de dsDNA por modelos de HDR de ssDNA longos, que não podem integrar não especificamente nas quebras de fita dupla (Quadros et al., "Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors e CRISPR ribonucleoproteins," *Genome Biol.* 18, 92 (2017); e Leonetti et

al. http://www.biorxiv.org/content/early/2017/08/21/178905).

[00146] Para testar esta hipótese, modelos de HDR de ssDNA foram gerados com dois métodos que produzem grandes quantidades de ssDNA longo necessário para a eletroporação (Figura 35). Os modelos de HDR de ssDNA reduziram as integrações inespecíficas funcionais em aproximadamente 100 vezes, enquanto mantém a integração inespecífica eficiente (Figura 25D). Foi possível utilizar a nickase Cas9 D10A com modelos de ssDNA. Nessas experiências, embora as taxas de integração inespecífica tenham sido reduzidas, integrações inespecíficas foram reduzidas a níveis de origem vistos sem modelo (Figuras 25E e F). Para sítios em que a atividade fora do alvo potencial é uma preocupação, os modelos de nickase Cas9 D10A e HDR de ssDNA podem ser empregados para reduzir as taxas de integração decorrentes de quebras de fita dupla induzidas fora do alvo e quebras de ocorrência natural, respectivamente, o que pode tornar assim um método atraente para modificação terapêutica das células T do paciente.

Correção de mutação terapêutica através do direcionamento genético não viral

[00147] A aplicação de direcionamento genético não viral para corrigir as mutações que provocam desregulação imune monogênica em células T de pacientes foi realizada. Uma família com desregulação imune primária monogênica com doença autoimune provocada por mutações recessivas da perda de função no gene que codifica o receptor alfa de IL-2 (IL2RA), também conhecido como CD25 (Sharfe et al. "Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3168–3171 (1997); Caudy et al. "CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked–like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes," J.

Allergy Clin. Immunol. 119, 482–487 (2007); e Goudy et al., "Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity," *Clin. Immunol.* 146, 248–261 (2013)) foi identificada. O IL2RA é essencial para Tregs e homeostase imune (Sakaguchi et al. "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases," *J. Immunol.* 155, 1151–1164 (1995); e Rudensky et al. "Regulatory T cells and Foxp3," *Immunol. Rev.* 241, 260–268 (2011)), e as crianças da família que são heterozigotos compostos com duas mutações de perda de função possuem manifestações autoimunes pleiotrópicas (Tabela 1). Uma delas é afetada pelo diabetes tipo 1 (DM1) de início neonatal e a outra desenvolveu citopenias autoimunes recalcitrantes durante a infância. Todos os três membros da família com deficiência de IL2RA demonstraram autoanticorpos séricos patológicos. As crianças com deficiência de IL2RA possuem uma perda quase completa da expressão da superfície celular de IL2RA e, portanto, praticamente nenhuma Treg CD3+CD4+CD25hiCD127lo detectável em seu sangue, enquanto que os familiares que carregam mutações heterozigóticas de IL2RA apresentam expressão reduzida de IL2RA em suas Tregs (Figura 30). No entanto, as frequências de células T CD3+CD4+CD127loFOXP3 + nos indivíduos com deficiência de IL2RA se assemelham àquelas de doadores saudáveis (HD) e membros da família heterozigotos, sugerindo que as células do tipo Treg se desenvolvem e persistem apesar das mutações no IL2RA. Utilizando uma estratégia para isolar as Tregs sem expressão de CD25, verificou-se que as células enriquecidas com CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+ Treg de indivíduos com deficiência de CD25 apresentaram uma capacidade defeituosa de

suprimir a proliferação de células T respondedoras (Tresps) em comparação com as contrapartes de HD (Figura 29). Por outro lado, as Tregs de parentes com uma única mutação heterozigótica de IL2RA podem inibir a proliferação de Tresp, embora com capacidade abaixo do ideal (Figura 29). Portanto, a correção da expressão funcional de IL2RA na superfície das células T FOXP3+ desses pacientes pode representar uma abordagem valiosa para o desenvolvimento de uma terapia gênica ex vivo.

Tabela 1

Paciente	sexo	Estado de mutação IL2RA	Fenótipo da doença autoimune	Histórico clínico	Autoanticorpos
c.530Het (mãe)	F	c.530A>G/WT	nenhum	infecções de ouvido da infância	nenhum
c.800 Het 1 (pai)	M	c.800delA/WT	nenhum	sem problemas médicos	nenhum
c.800 Het 2	F	c.800delA/WT	nenhum	alergias	nenhum
c.800 Het 3	F	c.800delA/WT	nenhum	sem problemas médicos	nenhum
Het Comp 1	M	c.530A>G/ c.800delA	Diabetes tipo 1	diabetes dependente de insulina no primeiro ano de vida	Anti-GAD, ICA512
Het Comp 2	M	c.530A>G/ c.800delA	autoanticorpos de diabetes	infecções de ouvido: eczema	Anti-GAD, MIAA, ICA
Het Comp 3	F	c.530A>G/ c.800delA	púrpura trombocitopênica imune; neutropenia autoimune	infecções de ouvido; anemia hemolítica; dermatite humular; medula óssea hipercelular com relação CD4/CD8 invertida; úlceras na boca	antiplaquetas

[00148] O sequenciamento completo do exoma revelou que as crianças com deficiência de IL2RA abrigavam mutações heterozigotas compostas em IL2RA (Figura 30A e Figura 31). Uma mutação em c.530A>G cria um códon de parada prematuro. Melhoras na cultura de

células e metodologias de eletroporação tornaram possível corrigir com eficiência a mutação usando modelos de HDR de ssDNA de ~120 pb quimicamente sintetizados (Figura 32). As taxas foram ainda mais altas utilizando um modelo de dsDNA mais longo (Figura 30B e Figura 32 e 33). As células T derivadas do paciente corrigidas expressavam IL2RA em sua superfície. Embora a correção tenha sido bem-sucedida nos três irmãos, taxas mais baixas de expressão de IL2RA no het composto 3, que pode ser devido ao estado celular alterado associado com a doença do paciente ou ao fato de ela ser o único irmão tratado com imunossupressão (Tabela 1 e Figura 34). A segunda mutação, c.800delA, provoca um frameshift na estrutura de leitura do éxon IL2RA final, resultando na leitura incorreta da porção do gene codificado no éxon final, assim como na translação contínua após o códon de parada normal. Esse frameshift pode ser melhorado mesmo sem um modelo de HDR (Figura 33). Nesse sítio, o corte genômico provocado por uma RNP Cas9 isoladamente foi suficiente para provocar a expressão produtiva da IL2RA na superfície celular, provavelmente através da restauração da estrutura correta com mutações de inserção/exclusão (Figura 33). Tomados em conjunto, esses dados mostram como as mutações distintas podem ser corrigidas nas células T de pacientes com mecanismos de reparo dependentes do modelo de HDR e não dependentes do modelo de HDR.

[00149] Uma estratégia terapêutica potencial para pacientes dessa família com defeitos monogênicos de Treg seria a correção gênica das células T *ex vivo*, seguida pela transfusão de Tregs autólogas corrigidas. As células Treg produzidas por correção direcionada podem limitar alguns dos riscos potenciais do transplante de células tronco hematopoiéticas. Se a correção de uma das mutações IL2RA levou à sinalização produtiva e quer ou não a correção ocorreu em

uma fração significativa de Tregs FOXP3+, foi testada. Após a correção da mutação c.530A>G, as células foram capazes de sinalizar funcionalmente através do IL2RA, o receptor de IL-2 de alta afinidade. Em resposta ao tratamento com IL-2, as células modificadas demonstraram aumento da fosforilação de STAT5, uma característica da sinalização produtiva (Figura 31C e Figuras 33 e 34). Além disso, a citometria de fluxo confirmou que uma fração das células corrigidas por IL2RA expressava FOXP3, um fator transcricional crítico em Tregs (Figura 30D e Figuras 32 e 33).

[00150] O gene endógeno que codifica o IL2RA está sob controle rígido por vários elementos cis-reguladores que constituem um super-intensificador (Farh et al., "Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants", Nature 518, 337–343 (2015); e Simeonov et al. "Discovery of Stimulation-Responsive Immune Enhancers with Unbiased CRISPR Activation," Nature 549 (7670): 111-115 (2017)). Portanto, a correção terapêutica de IL2RA é provável que dependa de reparo específico do gene em sua posição genômica endógena. Dado que as inserções de GFP com Cas9 e dsDNA mostraram que existe um potencial para integrações não específicas de dsDNA, usamos a nickase Cas9 D10A e um modelo de ssDNA longo para reparar especificamente a mutação do paciente c.530A>G. O uso desses reagentes foi possível de maneira específica e seletiva para corrigir o gene mutante em ~20% das células T do paciente (Figura 30E).

[00151] O direcionamento genético não viral permite a inserção eficiente de sequências definidas em todo o genoma de células T humanas primárias. Essas inserções podem variar a partir da introdução ou correção de mutações de pares de bases únicas, até a integração de grandes sequências funcionais e marcas em posições endógenas, e integrações diversificadas em todo o genoma são

possíveis. Para aplicações terapêuticas de células T planejadas, as integrações inespecíficas podem ser significativamente reduzidas utilizando a nickase Cas9 D10A e um modelo de HDR de ssDNA. Os métodos e resultados aqui fornecidos permitirão o desenvolvimento acelerado de terapias de células T planejadas e o tratamento de doenças genéticas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para editar o genoma de uma célula, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) fornecer um complexo modelo de DNA do complexo de ribonucleoproteína Cas9 (RNP) compreendendo:

(i) a RNP, em que a RNP compreende um domínio de nuclease Cas9 e um RNA guia, em que o RNA guia especificamente hibrida com uma região alvo do genoma da célula, e em que o domínio nuclease Cas9 cliva a região alvo para criar um sítio de inserção no genoma da célula; e

(ii) um modelo de DNA de fita dupla ou fita simples, em que o tamanho do modelo de DNA é maior do que cerca de 200 nucleotídeos, em que as extremidades 5' e 3' do modelo de DNA compreendem sequências de nucleotídeo que são homólogas às sequências genômicas que flanqueiam o sítio de inserção, e em que a relação molar de RNP para o modelo de DNA no complexo é de cerca de 3:1 a cerca de 100:1; e

b) introduzir o complexo modelo de RNP-DNA na célula.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o complexo modelo de RNP-DNA é formado pela incubação da RNP com o modelo de DNA durante menos de cerca de um minuto a cerca de trinta minutos, em uma temperatura ao redor de 2° a 25°C.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o modelo de DNA é um modelo de DNA linear.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o modelo de DNA é um modelo de DNA de fita simples.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o modelo de DNA é um modelo de DNA de fita simples puro.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o complexo modelo de RNP-DNA e a célula são misturados antes da introdução do complexo modelo de RNP-DNA na célula.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a RNP compreende uma nuclease Cas9.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a RNP compreende uma nickase Cas9.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o complexo modelo de RNP-DNA compreende pelo menos dois complexos de RNP estruturalmente diferentes.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que os pelo menos dois complexos de RNP estruturalmente diferentes contêm RNAs guia estruturalmente diferentes.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que cada um dos complexos de RNP estruturalmente diferentes compreende uma nickase Cas9, e em que os RNAs guia estruturalmente diferentes hibridizam com filamentos opostos da região alvo.

12. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que os pelo menos dois complexos de RNP estruturalmente diferentes contêm domínios de nuclease Cas9 estruturalmente diferentes.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a introdução compreende eletroporação.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a relação molar de RNP para o modelo de DNA é de cerca de 5:1 a cerca de 15:1.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a relação molar de RNP para o modelo de DNA é de cerca de 5:1 a cerca de 10:1.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a relação molar de RNP para o modelo de DNA é de cerca de 8:1 a cerca de 12:1.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o tamanho do modelo de DNA é maior do que cerca de 1 kb.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que o modelo de DNA está em uma concentração de cerca de 2,5 pM a cerca de 25 pM.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que a quantidade de modelo de DNA é de cerca de 1 µg a cerca de 10 µg.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula hematopoiética primária ou uma célula-tronco hematopoiética primária.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que o complexo modelo de RNP-DNA é introduzido em cerca de 1 x 10^5 a cerca de 2 x 10^6 células.

22. Método de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula hematopoiética primária.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a célula hematopoiética primária é uma célula imune.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a célula imune é uma célula T.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a célula T é uma célula T reguladora, uma célula T efetora ou uma célula T ingênua.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a célula T reguladora, célula T efetora ou célula T ingênua é uma célula T $CD4^+$.

27. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a célula T é uma célula T $CD8^+$.

28. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a célula T é uma célula T $CD4^+CD8^+$.

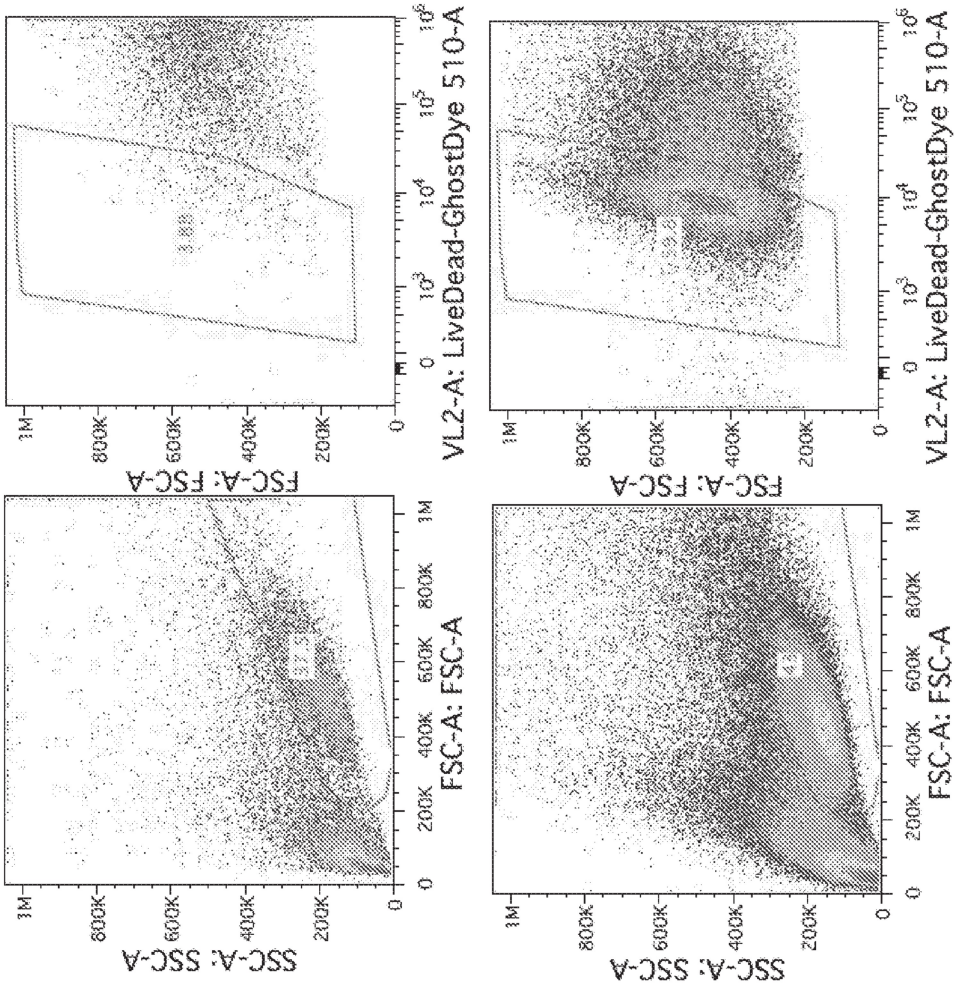

Apenas plamídeo
Plasmídeo + RNP
SSC-A: SSC-A
FSC-A: FSC-A
FSC-A: FSC-A
VL2-A: LiveDead-GhostDye 510-A
1M
800K
600K
400K
200K
0
10^3
10^4
10^5
10^6

FIG. 1

Viabilidade celular do resgate de RNP + plasmídeo

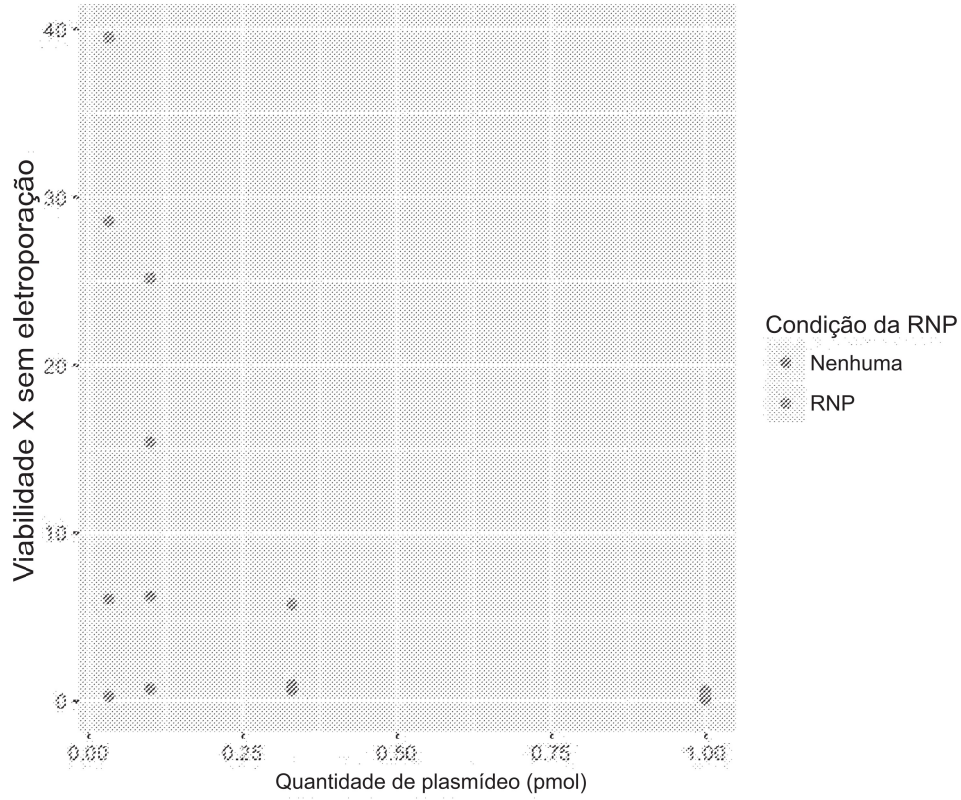


FIG. 2

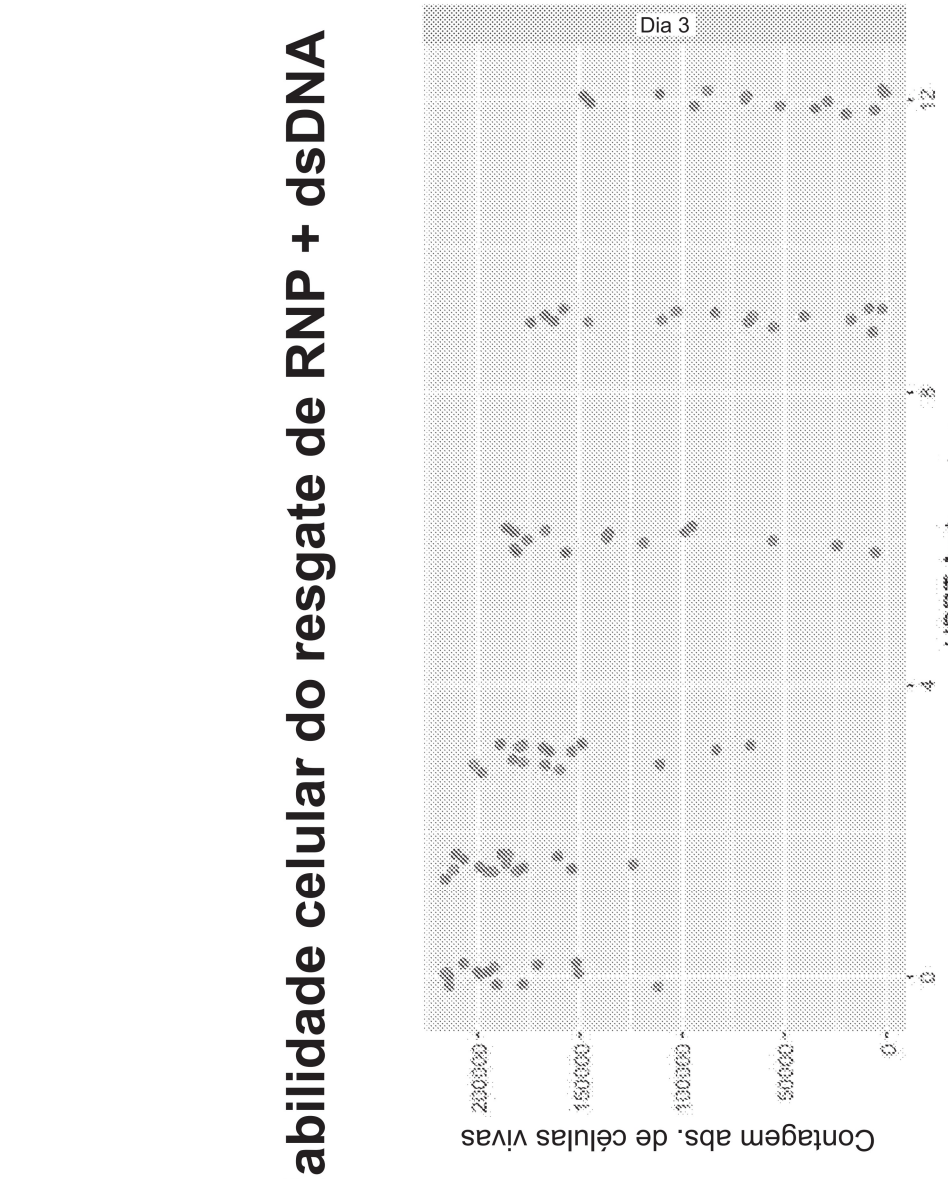

Viabilidade celular do resgate de RNP + dsDNA
Contagem abs. de células vivas
200000
150000
100000
50000
0
Dia 3
RNP Amt., pmoles
0 pmoles
40 pmoles
80 pmoles
120 pmoles
0
4
8
12
HDRT Amt., pmoles

FIG. 3

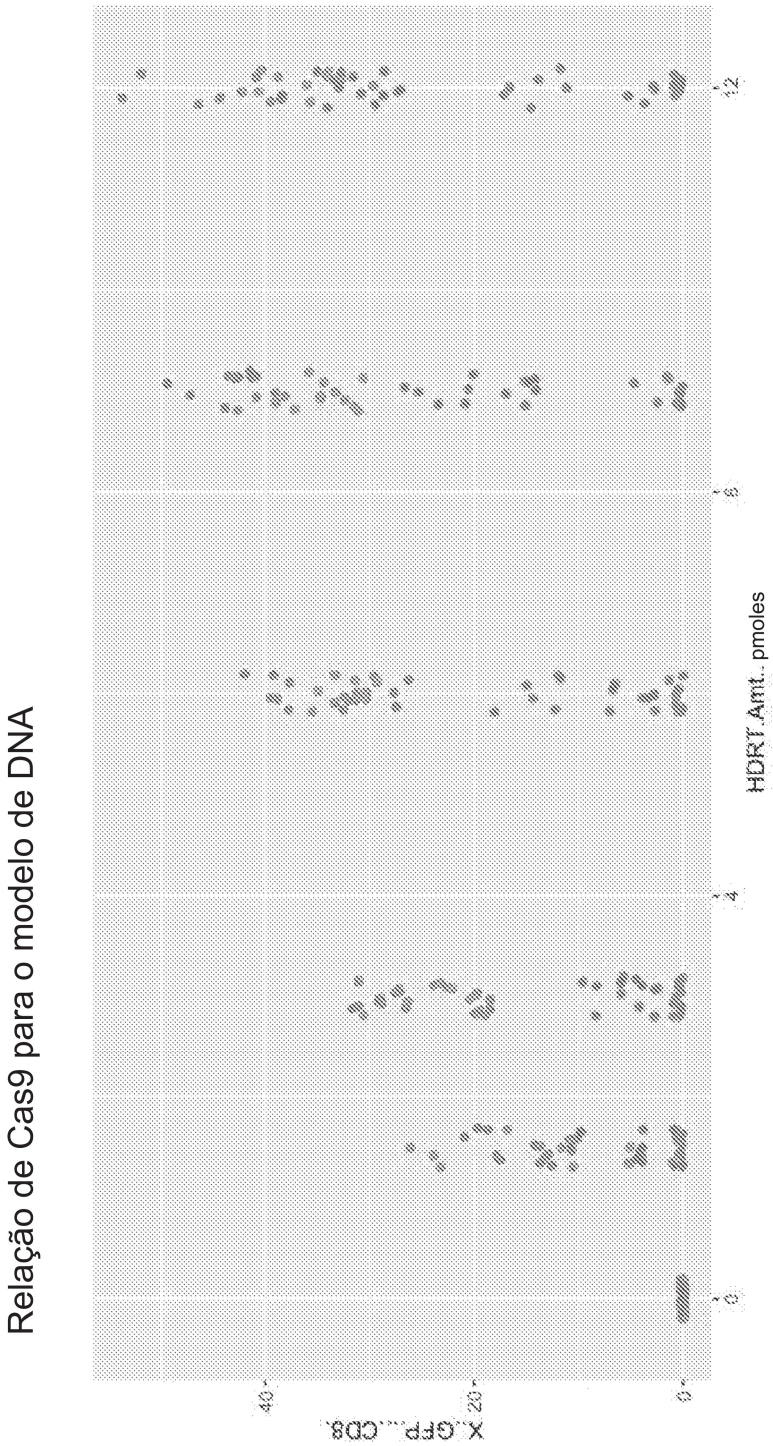


FIG. 4

Relação de Cas9 para o modelo de DNA

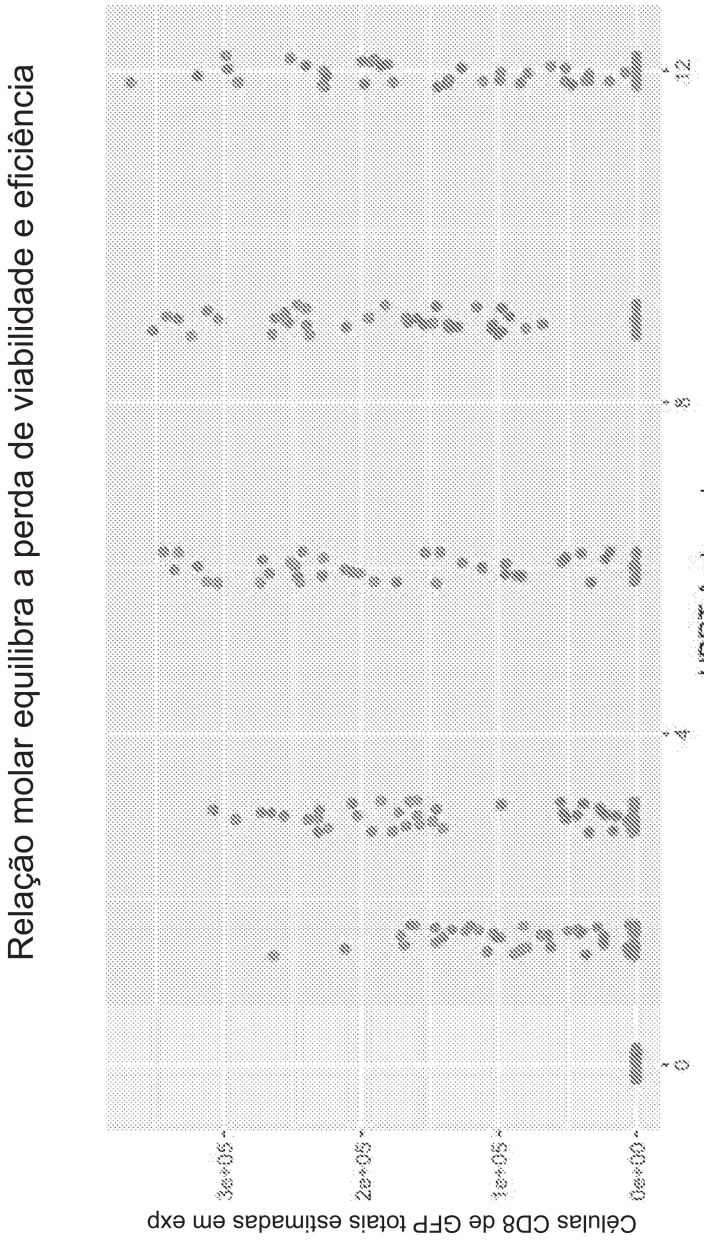

Relação molar equilibra a perda de viabilidade e eficiência
Células CD8 de GFP totais estimadas em exp
0e+00
1e+05
2e+05
3e+05
0
4
8
12
HDRT Amt. pmoles
RNP Amt. pmoles
0 pmoles
40 pmoles
80 pmoles
120 pmoles

FIG. 5

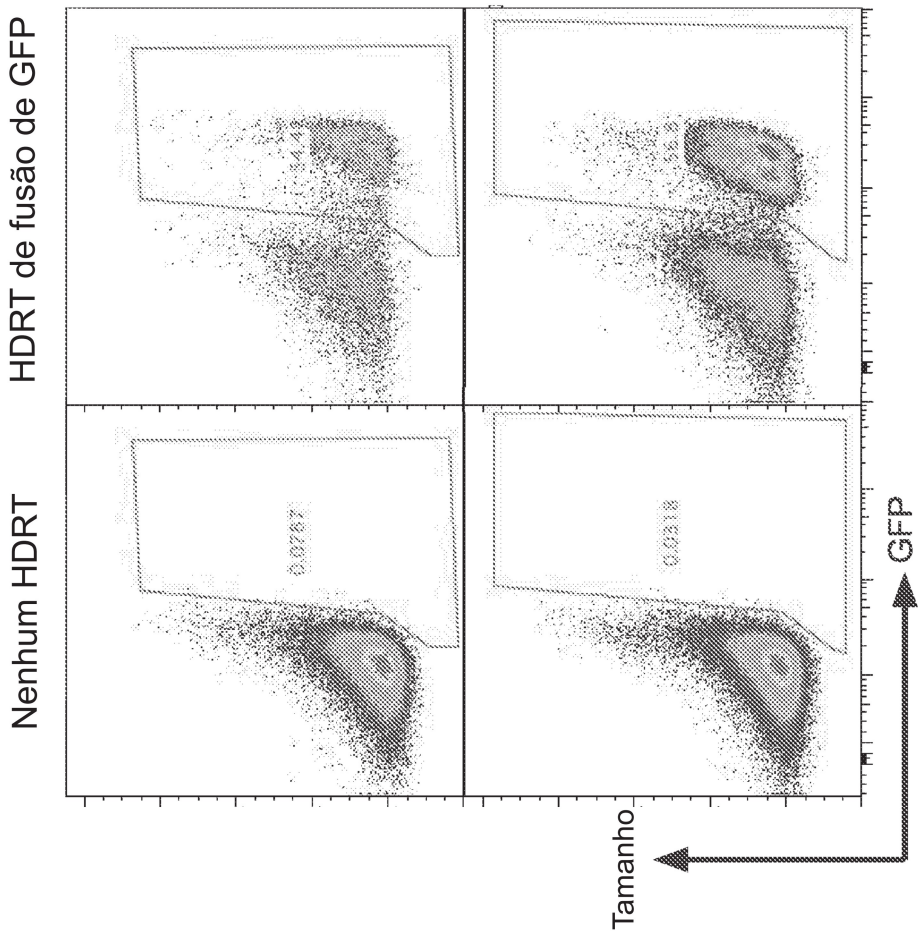

Nenhum HDRT
HDRT de fusão de GFP
Células T CD4 humanas primárias
Células T CD8 humanas primárias
0.0767
0.0318
Tamanho
GFP

FIG. 6

Mas- Modelos de dsDNA provocam pequenas quantidades de integrações inespecíficas

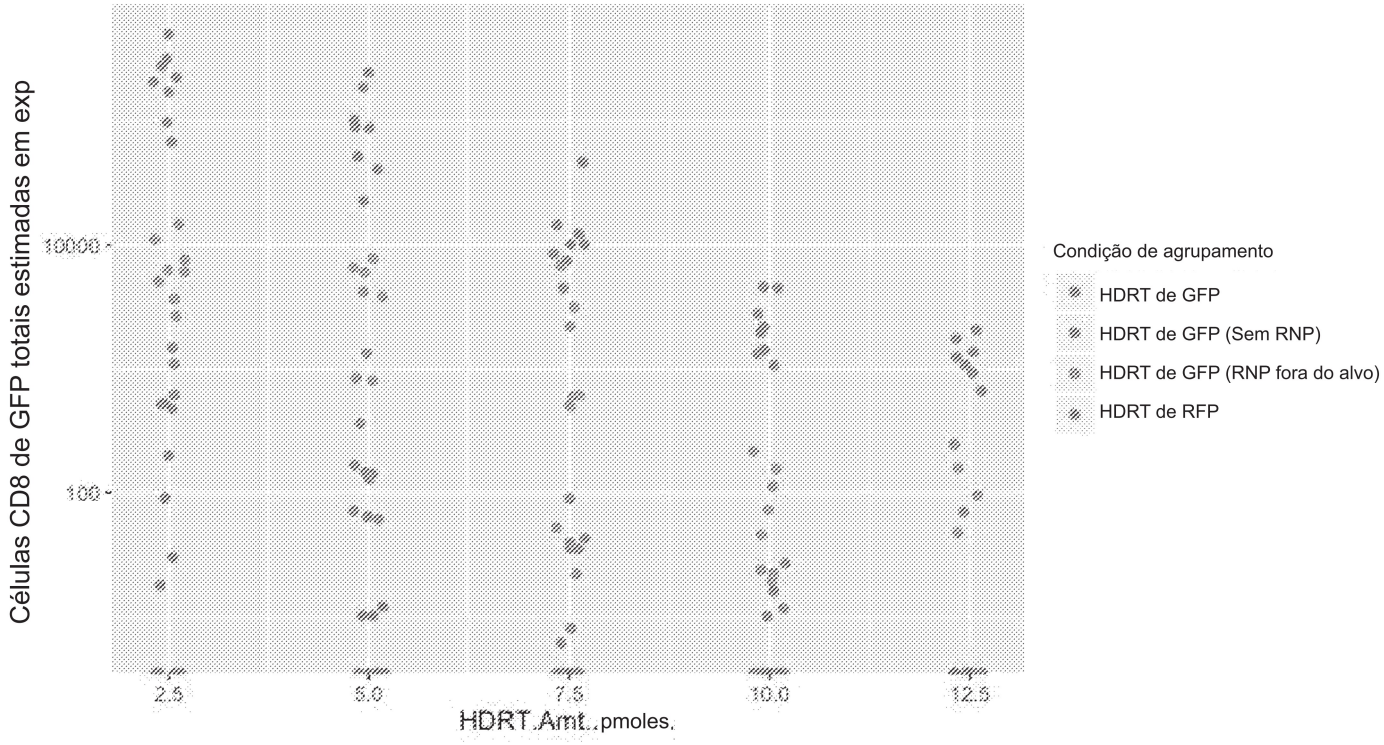
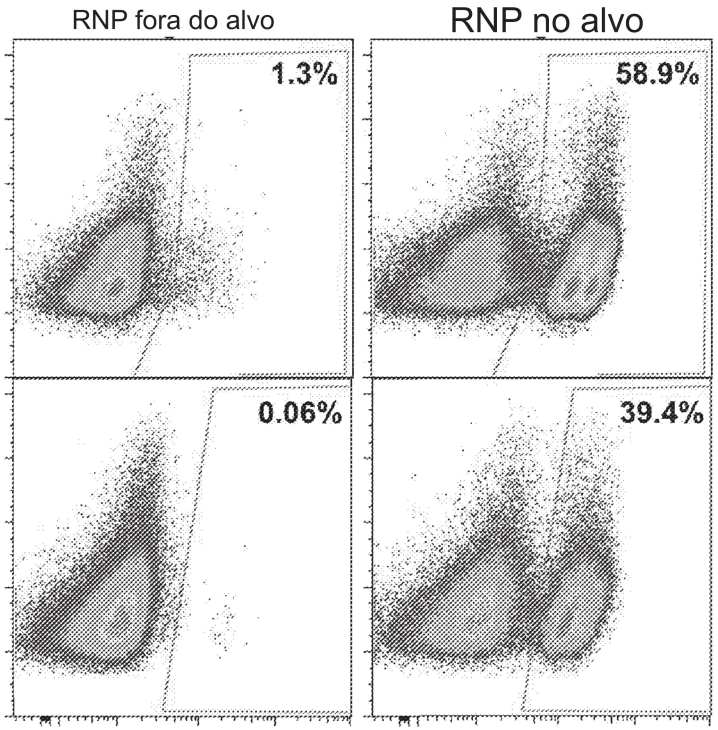


FIG. 7

Integrações inespecíficas reduzidas utilizando ssDNA longo

Células T CD8
humanas primárias

Fusão de RAB11a-GFP



Modelo
de dsDNA
(~1.5 kb)

Modelo
de ssDNA
(~1.5kb)

FIG. 8

UCSF | Marson Lab

Nickases Caso impedem quebras ds fora do alvo, ainda permitem inserções de alta eficiência

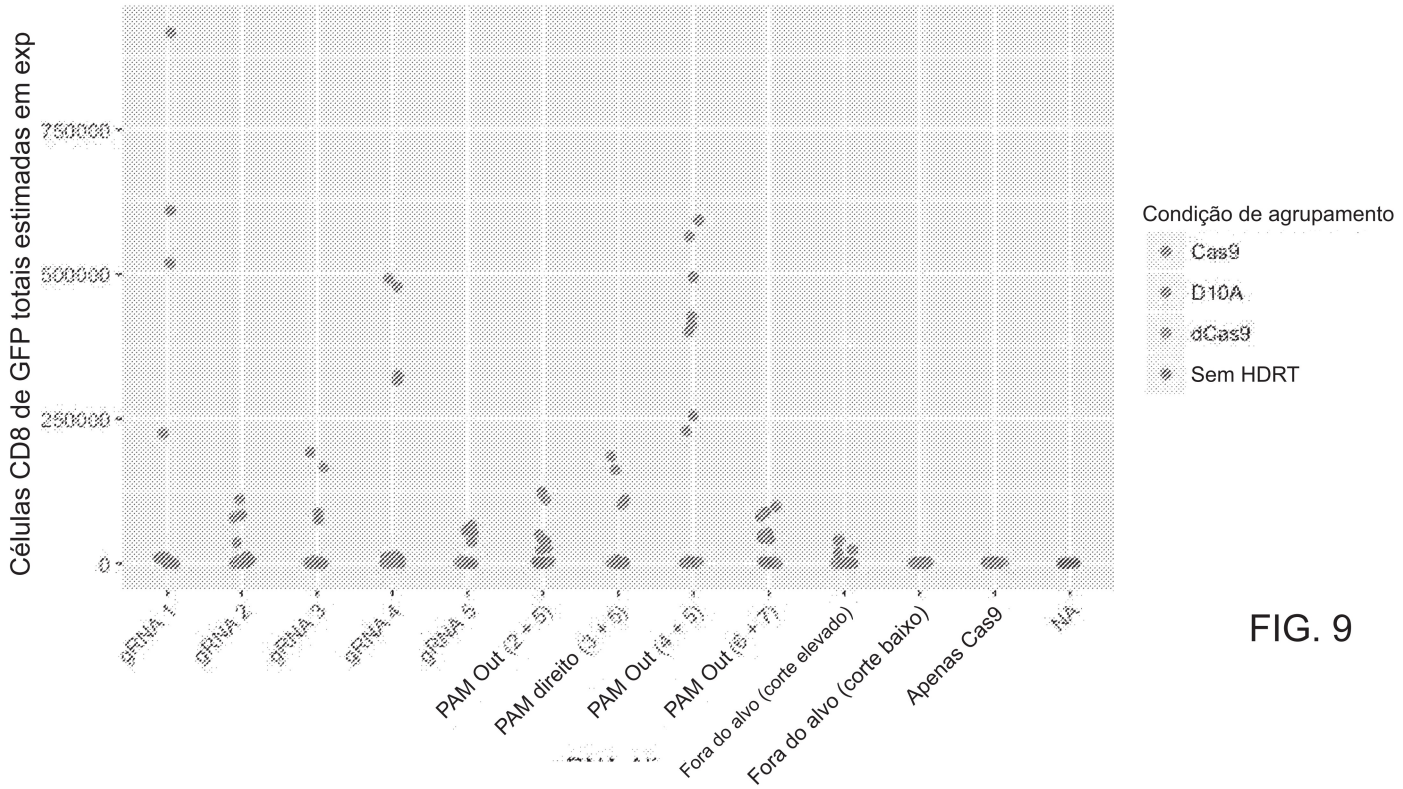


FIG. 9

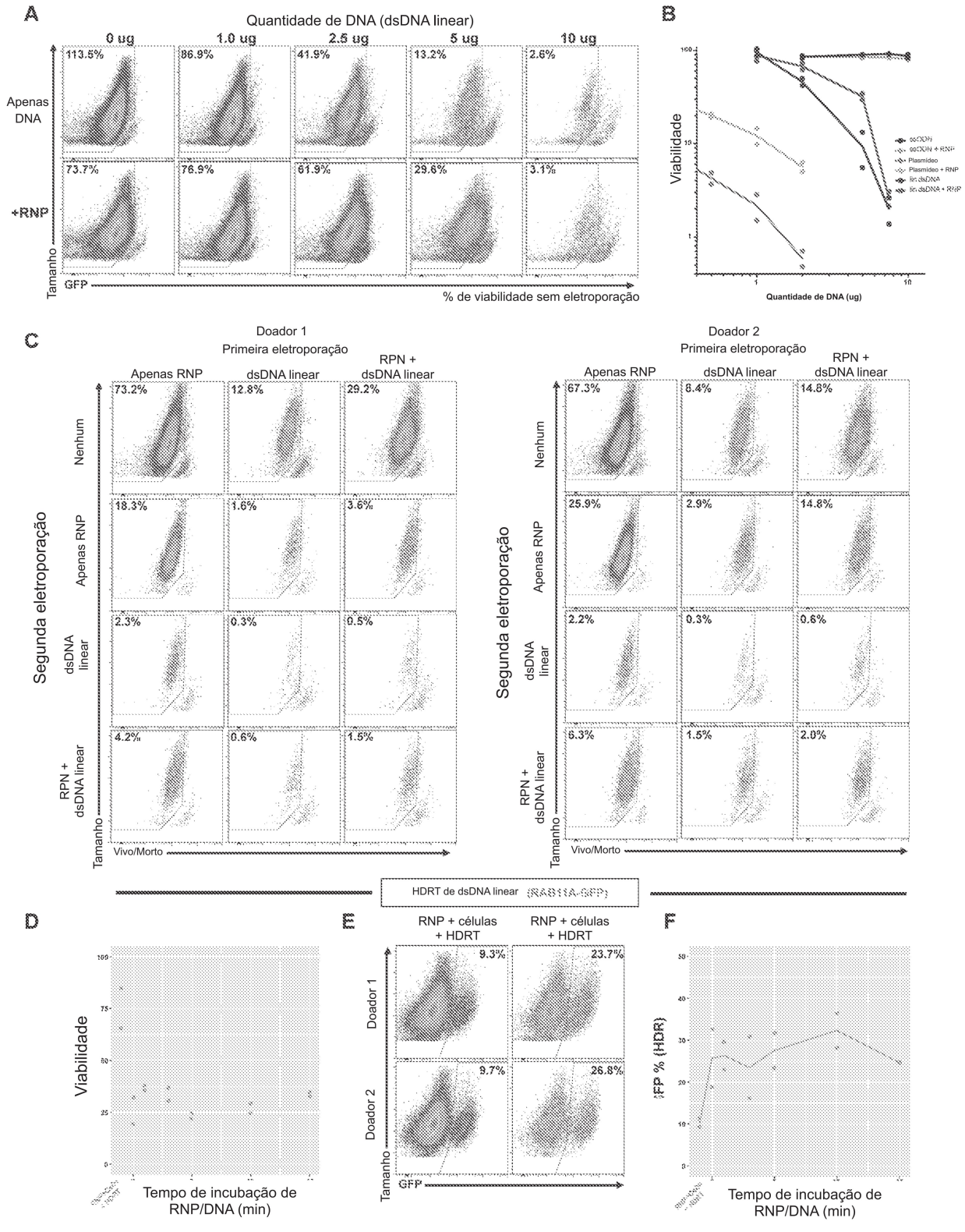

A
Quantidade de DNA (dsDNA linear)
0 ug
1.0 ug
2.5 ug
5 ug
10 ug
Apenas DNA
+RNP
113.5%
86.9%
41.9%
13.2%
2.6%
73.7%
76.9%
61.9%
29.6%
3.1%
Tamanho
GFP
% de viabilidade sem eletroporação
B
Viabilidade
Quantidade de DNA (ug)
ssODN
ssODN + RNP
Plasmídeo
Plasmídeo + RNP
lin dsDNA
lin dsDNA + RNP
C
Doador 1
Primeira eletroporação
Apenas RNP
dsDNA linear
RPN + dsDNA linear
Segunda eletroporação
Nenhum
Apenas RNP
dsDNA linear
RPN + dsDNA linear
73.2%
12.8%
29.2%
18.3%
1.6%
3.6%
2.3%
0.3%
0.5%
4.2%
0.6%
1.5%
Tamanho
Vivo/Morto
Doador 2
Primeira eletroporação
Apenas RNP
dsDNA linear
RPN + dsDNA linear
Segunda eletroporação
Nenhum
Apenas RNP
dsDNA linear
RPN + dsDNA linear
67.3%
8.4%
14.8%
25.9%
2.9%
14.8%
2.2%
0.3%
0.6%
6.3%
1.5%
2.0%
Tamanho
Vivo/Morto
HDRT de dsDNA linear (RABBIT-GFP)
D
Viabilidade
Tempo de incubação de RNP/DNA (min)
E
RNP + células + HDRT
RNP + células + HDRT
Doador 1
Doador 2
9.3%
23.7%
9.7%
26.8%
Tamanho
GFP
F
GFP % (HDR)
Tempo de incubação de RNP/DNA (min)

FIG. 11

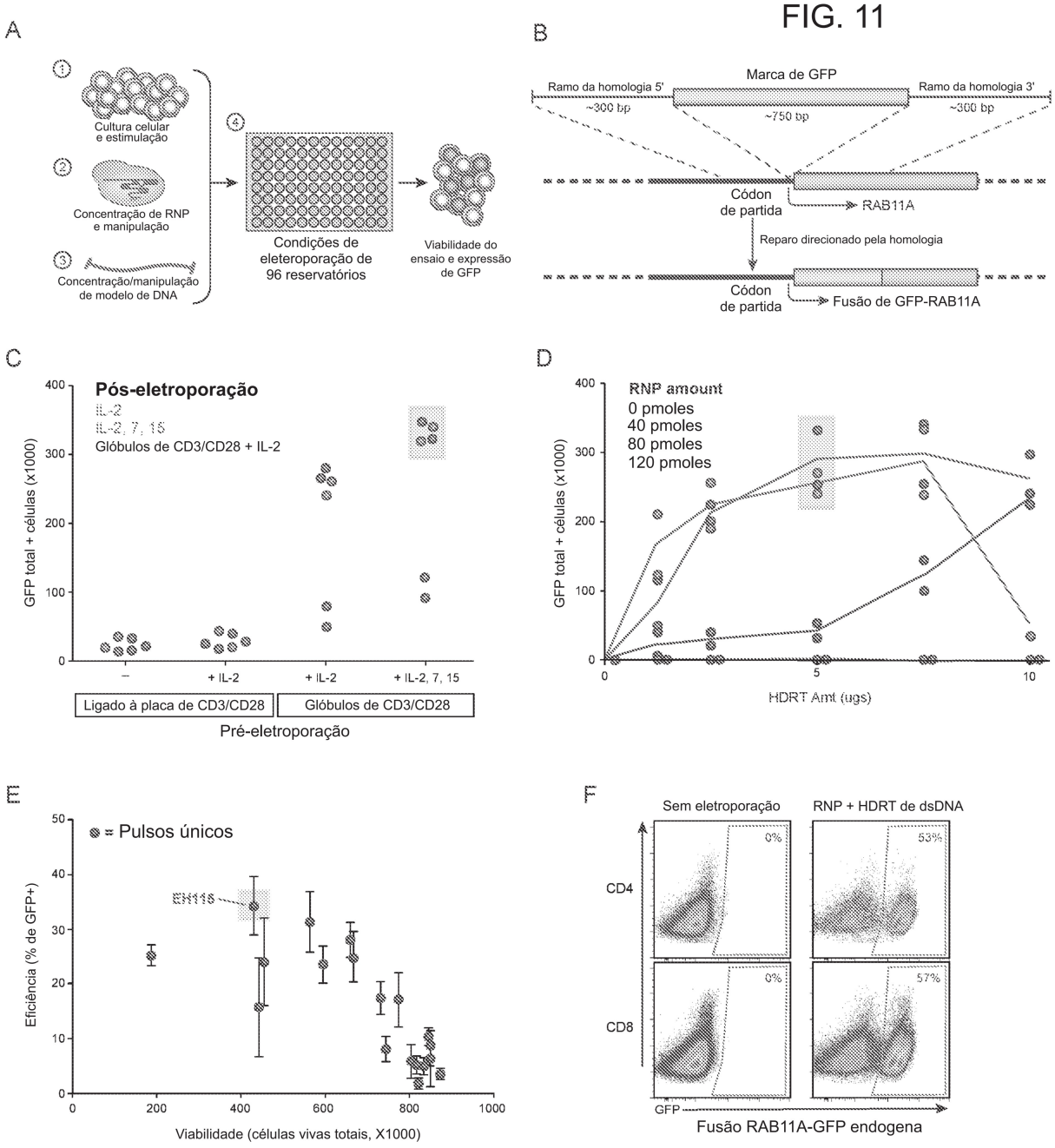
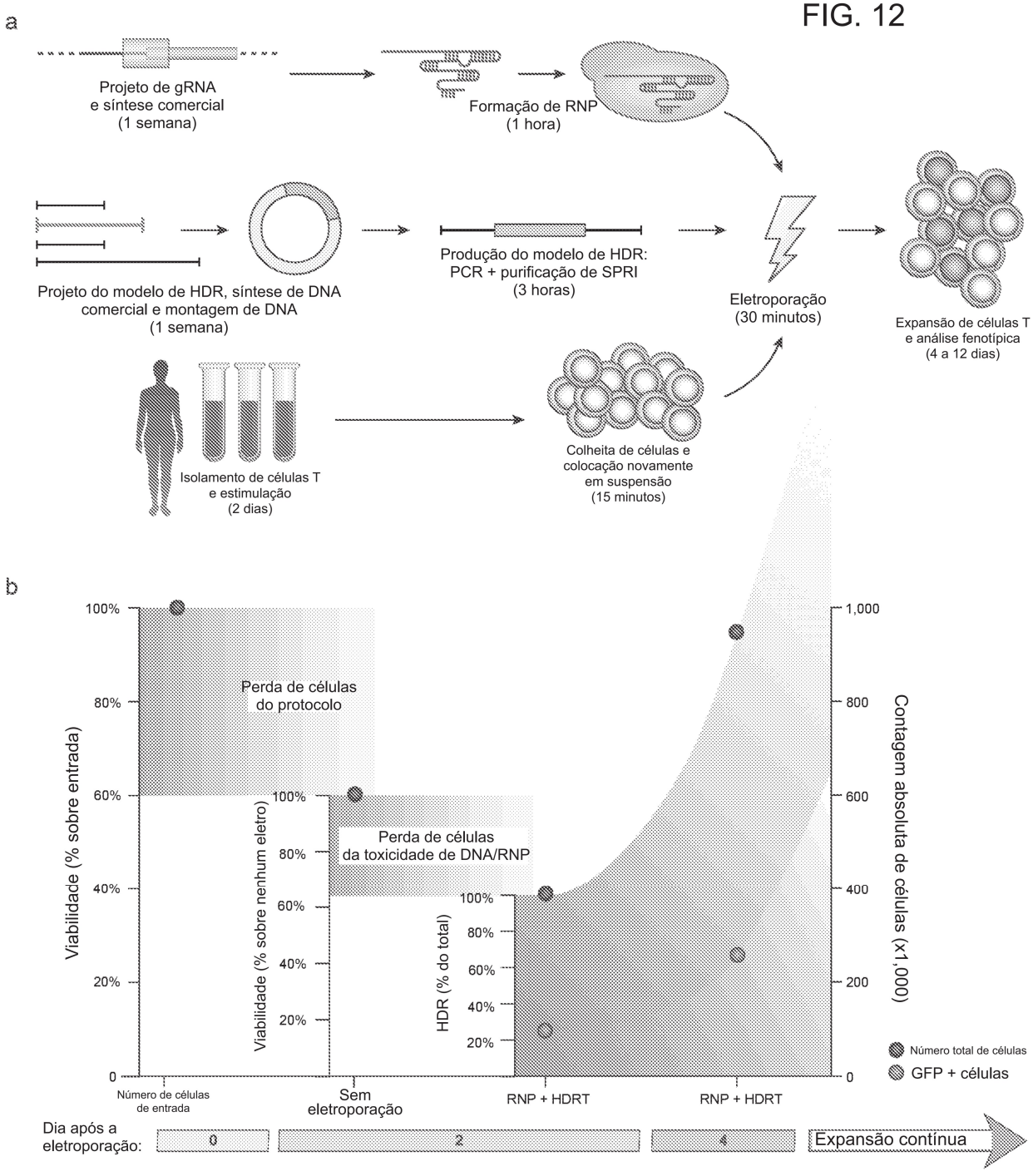

A
Cultura celular e estimulação
Concentração de RNP e manipulação
Concentração/manipulação de modelo de DNA
Condições de eletroporação de 96 reservatórios
Viabilidade do ensaio e expressão de GFP
B
Marca de GFP
Ramo da homologia 5'
Ramo da homologia 3'
~300 bp
~750 bp
~300 bp
Códon de partida
RAB11A
Reparo direcionado pela homologia
Códon de partida
Fusão de GFP-RAB11A
C
Pós-eletroporação
IL-2
IL-2, 7, 15
Glóbulos de CD3/CD28 + IL-2
GFP total + células (x1000)
–
+ IL-2
+ IL-2
+ IL-2, 7, 15
Ligado à placa de CD3/CD28
Glóbulos de CD3/CD28
Pré-eletroporação
D
RNP amount
0 pmoles
40 pmoles
80 pmoles
120 pmoles
GFP total + células (x1000)
HDRT Amt (ugs)
E
Pulsos únicos
EH115
Eficiência (% de GFP+)
Viabilidade (células vivas totais, X1000)
F
Sem eletroporação
RNP + HDRT de dsDNA
CD4
CD8
0%
53%
0%
57%
GFP
Fusão RAB11A-GFP endogena

FIG. 12


a
Projeto de gRNA
e síntese comercial
(1 semana)
Formação de RNP
(1 hora)
Projeto do modelo de HDR, síntese de DNA
comercial e montagem de DNA
(1 semana)
Produção do modelo de HDR:
PCR + purificação de SPRI
(3 horas)
Eletroporação
(30 minutos)
Expansão de células T
e análise fenotípica
(4 a 12 dias)
Isolamento de células T
e estimulação
(2 dias)
Colheita de células e
colocação novamente
em suspensão
(15 minutos)
b
Viabilidade (% sobre entrada)
Perda de células
do protocolo
Viabilidade (% sobre nenhum eletro)
Perda de células
da toxicidade de DNA/RNP
HDR (% do total)
Contagem absoluta de células (x1,000)
Número total de células
GFP + células
Número de células
de entrada
Sem
eletroporação
RNP + HDRT
RNP + HDRT
Dia após a
eletroporação:
0
2
4
Expansão contínua

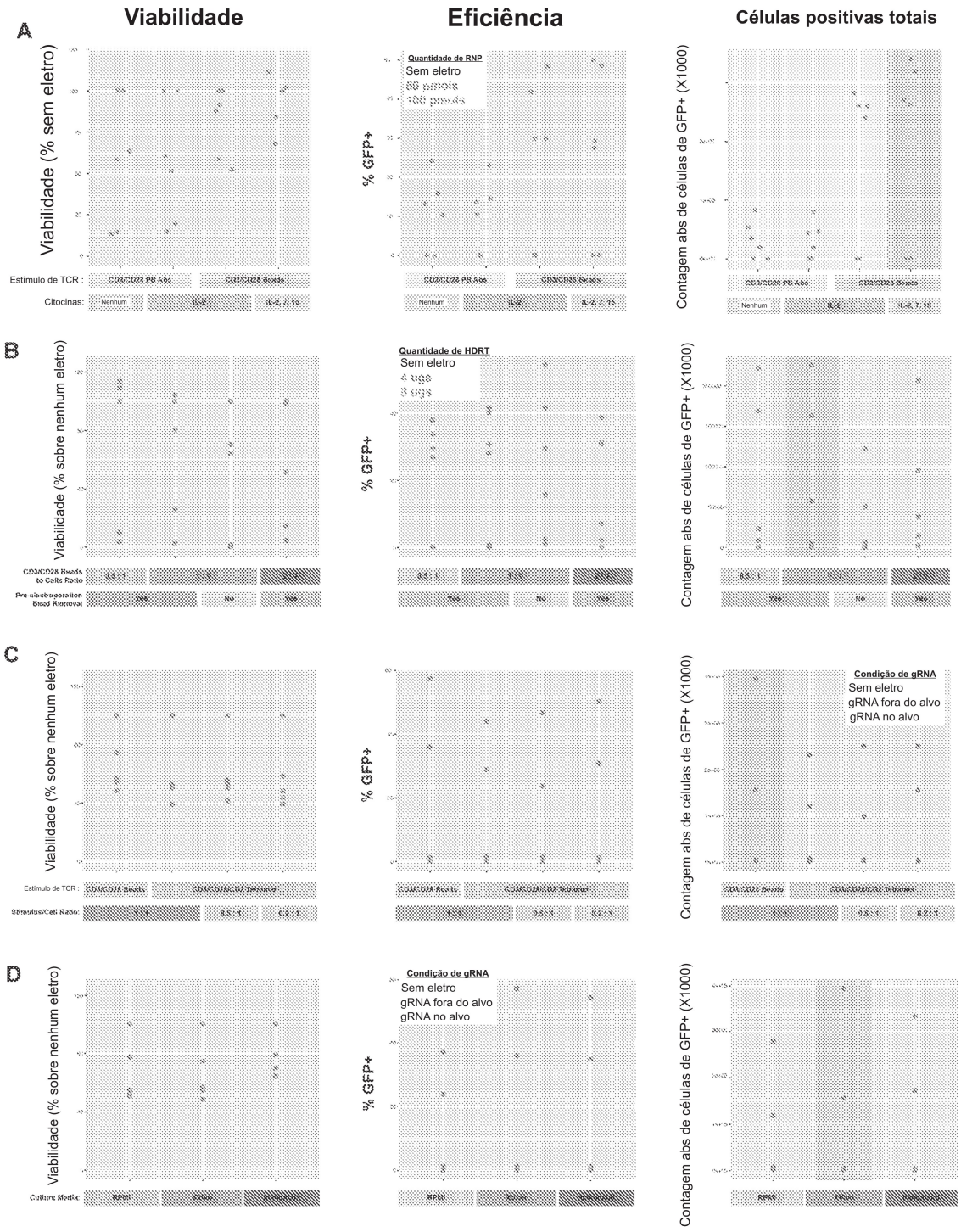

A
Viabilidade
Eficiência
Células positivas totais
Viabilidade (% sem eletro)
% GFP+
Contagem abs de células de GFP+ (X1000)
Quantidade de RNP
Sem eletro
80 pmols
160 pmols
Estímulo de TCR :
CD3/CD28 PB Abs
CD3/CD28 Beads
Citocinas:
Nenhum
IL-2
IL-2, 7, 15
B
Viabilidade (% sobre nenhum eletro)
Quantidade de HDRT
Sem eletro
4 mgs
8 mgs
CD3/CD28 Beads to Cells Ratio
Pre-electroporation Bead Removal
Yes
No
C
Viabilidade (% sobre nenhum eletro)
Condição de gRNA
Sem eletro
gRNA fora do alvo
gRNA no alvo
Estímulo de TCR :
CD3/CD28 Beads
CD3/CD28/CD2 Tetramer
Stimulus/Cell Ratio:
D
Viabilidade (% sobre nenhum eletro)
Condição de gRNA
Sem eletro
gRNA fora do alvo
gRNA no alvo
Culture Media:
RPMI
X-Vivo
X-Vivo/AIM V

FIG. 13

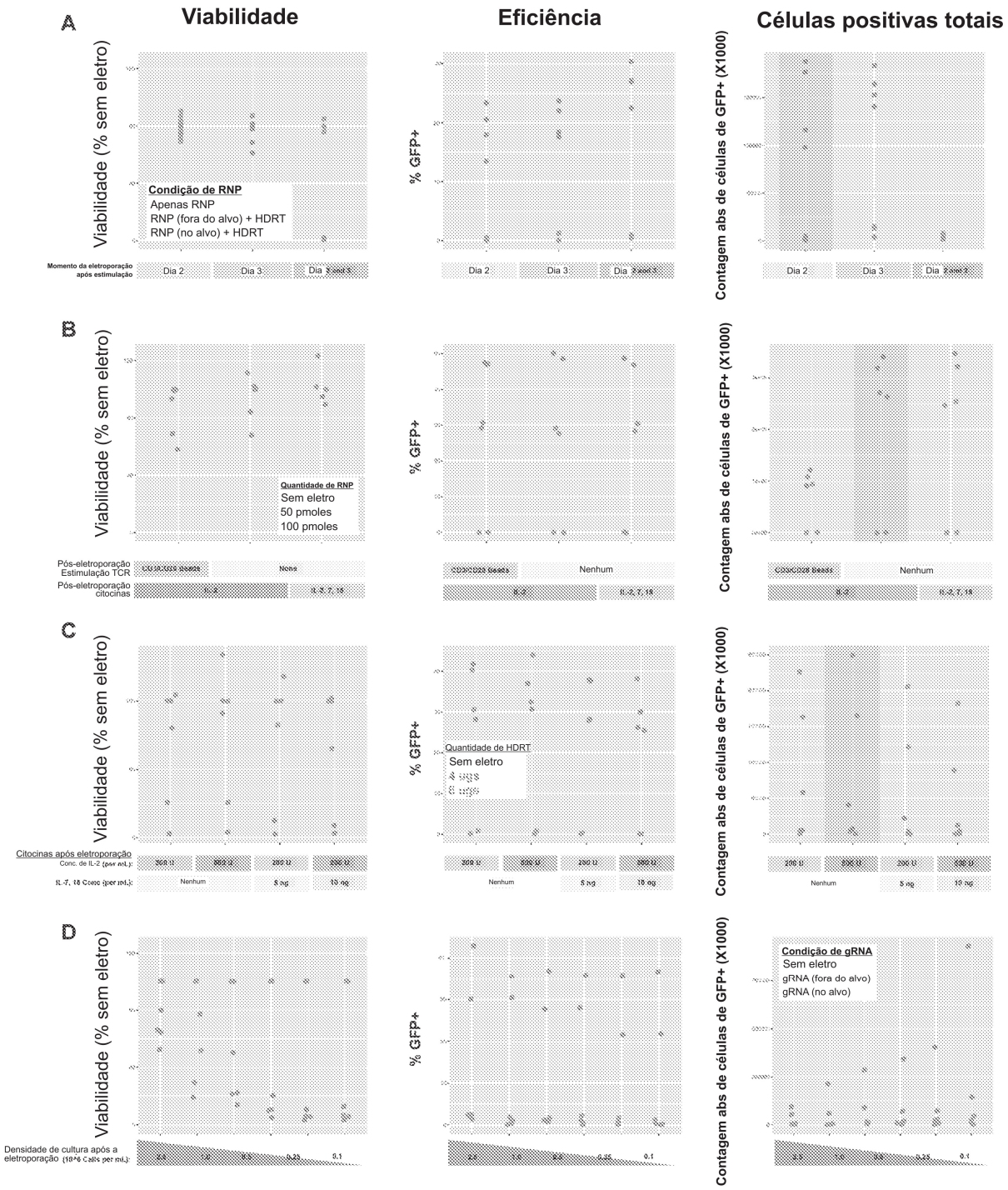
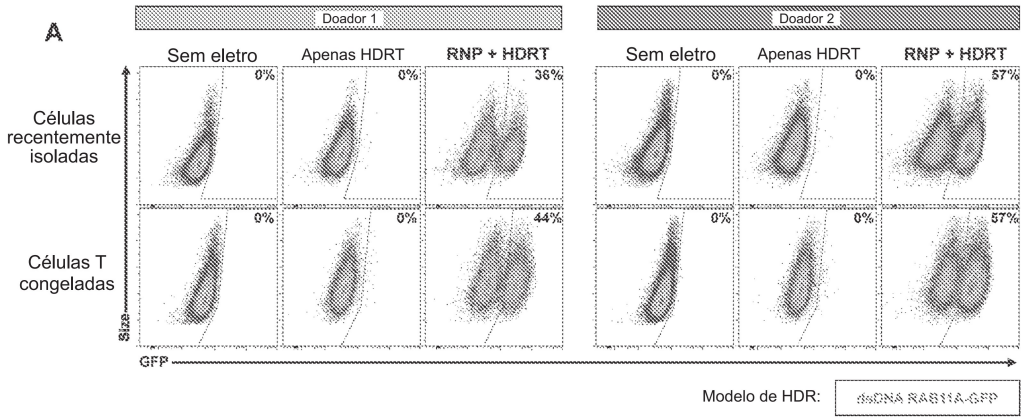

A
Viabilidade
Eficiência
Células positivas totais
Viabilidade (% sem eletro)
% GFP+
Contagem abs de células de GFP+ (X1000)
Condição de RNP
Apenas RNP
RNP (fora do alvo) + HDRT
RNP (no alvo) + HDRT
Momento da eletroporação após estimulação
Dia 2
Dia 3
Dia 5 ou 6
B
Quantidade de RNP
Sem eletro
50 pmoles
100 pmoles
Pós-eletroporação Estimulação TCR
CD3/CD28 Beads
None
Nenhum
Pós-eletroporação citocinas
IL-2
IL-2, 7, 15
C
Quantidade de HDRT
Sem eletro
4 uM
8 uM
Citocinas após eletroporação
Conc. de IL-2 (per mL):
200 U
800 U
IL-7, 15 Conc (per mL):
Nenhum
5 ng
10 ng
D
Densidade de cultura após a eletroporação (10^6 Cells per mL):
2.5
1.25
0.63
0.31
0.1
Condição de gRNA
Sem eletro
gRNA (fora do alvo)
gRNA (no alvo)

FIG. 13


A
Doador 1
Doador 2
Sem eletro
Apenas HDRT
RNP + HDRT
Sem eletro
Apenas HDRT
RNP + HDRT
Células recentemente isoladas
Células T congeladas
0%
0%
36%
0%
0%
57%
0%
0%
44%
0%
0%
57%
Size
GFP
Modelo de HDR:
dsDNA RAB11A-GFP

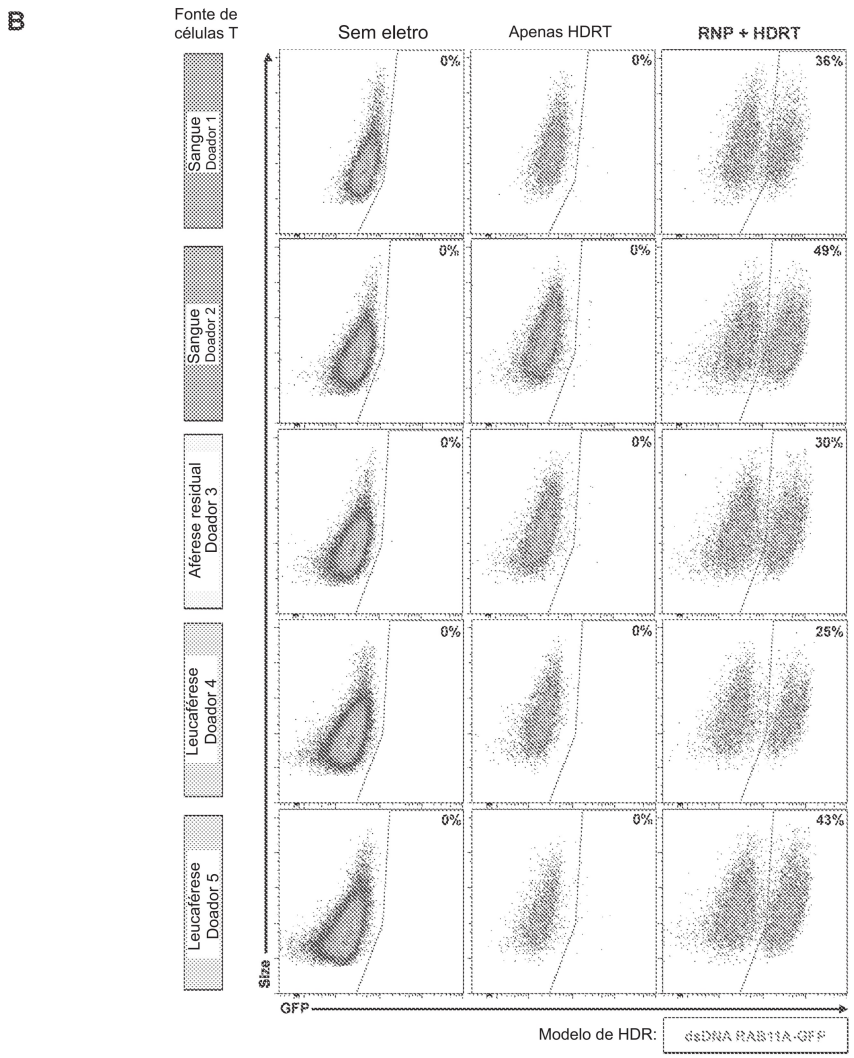

B
Fonte de células T
Sem eletro
Apenas HDRT
RNP + HDRT
Sangue Doador 1
Sangue Doador 2
Aférese residual Doador 3
Leucaférese Doador 4
Leucaférese Doador 5
0%
0%
36%
0%
0%
49%
0%
0%
38%
0%
0%
25%
0%
0%
43%
Size
GFP
Modelo de HDR:
dsDNA RAB11A-GFP

FIG. 15

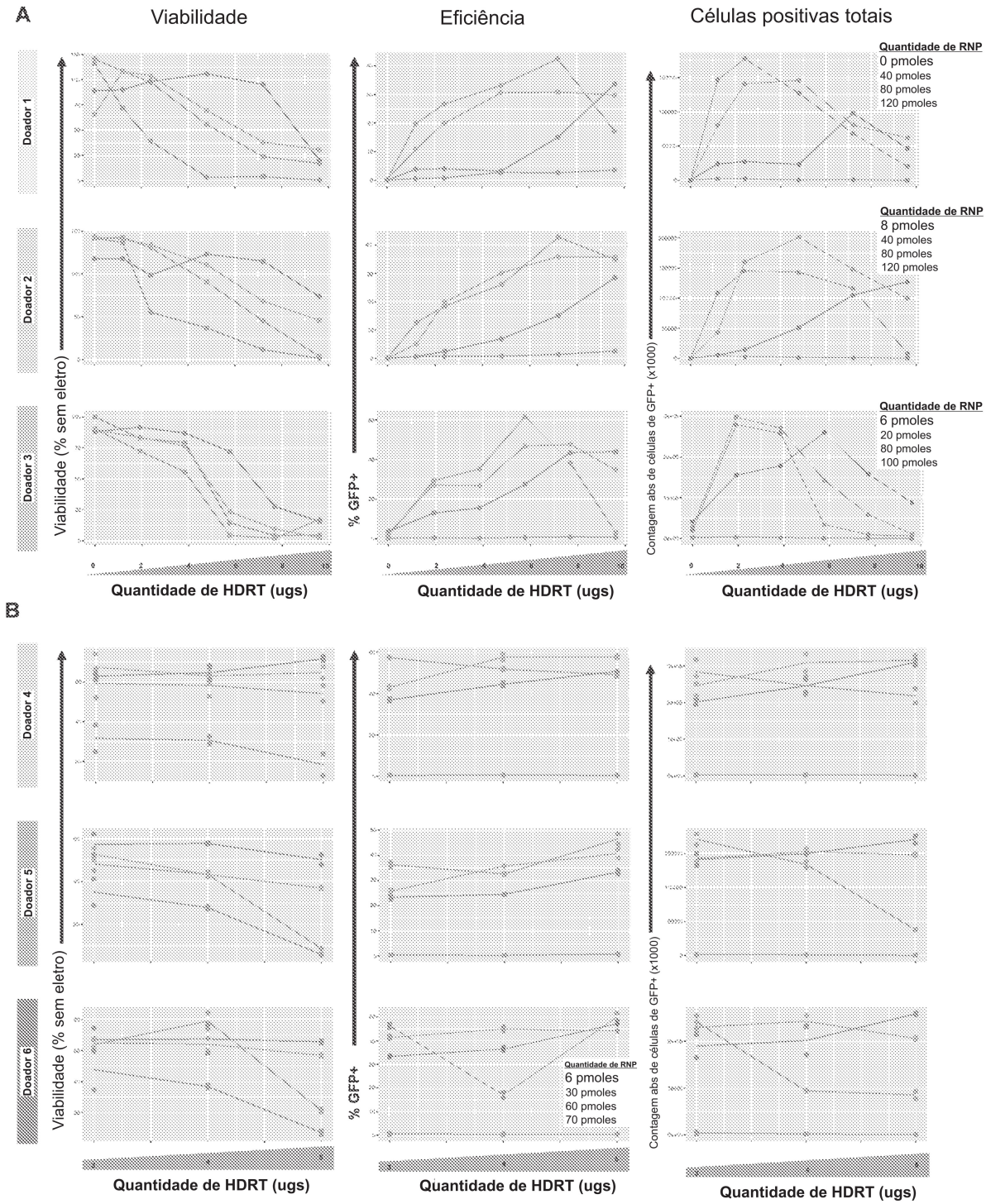

A
Viabilidade
Eficiência
Células positivas totais
Doador 1
Doador 2
Doador 3
Viabilidade (% sem eletro)
% GFP+
Contagem abs de células de GFP+ (x1000)
Quantidade de RNP
0 pmoles
40 pmoles
80 pmoles
120 pmoles
Quantidade de RNP
8 pmoles
40 pmoles
80 pmoles
120 pmoles
Quantidade de RNP
6 pmoles
20 pmoles
80 pmoles
100 pmoles
Quantidade de HDRT (ugs)
Quantidade de HDRT (ugs)
Quantidade de HDRT (ugs)
B
Doador 4
Doador 5
Doador 6
Viabilidade (% sem eletro)
% GFP+
Contagem abs de células de GFP+ (x1000)
Quantidade de RNP
6 pmoles
30 pmoles
60 pmoles
70 pmoles
Quantidade de HDRT (ugs)
Quantidade de HDRT (ugs)
Quantidade de HDRT (ugs)

FIG. 16

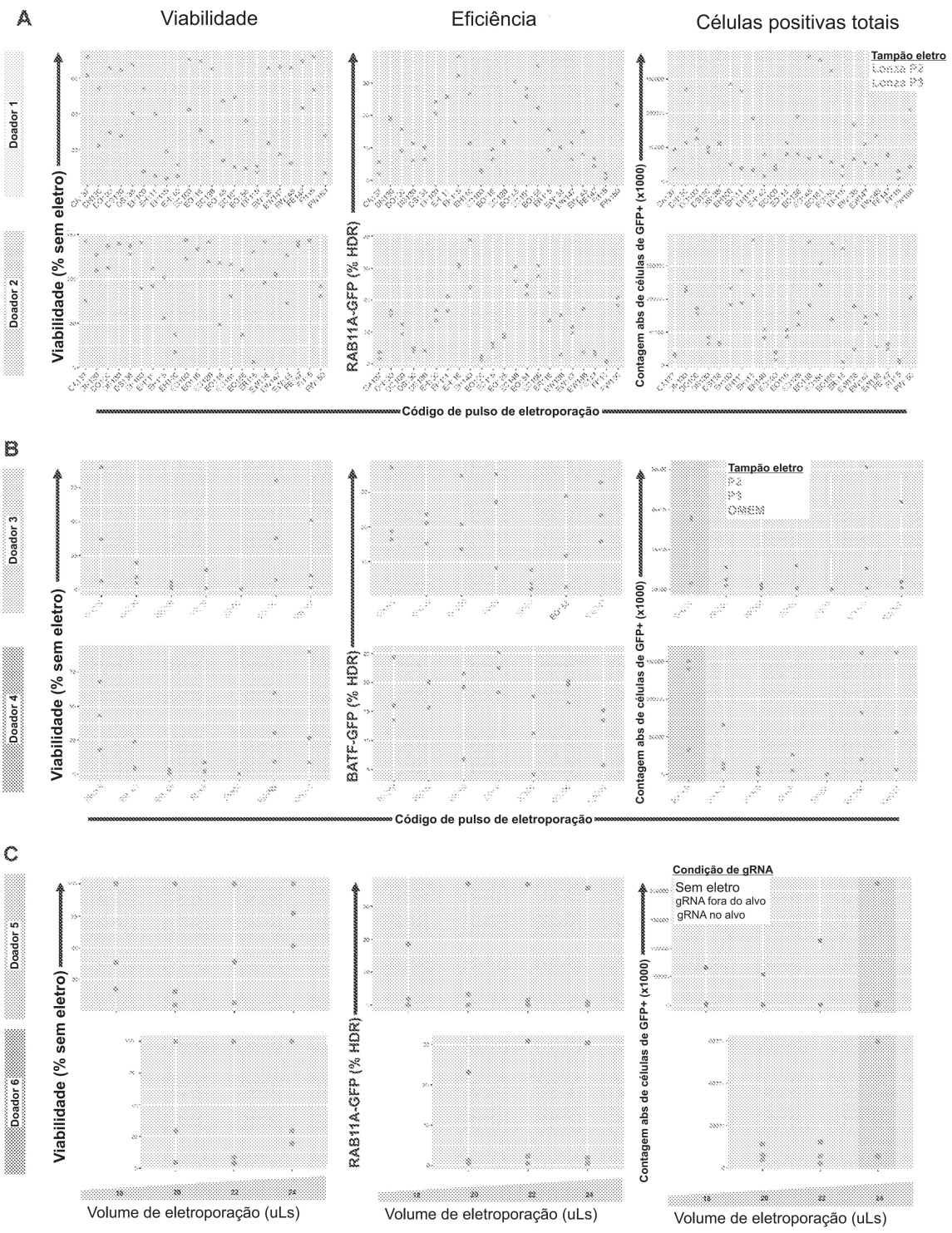

A
Viabilidade
Eficiência
Células positivas totais
Doador 1
Doador 2
Viabilidade (% sem eletro)
RAB11A-GFP (% HDR)
Contagem abs de células de GFP+ (x1000)
Tampão eletro
Lonza P2
Lonza P3
Código de pulso de eletroporação
B
Doador 3
Doador 4
Viabilidade (% sem eletro)
BATF-GFP (% HDR)
Contagem abs de células de GFP+ (x1000)
Tampão eletro
P2
P3
OMEM
Código de pulso de eletroporação
C
Doador 5
Doador 6
Viabilidade (% sem eletro)
RAB11A-GFP (% HDR)
Contagem abs de células de GFP+ (x1000)
Condição de gRNA
Sem eletro
gRNA fora do alvo
gRNA no alvo
Volume de eletroporação (uLs)
Volume de eletroporação (uLs)
Volume de eletroporação (uLs)

FIG. 17

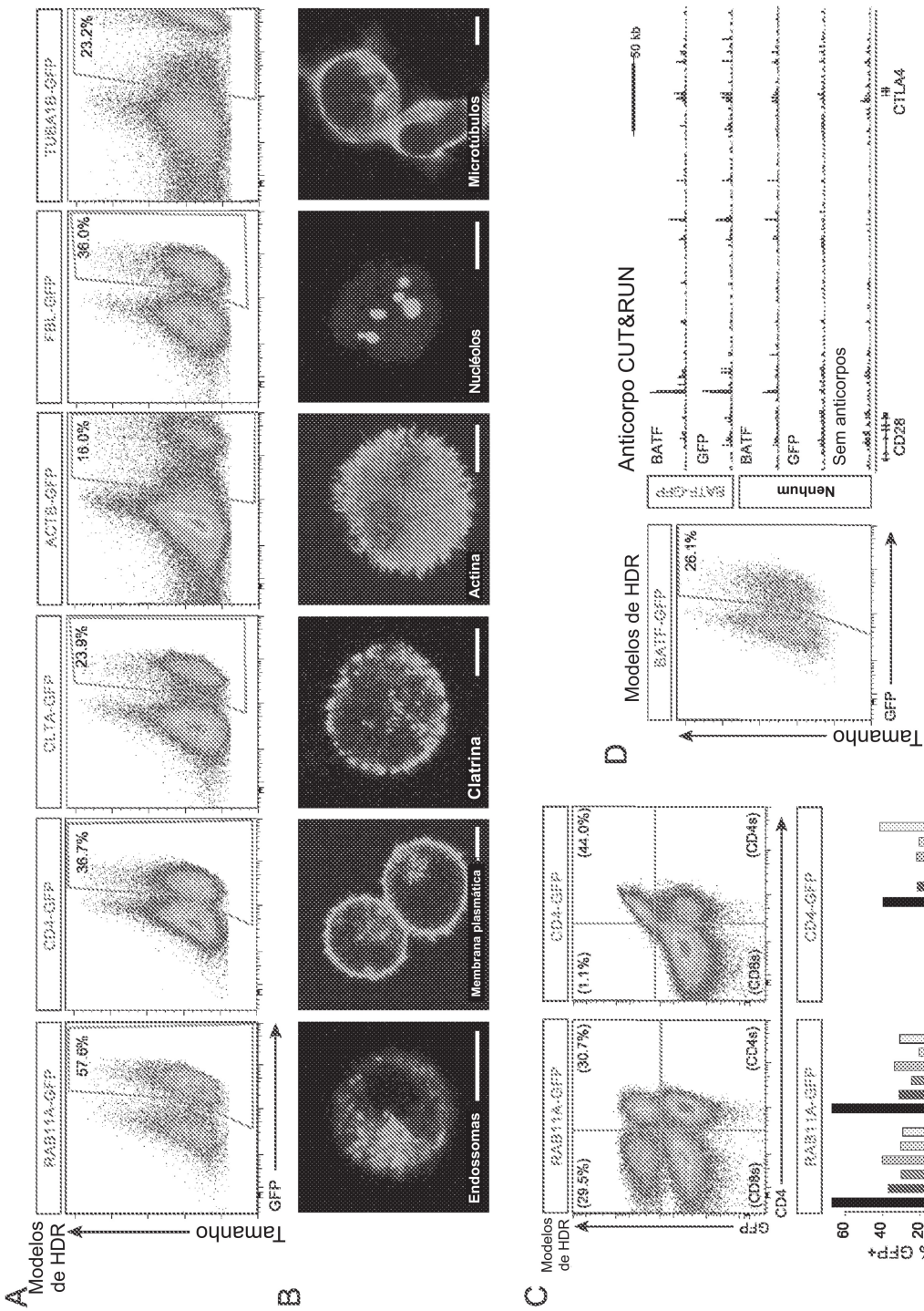

A
Modelos de HDR
Tamanho
GFP
RAB11A-GFP
57.6%
CD4-GFP
36.7%
CLTA-GFP
23.9%
ACTB-GFP
16.0%
FBL-GFP
36.0%
TUBA1B-GFP
23.2%
B
Endossomas
Membrana plasmática
Clatrina
Actina
Nucléolos
Microtúbulos
C
Modelos de HDR
RAB11A-GFP
(29.5%)
(30.7%)
(CD8s)
(CD4s)
CD4
GFP
CD4-GFP
(1.1%)
(44.0%)
% GFP+
Tipo célula T humana primária
CD8
CD4
Doadores de 1 a 6
D
Modelos de HDR
BATF-GFP
26.1%
Tamanho
GFP
Anticorpo CUT&RUN
50 kb
BATF
GFP
Nenhum
Sem anticorpos
CD28
CTLA4

FIG. 18

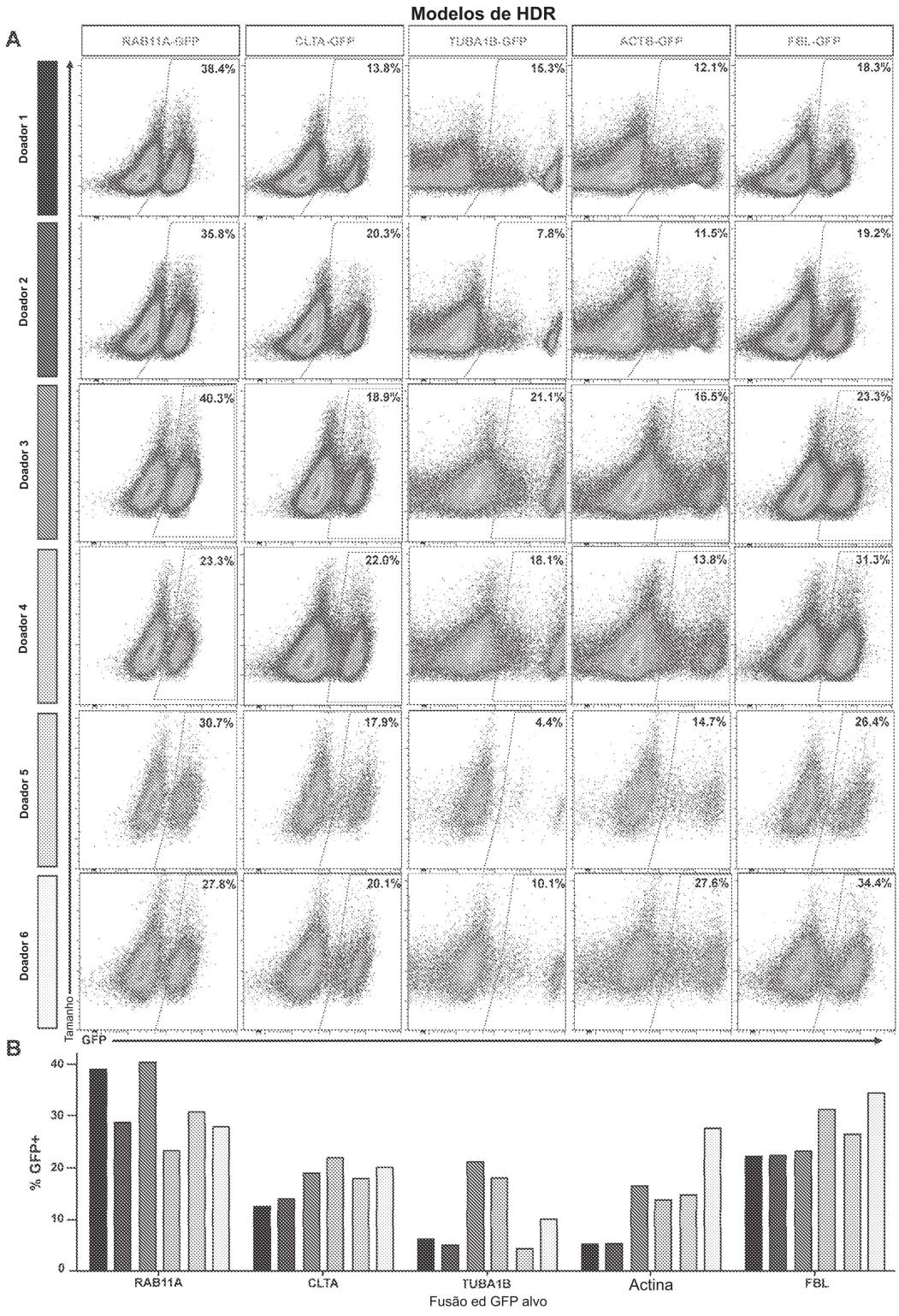

Modelos de HDR
A
RAB11A-GFP
CLTA-GFP
TUBA1B-GFP
ACTB-GFP
FBL-GFP
Doador 1
Doador 2
Doador 3
Doador 4
Doador 5
Doador 6
38.4%
13.8%
15.3%
12.1%
18.3%
35.8%
20.3%
7.8%
11.5%
19.2%
40.3%
18.9%
21.1%
16.5%
23.3%
23.3%
22.0%
18.1%
13.8%
31.3%
30.7%
17.9%
4.4%
14.7%
26.4%
27.8%
20.1%
10.1%
27.6%
34.4%
Tamanho
GFP
B
% GFP+
0
10
20
30
40
RAB11A
CLTA
TUBA1B
Actina
FBL
Fusão ed GFP alvo

FIG. 19

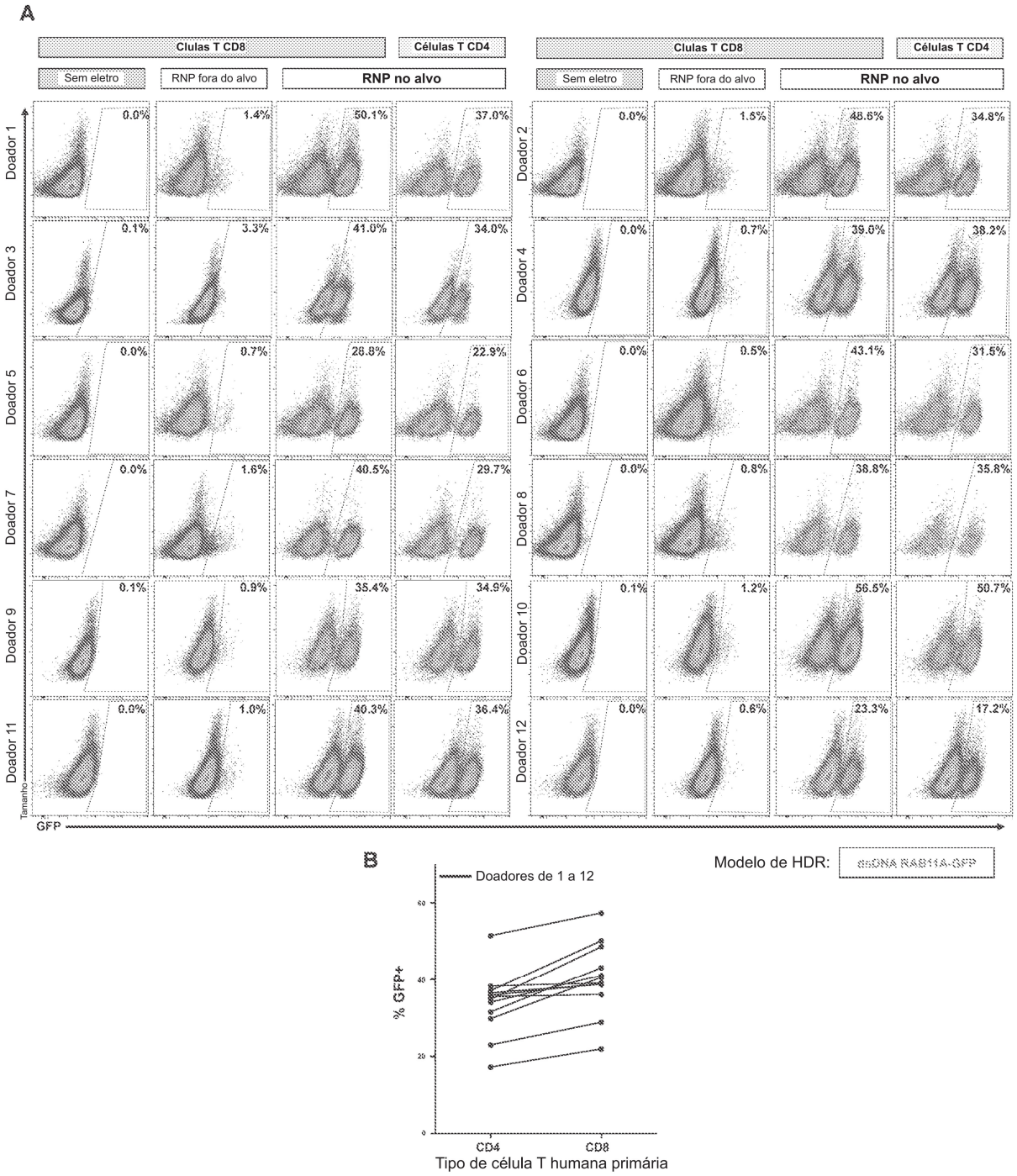

A
Clulas T CD8
Células T CD4
Sem eletro
RNP fora do alvo
RNP no alvo
Doador 1
Doador 2
Doador 3
Doador 4
Doador 5
Doador 6
Doador 7
Doador 8
Doador 9
Doador 10
Doador 11
Doador 12
0.0%
1.4%
50.1%
37.0%
0.0%
1.5%
48.6%
34.8%
0.1%
3.3%
41.0%
34.0%
0.0%
0.7%
39.0%
38.2%
0.0%
0.7%
26.8%
22.9%
0.0%
0.5%
43.1%
31.5%
0.0%
1.6%
40.5%
29.7%
0.0%
0.8%
38.8%
35.8%
0.1%
0.9%
35.4%
34.9%
0.1%
1.2%
56.5%
50.7%
0.0%
1.0%
40.3%
36.4%
0.0%
0.6%
23.3%
17.2%
Tamanho
GFP
B
Doadores de 1 a 12
% GFP+
60
40
20
0
CD4
CD8
Tipo de célula T humana primária
Modelo de HDR:
dsDNA RAB11A-GFP

FIG. 20

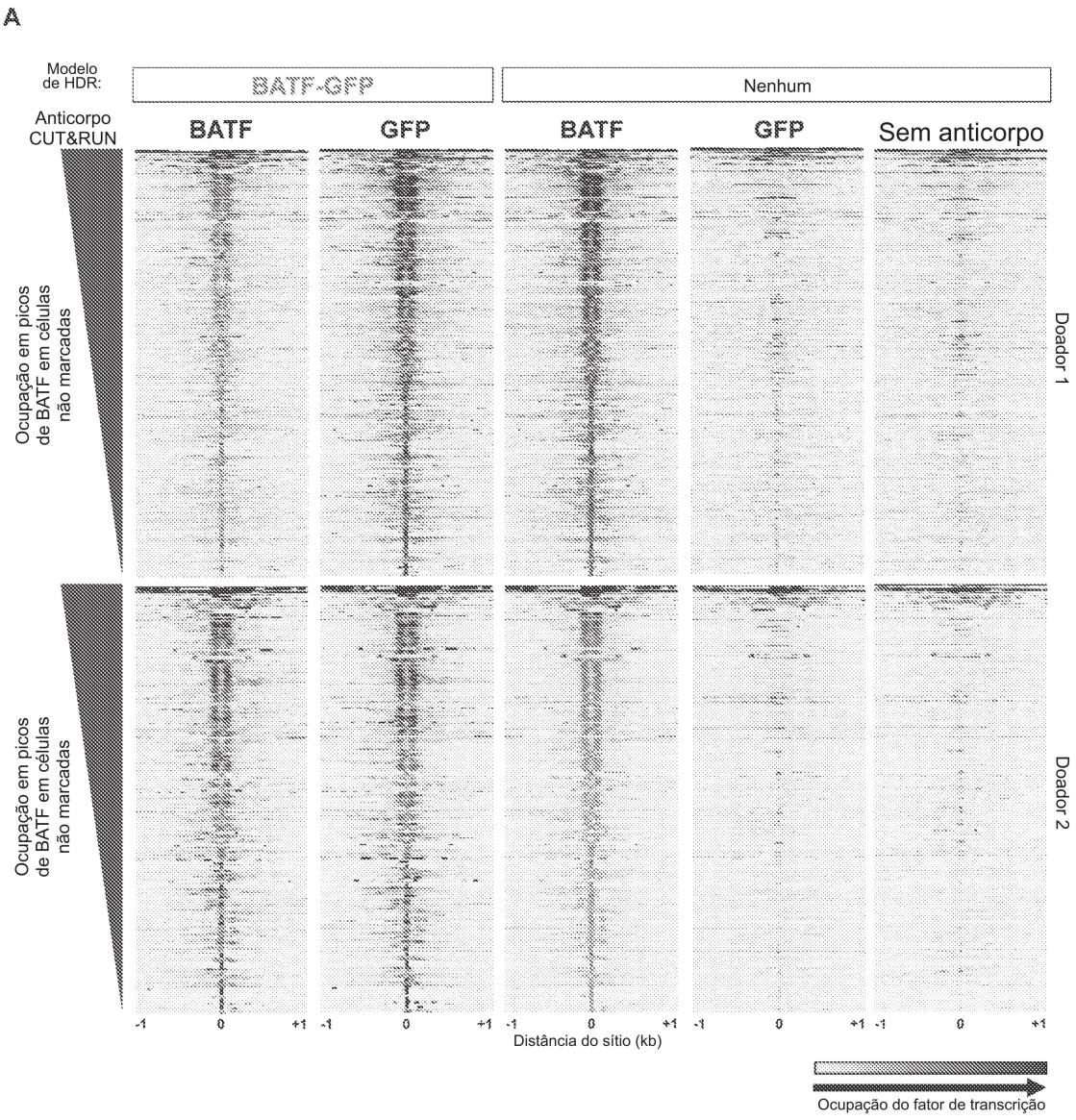

A
Modelo de HDR:
BATF-GFP
Nenhum
Anticorpo CUT&RUN
BATF
GFP
BATF
GFP
Sem anticorpo
Ocupação em picos de BATF em células não marcadas
Doador 1
Ocupação em picos de BATF em células não marcadas
Doador 2
-1
0
+1
Distância do sítio (kb)
Ocupação do fator de transcrição

FIG. 21

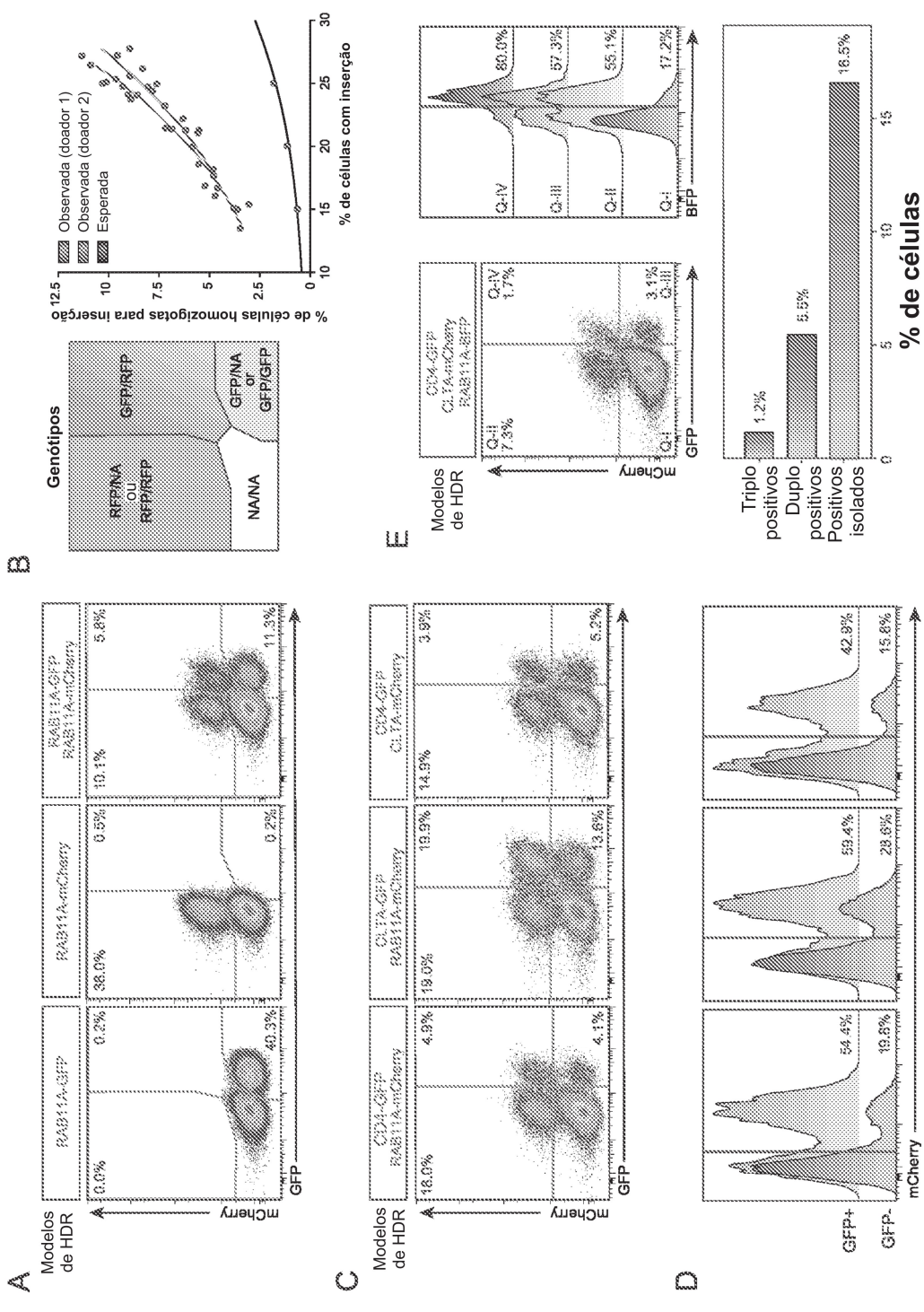

A
Modelos de HDR
RAB11A-GFP
RAB11A-mCherry
mCherry
GFP
B
Genótipos
RFP/NA ou RFP/RFP
GFP/RFP
NA/NA
GFP/NA or GFP/GFP
% de células homozigotas para inserção
Observada (doador 1)
Observada (doador 2)
Esperada
% de células com inserção
C
Modelos de HDR
CD4-GFP
CLTA-mCherry
RAB11A-mCherry
D
GFP+
GFP-
mCherry
E
Modelos de HDR
CD4-GFP
CLTA-mCherry
RAB11A-BFP
BFP
Triplo positivos
Duplo positivos
Positivos isolados
% de células

FIG. 22

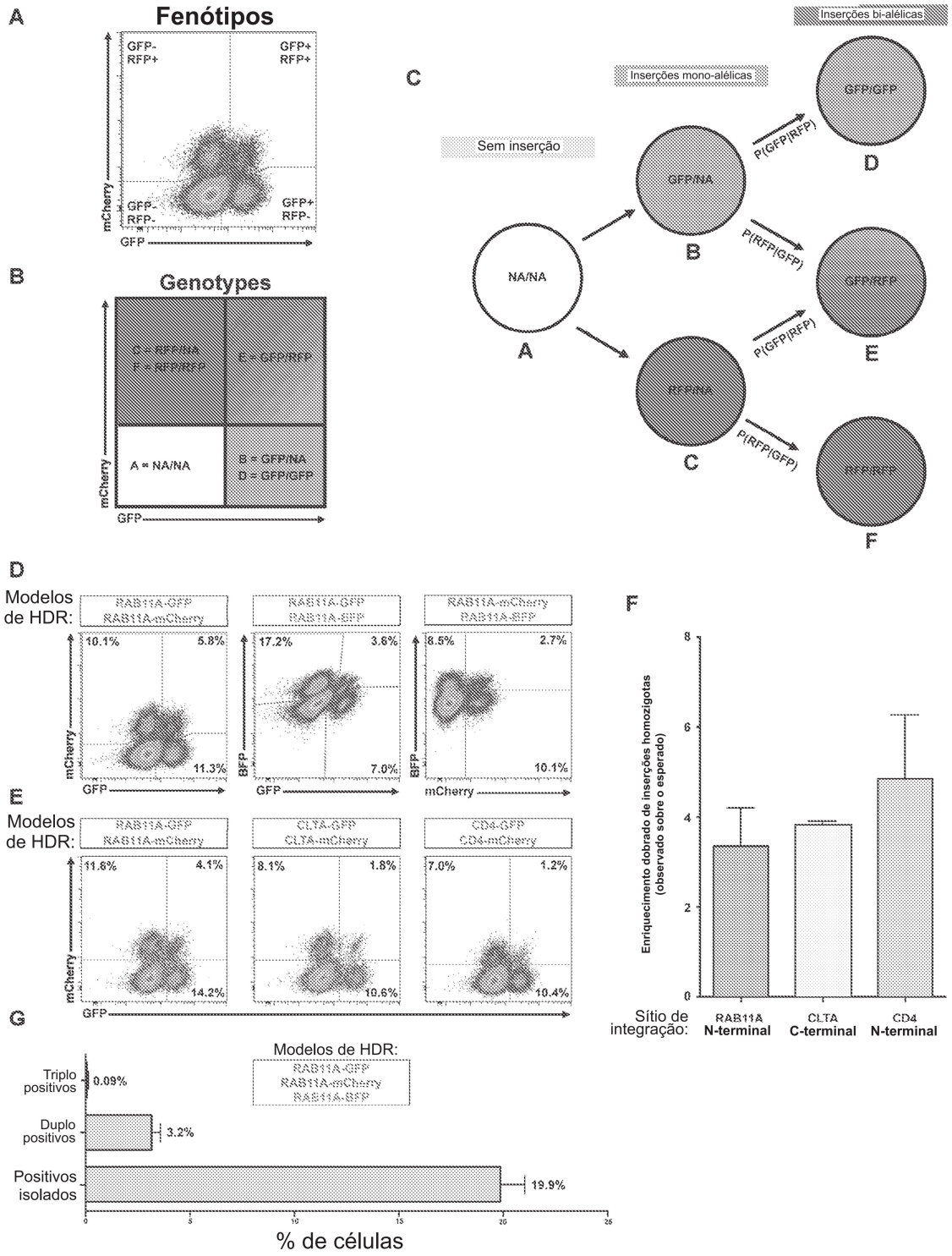

A
Fenótipos
GFP-
RFP+
GFP+
RFP+
GFP-
RFP-
GFP+
RFP-
mCherry
GFP
B
Genotypes
C = RFP/NA
F = RFP/RFP
E = GFP/RFP
A = NA/NA
B = GFP/NA
D = GFP/GFP
mCherry
GFP
C
Inserções bi-alélicas
Inserções mono-alélicas
Sem inserção
NA/NA
A
GFP/NA
B
RFP/NA
C
GFP/GFP
D
GFP/RFP
E
RFP/RFP
F
P(GFP|RFP)
P(RFP|GFP)
P(GFP|RFP)
P(RFP|GFP)
D
Modelos de HDR:
RAB11A-GFP
RAB11A-mCherry
10.1%
5.8%
11.3%
RAB11A-GFP
RAB11A-BFP
17.2%
3.8%
7.0%
RAB11A-mCherry
RAB11A-BFP
8.5%
2.7%
10.1%
mCherry
GFP
BFP
GFP
BFP
mCherry
E
Modelos de HDR:
RAB11A-GFP
RAB11A-mCherry
11.6%
4.1%
14.2%
CLTA-GFP
CLTA-mCherry
8.1%
1.8%
10.6%
CD4-GFP
CD4-mCherry
7.0%
1.2%
10.4%
mCherry
GFP
F
Enriquecimento dobrado de inserções homozigotas (observado sobre o esperado)
0
2
4
6
8
Sítio de integração:
RAB11A N-terminal
CLTA C-terminal
CD4 N-terminal
G
Modelos de HDR:
RAB11A-GFP
RAB11A-mCherry
RAB11A-BFP
Triplo positivos
0.09%
Duplo positivos
3.2%
Positivos isolados
19.9%
0
5
10
15
20
25
% de células

FIG. 23

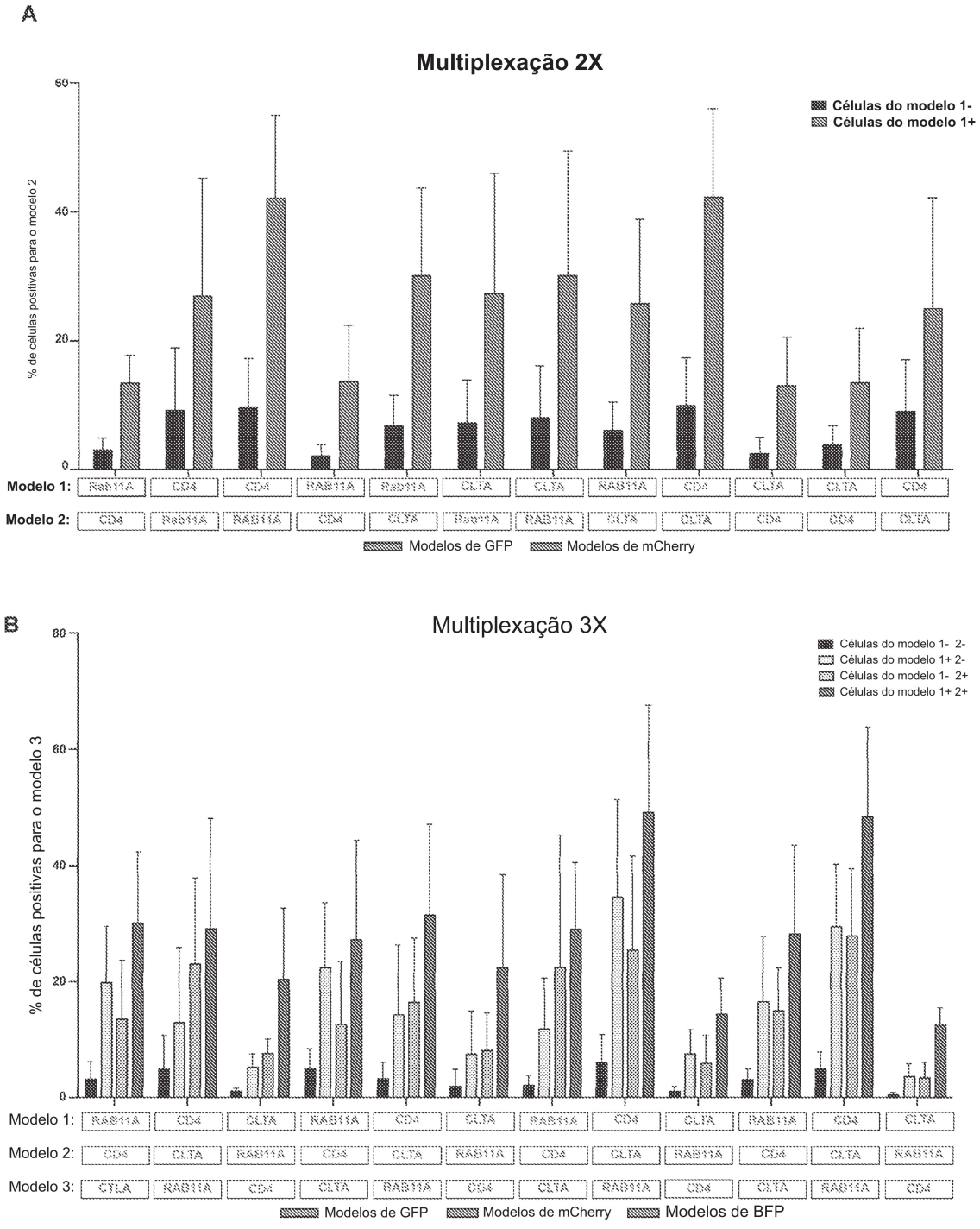

A
Multiplexação 2X
Células do modelo 1-
Células do modelo 1+
% de células positivas para o modelo 2
60
40
20
0
Modelo 1:
Modelo 2:
Modelos de GFP
Modelos de mCherry
B
Multiplexação 3X
Células do modelo 1- 2-
Células do modelo 1+ 2-
Células do modelo 1- 2+
Células do modelo 1+ 2+
% de células positivas para o modelo 3
80
60
40
20
0
Modelo 1:
Modelo 2:
Modelo 3:
Modelos de GFP
Modelos de mCherry
Modelos de BFP

FIG. 24

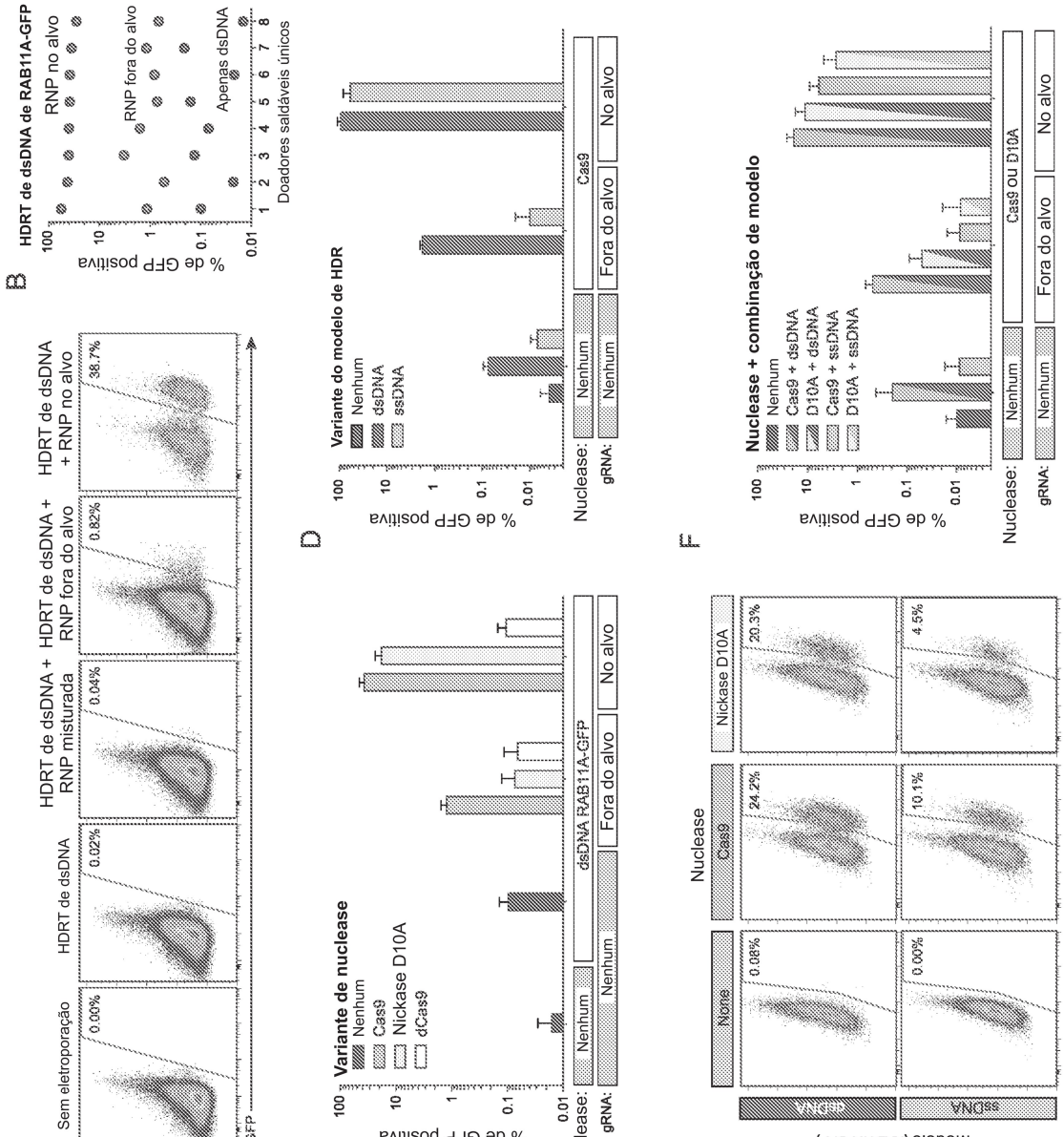

A
Sem eletroporação
HDRT de dsDNA
HDRT de dsDNA + RNP misturada
HDRT de dsDNA + RNP fora do alvo
HDRT de dsDNA + RNP no alvo
0.00%
0.02%
0.04%
0.82%
38.7%
Size
GFP
B
HDRT de dsDNA de RAB11A-GFP
% de GFP positiva
RNP no alvo
RNP fora do alvo
Apenas dsDNA
Doadores saldáveis únicos
C
Variante de nuclease
Nenhum
Cas9
Nickase D10A
dCas9
% de GFP positiva
dsDNA RAB11A-GFP
Nuclease:
gRNA:
Nenhum
Fora do alvo
No alvo
D
Variante do modelo de HDR
Nenhum
dsDNA
ssDNA
% de GFP positiva
Cas9
E
Nuclease
None
Cas9
Nickase D10A
0.08%
24.2%
20.3%
0.00%
10.1%
4.5%
Modelo (RAB11A-GFP)
dsDNA
ssDNA
GFP
F
Nuclease + combinação de modelo
Nenhum
Cas9 + dsDNA
D10A + dsDNA
Cas9 + ssDNA
D10A + ssDNA
% de GFP positiva
Nenhum
Cas9 ou D10A
Fora do alvo
No alvo

FIG. 25

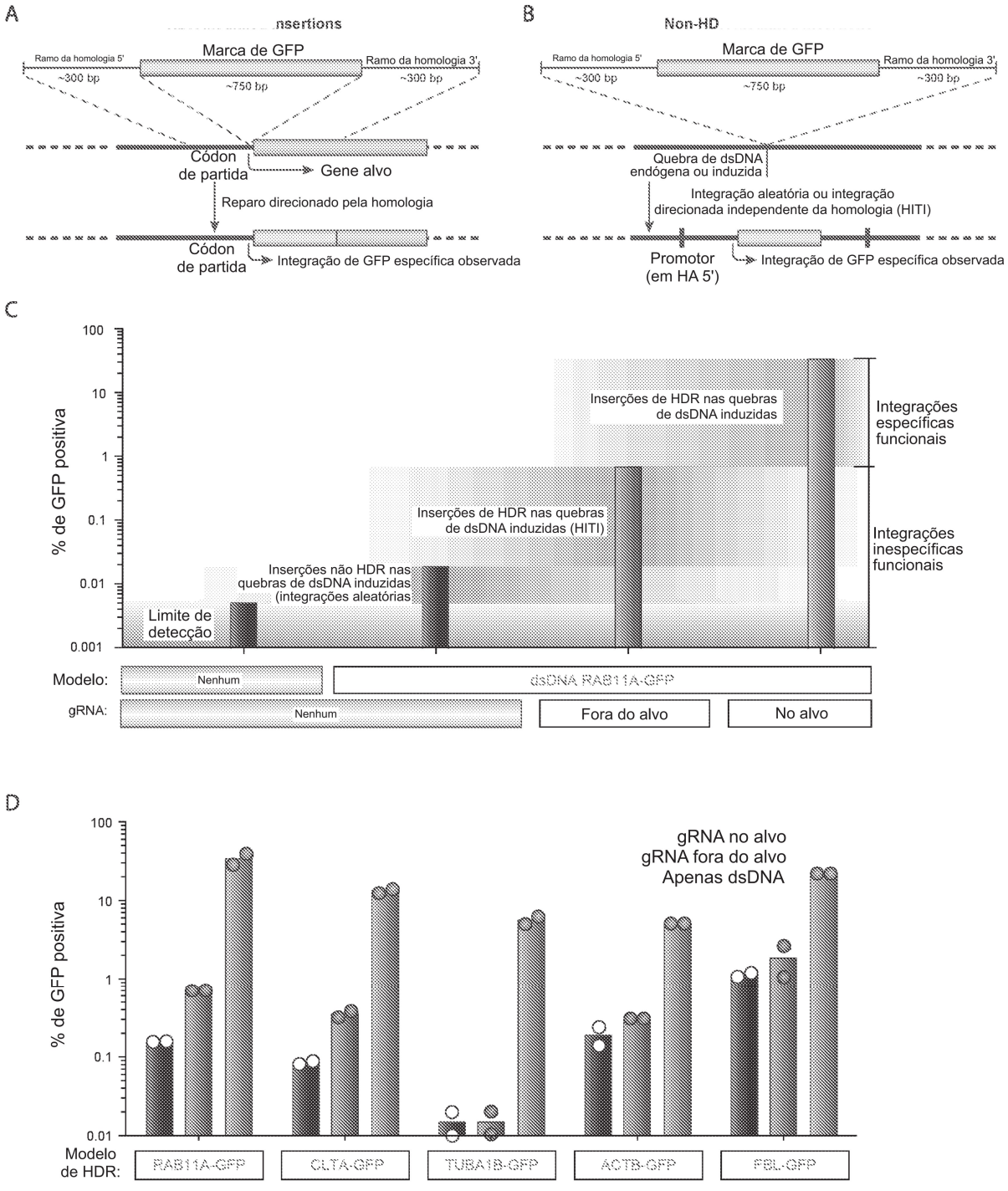

A
nsertions
Ramo da homologia 5'
Marca de GFP
Ramo da homologia 3'
~300 bp
~750 bp
~300 bp
Códon de partida
Gene alvo
Reparo direcionado pela homologia
Códon de partida
Integração de GFP específica observada
B
Non-HD
Ramo da homologia 5'
Marca de GFP
Ramo da homologia 3'
~300 bp
~750 bp
~300 bp
Quebra de dsDNA endógena ou induzida
Integração aleatória ou integração direcionada independente da homologia (HITI)
Promotor (em HA 5')
Integração de GFP específica observada
C
% de GFP positiva
100
10
1
0.1
0.01
0.001
Inserções de HDR nas quebras de dsDNA induzidas
Inserções de HDR nas quebras de dsDNA induzidas (HITI)
Inserções não HDR nas quebras de dsDNA induzidas (integrações aleatórias
Limite de detecção
Integrações específicas funcionais
Integrações inespecíficas funcionais
Modelo:
Nenhum
dsDNA RAB11A-GFP
gRNA:
Nenhum
Fora do alvo
No alvo
D
% de GFP positiva
100
10
1
0.1
0.01
gRNA no alvo
gRNA fora do alvo
Apenas dsDNA
Modelo de HDR:
RAB11A-GFP
CLTA-GFP
TUBA1B-GFP
ACTB-GFP
FBL-GFP

FIG. 26

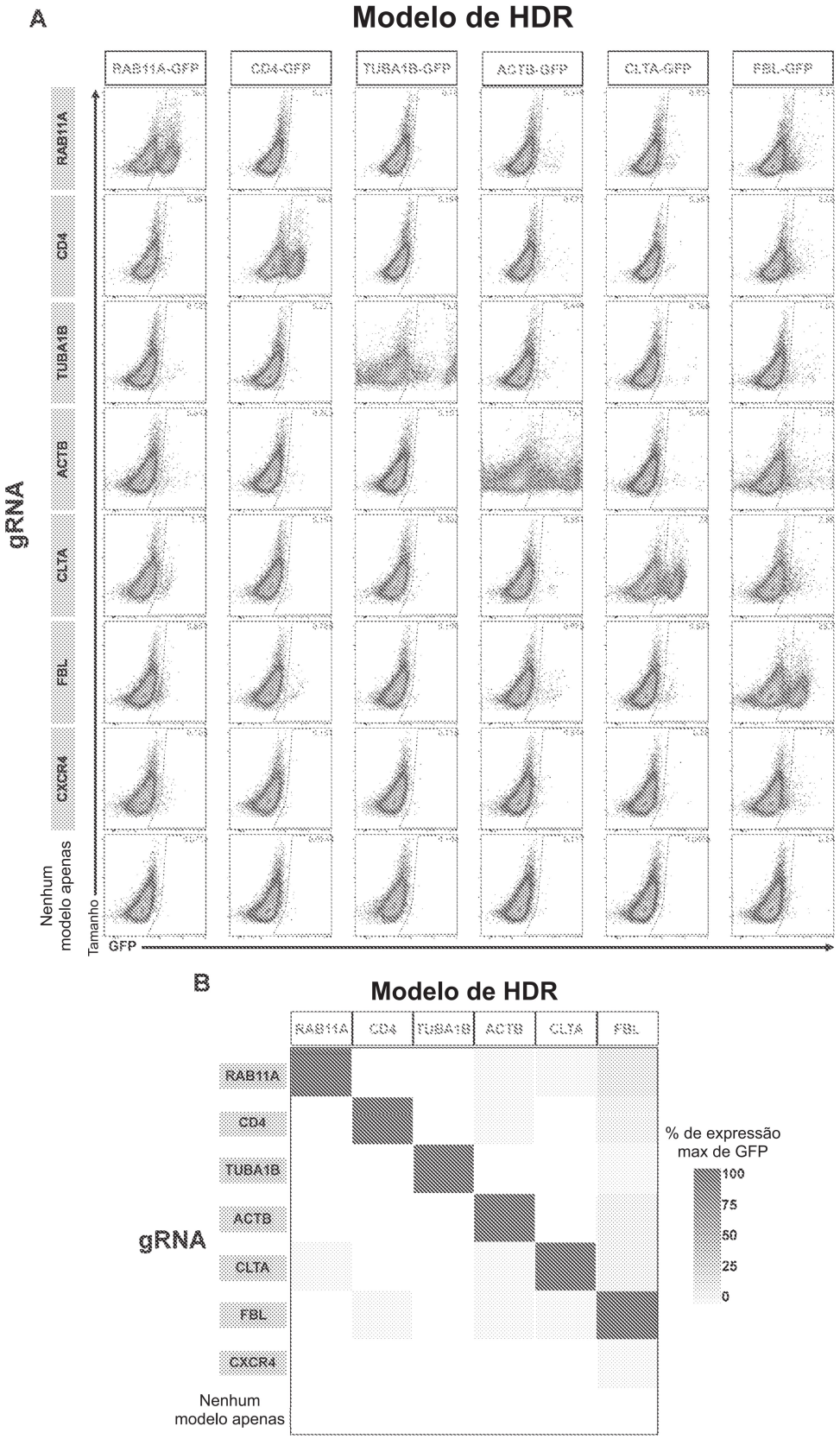

A
Modelo de HDR
RAB11A-GFP
CD4-GFP
TUBA1B-GFP
ACTB-GFP
CLTA-GFP
FBL-GFP
gRNA
RAB11A
CD4
TUBA1B
ACTB
CLTA
FBL
CXCR4
Nenhum modelo apenas
Tamanho
GFP
B
Modelo de HDR
RAB11A
CD4
TUBA1B
ACTB
CLTA
FBL
gRNA
CXCR4
Nenhum modelo apenas
% de expressão max de GFP
100
75
50
25
0

FIG. 27

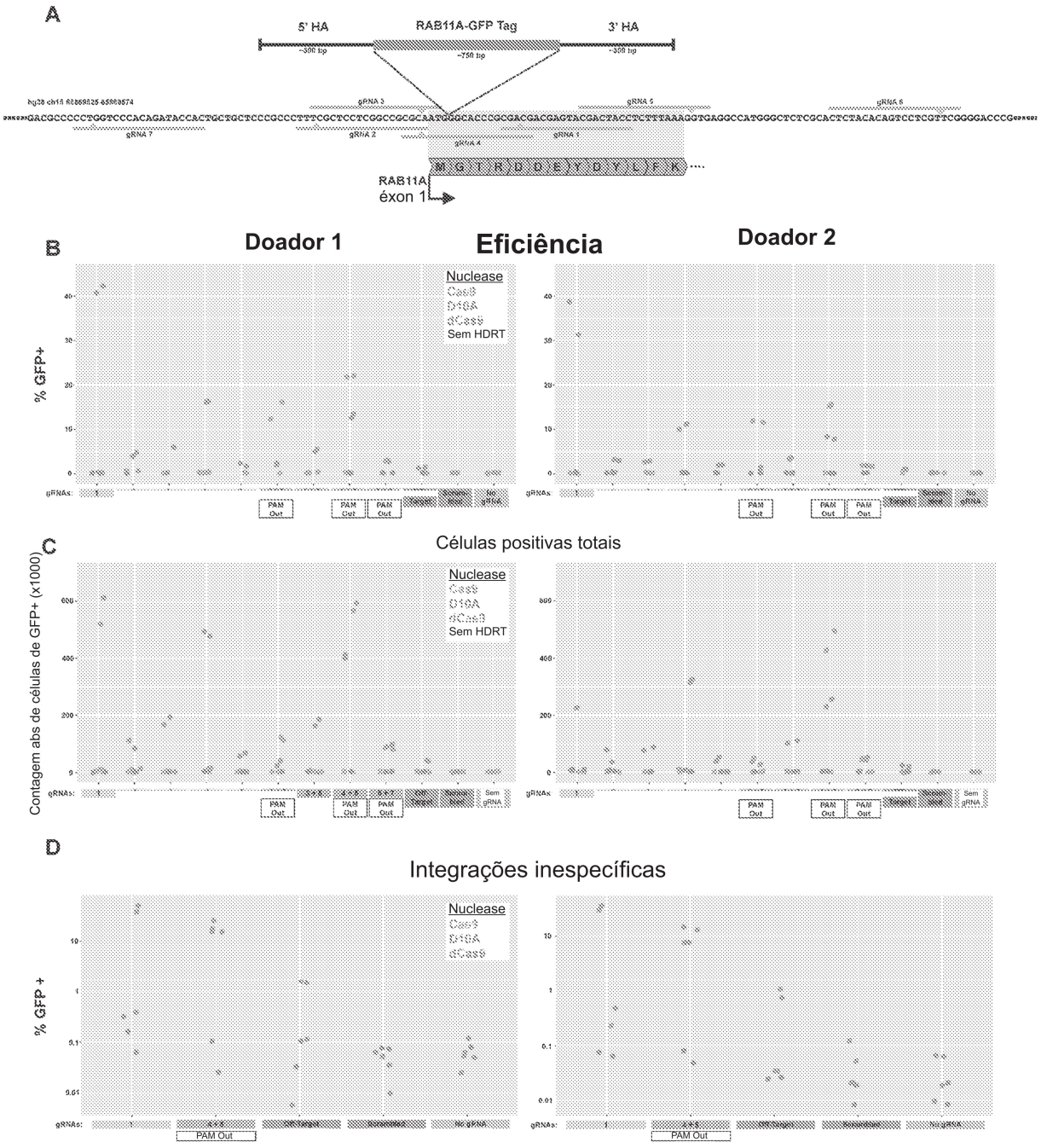

A
5' HA
RAB11A-GFP Tag
3' HA
~300 bp
~750 bp
~300 bp
gRNA 3
gRNA 5
gRNA 6
gRNA 7
gRNA 2
gRNA 4
gRNA 1
M G T R D D E Y D Y L F K
RAB11A
éxon 1
B
Doador 1
Eficiência
Doador 2
Nuclease
Cas9
D10A
dCas9
Sem HDRT
% GFP+
gRNAs:
PAM Out
Target
Scramble
No gRNA
Células positivas totais
Contagem abs de células de GFP+ (x1000)
C
D
Integrações inespecíficas
% GFP +

FIG. 28

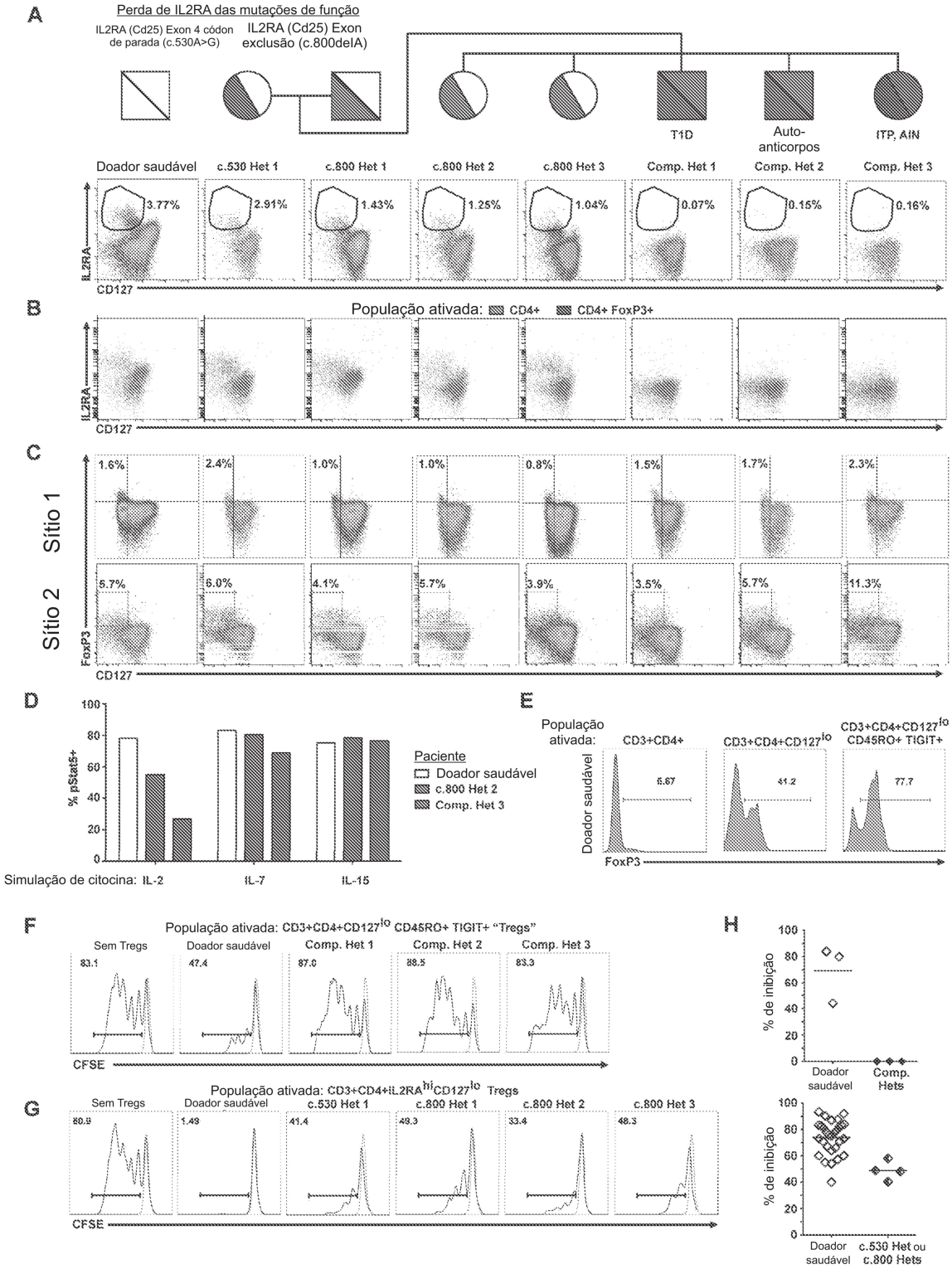
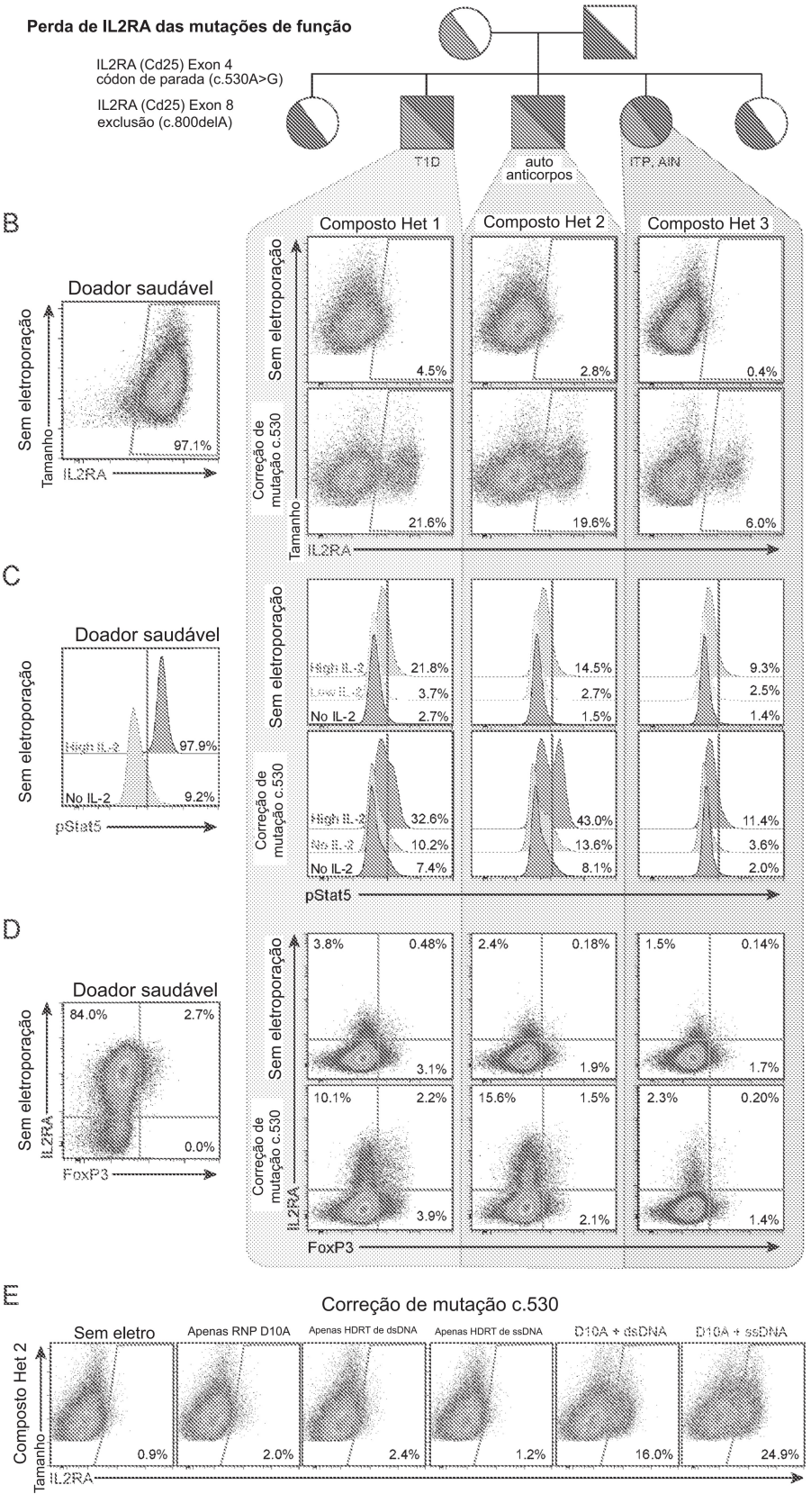

A
Perda de IL2RA das mutações de função
IL2RA (Cd25) Exon 4 códon de parada (c.530A>G)
IL2RA (Cd25) Exon exclusão (c.800delA)
T1D
Auto-anticorpos
ITP, AIN
Doador saudável
c.530 Het 1
c.800 Het 1
c.800 Het 2
c.800 Het 3
Comp. Het 1
Comp. Het 2
Comp. Het 3
3.77%
2.91%
1.43%
1.25%
1.04%
0.07%
0.15%
0.16%
IL2RA
CD127
B
População ativada: CD4+ CD4+ FoxP3+
C
Sítio 1
Sítio 2
1.6%
2.4%
1.0%
1.0%
0.8%
1.5%
1.7%
2.3%
5.7%
6.0%
4.1%
5.7%
3.9%
3.5%
5.7%
11.3%
FoxP3
CD127
D
% pStat5+
Paciente
Doador saudável
c.800 Het 2
Comp. Het 3
Simulação de citocina: IL-2
IL-7
IL-15
E
População ativada:
CD3+CD4+
CD3+CD4+CD127lo
CD3+CD4+CD127lo CD45RO+ TIGIT+
Doador saudável
6.67
41.2
77.7
FoxP3
F
População ativada: CD3+CD4+CD127lo CD45RO+ TIGIT+ "Tregs"
Sem Tregs
Doador saudável
Comp. Het 1
Comp. Het 2
Comp. Het 3
83.1
47.4
87.0
88.5
83.3
CFSE
G
População ativada: CD3+CD4+IL2RAhiCD127lo Tregs
Sem Tregs
Doador saudável
c.530 Het 1
c.800 Het 1
c.800 Het 2
c.800 Het 3
80.9
1.49
41.4
48.3
33.4
48.3
CFSE
H
% de inibição
Doador saudável
Comp. Hets
% de inibição
Doador saudável
c.530 Het ou c.800 Hets

FIG. 29

FIG. 30


Perda de IL2RA das mutações de função
IL2RA (Cd25) Exon 4
códon de parada (c.530A>G)
IL2RA (Cd25) Exon 8
exclusão (c.800delA)
T1D
auto
anticorpos
ITP, AIN
B
Doador saudável
Sem eletroporação
Tamanho
IL2RA
97.1%
Composto Het 1
Composto Het 2
Composto Het 3
Sem eletroporação
Correção de
mutação c.530
4.5%
2.8%
0.4%
21.6%
19.6%
6.0%
C
Doador saudável
High IL-2
No IL-2
97.9%
9.2%
pStat5
21.8%
3.7%
2.7%
14.5%
2.7%
1.5%
9.3%
2.5%
1.4%
32.6%
10.2%
7.4%
43.0%
13.6%
8.1%
11.4%
3.6%
2.0%
D
Doador saudável
84.0%
2.7%
0.0%
FoxP3
3.8%
0.48%
3.1%
2.4%
0.18%
1.9%
1.5%
0.14%
1.7%
10.1%
2.2%
3.9%
15.6%
1.5%
2.1%
2.3%
0.20%
1.4%
E
Correção de mutação c.530
Sem eletro
Apenas RNP D10A
Apenas HDRT de dsDNA
Apenas HDRT de ssDNA
D10A + dsDNA
D10A + ssDNA
Composto Het 2
0.9%
2.0%
2.4%
1.2%
16.0%
24.9%

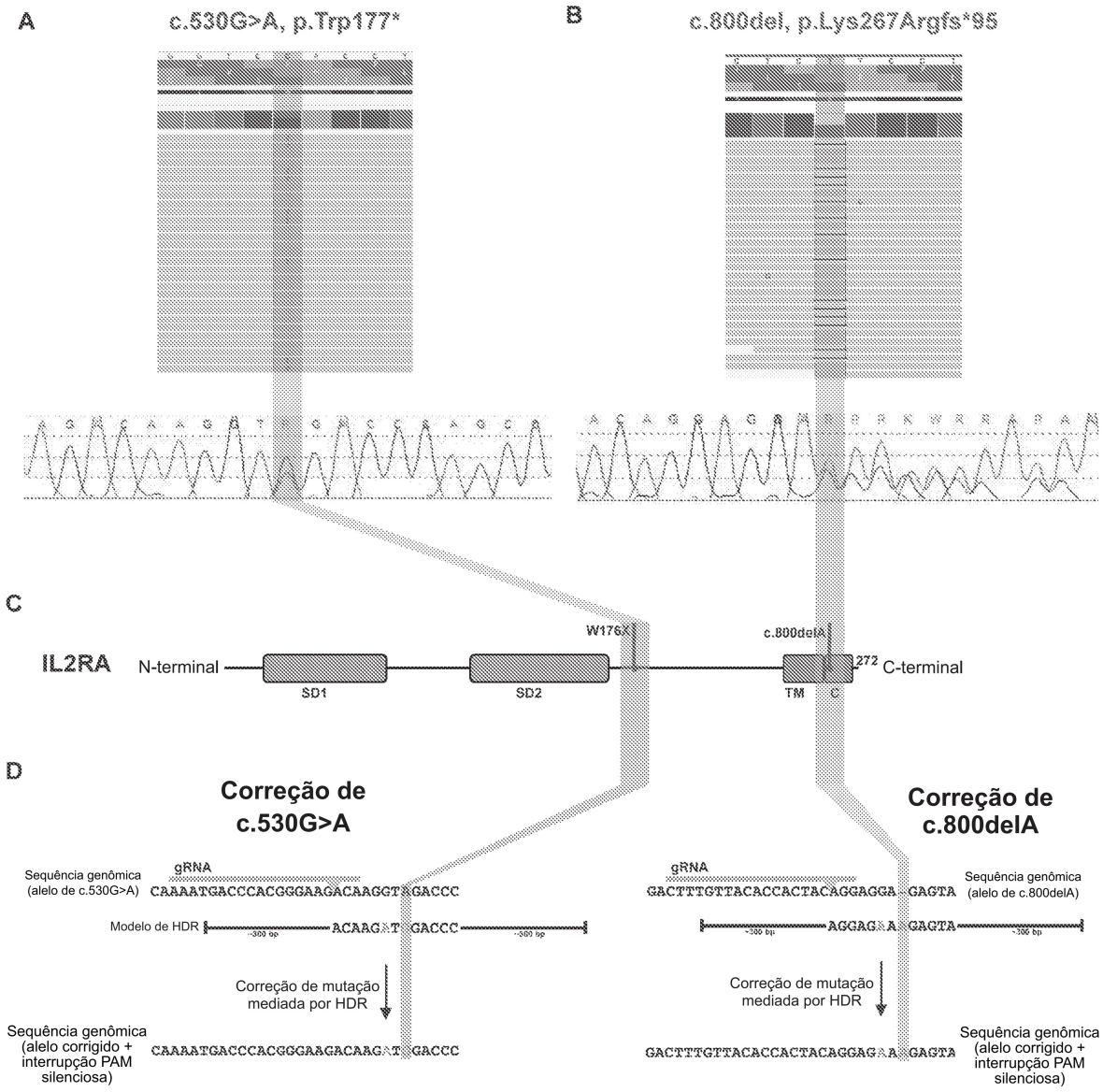

A
c.530G>A, p.Trp177*
B
c.800del, p.Lys267Argfs*95
C
IL2RA
N-terminal
W176X
c.800delA
272
C-terminal
SD1
SD2
TM
C
D
Correção de c.530G>A
Correção de c.800delA
Sequência genômica (alelo de c.530G>A)
gRNA
CAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGTAGACCC
Modelo de HDR
ACAAGAT GACCC
~300 bp
Correção de mutação mediada por HDR
Sequência genômica (alelo corrigido + interrupção PAM silenciosa)
CAAAATGACCCACGGGAAGACAAGATGACCC
gRNA
GACTTTGTTACACCACTACAGGAGGAGAGTA
Sequência genômica (alelo de c.800delA)
AGGAGAGAGTA
~300 bp
Correção de mutação mediada por HDR
GACTTTGTTACACCACTACAGGAGAGAGTA
Sequência genômica (alelo corrigido + interrupção PAM silenciosa)

FIG. 31

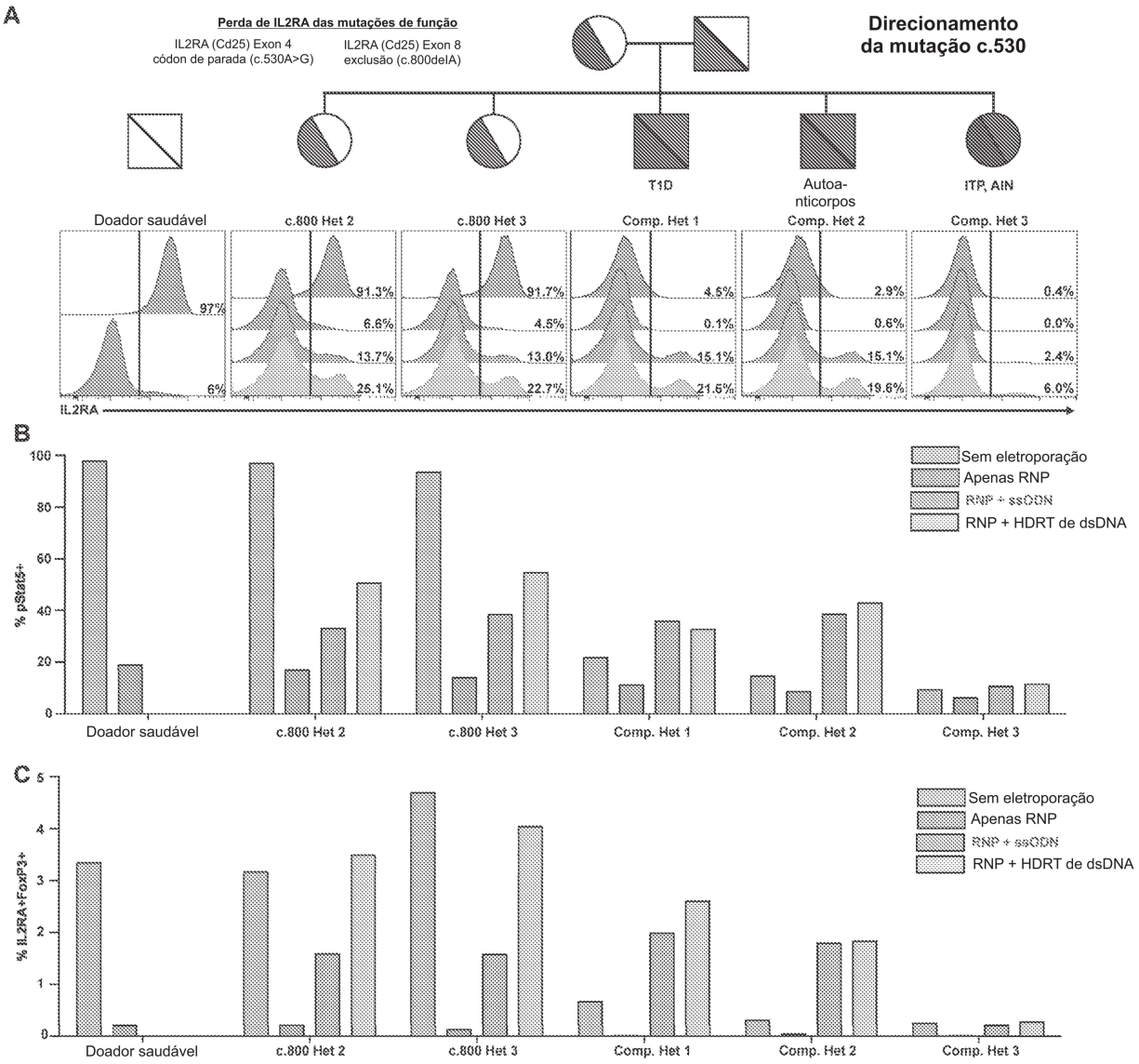

A
Perda de IL2RA das mutações de função
IL2RA (Cd25) Exon 4
códon de parada (c.530A>G)
IL2RA (Cd25) Exon 8
exclusão (c.800delA)
Direcionamento
da mutação c.530
T1D
Autoa-
nticorpos
ITP, AIN
Doador saudável
c.800 Het 2
c.800 Het 3
Comp. Het 1
Comp. Het 2
Comp. Het 3
97%
6%
91.3%
6.6%
13.7%
25.1%
91.7%
4.5%
13.0%
22.7%
4.5%
0.1%
15.1%
21.6%
2.9%
0.6%
15.1%
19.6%
0.4%
0.0%
2.4%
6.0%
IL2RA
B
% pStat5+
Sem eletroporação
Apenas RNP
RNP + ssODN
RNP + HDRT de dsDNA
Doador saudável
c.800 Het 2
c.800 Het 3
Comp. Het 1
Comp. Het 2
Comp. Het 3
C
% IL2RA+FoxP3+
Sem eletroporação
Apenas RNP
RNP + ssODN
RNP + HDRT de dsDNA
Doador saudável
c.800 Het 2
c.800 Het 3
Comp. Het 1
Comp. Het 2
Comp. Het 3

FIG. 32

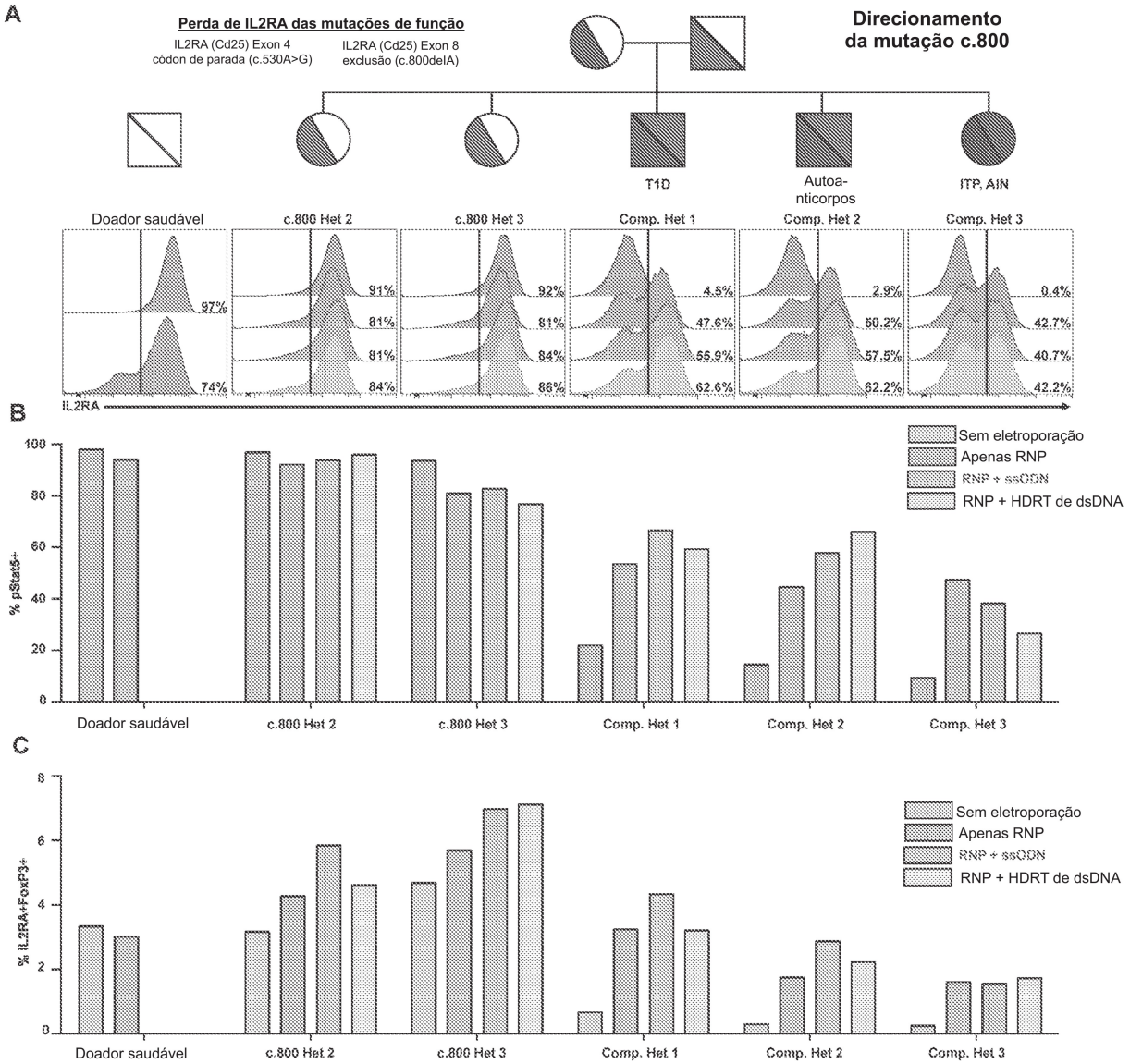

A
Perda de IL2RA das mutações de função
IL2RA (Cd25) Exon 4
códon de parada (c.530A>G)
IL2RA (Cd25) Exon 8
exclusão (c.800delA)
Direcionamento
da mutação c.800
T1D
Autoa-
nticorpos
ITP, AIN
Doador saudável
c.800 Het 2
c.800 Het 3
Comp. Het 1
Comp. Het 2
Comp. Het 3
97%
74%
91%
81%
81%
84%
92%
81%
84%
86%
4.5%
47.6%
55.9%
62.6%
2.9%
50.2%
57.5%
62.2%
0.4%
42.7%
40.7%
42.2%
IL2RA
B
% pStat5+
Sem eletroporação
Apenas RNP
RNP + ssODN
RNP + HDRT de dsDNA
Doador saudável
c.800 Het 2
c.800 Het 3
Comp. Het 1
Comp. Het 2
Comp. Het 3
C
% IL2RA+FoxP3+
Sem eletroporação
Apenas RNP
RNP + ssODN
RNP + HDRT de dsDNA
Doador saudável
c.800 Het 2
c.800 Het 3
Comp. Het 1
Comp. Het 2
Comp. Het 3

FIG. 33

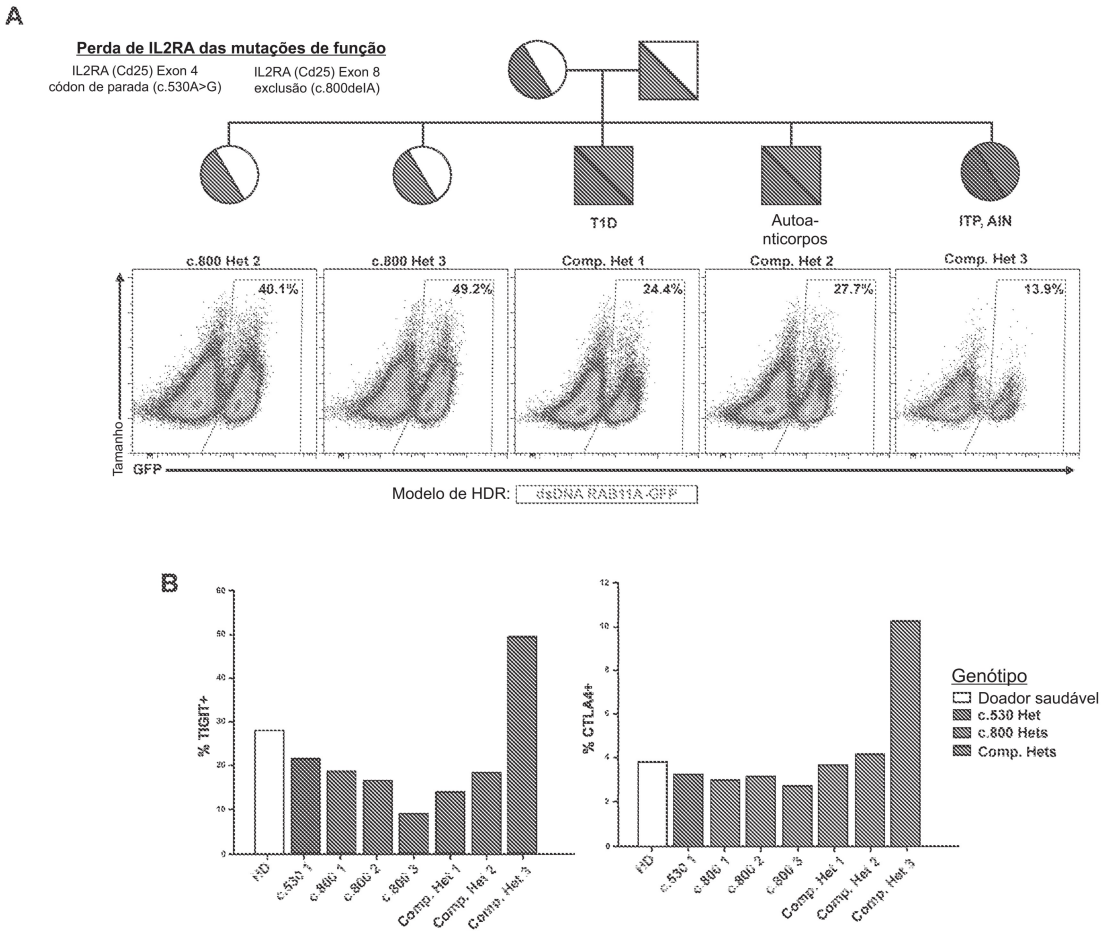

A
Perda de IL2RA das mutações de função
IL2RA (Cd25) Exon 4
códon de parada (c.530A>G)
IL2RA (Cd25) Exon 8
exclusão (c.800delA)
T1D
Autoa-
nticorpos
ITP, AIN
c.800 Het 2
c.800 Het 3
Comp. Het 1
Comp. Het 2
Comp. Het 3
40.1%
49.2%
24.4%
27.7%
13.9%
Tamanho
GFP
Modelo de HDR:
ssDNA RAB11A-GFP
B
% TIGIT+
% CTLA4+
HD
c.530 1
c.800 1
c.800 2
c.800 3
Comp. Het 1
Comp. Het 2
Comp. Het 3
Genótipo
Doador saudável
c.530 Het
c.800 Hets
Comp. Hets

FIG. 34

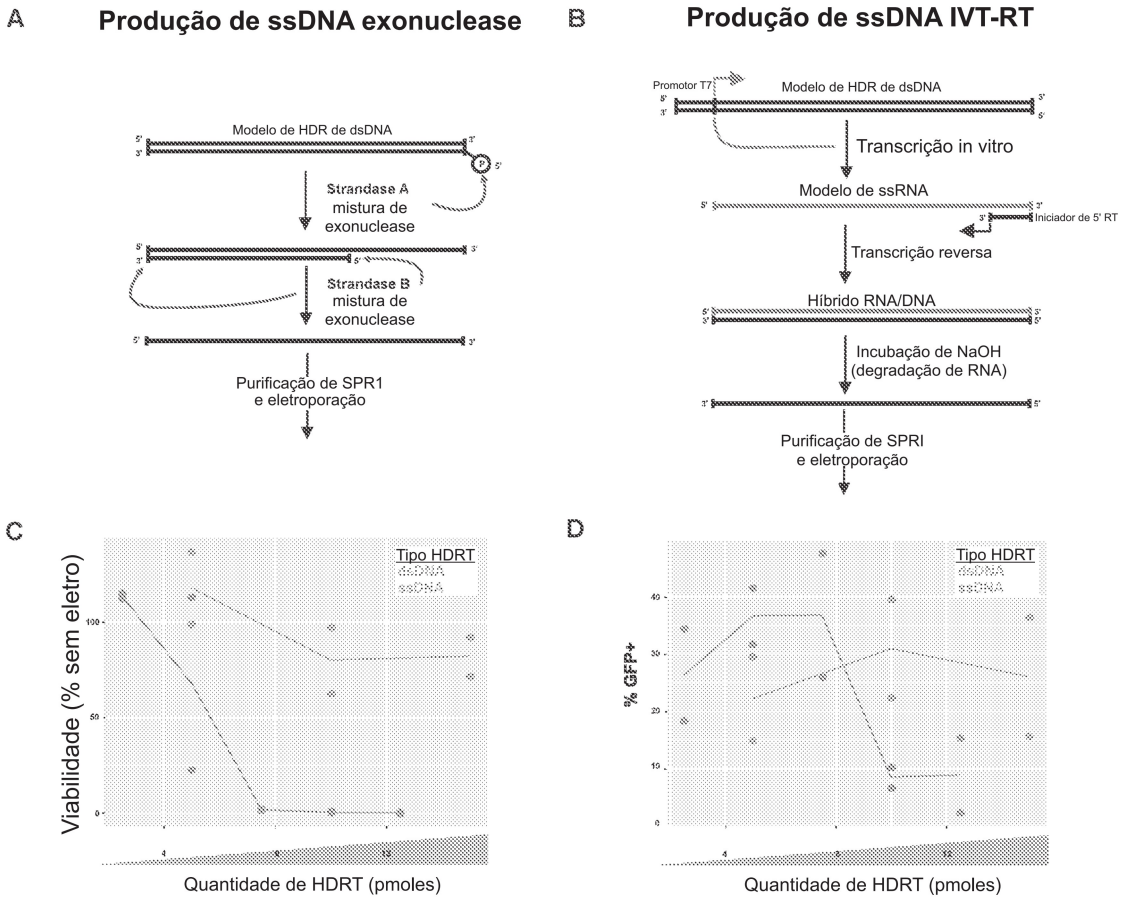

A
Produção de ssDNA exonuclease
Modelo de HDR de dsDNA
Strandase A
mistura de
exonuclease
Strandase B
mistura de
exonuclease
Purificação de SPR1
e eletroporação
B
Produção de ssDNA IVT-RT
Promotor T7
Modelo de HDR de dsDNA
Transcrição in vitro
Modelo de ssRNA
Iniciador de 5' RT
Transcrição reversa
Híbrido RNA/DNA
Incubação de NaOH
(degradação de RNA)
Purificação de SPRI
e eletroporação
C
Viabilidade (% sem eletro)
Tipo HDRT
dsDNA
ssDNA
Quantidade de HDRT (pmoles)
D
% GFP+
Tipo HDRT
dsDNA
ssDNA
Quantidade de HDRT (pmoles)

FIG. 35

RESUMO

Patente de Invenção: **"INSERÇÕES DE DNA NÃO VIRAL DIRECIONADAS".**

São aqui fornecidos métodos e composições para a edição do genoma de uma célula. Em algumas modalidades, uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 200 nucleotídeos de comprimento é inserida em uma região alvo no genoma de uma célula.

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

Código de Controle

Campo 1

Campo 2

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA 12.12.19 P244516.TXT
- Data de Geração do Código: 13/12/2019
- Hora de Geração do Código: 16:09:23
- Código de Controle:
  - Campo 1: 2A2E67FAB60D381A
  - Campo 2: 60C9FA70517C6E0B