

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 473**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63	(2006.01)
C12N 15/66	(2006.01)
C12N 9/22	(2006.01)
C12N 15/113	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2016 PCT/US2016/015836**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16123578**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2016 E 16744244 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **20.12.2023 EP 3250693**

54 Título: **Suministro de proteínas en células hematopoyéticas primarias**

30 Prioridad:

30.01.2015 US 201562110187 P
25.08.2015 US 201562209711 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
09.05.2024

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US

72 Inventor/es:

MARSON, ALEXANDER;
DOUDNA, JENNIFER;
BLUESTONE, JEFFREY;
SCHUMANN, KATHRIN y
LIN, STEVEN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 880 473 T5

DESCRIPCIÓN

Suministro de proteínas en células hematopoyéticas primarias

5 **Antecedentes de la invención**

Los métodos, las composiciones, las mezclas de reacción, los kits y los dispositivos, para la manipulación precisa y eficiente de las células primarias, son muy prometedores para el desarrollo de terapias basadas en células, así como para la investigación básica de la función de diversas células, tejidos, órganos y sistemas corporales. Por ejemplo, los recientes avances en la generación y uso de células T primarias específicas de antígeno, son muy prometedores para la inmunoterapia contra el cáncer y las enfermedades infecciosas. Como ejemplo adicional, la capacidad de dirigir con precisión los genes reguladores en células primarias puede usarse para estudiar los resultados fenotípicos de dicha modulación.

15 Kim *et al.*, "Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins", GENOME RESEARCH, US, (20140402), vol. 24, n.º 6, enseñan el suministro de la proteína Cas9 recombinante purificada y los ARN guía en células K562, fibroblastos BJ y células madre embrionarias, pero no en células hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas. ZHONG CHEN *et al.*, "Receptor-mediated delivery of engineered nucleases for genome modification", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (20130816), vol. 41, n.º 19, enseñan un método mediado por ligando para introducir nucleasas de dedos de zinc (ZFN, del inglés *zinc-finger nucleases*) en las células, incluidas las células madre progenitoras hematopoyéticas, mediante endocitosis mediada por el receptor de transferrina. KATHRIN SCHUMANN *et al.*, "Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, (20150727), vol. 112, n.º 33, enseñan que las RNP (ribonucleoproteínas) Cas9 son una herramienta programable para reemplazar secuencias de nucleótidos específicas en el genoma de células inmunitarias maduras.

Breve resumen de la invención

La materia objeto de la invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método de edición del genoma de una célula, en donde la célula es una célula hematopoyética primaria o una célula madre hematopoyética primaria, comprendiendo el método:

- a) proporcionar una mezcla de reacción que comprenda un complejo de ribonucleoproteína Cas9, un molde de ADN oligonucleotídico bicatenario o monocatenario y la célula, en donde el complejo de ribonucleoproteína Cas9 comprende un dominio de nucleasa Cas9 y un ARN guía, en donde el ARN guía se hibrida específicamente con una región diana del genoma de la célula; y en donde el molde tiene una longitud de 50, 75 o 100 b o pb a 110, 120, 125, 150, 200, 225, o 250 b o pb; y
- b) introducir en la célula el complejo de ribonucleoproteína Cas9 y el molde de ADN mediante electroporación.

En algunas realizaciones, la célula hematopoyética primaria o una célula madre hematopoyética primaria, se modifica para expresar una proteína heteróloga antes, durante o después de que se edite el genoma de la célula, como se ha descrito anteriormente o en alguna otra parte del presente documento. En algunas realizaciones, la proteína heteróloga está codificada por un vector vírico (por ejemplo, un lentivírico). En algunas realizaciones, la proteína heteróloga es una proteína receptora quimérica específica de antígeno (CAR, *chimeric antigen receptor*) o un receptor de células T (TCR, *T-cell Receptor*) heterólogo, incluyendo, pero si limitación, un TCR reorganizado.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método de edición del genoma de una célula, en donde la célula es una célula hematopoyética primaria o una célula madre hematopoyética primaria, comprendiendo el método: a) proporcionar una mezcla de reacción que comprenda un complejo de ribonucleoproteína Cas9, un molde de ADN oligonucleotídico bicatenario o monocatenario y la célula, en donde el complejo de ribonucleoproteína Cas9 comprende un dominio de nucleasa Cas9 y un ARN guía, en donde el ARN guía se hibrida específicamente con una región diana del genoma de la célula; y en donde el molde tiene una longitud de 50, 75 o 100 b o pb a 110, 120, 125, 150, 200, 225, o 250 b o pb; y b) introducir en la célula el complejo de ribonucleoproteína Cas9 y el molde de ADN mediante electroporación. . En algunas realizaciones, el método proporciona una eficiencia de edición del genoma de al menos aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, la célula no contiene un ácido nucleico que codifique Cas9 y/o un ácido nucleico de ADN que codifique un ARN guía.

En algunas realizaciones, antes de proporcionar, como se indica en a), la célula no se immortaliza ni se transforma. En algunos casos, después de la introducción, como se indica en b), la célula no se immortaliza ni se transforma. En algunas realizaciones, la célula no se ha sometido a pases antes de proporcionar, como se indica en a). En algunos casos, antes de proporcionar, como se indica en a), la célula se ha aislado directamente de un organismo o tejido hospedador y se ha cultivado. En algunos casos, antes de proporcionar, como se indica en a), la célula se ha aislado directamente de un organismo o tejido hospedador y no se ha cultivado.

En algunos casos, la electroporación comprende colocar la mezcla de reacción en una cámara entre un cátodo y un ánodo, y aplicar un potencial de tensión entre el cátodo y el ánodo de aproximadamente 20 kV/m a aproximadamente 100 kV/m. En algunos casos, el potencial de tensión se aplica como un pulso que tiene una duración de aproximadamente 5 ms a aproximadamente 100 ms. En algunos casos, el método comprende además repetir la aplicación del pulso de potencial de tensión de 2 a 10 veces. En algunos casos, la cámara es un elemento hueco que tiene una longitud longitudinal y un área transversal horizontal; la cámara comprende un primer y un segundo extremo distal separados por la longitud longitudinal; y la cámara tiene: un primer electrodo en el primer extremo distal; y un depósito que contiene una solución electrolítica en comunicación fluida con el segundo extremo distal de la cámara, teniendo dicho depósito un segundo electrodo. En algunos casos, la cámara tiene una relación entre la longitud longitudinal y el área transversal horizontal en el intervalo de 50 a 10 000.

En algunas realizaciones, el complejo de ribonucleoproteína de Cas9 en la mezcla de reacción está a una concentración de aproximadamente 0,25 μM a aproximadamente 5 μM . En algunas realizaciones, el complejo de ribonucleoproteína de Cas9 o la apo proteína Cas9 en la mezcla de reacción está a una concentración de aproximadamente 0,9 μM a aproximadamente 1,8 μM . En algunas realizaciones, la mezcla de reacción contiene de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 4×10^5 células hematopoyéticas primarias o células madre hematopoyéticas primarias o de aproximadamente $0,9 \times 10^4$ a aproximadamente $3,6 \times 10^4$ células hematopoyéticas primarias o células madre hematopoyéticas primarias por μl . En algunas realizaciones, la mezcla de reacción contiene de aproximadamente 2×10^5 a aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células hematopoyéticas primarias o células madre hematopoyéticas primarias o de $1,8 \times 10^4$ a aproximadamente $2,2 \times 10^4$ células hematopoyéticas primarias o células madre hematopoyéticas primarias por μl . En algunas realizaciones, la célula es una célula hematopoyética primaria.

En algunos casos, la célula hematopoyética primaria es una célula inmunitaria. En algunos casos, la célula inmunitaria es una célula T. En algunos casos, la célula T es una célula T reguladora, una célula T efectora o una célula T intacta (*naïve*). En algunos casos, la célula T reguladora, célula T efectora o célula T intacta, es una célula T CD4^+ . En algunos casos, la célula T es una célula T reguladora $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD127}^{\text{lo}}$. En algunos casos, la célula T es una célula T FOXP3^+ . En algunos casos, la célula T es una célula T efectora $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{lo}}\text{CD127}^{\text{hi}}$. En algunos casos, la célula T es una célula T $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{lo}}\text{CD127}^{\text{hi}}\text{CD45RA}^{\text{hi}}\text{CD45RO}^-$ intacta. En algunos casos, la célula T es una célula T CD8^+ . En algunos casos, la célula T es una célula T $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$. En algunos casos, antes de proporcionar, como se indica en a), la célula T está preactivada. En algunos casos, antes de proporcionar, como se indica en a), la célula T no está estimulada. En algunos casos, la célula T comprende un receptor de antígeno recombinante.

En algunas realizaciones, el molde de ADN oligonucleotídico bicatenario o monocatenario está a una concentración de aproximadamente 9 μM a aproximadamente 180 μM . En algunos casos, el molde de ADN oligonucleotídico bicatenario o monocatenario está a una concentración de aproximadamente 45 μM . En algunos casos, el método proporciona una eficiencia de edición del genoma de células hematopoyéticas primarias (por ejemplo, células T estimuladas o no estimuladas) o de células madre hematopoyéticas primarias (por ejemplo, por reparación de muesca, reparación de unión de extremos no homólogos o reparación dirigida por homología de sitios de escisión mono o bicatenarios de Cas9) de al menos aproximadamente 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 % u 80 %.

En algunos casos, el método proporciona una eficiencia de edición del genoma de células hematopoyéticas primarias (por ejemplo, células T estimuladas o no estimuladas) o de células madre hematopoyéticas primarias (por ejemplo, por reparación de muesca, reparación de unión de extremos no homólogos o reparación dirigida por homología de sitios de escisión mono o bicatenarios de Cas9) de aproximadamente 20 % a aproximadamente 80 %, de aproximadamente 25 %, a aproximadamente 70 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 75 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 70 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 70 %, de aproximadamente 25 % a aproximadamente 65 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 60 % o de aproximadamente 35 % a aproximadamente 55 %.

En algunos casos, el método proporciona una eficiencia de edición del genoma dirigida por molde, de células hematopoyéticas primarias (por ejemplo, células T estimuladas o no estimuladas) o de células madre hematopoyéticas primarias de al menos aproximadamente 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 % o 75 %.

En algunos casos, el método proporciona una eficiencia de edición del genoma dirigida por molde de células hematopoyéticas primarias (por ejemplo, células T estimuladas o no estimuladas) o de células madre hematopoyéticas primarias de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 7 % a aproximadamente 25 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 5 %, a aproximadamente 25 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 25 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 % o de aproximadamente 10 % a aproximadamente 15. En algunos

casos, el molde de ADN oligonucleotídico monocatenario codifica un receptor de antígeno recombinante, una parte del mismo, o un componente del mismo.

5 En algunas realizaciones, la célula es una célula T, y el método comprende además: c) después de la introducción, como se indica en b), transferir la mezcla de reacción a un medio de cultivo que contenga un agonista de CD3 y un agonista de CD28, y cultivar las células. En algunos casos, el agonista de CD3 o el agonista de CD28 se inmovilizan en una superficie sólida, o el agonista de CD3 y el agonista de CD28 se inmovilizan en una superficie sólida (por ejemplo, se inmovilizan en una perla o en perlas distintas o en una superficie de una placa de cultivo o de un pocillo).
10 En algunos casos, el agonista de CD3 es un anticuerpo anti CD3. En algunos casos, el agonista de CD28 es un anticuerpo anti CD28. En algunos casos, el método comprende además: c) después del cultivo de c), transferir la mezcla de reacción a un medio de cultivo que no contenga un agonista de CD3 o un agonista de CD28, y cultivar las células.

15 En algunos casos, el anticuerpo anti CD3 (por ejemplo, inmovilizado o soluble) está a una concentración de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 µg/ml. En algunos casos, el anticuerpo anti CD3 (por ejemplo, inmovilizado o soluble) está a una concentración de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 25 µg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 µg/ml, de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 µg/ml, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 µg/ml o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 µg/ml. En algunos casos, el anticuerpo anti CD28 (por ejemplo, inmovilizado o soluble) está a una concentración de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,
20 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 µg/ml. En algunos casos, el anticuerpo anti CD28 (por ejemplo, inmovilizado o soluble) está a una concentración de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 µg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 µg/ml, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 µg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 7,5 µg/ml o de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 µg/ml.

25 En algunas realizaciones, el complejo de ribonucleoproteína Cas9 comprende una nucleasa Cas9. En algunas realizaciones, el complejo de ribonucleoproteína Cas9 comprende una nicasa Cas9. En algunas realizaciones, el complejo de ribonucleoproteína Cas9 comprende un dominio de nucleasa Cas9 fusionado con una endonucleasa de restricción o con una nicasa. En algunas realizaciones, el complejo de ribonucleoproteína Cas9 comprende un dominio de nucleasa Cas9 fusionado con un modulador transcripcional o con un modificador de la cromatina.
30

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende al menos dos complejos de ribonucleoproteína Cas9 estructuralmente diferentes. En algunos casos, los al menos dos complejos de ribonucleoproteína Cas9 estructuralmente diferentes contienen ARNGs estructuralmente diferentes. En algunos casos, los al menos dos complejos de ribonucleoproteína Cas9 estructuralmente diferentes contienen dominios Cas9 estructuralmente diferentes.
35

Definiciones

40 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/una" y "el/la" incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o a ácidos ribonucleicos (ARN) y a polímeros de los mismos, ya sea en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, la expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes de la misma modificada de manera conservativa (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP (*single-monomonucleotide polymorphism*, polimorfismos mononucleotídicos) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente,
45 las sustituciones de codones degenerados pueden realizarse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida por restos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); y Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).
50

55 El término "gen" puede referirse al segmento de ADN implicado en la producción o codificación de una cadena polipeptídica. Puede incluir regiones que preceden y siguen a la región codificante (líder y remolque) así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones). Como alternativa, el término "gen" puede referirse al segmento de ADN implicado en la producción o codificación de un ARN no traducido, tal como un ARNr, un ARNt, un ARN guía (por ejemplo, un ARN guía pequeño) o un micro ARN.
60

Un "promotor" se define como una serie de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, un promotor incluye las secuencias de ácidos nucleicos necesarias próximas al sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de la polimerasa de tipo II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente un potenciador distal o elementos represores, que se pueden localizar tanto como varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción.
65

Un "casete de expresión" es una construcción de ácido nucleico, generada de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de una secuencia de polinucleótidos particular en una célula hospedadora. Un casete de expresión puede ser parte de un plásmido, genoma vírico o fragmento de ácido nucleico. Normalmente, un casete de expresión incluye un polinucleótido a transcribir, unido operativamente a un promotor.

Un "gen indicador" codifica proteínas que son fácilmente detectables debido a sus características bioquímicas, tales como rasgos de actividad enzimática o quimiofluorescentes. Un ejemplo específico de dicho indicador es la proteína verde fluorescente. La fluorescencia generada a partir de esta proteína se puede detectar con varios sistemas de detección de fluorescencia disponibles en el comercio. Otros indicadores pueden detectarse mediante tinción. El indicador también puede ser una enzima que genere una señal detectable cuando se pone en contacto con un sustrato apropiado. El indicador puede ser una enzima que cataliza la formación de un producto detectable. Las enzimas adecuadas incluyen, pero sin limitación, proteasas, nucleasas, lipasas, fosfatasa y hidrolasas. El indicador puede codificar una enzima cuyos sustratos sean sustancialmente impermeables a las membranas plasmáticas eucariotas, lo que hace posible controlar estrictamente la formación de señales. Los ejemplos específicos de genes indicadores adecuados que codifican enzimas incluyen, pero sin limitación, CAT (cloranfenicol acetil transferasa; Alton y Vapnek (1979) *Nature* 282: 864-869); luciferasa (lux); β -galactosidasa; LacZ; β -glucuronidasa; y fosfatasa alcalina (Toh, *et al.* (1980) *Eur. J. Biochem.* 182: 231-238; y Hall *et al.* (1983) *J. Mol. Appl. Gen.* 2: 101). Otros indicadores adecuados incluyen los que codifican un epítipo particular que puede detectarse con un anticuerpo marcado que reconoce específicamente el epítipo.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y aminoácidos miméticos que funcionan de una manera similar a la de los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que la de un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que se une a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que la de un aminoácido de origen natural. Los "aminoácidos miméticos" se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácidos, pero que funciona de una manera similar a la un aminoácido de origen natural.

En la técnica existen varios métodos conocidos que permiten la incorporación de un derivado o análogo de aminoácido no natural en una cadena polipeptídica de una manera específica de sitio, véase, por ejemplo, el documento WO 02/086075.

En el presente documento los aminoácidos pueden denominarse con los símbolos de tres letras comúnmente conocidos o con los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Del mismo modo, los nucleótidos pueden denominarse con sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

"Polipéptido" "péptido", y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los tres términos se aplican a polímeros de aminoácidos en donde uno o más restos de aminoácidos es(son) un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y a polímeros de aminoácidos de origen no natural. Como se usa en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en donde los restos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

Las "variantes modificadas de manera conservativa" se aplican a secuencias tanto de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácido nucleico, "variantes modificadas de manera conservativa" se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, de secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en donde un codón especifique una alanina, el codón puede alterarse por cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservativa. En el presente documento, cada secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que, en un ácido nucleico, cada codón (excepto AUG que es normalmente el único codón para la metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para el triptófano) puede modificarse para dar como resultado una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales en un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia proteica que altera, añade o delecciona un solo

aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservativa" en donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. En la técnica se conocen bien tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas de manera conservativa son adicionales y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención. En algunos casos, se pueden utilizar variantes modificadas de manera conservativa de Cas9 o ARNgs como se describe en el presente documento.

Cada uno de los ocho grupos siguientes contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)

véase, por ejemplo, Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Co., Nueva York (1984)).

En el presente documento los aminoácidos pueden denominarse con los símbolos de tres letras comúnmente conocidos o con los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Del mismo modo, los nucleótidos pueden denominarse con sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Una "secuencia de translocación" o "secuencia de transducción" se refiere a una secuencia peptídica o proteica (o fragmento activo o dominio de la misma) que dirige el movimiento de una proteína desde un compartimento celular a otro, o desde el espacio extracelular a través de la membrana celular o plasmática en la célula. Las secuencias de translocación que dirigen el movimiento de una proteína desde el espacio extracelular a través de la membrana celular o plasmática hacia la célula son "péptidos de penetración celular". Las secuencias de translocación que se localizan en el núcleo de una célula se denominan secuencias, señales, dominios, péptidos o similares de "localización nuclear". Los ejemplos de secuencias de translocación incluyen, sin limitación, el dominio de transducción TAT (véase, por ejemplo, S. Schwarze *et al.*, Science 285 (3 de septiembre de 1999); penetrinas o péptidos de penetratina (D. Derossi *et al.*, Trends in Cell Biol. 8, 84-87); virus del herpes simple de tipo 1 VP22 (A. Phelan *et al.*, Nature Biotech. 16, 440-443 (1998) y péptidos policatiónicos (por ejemplo, poliarginina) (Cell Mol. Life Sci. 62 (2005) 1839-1849). En la técnica se conocen secuencias de translocación adicionales. Los péptidos de translocación se pueden fusionar (por ejemplo, en el extremo amino o carboxilo), conjugar con, o acoplarse a, un compuesto de la presente invención, para, entre otras cosas, producir un compuesto conjugado que puede pasar fácilmente a las células diana, o a través de la barrera hematoencefálica y a las células diana.

El sistema "CRISPR/Cas" se refiere a una clase generalizada de sistemas bacterianos para la defensa contra ácido nucleico extraño. Los sistemas CRISPR/Cas se encuentran en una amplia gama de organismos eubacterianos y arqueales. Los sistemas CRISPR/Cas incluyen el tipo I, II y los subtipos III. Los sistemas CRISPR/Cas de tipo II de tipo silvestre utilizan una nucleasa Cas9 mediada por ARN, en complejo con ARN guía y activador para reconocer y escindir ácido nucleico extraño. En la técnica también se conocen ARN guía que tienen la actividad de un ARN tanto guía como activador. En algunos casos, dichos ARN guía con doble actividad se denominan ARN guía pequeños (ARNgp).

Los homólogos de Cas9 se encuentran en una amplia variedad de eubacterias, incluyendo, pero sin limitación, bacterias de los siguientes grupos taxonómicos: *Actinobacterias*, *Aquificae*, *Bacteroidetes-Chlorobi*, *Chlamydiae-Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Cyanobacterias*, *Firmicutes*, *Proteobacterias*, *Espiroquetas* y *Termotogas*. Una proteína Cas9 ilustrativa es la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Otras proteínas Cas9 y sus homólogos se describen, por ejemplo, en Chylinski, *et al.*, RNA Biol. 1 de mayo de 2013; 10(5): 726-737; Nat. Rev. Microbiol. junio de 2011; 9(6): 467-477; Hou, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 24 de septiembre de 2013; 110(39):15644-9; Sampson *et al.*, Nature. 9 de mayo de 2013; 497(7448):254-7; y Jinek, *et al.*, Science. 17 de agosto de 2012; 337(6096):816-21. El dominio de nucleasa Cas9 se puede optimizar para lograr una actividad eficiente o una estabilidad mejorada en la célula hospedadora.

Como se usa en el presente documento, el término "Cas9" se refiere a una nucleasa mediada por ARN (por ejemplo, de origen bacteriano o arqueal, o procedente de los mismos). Como ejemplos de nucleasas mediadas por ARN se incluyen las proteínas Cas9 anteriores y sus homólogos, e incluyen, pero no se limitan a, CPF1 (Véase, por ejemplo, Zetsche *et al.*, Cell, volumen 163, publicación 3, págs. 759-771 del 22 de octubre de 2015). De manera similar, como se usa en el presente documento, la expresión complejo de "ribonucleoproteína Cas9" y similares, se refiere a un complejo entre la proteína Cas9 y un ARNcr (por ejemplo, ARN guía o ARN guía pequeño), la proteína Cas9 y un ARNcr transactivador (ARNcrtra), la proteína Cas9 y un ARN guía pequeño, o una combinación de los mismos (por ejemplo, un complejo que contiene la proteína Cas9, un ARNcrtra y un ARN guía ARNcr).

Como se usa en el presente documento, el término "edición", en el contexto de edición de un genoma de una célula, se refiere a inducir un cambio estructural en la secuencia del genoma en una región genómica diana. Por ejemplo, la edición puede tomar la forma de inducir una mutación de inserción-delección (indel) en una secuencia del genoma en una región genómica diana. Dicha edición se puede realizar induciendo una rotura bicatenaria dentro de una región genómica diana, o un par de muescas monocatenarias en cadenas opuestas y flanqueando la región genómica diana. Los métodos para inducir roturas mono o bicatenarias en o dentro de una región genómica diana, incluyen el uso de un dominio de nucleasa Cas9, o un derivado del mismo, y un ARN guía, o un par de ARN guías, dirigido a la región genómica diana.

- 5
- 10 Como se usa en el presente documento, la expresión "introducir", en el contexto de introducir un complejo de ribonucleoproteína Cas9 o introducir un dominio de nucleasa Cas9, se refiere a la translocación de la proteína Cas9 o del complejo de ribonucleoproteína Cas9, desde el exterior de una célula al interior de la célula. En algunos casos, introducir se refiere a la translocación de la Cas9 o de la ribonucleoproteína Cas9 desde el exterior de la célula al interior del núcleo de la célula. Se contemplan varios métodos de dicha translocación, que incluyen, pero sin limitación, electroporación, contacto con nanocables o nanotubos, internalización mediada por receptor, translocación a través de péptidos que penetran en la célula, translocación mediada por liposomas y similares.
- 15

Como se usa en el presente documento, el término "primaria", en el contexto de una célula primaria o de una célula madre primaria, se refiere a una célula que no se ha transformado o inmortalizado. Dichas células primarias se pueden cultivar, subcultivar o hacer pases un número de veces limitado (por ejemplo, cultivarse 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces). En algunos casos, las células primarias están adaptadas a condiciones de cultivo *in vitro*. En algunos casos, las células primarias se han aislado de un organismo, sistema, órgano o tejido, opcionalmente se han clasificado y utilizado directamente sin cultivar o subcultivar. En algunos casos, las células primarias están estimuladas, activadas o diferenciadas. Por ejemplo, las células T primarias se pueden activar por contacto con (por ejemplo, cultivando en presencia de) agonistas de CD3, CD28, IL-2, IFN- γ , o una combinación de los mismos.

- 20
- 25

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre hematopoyética" se refiere a un tipo de célula madre que puede dar lugar a una célula sanguínea. Las células madre hematopoyéticas pueden dar lugar a células de los linajes mieloide o linfoide, o una combinación de los mismos. Las células madre hematopoyéticas se encuentran predominantemente en la médula ósea, aunque pueden aislarse de sangre periférica o de una fracción de la misma. Se pueden usar varios marcadores de superficie celular para identificar, clasificar o purificar las células madre hematopoyéticas. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas se identifican como c-kit⁺ y lin⁻. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas humanas se identifican como CD34⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{lo/-}, C-kit/CD117⁺, lin⁻. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas humanas se identifican como CD34⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{lo/-}, C-kit/CD117⁺, lin⁻. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas humanas se identifican como CD133⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{lo/-}, C-kit/CD117⁺, lin⁻. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas de ratón se identifican como CD34^{lo/-}, SCA-1⁺, Thy1^{+/lo}, CD38⁺, C-kit⁺, lin⁻. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas son CD150⁺CD48⁻CD244⁻.

- 30
- 35
- 40
- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula hematopoyética" se refiere a una célula procedente de una célula madre hematopoyética. La célula hematopoyética puede obtenerse o proporcionarse mediante aislamiento de un organismo, sistema, órgano o tejido (por ejemplo, sangre, o una fracción de la misma). Como alternativa, se puede aislar una célula madre hematopoyética y obtener o proporcionar la célula hematopoyética mediante la diferenciación de la célula madre. Las células hematopoyéticas incluyen células con potencial limitado para diferenciarse en otros tipos de células. Dichas células hematopoyéticas incluyen, pero sin limitación, células progenitoras multipotentes, células progenitoras de linaje restringido, células progenitoras mieloides comunes, células progenitoras de granulocitos-macrófagos o células progenitoras de megacariocitos-eritroides. Las células hematopoyéticas incluyen células de los linajes linfoide y mieloide, tales como linfocitos, eritrocitos, granulocitos, monocitos y trombocitos. En algunas realizaciones, la célula hematopoyética es una célula inmunitaria, tal como una célula T, una célula B, un macrófago o una célula dendrítica.
- 50

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula T" se refiere a una célula linfoide que expresa una molécula receptora de células T. Las células T incluyen, pero sin limitación, células T intactas, células T estimuladas, células T primarias (por ejemplo, no cultivadas), células T cultivadas, células T inmortalizadas, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T de memoria, células T reguladoras, células T citolíticas naturales, combinaciones de las mismas, o subpoblaciones de las mismas. Las células T pueden ser CD4⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺. Las células T pueden ser células auxiliares, por ejemplo células auxiliares (*helper*) de tipo T_H1, T_H2, T_H3, T_H9, T_H17 o T_{FH}. Las células T pueden ser células T citotóxicas. Las células T reguladoras pueden ser FOXP3⁺ o FOXP3⁻. Las células T pueden ser células T alfa/beta o células T gamma/delta. En algunos casos, la célula T es una célula T reguladora CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}. En algunos casos, la célula T es una célula T reguladora seleccionada del grupo que consiste en Tr1, Th3, CD8⁺CD28⁻, Treg17 y células T restringidas por Qa-1, o una combinación o subpoblación de las mismas. En algunos casos, la célula T es una célula T FOXP3⁺. En algunos casos, la célula T es una célula T efectora CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}. En algunos casos, la célula T es una célula T intacta CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}CD45RA^{hi}CD45RO⁻.

- 55
- 60
- 65 Una célula T puede ser una célula T recombinante que se ha manipulado genéticamente. En algunos casos, la célula

T recombinante tiene un receptor de células T recombinante (por ejemplo, mutado o heterólogo). Por ejemplo, el receptor de células T puede tener una o más mutaciones en una región determinante de complementariedad de un receptor de células T para alterar la especificidad del antígeno. Como ejemplo adicional, el receptor de células T se puede mutar (por ejemplo, en el endodominio) para aumentar o disminuir la señalización. Como otro ejemplo más, el receptor de células T se puede reemplazar con un receptor de células T heterólogo. Como otro ejemplo más, el receptor de células T se puede reemplazar con un polipéptido que tenga un dominio receptor diferente, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunos casos, el receptor de células T es un receptor quimérico que contiene un dominio de direccionamiento (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo), un dominio transmembrana y un dominio intracelular o endodominio. El endodominio puede contener uno o más dominios de señalización y/o dominios adaptadores para proporcionar una activación de células T y actividad antigénica consistentes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unión de extremos no homólogos" o NHEJ (siglas del inglés *non-homologous end joining*) se refiere a un proceso celular en el que los extremos cortados o mellados de una cadena de ADN se ligan directamente sin la necesidad de un ácido nucleico molde homólogo. La NHEJ puede conducir a la adición, a la delección, a la sustitución, o una combinación de las mismas, de uno o más nucleótidos en el sitio de reparación.

Como se usa en el presente documento, la expresión reparación dirigida por homología (HDR, del inglés *homology directed repair*) se refiere a un proceso celular en el que los extremos cortados o mellados de una cadena de ADN se reparan mediante polimerización a partir de un ácido nucleico molde homólogo. Por tanto, la secuencia original se reemplaza con la secuencia del molde. El ácido nucleico molde homólogo puede proporcionarse con secuencias homólogas en otras partes del genoma (cromátidas hermanas, cromosomas homólogos o regiones repetidas en el mismo cromosoma o cromosomas diferentes). Como alternativa, se puede introducir un ácido nucleico molde exógeno para obtener un cambio específico inducido por HDR de la secuencia en el sitio diana. De esta manera, pueden introducirse mutaciones específicas en el sitio de corte.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molde de ADN oligonucleotídico monocatenario" o "ssODT" (por las siglas del inglés *single-stranded oligonucleotide DNA template*), se refiere a un oligonucleótido de ADN que puede utilizar una célula como molde para la HDR (reparación dirigida por homología). Generalmente, el ssODT tiene al menos una región de homología con un sitio diana. En algunos casos, el ssODT tiene dos regiones homólogas que flanquean una región que contiene una mutación o una secuencia heteróloga que se insertará en un sitio de corte diana.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Edición consistente del locus CXCR4 humano en células T CD4⁺ humanas primarias. (A) Esquema experimental del suministro de la ribonucleoproteína Cas9:ARN guía sencillo (Cas9 RNP) a células T CD4⁺ humanas primarias para la edición del genoma, seguido de caracterización genética y fenotípica. (B) Representación esquemática de la secuencia diana de ARN guía sencillo (ARNgs) (azul) y PAM (verde) diseñada para editar la secuencia codificante en el locus CXCR4 humano. (C) Los gráficos de FACS muestran porcentajes crecientes de células con baja (*low*) expresión de CXCR4 (CXCR4^{lo}) con concentraciones más altas de RNP Cas9 CXCR4 en comparación con las células tratadas con control (Cas9 sin ARNgs, CTRL). (D) El ensayo con endonucleasa I de T7 (T7E1) demuestra la edición del genoma en el locus CXCR4, observándose más edición en células CXCR4^{lo} clasificadas con FACS que en células CXCR4^{hi}. Se indica el tamaño esperado del producto de la PCR (938 nucleótidos; nt) y los tamaños aproximados de los fragmentos de T7E1 esperados. La frecuencia de edición total se midió usando un ensayo con endonucleasa I de T7 y se analizó usando una fórmula descrita en 'Materiales y Métodos' y los resultados numéricos se indican como % de edición (total) debajo de la imagen del gel de agarosa. (E) Patrones de mutación detectados por secuenciación del locus CXCR4 en células CXCR4^{hi} y CXCR4^{lo} tratadas con Cas9 RNP clasificadas en comparación con la secuencia de células tratadas con control CXCR4^{lo} (CTRL). La secuencia de referencia (REF) se muestra encima de las secuencias clonales de cada población, indicándose las secuencias diana de ARNgs (azul) y PAM (verde). Las rayas de color rojo indican bases delecionadas y las secuencias de color rojo indican nucleótidos mutados o insertados. Se truncaron las secuencias no mutadas de varios clones.

Figura 2. La reparación dirigida por homología eficiente, permite el reemplazo de ADN dirigido en células T humanas primarias. (A) Representación esquemática de un molde de HDR oligonucleotídico monocatenario con brazos de homología de 90 nucleótidos (nt) diseñados para reemplazar 12 nt e introducir un nuevo sitio de escisión de la enzima de restricción HindIII (naranja) en el locus CXCR4, en donde se escinde la RNP Cas9. Se indica la diana de ARNgs (azul) y la secuencia de PAM (verde). (B) Histograma de tinción de la superficie celular de CXCR4 evaluada por citometría de flujo en células tratadas con RNP Cas9 CXCR4 en presencia y ausencia de molde de HDR monocatenario (en comparación con células tratadas con la proteína Cas9 de control y con células no teñidas). (C) Los gráficos de FACS (correspondientes al histograma del panel B) muestran ablación máxima de CXCR4 con tratamiento usando la RNP Cas9 y 100 pmol de ssODT. (D) Se utilizó el ensayo con T7E1 para calcular el porcentaje de edición total (definido como la suma de todos los acontecimientos NHEJ y HDR que dan lugar a indels en el sitio de escisión de Cas9), mientras que la frecuencia de HDR se determinó mediante digestión con HindIII, que escindió específicamente el sitio HindIII recién integrado, y se calculó como la relación entre el producto

de ADN y el sustrato de ADN. Se indica el tamaño esperado del producto de la PCR (938 nucleótidos; nt) y los fragmentos de digestión de T7E1 y HindIII esperados aproximados. La edición total y las frecuencias de HDR se calcularon en células de control y en RNP Cas9 CXCR4 tratada en células con concentraciones variables de ssODT (0, 50, 100 y 200 pmol) y los resultados numéricos se muestran debajo de la imagen de gel de agarosa.

5 **Figura 3. La edición del genoma de FOXP3 desestabiliza los niveles de los receptores de citocinas de células Treg humanas.** (A) Representación esquemática de dos dianas de ARNGs (azul) y secuencias de PAM (verde) diseñadas para editar secuencias codificantes en el locus *FOXP3* humano. (B) El ensayo con T7E1 confirma la edición del genoma en dos dianas en el locus *FOXP3* con un tamaño esperado del producto de la PCR (900 nucleótidos; nt) y se indican los tamaños aproximados esperados del fragmento de T7E1. (C) Histograma de niveles intracelulares de FOXP3 evaluados por citometría de flujo en células tratadas con la RNP Cas9 FOXP3 en comparación con controles (proteína Cas9 sin ARNGs y control de tinción de isotipo). (D) Histograma de tinción de la superficie celular de CD127 (IL7R α) evaluado por citometría de flujo en células tratadas con la RNP Cas9 FOXP3 en comparación con controles (proteína Cas9 sin ARNGs y control no teñido).

15 **Figura 4. El direccionamiento de las RNP Cas9 a FOXP3 altera la diferenciación de células Treg inducidas humanas.** (A) células T CD4⁺ intactas se sometieron a electroporación con las RNP Cas9 después de dos días de estimulación *ex vivo*. Después del tratamiento con Cas9 RNP, las células se cultivaron con IL-2 y TGF- β en condiciones de generación de iTreg. Las RNP Cas9 FOXP3 redujeron la generación de iTreg FOXP3⁺ y condujeron a un mayor porcentaje de células que secretaban IFN γ , una citocina proinflamatoria (evaluada mediante citometría de flujo). (B) Las cantidades de células que secretan FOXP3⁺ e IFN γ con las RNP Cas9 FOXP3 o RNP de control, se calcularon a partir de tres experimentos (las barras de error muestran la desviación estándar; se indican diferencias significativas con respecto a las células de control: * p<0,05, ** p<0,01). El inserto muestra porcentajes de FOXP3⁺IFN γ ⁺ a escala ampliada. (C) Las RNP Cas9 FOXP3 redujeron la generación de iTreg FOXP3⁺CTLA-4⁺ (evaluado por FACS). La expresión de CTLA-4⁺ en la población FOXP3⁻ se vio menos afectada, en consonancia con los mecanismos dependientes de FOXP3 e independientes de FOXP3 que contribuyen a la expresión de CTLA-4.

20 **Figura 5:** Ilustra la edición satisfactoria de la región genómica que codifica PD-1 en células T efectoras humanas primarias (CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}).

25 **Figura 6:** Ilustra los resultados del suministro de la RNP Cas9 a células T CD4⁺ efectoras no estimuladas utilizando un aparato de compresión de células en el que una mezcla de reacción que contiene las células y la RNP Cas9 se fuerza a pasar a través de una constricción de deformación celular que es más pequeña que el diámetro de la célula. El forzamiento introduce poros transitorios en una membrana celular de la célula, lo que permite que la RNP Cas9 entre en la célula a través de los poros transitorios. Las células se clasificaron basándose en la captación de dextrano marcado con Azul Pacífico (PB, *Pacific Blue*) (3 kD) y dextrano marcado con FITC (500 kD). Un ensayo con endonucleasa 1 de T7 confirmó el enriquecimiento de la edición en células que habían absorbido ambos dextranos.

30 **Figura 7:** Ilustra la edición eficiente de *CXCR4* en células T CD4⁺ humanas primarias. (A) Esquema experimental del suministro de la ribonucleoproteína Cas9:ARN guía sencillo (Cas9 RNP) a células T CD4⁺ humanas primarias para la edición del genoma, seguido de caracterizaciones genéticas y fenotípicas. (B) Representación esquemática de la diana de ARN guía sencillo (ARNGs) y secuencia de PAM diseñadas para editar la secuencia codificante en el locus *CXCR4* humano. (C) Los gráficos de FACS muestran porcentajes crecientes de células con baja (*low*) expresión de *CXCR4* (CXCR4^{lo}) con concentraciones más altas de RNP Cas9 CXCR4 (RNP^{lo} Cas9: 0,9 μ M; Cas9 RNP^{hi}: 1,8 μ M) en comparación con las células tratadas con control (Cas9 sin ARNGs, CTRL; concentración final: 1,8 μ M). (D) El ensayo con endonucleasa I de T7 (T7E1) demuestra la edición del genoma en el locus *CXCR4*, observándose más edición en células con CXCR4^{lo} clasificadas con FACS, que en células con CXCR4^{hi}. Se indica el tamaño esperado del producto de la PCR (938 nucleótidos; nt) y los fragmentos de digestión de T7E1 esperados aproximados. Las frecuencias de edición total se indican como % de edición total debajo de la imagen del gel de agarosa. (E) Los patrones de mutación detectados por clonación y secuenciación de Sanger del locus *CXCR4* en células CXCR4^{hi} y CXCR4^{lo} clasificadas tratadas con RNP Cas9 (1,8 μ M), se compararon con los de la secuencia de células CXCR4^{lo} tratadas con control (CTRL). La secuencia de referencia (REF) se muestra encima de las secuencias clonales de cada población, indicándose las secuencias diana de ARNGs (azul) y PAM (verde). Las rayas de color rojo indican bases delecionadas y las secuencias de color rojo indican nucleótidos mutados. La punta de flecha indica el sitio de corte de Cas9 previsto. Las secuencias de mala calidad obtenidas de tres CXCR4^{lo} adicionales se eliminaron de la alineación de secuencias.

35 **Figura 8:** La reparación dirigida por homología eficiente, permite el reemplazo de ADN dirigido en células T humanas primarias. (A) Representación esquemática del molde de HDR oligonucleotídico monocatenario con brazos de homología de 90 nt diseñado para reemplazar 12 nt, incluida la secuencia de PAM e introducir un nuevo sitio de escisión de la enzima de restricción HindIII en el locus *CXCR4*, en donde se escinde la RNP Cas9. Se indica la diana de ARNGs y la secuencia de PAM. (B) Histogramas de tinción de la superficie celular de CXCR4 evaluada por citometría de flujo en células tratadas con RNP Cas9 CXCR4 en presencia de diversas concentraciones de molde de HDR monocatenario (en comparación con células de control tratadas con la proteína

Cas9 y con células no teñidas). (C) Los gráficos de FACS (correspondientes a los histogramas del panel B) muestran ablación máxima de CXCR4 con tratamiento usando la RNP Cas9 y 100 pmol de molde de HDR. (D) Se utilizó el ensayo con T7E1 para calcular el % de edición total (definido como la suma de todos los acontecimientos NHEJ y HDR que dan lugar a indels en el sitio de escisión de Cas9), mientras que la frecuencia de HDR se determinó mediante digestión con HindIII, que escindió específicamente el sitio HindIII recién integrado, y se calculó como la relación entre el producto de ADN y el sustrato de ADN. Se indica el tamaño esperado del producto de la PCR (938 nt) y los fragmentos de digestión de T7E1 y HindIII esperados aproximados.

Figura 9: Efectos de los moldes de HDR específicos y de control sobre los niveles de expresión de superficie de PD-1 y CXCR4. (A) Los efectos sobre la expresión de CXCR4 se probaron para dos moldes de HDR diferentes con la misma composición de nucleótidos. En todas las células tratadas con la RNP Cas9 CXCR4, El molde de HDR CXCR4 (filas 5-8) se comparó con un molde de HDR de control que consistía en los mismos nucleótidos que la HDR de CXCR4 original en orden aleatorio, incluido un sitio de restricción HindIII (filas 1-4) y con un tratamiento sin molde de HDR (filas 9-12). Otros controles son Cas9 CTRL (Cas9 sin molde de HDR; dos filas finales) y la RNP Cas9 guía desordenada (sin corte previsto en genoma humano) con 100 pmol de molde de HDR CXCR4 (filas 13 y 14). Los histogramas muestran los resultados de 4 experimentos con 2 ARNGs de CXCR4 transcritos *in vitro* de manera diferente (dos estrategias de purificación diferentes, véase el apartado **Materiales y Métodos** del Ejemplo 4) probados en 2 donantes de sangre diferentes. Al igual que en la Figura 12, para cada donante de sangre, los experimentos realizados con ARNGs extraídos con fenol/cloroformo se muestran en la parte superior y los experimentos con ARNGs purificados con PAGE se muestran en la parte inferior; se prepararon guías desordenadas para ambos experimentos con extracción usando fenol/cloroformo. (B) Niveles de expresión de superficie de PD-1 (panel izquierdo) y CXCR4 (panel derecho) después de la edición con las RNP Cas9 y con los moldes de HDR específicos e inespecíficos, respectivos. Tal y como se indica, las células diana se compararon con células tratadas con Cas9 de CTRL (gris oscuro) o con la RNP Cas9 guía desordenada como se indica.

Figura 10: Análisis cuantitativo de la edición mediada por la RNP Cas9 y HDR mediante secuenciación profunda. (A) Las indels (inserciones y deleciones) mediadas por RNP Cas9 CXCR4 y la HDR de los experimentos de la Figura 8, se analizaron mediante secuenciación profunda dirigida del locus *CXCR4*. Se muestra un total de 100 nt centrados en el sitio de corte previsto con la diana de ARNGs, la secuencia de PAM y la prevista después del direccionamiento del genoma por HDR. En cada posición, se muestra la fracción de lecturas que se alinearon correctamente con el genoma de referencia o la secuencia procedente del molde de HDR. Aunque es poco frecuente (~1-2 %), se detectaron ediciones solo con el tratamiento de control de Cas9, incluso en sitio de corte previsto de *CXCR4*, lo que posiblemente indica cantidades mínimas de contaminación experimental de las RNP Cas9. (B) El gráfico de barras resume las fracciones de lecturas editadas con deleciones, inserciones, o direccionamiento por HDR satisfactorio en células tratadas con Cas9 CTRL, RNP Cas9 CXCR4 y RNP Cas9 CXCR4 con 50 pmol o 100 pmol de molde de CXCR4 HDR en el sitio *CXCR4* y en dos sitios inespecíficos previstos. Para calcular las fracciones de deleciones e inserciones se eliminaron lecturas con secuencias incorporadas procedentes del molde de HDR. Los gráficos de dispersión muestran la localización genómica (+/- 100 nt alrededor del lado de corte de Cas9 esperado; cromosoma 2:136873140-136873340) y la longitud de las deleciones (C) y las inserciones (D). El panel superior muestra deleciones/inserciones de células tratadas con CXCR4 RNP; en el centro se muestran deleciones/inserciones en lecturas sin la secuencia de molde de HDR incorporada en células tratadas con molde CXCR4 RNP y CXCR4 HDR; la parte inferior muestra deleciones/inserciones en lecturas con secuencias incorporadas procedente del molde de HDR. Las puntas de flecha indican la ubicación aproximada del sitio de corte de Cas9 esperado.

Figura 11: Distribución de las longitudes de inserción y deleción cerca del sitio de corte de *CXCR4* esperado. Los histogramas muestran el porcentaje de lecturas que contienen diversos tamaños de deleciones (barras grises) e inserciones (barras negras) dentro de +/- 20 nt del sitio de corte previsto. En la parte superior se muestran inserciones y deleciones de células tratadas con CXCR4 RNP. En el centro se muestran inserciones y deleciones en lecturas sin secuencias incorporadas procedentes del molde de HDR en las células tratadas con el molde de CXCR4 RNP y CXCR4 HDR (parte inferior). Inserciones y deleciones en lecturas que incorporaron la secuencia procedente del molde de HDR en las células tratadas con el molde de CXCR4 RNP y CXCR4 HDR.

Figura 12: Figura 4. Las RNP Cas9 se pueden programar para la edición por inserción (*knock-in*) de *PD-1* o *CXCR4*. (A) Representación esquemática del molde de PD-1 HDR monocatenario con brazos de homología de 90 nt diseñado para reemplazar 12 nt por 11 nt introduciendo un nuevo sitio de escisión de la enzima de restricción HindIII para reemplazar la secuencia de PAM. Se indica la diana de ARNGs y la secuencia de PAM. (B) Histogramas de los niveles de expresión de la superficie celular de PD-1 evaluados por citometría de flujo. Todas las células se trataron con 100 pmol de molde PD-1 HDR. Las células tratadas con PD-1 Cas9 RNP se muestran en azul, las células tratadas con la RNP Cas9 CXCR4 se muestran en gris claro y las células tratadas con la RNP Cas9 guía desordenada (sin corte previsto dentro del genoma humano) se muestran en color gris oscuro. (C) Histogramas de los niveles de expresión de la superficie celular de CXCR4 evaluados por citometría de flujo. Todas las células se trataron con 100 pmol de molde CXCR4 HDR. Las células tratadas con la RNP Cas9 CXCR4 se muestran en las cuatro primeras filas, las células tratadas con la RNP Cas9 PD-1 se muestran en las cuatro filas siguientes y las tratadas con la RNP Cas9 guía desordenada se muestran en las dos últimas filas. Los paneles B y C muestran los resultados de 4 experimentos con 2 ARNGs de CXCR4 y PD-1 transcritos y purificados *in vitro* de manera diferente

(véase el apartado de Materiales y Métodos, información complementaria del Ejemplo 4) probados en 2 donantes de sangre diferentes. Para cada donante de sangre, los experimentos realizados con ARNGs extraídos con fenol/cloroformo se muestran en la parte superior y los experimentos con ARNGs purificados con PAGE se muestran en la parte inferior; se prepararon guías desordenadas para ambos experimentos con extracción usando fenol/cloroformo. La línea de puntos indica la ventana de adquisición en células con alta expresión de PD-1 o CXCR4, respectivamente. El porcentaje de células con alta expresión de PD-1 fue significativamente menor con el tratamiento con RNP Cas9 PD-1 en comparación con el tratamiento con RNP Cas9 CXCR4 ($p < 0,001$) o con el tratamiento con la RNP Cas9 guía desordenada ($p < 0,001$). El porcentaje de células con alta expresión de CXCR4 fue significativamente menor con el tratamiento con RNP Cas9 CXCR4 en comparación con el tratamiento con RNP Cas9 PD-1 ($p < 0,001$) o con el tratamiento con la con la RNP Cas9 guía desordenada ($p < 0,001$) (chi-cuadrado de Pearson). (D) La edición del genoma se analizó mediante el ensayo con T7E1, mientras que la HDR se detectó mediante digestión con HindIII, que escindió específicamente el sitio HindIII recién integrado; los productos de escisión de ambos ensayos se indican con puntas de flecha. Las concentraciones de varios moldes de HDR se indican encima de los geles de agarosa. El molde de CTRL HDR se refiere a una versión desordenada del molde de CXCR4 HDR original que incluye un sitio de restricción HindIII. En todas las condiciones se observó una segunda banda de gel no específica de significado poco claro en el T7E1 del amplicón de *PD-1*. Se calcularon las frecuencias totales de edición y HDR y se muestran debajo de las imágenes de gel de agarosa.

Descripción detallada

I. Introducción

El suministro de ácidos nucleicos, proteínas y complejos de proteínas y ácidos nucleicos a células primarias, tales como células hematopoyéticas primarias o células madre hematopoyéticas primarias, puede estar limitado por una baja eficiencia. En el presente documento se describen métodos y composiciones para lograr un suministro de eficacia sorprendentemente alta de la proteína Cas9 o el complejo de ribonucleoproteína Cas9 a una célula primaria o a una célula madre primaria. Dicho suministro de alta eficiencia de un complejo de ribonucleoproteína de Cas9, puede permitir mejorar los métodos de edición del genoma, de la modificación de la cromatina, de la regulación genética, de la diferenciación celular y del control de la actividad celular. En algunas realizaciones, el suministro de alta eficiencia de un complejo de ribonucleoproteína de Cas9, se realiza en una célula hematopoyética primaria o en una célula madre hematopoyética primaria.

El suministro de alta eficiencia de las ribonucleoproteínas Cas9 a células hematopoyéticas primarias, se puede usar, por ejemplo, para la edición del genoma, la modificación de la cromatina, la regulación génica, la diferenciación celular y para el control de la actividad de células inmunitarias, tales como células T. Por ejemplo, en una célula T pueden suministrarse reactivos de edición del genoma, reactivos modificadores de la cromatina o agentes para modular la expresión de uno o más genes. Como ejemplo adicional, en una célula T pueden suministrarse reactivos que controlan la actividad, la diferenciación o la desdiferenciación de las células T. Estos métodos pueden usarse para tratar o prevenir el cáncer, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunitarias.

En algunos casos, los métodos y las composiciones que se describen el presente documento pueden usarse para la generación, modificación, uso o control de células T recombinantes, tales como células T receptoras de antígenos quiméricos (células T CAR). Estas células T CAR pueden utilizarse para tratar o prevenir el cáncer, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, en algunas realizaciones, uno o más productos génicos se insertan o inactivan en una célula modificada para expresar una proteína heteróloga (por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico (CAR)). Como ejemplos de productos génicos que inactivan pueden incluirse, por ejemplo, PD-1. El CAR puede introducirse mediante cualquier método disponible, por ejemplo, mediante por expresión vírica (por ejemplo, lentivírica). El vector CAR se puede introducir en la célula antes, durante o después de que se edite el genoma de la célula para insertar o inactivar el producto génico.

I. Métodos

Los métodos para el suministro de la proteína Cas9 a células primarias pueden incluir proporcionar una mezcla de reacción que comprenda un complejo de ribonucleoproteína Cas9 y la célula y b) introducir en la célula el complejo de ribonucleoproteína Cas9 mediante electroporación, en donde el complejo de ribonucleoproteína Cas9 comprende un dominio de nucleasa Cas9 y un ARN guía (por ejemplo, ARN guía pequeño) en el interior de la célula. El ARN guía se puede configurar para hibridar específicamente con una región diana del genoma de la célula.

En algunos casos, en la célula se introduce una pluralidad de complejos de ribonucleoproteína estructuralmente diferentes. Por ejemplo, una proteína Cas9 puede formar un complejo con una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más, por ejemplo, 2-10, 5-100, 20-100) de ARN guía estructuralmente diferentes para dirigirse a una pluralidad de regiones genómicas diana estructuralmente diferentes. Como ejemplo adicional, una pluralidad de proteínas Cas9 estructuralmente diferentes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) pueden formar un complejo con un ARN guía, o con una pluralidad de ARN guía estructuralmente diferentes para introducir en la célula una pluralidad de funciones efectoras diferentes. En algunos casos, los complejos de ribonucleoproteína Cas9 se forman por separado, de tal manera que una función efectora Cas9 seleccionada (por ejemplo, edición del genoma, modulación de la transcripción, etc.) se

puede acoplar con un ARN guía seleccionado y, por tanto, dirigirse a una región genómica diana seleccionada. Una vez formado, la pluralidad de ribonucleoproteínas Cas9 estructuralmente diferentes se puede proporcionar en una mezcla de reacción que contenga una célula e introducirse en ella como se describe en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento proporcionan una eficiencia de suministro de la Cas9 o del complejo de ribonucleoproteína Cas9 de al menos aproximadamente 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97,5 %, 99 %, 99,5 %, 99 % o mayor. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento proporcionan una eficiencia de suministro de la Cas9 o del complejo de ribonucleoproteína Cas9 de aproximadamente 20 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor, o de aproximadamente 70 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor. En algunos casos, la eficiencia se determina con respecto a las células que son viables después de la introducción de la Cas9 o de la ribonucleoproteína Cas9 en la célula. En algunos casos, la eficiencia se determina con respecto al número total de células (viables o no viables) a las que se les introduce la ribonucleoproteína Cas9 en la célula.

20 Como métodos para determinar la eficiencia del suministro se incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: detección de un marcador detectable fusionado, o unido de otro modo, a Cas9, a un ARN guía o a un complejo de ribonucleoproteína Cas9. Por ejemplo, la Cas9 o el ARN guía se pueden fusionar con un marcador fluorescente, cuya internalización en una célula puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Como ejemplo adicional, el ARN guía se puede detectar sometiendo a lisis la célula, amplificando el ARN guía y detectando el ARN guía amplificado. En algunos casos, la amplificación incluye una etapa de transcripción inversa para producir ADNc guía, y el ADNc guía se amplifica y detecta.

30 Como ejemplo adicional, la eficiencia de suministro se puede determinar detectando un efecto posterior de la Cas9 o del complejo de ribonucleoproteína Cas9. Por ejemplo, el suministro se puede estimar cuantificando el número de células editadas del genoma o de alelos editados del genoma en una población de células (en comparación con el total de células/alelos o el total de células viables obtenidas después de la etapa de introducción). Para cuantificar la edición del genoma se pueden utilizar varios métodos. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el uso de una nucleasa específica de emparejamiento erróneo, tal como la endonucleasa I de T7; secuenciación de uno o más locus diana (por ejemplo, mediante secuenciación de Sanger de fragmentos de amplificación de locus diana clonados); seguimiento de indeles por descomposición (TIDE); y secuenciación profunda de alto rendimiento.

35 En el ensayo con la endonucleasa I de T7, se recoge una pluralidad de celdas que contienen una fracción de células editadas, se extrae el ADN genómico, la región genómica diana se amplifica y los amplicones se hibridan. Los amplicones de ADN genómico editados formarán estructuras híbridas con emparejamiento erróneo con amplicones de ADN de tipo silvestre. El ADN se digiere con una nucleasa específica de emparejamiento erróneo que escinde ADN bicatenario que contiene uno o más pares de bases con emparejamiento erróneo. El grado de escisión se puede ensayar para determinar la eficiencia de la edición. Como estrategias alternativas para cuantificar la eficiencia de la edición, pueden incluirse la PCR cuantitativa o la PCR digital. En algunos casos, el número de células editadas puede ser menor que el número de células en las que se ha logrado el suministro debido a ineficiencias posteriores en la unión o la escisión de las regiones genómicas diana, o a ineficiencias en la detección de acontecimiento de edición. 45 De manera similar, el número de células que muestran una modulación transcripcional o una modificación de la cromatina cuando la proteína Cas9 suministrada es una fusión con un dominio efector que proporciona dicha actividad, puede ser menor que el número de células en las que se ha logrado el suministro. Como tal, la eficiencia de un efecto posterior detectado puede considerarse como un límite inferior de la eficiencia del suministro.

50 En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento proporcionan una alta viabilidad celular a las células en las que se ha introducido la ribonucleoproteína Cas9 o la Cas9 en la célula. En algunos casos, la alta viabilidad se consigue formando en la membrana extracelular un número limitado de poros que tengan una vida útil corta. En algunos casos, la viabilidad de las células en las que se ha introducido la ribonucleoproteína Cas9 o Cas9 en la célula es de al menos aproximadamente 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97,5 %, 99 %, 99,5 %, 99 % o mayor. En algunos casos, la viabilidad de las células en las que se ha introducido la ribonucleoproteína Cas9 o Cas9 en la célula es de aproximadamente 20 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor, o de aproximadamente 70 % a aproximadamente 85 % o 90 % o mayor.

65 La Cas9, en forma de un complejo de ribonucleoproteína Cas9, se puede introducir en una célula que no contenga ADN que codifique un ARN guía, que no contenga ADN que codifique una proteína Cas9 y/o que no contenga ADN que codifique una proteína Cas9 estructuralmente idéntica a la proteína Cas9 suministrada en el complejo de ribonucleoproteína.

A. Introducción de Cas9 o de una ribonucleoproteína Cas9 en una célula

Los métodos para introducir el complejo de ribonucleoproteína Cas9 en una célula (una célula hematopoyética o una célula madre hematopoyética, incluyendo, por ejemplo, dichas células de seres humanos), incluyen la formación de una mezcla de reacción que contenga el complejo de ribonucleoproteína Cas9 y la introducción de orificios transitorios en la membrana extracelular de la célula. Dichos orificios transitorios se introducen mediante electroporación. Generalmente, los orificios transitorios se introducen presencia del complejo de ribonucleoproteína Cas9 y se deja que el complejo de ribonucleoproteína Cas9 se difunda al interior de la célula.

Los métodos, las composiciones y los dispositivos para someter las células a electroporación con objeto de introducir un complejo de ribonucleoproteína Cas9, pueden incluir los descritos en los ejemplos del presente documento. Los métodos, composiciones y dispositivos adicionales o alternativos para someter las células a electroporación para introducir un complejo de ribonucleoproteína Cas9, pueden incluir los descritos en el documento WO/2006/001614 o en Kim, J.A. *et al.* Biosens. Bioelectron. 23, 1353-1360 (2008). Los métodos, composiciones y dispositivos adicionales o alternativos para someter las células a electroporación para introducir un complejo de ribonucleoproteína Cas9, pueden incluir los descritos en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006/0094095; 2005/0064596 o 2006/0087522. Los métodos, composiciones y dispositivos adicionales o alternativos para someter las células a electroporación para introducir un complejo de ribonucleoproteína Cas9, pueden incluir los descritos en Li, L.H. *et al.* Cancer Res. Treat. 1, 341-350 (2002); en las patentes de Estados Unidos n.º: 6.773.669; 7.186.559; 7.771.984; 7.991.559; 6485961; 7029916; y en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º: 2014/0017213; y 2012/0088842. Los métodos, composiciones y dispositivos adicionales o alternativos para someter las células a electroporación para introducir una Cas9 o un complejo de ribonucleoproteína Cas9, pueden incluir los descritos en Geng, T. *et al.*, J. Control Release 144, 91-100 (2010); y Wang, J., *et al.* Lab. Chip 10, 2057-2061 (2010).

En algunos casos, los métodos o las composiciones descritos en las patentes o en las publicaciones citadas en el presente documento se modifican para el suministro de Cas9 o de la ribonucleoproteína Cas9. Dicha modificación puede incluir aumentar o disminuir la tensión, la longitud del pulso o el número de pulsos. Dicha modificación puede incluir además la modificación de tampones, medios, soluciones electrolíticas o de sus componentes. La electroporación se puede realizar usando dispositivos conocidos en la técnica, tal como un dispositivo de electroporación Bio-Rad Gene Pulser, un sistema de transfección de Invitrogen Neon, un sistema de transfección de MaxCyte, un dispositivo de nucleofección de Lonza, un dispositivo de transfección de NEPA Gene NEPA21, un sistema de electroporación a través de flujo que contiene una bomba y un aporte constante de tensión, u otros dispositivos o sistemas de electroporación conocidos en la técnica.

En una realización ilustrativa, la electroporación se realiza con un dispositivo que tiene una gran distancia entre el cátodo y el ánodo. En algunos casos, la distancia entre el cátodo y el ánodo es de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 mm. En algunos casos, el dispositivo está configurado con un electrodo que tiene un área superficial relativamente pequeña en contacto con la mezcla de reacción que contiene la célula. En algunos casos, el área superficial de al menos uno de los electrodos, o el área superficial de al menos uno de los electrodos que está en contacto con la mezcla de reacción es de, o es aproximadamente de, 0,1 mm², 0,2 mm², 0,3 mm², 0,33 mm², 0,4 mm², 0,5 mm², 0,6 mm², 0,7 mm², 0,8 mm², 0,9 mm², o de 1 mm². En algunos casos, la relación de la distancia entre el cátodo y el ánodo y el área de la superficie del electrodo es de 1/50 a 1/1000. En algunos casos, la relación entre la longitud del eje longitudinal de la cámara de electroporación y el área transversal de la cámara de electroporación es de 50 a 10 000. En algunos casos, el dispositivo de electroporación tiene una cámara de electroporación con un primer y segundo extremo distal separados por la longitud longitudinal, en donde el primer electrodo está en el primer extremo distal y un depósito que contiene el segundo electrodo está en comunicación fluida con el segundo extremo distal.

En otra realización ilustrativa, la electroporación se realiza con un dispositivo Lonza 4D Nucleofector™. Por ejemplo, la electroporación se puede realizar con el kit Nucleofector™ de 96 pocillos de célula primaria P3 de Amaxa o el kit S 4D-Nucleofector X de célula primaria P3. En algunos casos, la electroporación se realiza resuspendiendo las células en un tampón de electroporación adecuado (por ejemplo, tampón Amaxa P3 con complemento de tampón), colocando las células en una cámara de electroporación y sometiéndolas a electroporación. En algunos casos, las células T activadas se pueden someter a electroporación con un dispositivo Nucleofector™ usando cualquiera de los siguientes programas: EH-115, CA-137, DS-150, CM-138, DS-120, CM-137, EH-100, CM-150, EO-100, DN-100, EN-138, DS-138, EN-150, DS-137, EW-113 o DS-130. En algunos casos, las células T activadas se pueden someter a electroporación con un dispositivo Nucleofector™ usando el programa EH-115. En algunos casos, las células T intactas se pueden someter a electroporación con un dispositivo Nucleofector™ usando cualquiera de los siguientes programas: EH-100, DN-100, EO-100 EN-138, EW-113 o EN-150. En algunos casos, las células T intactas se pueden someter a electroporación con un dispositivo Nucleofector™ usando el programa EH-100 o DN-100.

La electroporación se puede realizar colocando, en una cámara, entre un cátodo y un ánodo, una mezcla de reacción que contenga Cas9 o una ribonucleoproteína Cas9 y una célula, y aplicando un potencial de tensión entre el cátodo y el ánodo. El potencial de tensión puede ser de aproximadamente 20 kV/m a aproximadamente 100 kV/m. En algunos casos, el potencial de tensión es de aproximadamente 30 kV/m a aproximadamente 90 kV/m, de aproximadamente

30 kV/m a aproximadamente 80 kV/m, de aproximadamente 30 kV/m a aproximadamente 70 kV/m, de aproximadamente 30 kV/m a aproximadamente 60 kV/m, de aproximadamente 40 kV/m a aproximadamente 60 kV/m, de aproximadamente 45 a aproximadamente 55 o 60 kV/m, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 55 kV/m. En algunos casos, el potencial de tensión es de al menos aproximadamente 20 kV/m, 30 kV/m, 40 kV/m, 50 kV/m, 53 kV/m, 60 kV/m, 70 kV/m, 80 kV/m, 90 kV/m o 100 kV/m. En algunos casos, el potencial de tensión es, o es de aproximadamente, 0,5, 0,75, 1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4 o 2,5 kV. En algunos casos, el potencial de tensión es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 kV, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 2 kV, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 kV, de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 1,9 kV, de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 1,8 kV, de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 1,7 kV, de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 1,7 kV, o de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 1,7 kV.

El potencial de tensión se puede aplicar como un pulso o de forma continua. Para aplicación de tensión continua, la mezcla de reacción se puede hacer fluir a través de una cámara de electrodo usando una bomba u otro aparato de manipulación de líquidos. En algunos casos, la mezcla de reacción se hace fluir a través de la cámara de electrodo una vez. Como alternativa, la mezcla de reacción se puede hacer recircular a través de la cámara de electrodo. Para la aplicación de tensión de pulso, la longitud del pulso, el número de pulsos y la duración entre pulsos, se pueden optimizar para conseguir un suministro de alta eficiencia de Cas9 o del complejo de ribonucleoproteína Cas9.

El potencial de tensión se puede aplicar como un pulso una o varias veces. En algunos casos, el potencial de tensión se pulsa de 1 a 10 veces, de 1 a 9 veces, de 1 a 8 veces, de 1 a 7 veces, de 1 a 6 veces, de 1 a 5 veces o de 1 a 4 veces. En algunos casos, el potencial de tensión se pulsa de 2 a 9 veces, de 2 a 8 veces, de 2 a 7 veces, de 2 a 6 veces, de 2 a 5 veces o de 2 a 4 veces. En algunos casos, el potencial de tensión se pulsa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces.

La longitud del pulso del potencial de tensión puede ser de 1 a 100 ms, de 2 a 90 ms, de 3 a 80 ms, de 4 a 70 ms, de 5 a 60 ms, de 5 a 50 ms, de 5 a 40 ms, de 6 a 30 ms, de 7 a 20 ms o de 8 a 15 ms. En algunos casos, la longitud del pulso es de, o es de aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 ms.

En algunos casos, los pulsos de tensión se intercalan con periodos de descanso de una duración definida. En algunos casos, el período de descanso tiene una duración idéntica a cualquiera de las longitudes de pulso anteriores descritas en el presente documento. En algunos casos, el período de descanso es significativamente más largo que la longitud del pulso. Por ejemplo, una mezcla de reacción puede someterse a un pulso de tensión, recuperarse durante 1, 2, 5, 10, 15, 20 o 30 minutos, o más y volverse a aplicar un potencial de tensión. En algunos casos, la magnitud, duración o período de descanso de los pulsos de tensión múltiples, es variable. Por ejemplo, el primer pulso puede tener mayor potencial de tensión o mayor duración, que un segundo pulso, o viceversa.

Las células (por ejemplo, células T) pueden estimularse (por ejemplo, por contacto con anticuerpos anti CD3, anticuerpos anti CD28, o una combinación de los mismos, solubles o inmovilizados en una superficie sólida) o no estimularse. En algunos casos, antes de aplicar uno de los métodos de introducción de Cas9 RNP descritos en el presente documento (por ejemplo, electroporación), las células (por ejemplo, células T) pueden estimularse (por ejemplo, por contacto con anticuerpos anti CD3, anticuerpos anti CD28 o una combinación de los mismos, solubles o inmovilizados en una superficie sólida) o incubarse sin estimulación. En algunos casos, una citocina apropiada (por ejemplo, IL-2) puede ponerse en contacto con las células antes de mezclarse con los reactivos de introducción de la RNP Cas9 (por ejemplo, un tampón de electroporación), o puede ponerse en contacto con las células después de la introducción de la Cas9 o de la RNP Cas9, o una de sus combinaciones.

B. Cas9

La proteína Cas9 suministrada, en complejo con ARN, puede estar en forma de endonucleasa activa, de tal manera que cuando se une al ácido nucleico diana como parte de un complejo con un ARN guía, se introduce una rotura bicatenaria en el ácido nucleico diana. La ruptura bicatenaria se puede reparar mediante NHEJ para introducir mutaciones aleatorias, o mediante HDR para introducir mutaciones específicas. En los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar varias nucleasas Cas9. Por ejemplo, se puede utilizar una nucleasa Cas9 que requiera un motivo adyacente al protoespaciador (PAM, *protospacer adjacent motif*) NGG, inmediatamente en la posición 3' de la región dirigida por el ARN guía. Dichas nucleasas Cas9 pueden dirigirse a cualquier región de un genoma que contenga una secuencia NGG. Como ejemplo adicional, las proteínas Cas9, que requieren un motivo PAM ortogonal, se pueden utilizar para dirigirse a secuencias que no tienen una secuencia de PAM NGG adyacente. Como ejemplos de proteínas Cas9 con especificidades de secuencia de PAM ortogonal se incluyen, pero sin limitación, CFP1, las descritas en Nature Methods 10, 1116-1121 (2013), y las descritas en Zetsche *et al.*, Cell, volumen 163, publicación 3, págs 759-771 del 22 de octubre de 2015.

En algunos casos, la proteína Cas9 es una nicasa, de tal manera que cuando se une al ácido nucleico diana como parte de un complejo con un ARN guía, se introduce una rotura o muesca monocatenaria en el ácido nucleico diana. Un par de nicasas Cas9, cada una de ellas unida a un ARN guía estructuralmente diferente, puede dirigirse a dos

sitios proximales de una región genómica diana y así introducir un par de roturas monocatenarias proximales en la región genómica diana. Los pares de nicasas pueden proporcionar una mayor especificidad porque es probable que los efectos inespecíficos produzcan muescas sencillas, que generalmente se reparan sin lesión mediante mecanismos de reparación de escisión de bases. Como ejemplos de nicasas Cas9 se incluyen las nucleasas Cas9 que tienen una mutación D10A o H840A.

En algunos casos, la proteína Cas9 está en una forma inactiva de nucleasa. Por ejemplo, la proteína Cas9 puede estar en una forma inactiva de nucleasa que se fusiona con otra proteína accesoría o con un dominio efector. Por tanto, la nucleasa Cas9, en complejo con un ARN guía, puede funcionar para dirigirse a la proteína accesoría, el dominio efector, o la actividad de los mismos, en la región genómica diana. En algunos casos, la proteína nucleasa Cas9 inactiva se fusiona con una endonucleasa o nicasa. Por ejemplo, la nucleasa Cas9 inactiva se puede fusionar con una endonucleasa o nicasa heterodimérica estricta (por ejemplo, una endonucleasa heterodimérica estricta Fok I). Para localizar la actividad de la endonucleasa en una región genómica diana con una especificidad mejorada, se puede usar un par de dichas endonucleasas inactivas por nucleasa fusionadas con elementos correspondientes de una nucleasa heterodimérica estricta. Como ejemplos de fusiones de endonucleasa heterodimérica Cas9 se incluyen los descritos en Nat Biotechnol. Junio de 2014; 32(6): 577-582.

En algunos casos, una proteína Cas9, tal como una proteína nucleasa Cas9 inactiva se puede usar para modular la expresión génica o modificar la estructura de la cromatina. En algunos casos, una proteína nucleasa Cas9 inactiva puede formar un complejo con un ARN guía dirigido a un gen o al promotor de un gen. La proteína nucleasa Cas9 inactiva puede por tanto interferir con la unión de factores de transcripción u otra maquinaria de transcripción y así regular negativamente la transcripción del gen diana. El uso de múltiples ARN guía estructuralmente diferentes que se dirigen al mismo gen o región promotora, o una combinación de los mismos, puede usarse para disminuir aún más la transcripción del gen diana.

Como ejemplo adicional, una proteína Cas9, tal como una proteína nucleasa Cas9 inactiva se puede fusionar con un activador o represor de la transcripción para modular la transcripción de un gen diana. Como ejemplos de activadores se incluyen, pero sin limitación, una o más copias de un VP8, VP16, VP64, o un dominio de activación de p65 (p65AD). Como ejemplos de represores se incluyen, pero sin limitación, un dominio KRAB, un dominio de sombra de cromo, un dominio SID o un dominio de represión EAR (represor anfílico asociado a factores de respuesta a etileno) (SRDX). El activador o represor transcripcional puede optimizarse para obtener una actividad eficiente o una estabilidad mejorada en la célula hospedadora.

En algunos casos, la nucleasa Cas9, tal como una nucleasa Cas9 inactiva por nucleasa se puede fusionar con uno o más dominios efectores que regulan la metilación de ADN, la metilación o desmetilación de histonas, la desacetilación de histonas, la fosforilación de ARN polIII, o que promueven un aumento en la compactación del nucleosoma medido por la reducción de la hipersensibilidad a la ADNsa I o la disminución de la accesibilidad a la nucleasa microcócica. Una combinación de enzimas o dominios efectores de activación que podrían promover la transcripción podría incluir ADN desmetilasas, histonas desmetilasas o metilasas, histona acetilasas, ARN polIII fosforilasas, o enzimas o dominios efectores que reducen la compactación del nucleosoma medida por el aumento de la hipersensibilidad a la ADNsa I o aumento de la accesibilidad a la nucleasa microcócica, o promover el bucle cromosómico natural o no natural entre elementos potenciadores distales y elementos promotores proximales. Una combinación de enzimas o dominios efectores represores que podrían reprimir la transcripción podría incluir ADN metilasas, histonas desmetilasas o metilasas, histonas desacetilasas, ARN polIII fosforilasas, o enzimas o dominios efectores que aumentan la compactación del nucleosoma medida por la disminución de la hipersensibilidad a la ADNsa I o la disminución de la accesibilidad a la nucleasa microcócica, o inhibir el bucle cromosómico entre elementos potenciadores distales y elementos promotores proximales.

La nucleasa Cas9 se puede fusionar con una o más secuencias de translocación nuclear. El uso de secuencias de translocación nuclear en el extremo N, extremo C o internas, o de una o más secuencias de translocación nuclear fusionadas con un dominio o una proteína accesoría que se fusiona con una nucleasa Cas9, puede mejorar el suministro del complejo de ribonucleoproteína Cas9 al núcleo de la célula. El direccionamiento del suministro del complejo de ribonucleoproteína Cas9 al núcleo de la célula, puede aumentar el nivel de edición del genoma o del control transcripcional proporcionado al introducir en la célula la Cas9 o la ribonucleoproteína Cas9.

Para introducir el complejo de ribonucleoproteína Cas9 en la célula, la mezcla de reacción puede tener una concentración de ribonucleoproteína Cas9 de aproximadamente 0,25 μM a aproximadamente 5 μM , de aproximadamente 0,5 μM a aproximadamente 2,5 μM o de aproximadamente 0,9 μM a aproximadamente 1,8 μM . La concentración del complejo de ribonucleoproteína Cas9 puede estar a una concentración de, o estar a una concentración de aproximadamente, 0,25 μM , 0,3 μM , 0,4 μM , 0,5 μM , 0,6 μM , 0,7 μM , 0,8 μM , 0,9 μM , 1 μM , 1,1 μM , 1,2 μM , 1,3 μM , 1,4 μM , 1,5 μM , 1,6 μM , 1,7 μM , 1,8 μM , 1,9 μM , 2 μM , 2,1 μM , 2,2 μM , 2,3 μM , 2,4 μM , 2,5 μM o mayor. En algunos casos, la concentración del complejo de ribonucleoproteína Cas9 es menor, o menor que aproximadamente, 5 μM , 4 μM o 3 μM .

La mezcla de reacción para introducir el complejo de ribonucleoproteína Cas9 en la célula puede contener de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 4×10^5 células diana, de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ a

aproximadamente $3,5 \times 10^5$ células diana, de aproximadamente $1,75 \times 10^5$ a aproximadamente 3×10^5 células diana o de aproximadamente 2×10^5 a aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células diana. En algunos casos, la concentración de las células en la mezcla de reacción es de aproximadamente $0,5 \times 10^4$ a aproximadamente 5×10^4 células diana por μl , de aproximadamente $0,75 \times 10^4$ a aproximadamente 4×10^4 células diana por μl , de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 3×10^4 células diana por μl , de aproximadamente $1,5 \times 10^4$ a aproximadamente $2,5 \times 10^4$ o 3×10^4 células diana por μl o de aproximadamente $1,8 \times 10^4$ a aproximadamente $2,3 \times 10^4$ células diana por μl .

C. Ácidos nucleicos molde

10 En algunas realizaciones, para introducir el complejo de ribonucleoproteína Cas9 en la célula, la mezcla de reacción puede contener un ácido nucleico para dirigir la reparación dirigida por homología (HDR) de la escisión o formación de muescas, mediada por Cas9 o mediada por la fusión Cas9, en la región genómica diana. El ácido nucleico molde es generalmente un oligonucleótido de ADN bicatenario (doble cadena) o monocatenario (una sola cadena). En algunos casos, el ácido nucleico molde es un molde de ADN oligonucleotídico monocatenario (ssODT).

15 El ácido nucleico molde puede contener de 50, 75 o 100 b o pb a aproximadamente 110, 120, 125, 150, 200, 225 o 250 b o pb de longitud). Generalmente, los ácidos nucleicos molde más largos se proporcionan en forma de un plásmido circular o linealizado o como un componente de un vector (por ejemplo, como componente de un vector vírico), o un producto de amplificación o polimerización del mismo. Pueden proporcionarse ácidos nucleicos molde más cortos como oligonucleótidos monocatenarios o bicatenarios. Los oligonucleótidos molde monocatenarios o bicatenarios ilustrativos tienen una longitud de, o tienen una longitud de aproximadamente 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 20 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 115, 120, 125, 150, 175, 200, 225 o 250 pb. Dichos oligonucleótidos molde pueden contener uno o dos brazos de homología (por ejemplo, brazos de homología 25 25 flanqueantes) que son idénticos o sustancialmente idénticos a una región adyacente o que flanquea el sitio de corte diana. En algunos casos, el brazo o los brazos de homología tienen una longitud de 25 a aproximadamente 90 nucleótidos. Por ejemplo, el brazo o los brazos de homología pueden tener una longitud de aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 115 o 120 nucleótidos.

30 El ácido nucleico molde se puede proporcionar en la mezcla de reacción para su introducción en la célula a una concentración de aproximadamente $1 \mu\text{M}$ a aproximadamente $200 \mu\text{M}$, de aproximadamente $2 \mu\text{M}$ a aproximadamente $190 \mu\text{M}$, de aproximadamente $2 \mu\text{M}$ a aproximadamente $180 \mu\text{M}$, de aproximadamente $5 \mu\text{M}$ a aproximadamente $180 \mu\text{M}$, de aproximadamente $9 \mu\text{M}$ a aproximadamente $180 \mu\text{M}$, de aproximadamente $10 \mu\text{M}$ a aproximadamente $150 \mu\text{M}$, de aproximadamente $20 \mu\text{M}$ a aproximadamente $140 \mu\text{M}$, de aproximadamente $30 \mu\text{M}$ a aproximadamente $130 \mu\text{M}$, de aproximadamente $40 \mu\text{M}$ a aproximadamente $120 \mu\text{M}$ o de aproximadamente 45 35 μM a aproximadamente 90 o $100 \mu\text{M}$. En algunos casos, el ácido nucleico molde se puede proporcionar en la mezcla de reacción para su introducción en la célula a una concentración de, o de aproximadamente, $1 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $4 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $6 \mu\text{M}$, $7 \mu\text{M}$, $8 \mu\text{M}$, $9 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $11 \mu\text{M}$, $12 \mu\text{M}$, $13 \mu\text{M}$, $14 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$, $16 \mu\text{M}$, $17 \mu\text{M}$, $18 \mu\text{M}$, $19 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$, $35 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$, $45 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $55 \mu\text{M}$, $60 \mu\text{M}$, $70 \mu\text{M}$, $80 \mu\text{M}$, $90 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $110 \mu\text{M}$, $115 \mu\text{M}$, $120 \mu\text{M}$, $130 \mu\text{M}$, $140 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$, $160 \mu\text{M}$, $170 \mu\text{M}$, $180 \mu\text{M}$, $190 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$ o mayor.

En algunos casos, la eficiencia de la edición del genoma dirigida por molde y por NHEJ en presencia de un ácido nucleico molde (por ejemplo, ssODT), puede ser de al menos, o de al de menos aproximadamente, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o mayor. En algunos casos, 45 la eficiencia de incorporación de la secuencia del ácido nucleico molde (por ejemplo, ssODT) mediante HDR puede ser de al menos, o de al menos aproximadamente, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o mayor.

50 El ácido nucleico molde puede contener una amplia variedad de secuencias diferentes. En algunos casos, el ácido nucleico molde codifica un codón de terminación o un desplazamiento del marco de lectura, en comparación con la región genómica diana antes de la escisión y la HDR. Dicho ácido nucleico molde puede ser útil para anular o inactivar un gen o una parte del mismo. En algunos casos, el ácido nucleico molde codifica una o más mutaciones de sentido equivocado o inserciones o deleciones en marco en comparación con la región genómica diana. Dicho ácido nucleico 55 molde puede ser útil para alterar el nivel de expresión o actividad (por ejemplo, especificidad de ligando) de un gen diana o parte del mismo.

Por ejemplo, el ácido nucleico molde se puede usar para reemplazar una o más regiones determinantes complementarias, o partes de las mismas, de una cadena de receptor de células T o gen de anticuerpo. Por tanto, 60 dicho ácido nucleico molde puede alterar la especificidad antigénica de una célula diana. Por ejemplo, la célula diana se puede alterar para reconocer y, por lo tanto, suscitar una respuesta inmunitaria contra, un antígeno tumoral o un antígeno de una enfermedad infecciosa.

Como ejemplo adicional, el ácido nucleico molde puede codificar una secuencia de tipo silvestre para rescatar el nivel 65 de expresión o la actividad de un proteína endógena o un gen diana. Por ejemplo, células T que contienen una mutación en el gen FoxP3, o en una región promotora del mismo, se pueden rescatar para tratar el IPEX (síndrome

de inmunodesregulación, poliendocrinopatía, enteropatía, ligado al cromosoma X) o el lupus eritematoso sistémico. Como alternativa, el ácido nucleico molde puede codificar una secuencia que dé como resultado una menor expresión o actividad de un gen diana. Por ejemplo, eliminando o reduciendo la expresión o la actividad de FoxP3 en células T preparadas para inmunoterapia contra un cáncer o una enfermedad infecciosa específica, se puede obtener una mayor respuesta inmunoterapéutica.

Como ejemplo adicional, el ácido nucleico molde puede codificar una mutación que altere la función de un gen diana. Por ejemplo, el ácido nucleico molde puede codificar una mutación de una proteína de la superficie celular necesaria para el reconocimiento o la entrada de virus. La mutación puede reducir la capacidad del virus para reconocer o infectar la célula diana. Por ejemplo, las mutaciones de CCR5 o CXCR4 pueden conferir una mayor resistencia a la infección por VIH en células T CD4⁺.

En algunos casos, el ácido nucleico molde codifica una secuencia que, aunque adyacente a, o flanqueada por, una región de homología suficiente, es completamente ortogonal a la secuencia endógena. Por ejemplo, el ácido nucleico molde puede codificar un elemento promotor o represor inducible no relacionado con el promotor endógeno de un gen diana. El elemento promotor o represor inducible se puede insertar en la región promotora de un gen diana para proporcionar control temporal y/o espacial de la expresión o actividad del gen diana. Como ejemplo adicional, el ácido nucleico molde puede codificar un gen suicida, un gen indicador, o un gen reóstato, o una parte de los mismos. Después de un tratamiento satisfactorio, se puede usar un gen suicida para eliminar de un hospedador células de inmunoterapia específicas de antígeno. Durante la inmunoterapia, para modular la actividad de una respuesta inmunitaria se puede usar un gen reóstato. Para monitorizar el número, la ubicación y la actividad de las células *in vitro* o *in vivo* después de su introducción en un hospedador, se puede usar un gen indicador.

Los genes reóstato ilustrativos son genes de puntos de control inmunitario. Durante la inmunoterapia, para modular la actividad de una respuesta inmunitaria puede usarse un aumento o una disminución de la expresión o actividad de uno o más genes de puntos de control inmunitario. Por ejemplo, se puede aumentar la expresión de un gen de punto de control inmunitario, lo que da como resultado una disminución de la respuesta inmunitaria. Como alternativa, el gen del punto de control inmunitario se puede inactivar, dando como resultado un aumento de la respuesta inmunitaria. Como genes ilustrativos de puntos de control inmunitario se incluyen, pero sin limitación, CTLA-4 y PD-1. Los genes reóstato adicionales pueden incluir cualquier gen que module la proliferación o la función efectora de la célula diana. Dichos genes reóstato incluyen factores de transcripción, receptores de quimiocinas, receptores de citocinas, o genes implicados en rutas coinhibidoras, tales como TIGIT o TIM. En algunos casos, el gen reóstato es un gen reóstato sintético o recombinante que interacciona con la maquinaria de señalización celular. Por ejemplo, el gen reóstato sintético puede ser una molécula dependiente de fármaco o dependiente de luz que inhiba o active la señalización celular. Dichos genes sintéticos se describen, por ejemplo, en Cell 155(6): 1422-34 (2013); y en Proc Natl Acad Sci USA. 22 de abril de 2014;111(16):5896-901.

Como genes suicidas ilustrativos se incluyen, pero sin limitación, timidina cinasa, timidina cinasa del virus del herpes simple de tipo 1 (HSV-tk), isoenzima 4B1 del citocromo P450 (cyp4B1), citosina desaminasa, folilpoliglutamato sintasa (fpgs) humana o casp9 inducible. En algunas realizaciones, el gen suicida se selecciona del grupo que consiste en el gen que codifica la timidina cinasa del VHS-1 (abreviado como HSV-tk), la HSV-tk corregida mediante corte y empalme (abreviado como cHSV-tk, véase Fehse B *et al.*, Gene Ther (2002) 9(23): 1633-1638), los genes que codifican los mutantes HSV-tk sumamente sensibles a ganciclovir (mutantes en donde el resto en la posición 75 y/o el resto en la posición 39 están mutados (véase Black ME *et al.* Cancer Res (2001) 61(7):3022-3026; y Qasim W *et al.*, Gene Ther (2002) 9(12):824-827). En su lugar, pueden usarse genes suicidas distintos de genes basados en timidina cinasa. Por ejemplo, como genes suicidas pueden utilizarse genes que codifican el CD20 humano (la diana de anticuerpos monoclonales de calidad clínica tal como Rituximab®; véase Serafini M *et al.*, Hum Gene Ther. 2004;15:63-76), caspasas inducibles (como ejemplo: caspasa 9 humana modificada fusionada con una proteína de unión a FK506 (FKBP) humana para permitir la dimerización condicional usando un agente farmacéutico de molécula pequeña; véase Di Stasi A *et al.*, N Engl J Med. 3 de nov de 2011; 365(18): 1673-83; Tey SK *et al.*, Biol Blood Marrow Transplant. Agosto de 2007); '3(8):9) '3-24. Publicación electrónica del 29 de mayo de 2007) y FCU1 (que transforma un profármaco no tóxico 5-fluorocitosina o 5-FC en sus derivados sumamente citotóxicos 5-fluorouracilo o 5-FU y 5'-fluorouridina-5'-monofosfato o 5'-FUMP; Breton E *et al.*, C R Biol. Marzo de 2010;333(3):220-5. Publicación electrónica 201Q del 25 de enero).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico molde codifica un receptor de antígeno recombinante, una parte del mismo, o un componente del mismo. En las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0215427; 2004/0043401; 2007/0166327; 2012:0148552, 2014-0242701 2014/0274909; 20140314795; 2015/0031624; y en las publicaciones de solicitud internacional n.º WO/2000/023573 y WO 2014/134165, se describen receptores de antígenos recombinantes, así como partes y componentes de los mismos. Dichos receptores de antígenos recombinantes pueden usarse para inmunoterapia dirigida a un antígeno específico asociado a un tumor o asociado a una enfermedad infecciosa. En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para inactivar un receptor de antígeno endógeno, tal como un receptor de células T, receptor de células B, o una parte o un componente de los mismos. Los métodos descritos en el presente documento también se pueden usar para insertar un receptor de antígeno recombinante, una parte del mismo, o un componente del mismo. En algunas realizaciones, el receptor endógeno se inactiva y se reemplaza por el receptor recombinante (por ejemplo, un receptor

de células T recombinante o un receptor de antígeno quimérico recombinante). En algunos casos, el receptor recombinante se inserta en la ubicación genómica del receptor endógeno. En algunos casos, el receptor recombinante se inserta en una ubicación genómica diferente en comparación con el receptor endógeno.

5 **D. Regiones genómicas diana**

Los métodos y las composiciones que se describen en el presente documento pueden usarse para dirigirse esencialmente a cualquier secuencia genómica de una célula hospedadora. El direccionamiento puede dar como resultado una mutación o un reemplazo de al menos una parte de la secuencia genómica diana. Como alternativa, el
10 direccionamiento puede dar como resultado la modificación de la cromatina dentro y/o cerca de la región genómica diana, por ejemplo, mediante el reclutamiento de una proteína efectora modificadora de la cromatina. Dicha modificación de la cromatina puede usarse para aumentar o disminuir la transcripción de genes en la región genómica diana o próxima a ella. Como otra alternativa más, el direccionamiento puede reprimir o activar un gen la región genómica diana o próxima a ella, reclutando un dominio represor (por ejemplo, KRAB) o activador (por ejemplo, VP64)
15 en la región genómica diana.

Como regiones genómicas diana ilustrativas se incluyen regiones dentro o cerca del gen PD-1 o del gen CTLA-4. PD-1 y CTLA-4 son genes de puntos de control inmunitario y para controlar la actividad inmunogénica de la célula diana se puede usar la modulación o ablación de uno o más de los genes. Como regiones genómicas diana ilustrativas se
20 incluyen regiones dentro o cerca de genes que codifican un receptor usado para el reconocimiento o la entrada de virus. Por ejemplo, el gen CCR5 o CXCR4 puede dirigirse para mutar o regular negativamente estos receptores y, por tanto, conferir resistencia a infección por VIH en la célula diana.

Como regiones genómicas ilustrativas se incluyen regiones dentro o cerca de genes que codifican proteínas implicadas en el tránsito celular y en el asentamiento o reconocimiento dirigidos. Dichos genes incluyen, pero sin limitación,
25 receptores de células T y de células B, receptores de quimiocinas de células T tales como CXCR4, CCR9, CCR7, receptores de reconocimiento de patrones, antígeno linfocitario cutáneo, CD34, L-selectina, CD28 y GLYCAM-1.

Como regiones genómicas diana ilustrativas se incluyen genes que contienen mutaciones que están implicadas en, asociadas a, o causantes de enfermedades. Por ejemplo, una región genómica diana en o cerca del gen que codifica
30 FOXP3 puede dirigirse para aumentar o rescatar la función FOXP3 y por lo tanto tratar a pacientes que padecen una enfermedad autoinmunitaria tal como IPEX. Como ejemplo adicional, una región genómica diana en o cerca del gen que codifica IL2RA puede dirigirse para aumentar o rescatar la función IL2RA y por lo tanto tratar a pacientes que padecen una enfermedad autoinmunitaria. Como otro ejemplo más, una región genómica diana en o cerca del gen que codifica IL2RG puede dirigirse para aumentar o rescatar la función IL2RG y por lo tanto tratar a pacientes que padecen una inmunodeficiencia, tal como inmunodeficiencia combinada grave. Como otro ejemplo más, una región genómica diana en o cerca del gen que codifica GATA2 puede dirigirse para aumentar o rescatar la función GATA2 y por lo tanto tratar a pacientes que padecen MonoMAC.
35

40 **E. ARN guía**

En el presente documento se describen ARN guía y bibliotecas de ARN guía. Los ARN guía pueden contener de 5' a 3': una región de unión, una región de horquilla 5', una región de horquilla 3' y una secuencia de terminación de la transcripción. El ARN guía se puede configurar para formar un complejo estable y activo con una proteína Cas9. En
45 algunos casos, el ARN guía se optimiza para mejorar la expresión de un polinucleótido que codifica el ARN guía en una célula hospedadora.

La región de horquilla 5' puede tener una longitud de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 nucleótidos (por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o aproximadamente 50 nucleótidos de longitud). En algunos casos, la región de horquilla 5'
50 tiene una longitud de entre aproximadamente 30-45 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 nucleótidos de longitud). En algunos casos, la región de horquilla 5' tiene una longitud, o tiene una longitud de al menos aproximadamente, 31 nucleótidos (por ejemplo, tiene una longitud de al menos aproximadamente 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 nucleótidos). En algunos casos, la
55 región de horquilla 5' contiene uno o más bucles o protuberancias, y cada bucle o protuberancia tiene una longitud de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. En algunos casos, la región de horquilla 5' contiene un tallo de entre aproximadamente 10 y 30 pares de bases complementarias (por ejemplo, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 pares de bases complementarias).

En algunas realizaciones, la región de horquilla 5' puede contener estructuras de unión a proteínas o de unión a moléculas pequeñas. En algunos casos, la función de la horquilla 5' (por ejemplo, interaccionar o ensamblarse con una proteína Cas9) puede activarse condicionalmente con fármacos, factores de crecimiento, ligandos de molécula pequeña, o una proteína que se une a la estructura de unión a proteínas del tallo-bucle en 5'. En algunas realizaciones, la región de horquilla 5' puede contener nucleótidos no naturales. Por ejemplo, se pueden incorporar nucleótidos no
65 naturales para mejorar la interacción proteína-ARN, o para aumentar la estabilidad térmica o la resistencia a la degradación del ARN guía.

El ARN guía puede contener una secuencia intermedia entre las regiones de horquilla 5' y 3'. La secuencia intermedia entre las regiones de horquilla 5' y 3' puede tener una longitud de entre aproximadamente 0 a aproximadamente 50 nucleótidos, preferentemente una longitud entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 nucleótidos (por ejemplo, a una longitud de, o una longitud de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos). En algunos casos, la secuencia intermedia está diseñada para ser lineal, desestructurada, sustancialmente lineal o sustancialmente desestructurada. En algunas realizaciones, la secuencia intermedia puede contener nucleótidos no naturales. Por ejemplo, se pueden incorporar nucleótidos no naturales para mejorar la interacción proteína-ARN, o para aumentar la actividad del complejo ARN guía:ribonucleoproteína Cas9. Como ejemplo adicional, se pueden incorporar nucleótidos naturales para mejorar la estabilidad térmica o la resistencia a la degradación del ARN guía.

La región de horquilla 3' puede contener un bucle de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos y un tallo de aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos o más largo. En algunos casos, la región de horquilla 3' puede contener una estructura de unión a proteínas, de unión a moléculas pequeñas, de unión a hormonas o de unión a metabolitos, que puede estabilizar condicionalmente la estructura secundaria y/o terciaria del ARN guía. En algunas realizaciones, la región de horquilla 3' puede contener nucleótidos no naturales. Por ejemplo, se pueden incorporar nucleótidos no naturales para mejorar la interacción proteína-ARN, o para aumentar la actividad del complejo ARN guía:ribonucleoproteína Cas9. Como ejemplo adicional, se pueden incorporar nucleótidos naturales para mejorar la estabilidad térmica o la resistencia a la degradación del ARN guía.

En algunas realizaciones, el ARN guía incluye una estructura de terminación en su extremo 3'. En algunos casos, el ARN guía incluye una región de horquilla 3' adicional, por ejemplo, antes de la terminación y después de una primera región de horquilla 3', que pueden interactuar con proteínas, moléculas pequeñas, hormonas, *etc.*, para su estabilización o funcionalidad adicional, tal como estabilización condicional o regulación condicional del ensamblaje o actividad de ARN guía:ribonucleoproteína Cas9.

Generalmente, la región de unión está diseñada para complementarse o complementarse sustancialmente con una región genómica diana o con un conjunto de regiones genómicas diana, y por tanto unirse o hibridarse con dicha región o conjunto. En algunos casos, la región de unión puede incorporar bases oscilantes o degeneradas para unirse a múltiples regiones genómicas diana. En algunos casos, la región de unión puede complementar una secuencia que se conserva entre un conjunto de regiones genómicas diana para unirse a múltiples regiones genómicas diana. En algunos casos, la región de unión se puede alterar para aumentar la estabilidad. Por ejemplo, para aumentar la resistencia del ARN a la degradación se puede incorporar nucleótidos no naturales. En algunos casos, la región de unión se puede alterar o diseñar para impedir o reducir la formación de estructuras secundarias en la región de unión. En algunos casos, la región de unión puede diseñarse para optimizar el contenido de G-C. En algunos casos, el contenido de G-C es preferentemente entre aproximadamente 40 % y aproximadamente 60 % (por ejemplo, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %). En algunos casos, la región de unión, puede seleccionarse para comenzar con una secuencia que facilite la transcripción eficiente del ARN guía. Por ejemplo, la región de unión puede comenzar en el extremo 5' con un nucleótido G. En algunos casos, la región de unión puede contener nucleótidos modificados, tales como, sin limitación, nucleótidos metilados o fosforilados.

Los ARN guía se pueden modificar mediante métodos conocidos en la técnica. En algunos casos, las modificaciones pueden incluir, pero sin limitación, la adición de uno o más de los siguientes elementos de secuencia: una caperuza en 5' (por ejemplo, una caperuza de 7-metilguanilato); una cola poliadenilada en 3'; una secuencia ribointerruptora; una secuencia de control de la estabilidad; una horquilla; una secuencia de localización subcelular; una secuencia o un marcador de detección; o un sitio de unión para una o más proteínas. Las modificaciones también pueden incluir la introducción de nucleótidos no naturales, incluyendo, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: nucleótidos fluorescentes y nucleótidos metilados.

En algunas realizaciones, los ARN guía se seleccionan de manera que no tengan efectos inespecíficos significativos. En algunos casos, se puede determinar la similitud de una región de unión de ARN guía para secuencias de elementos genéticos inespecíficos. Los ARN guía dirigidos a regiones genómicas diana que tienen una alta similitud con una o más regiones genómicas inespecíficas que superen un umbral predestinado pueden eliminarse por filtración. En algunos casos, regiones de unión candidatas, incluyendo las secuencias del motivo adyacente al protoespaciador (PAM), se pueden puntuar usando una métrica de puntuación de manera manual o automatizada. Después, se pueden seleccionar regiones de unión del ARN guía que tengan un número aceptable de emparejamientos erróneos inespecíficos.

En algunas realizaciones, los ARNGs se dirigen a regiones específicas en un gen o cerca del mismo. Por ejemplo, un ARNGs puede dirigirse a una región en la región 5' de 0-750 pb (cadena arriba) del sitio de inicio de la transcripción de un gen o cerca de la misma. En algunos casos, el direccionamiento de la región de 0 a 750 pb puede proporcionar, o proporcionar un aumento de, la activación transcripcional por un complejo ARN guía:ribonucleoproteína Cas9. Por ejemplo, una célula puede ponerse en contacto con un dominio Cas9 fusionado con un activador transcripcional o con un dominio de fusión de epítopo y un ARN guía, o biblioteca de ARN guía, dirigido a la región 5' de 0-750 pb del sitio de inicio de la transcripción de uno o más genes.

Como ejemplo adicional, un ARN guía puede dirigirse a una región en la región 3' de 0-1000 pb (cadena abajo) del sitio de inicio de la transcripción de un gen o cerca de la misma. En algunos casos, el direccionamiento de la región de 0 a 1000 pb puede proporcionar, o proporcionar un aumento de, la represión transcripcional por un complejo ARN guía:ribonucleoproteína Cas9. Por ejemplo, una célula puede ponerse en contacto con un dominio Cas9 fusionado con un represor transcripcional o con un dominio de fusión de epítipo y un ARN guía, o biblioteca de ARN guía, dirigido a la región 3' de 0-1000 pb del sitio de inicio de la transcripción de uno o más genes.

En algunas realizaciones, los ARN guía se dirigen a una región en el sitio de inicio de la transcripción (TSS, siglas del inglés *transcription start site*), o cerca del mismo, basándose en una base de datos automatizada o anotada manualmente. Por ejemplo, los transcritos anotados ensembl/GENCODE o en el canal APPRIS (Rodríguez *et al.*, Nucleic Acids Res. Enero de 2013; 41 (publicación de la base de datos): D1 10-7, se pueden usar para identificar el TSS y los elementos genéticos diana de 0-750 pb cadena arriba (por ejemplo, para dirigirse a uno o más dominios activadores transcripcionales) o de 0-1000 pb cadena abajo (por ejemplo, para dirigirse a uno o más dominios represores transcripcionales) del TSS.

En algunas realizaciones, los ARNGs se dirigen a una región genómica que se espera que carezca relativamente de nucleosomas. Las ubicaciones y ocupaciones de los nucleosomas se pueden analizar usando digestión enzimática con nucleasa microcócica (MNasa). La MNasa es una endo-exo nucleasa que digiere preferentemente ADN desprotegido y el ADN enlazadores entre nucleosomas, enriqueciendo así el ADN asociado a nucleosomas. Para determinar la organización hologenómica de los nucleosomas, el ADN que queda de la digestión con MNasa se secuencía usando tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (MNasa-seq). Por tanto, se espera que las regiones que tienen una señal alta de Mnasa-seq estén relativamente ocupadas por nucleosomas y se espera que las regiones que tienen una señal baja de Mnasa-seq estén relativamente desocupadas de nucleosomas. Por tanto, en algunas realizaciones, los ARNGs se dirigen a una región genómica que tiene una señal baja de MNasa-Seq.

En algunos casos, los ARN guía se dirigen a una región que se predice que es transcripcionalmente muy activa. Por ejemplo, los ARN guía pueden dirigirse a una región que se predice que tiene una ocupación relativamente alta para la ARN polimerasa II (PolII). Dichas regiones pueden identificarse mediante secuenciación por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq) de PolII, que incluye regiones de ADN, que se purifican por afinidad, unidas a PolII usando un anticuerpo anti PolII e identificando las regiones purificadas mediante secuenciación. Por lo tanto, se espera que las regiones que tienen una señal PolII Chip-seq alta son transcripcionalmente muy activas. Por tanto, en algunos casos, los ARN guía se dirigen a regiones que tienen una señal PolII ChIP-seq alta como se desvela en la base de datos PolII ChIP-seq publicada enCODE (Landt, *et al.*, Genome Research, septiembre de 2012; 22(9): 1813-31).

Como ejemplo adicional, los ARNGs pueden dirigirse a una región que se espera que sea transcripcionalmente muy activa según se identifica mediante secuenciación de ejecución (*run-on*) o secuenciación de ejecución global (GRO-seq, *global run-on sequencing*). La GRO-seq implica la incubación de células o de núcleos con un nucleótido marcado y un agente (por ejemplo, sarcosilo) que inhibe la unión de la nueva ARN polimerasa con sitios de inicio de la transcripción. Por tanto, solo los genes con una ARN polimerasa activada producen transcritos marcados. Después de un período de tiempo suficiente para permitir que prosiga la transcripción global, se extrae el ARN marcado y los genes transcritos correspondientes se identifican mediante secuenciación. Por lo tanto, se espera que las regiones que tengan una señal GRO-seq alta sean transcripcionalmente muy activas. Por tanto, en algunos casos, los ARN guía se dirigen a regiones que tienen una señal GRO-seq alta como se desvela en los datos de GRO-seq publicados (por ejemplo, Core *et al.*, Science. 19 de diciembre de 2008; 322 (5909): 1845-8; y Hah *et al.*, Genome Res. agosto de 2013; 23(8): 1210-23).

En algunas realizaciones, los ARN guía pueden dirigirse a supuestas secuencias reguladoras (por ejemplo, supuestas secuencias reguladoras de mamíferos o de seres humanos), tales como promotores, potenciadores, aislantes, silenciadores, reguladores de corte y empalme y similares, basándose en datos de motivos de secuencia de ADN, ChIP-seq, ATAC-seq y/o ARN-seq.

En el presente documento también se describen casetes de expresión y vectores para producir los ARN guía en una célula hospedadora. Los casetes de expresión pueden contener un promotor (por ejemplo, un promotor heterólogo) unido operativamente a un polinucleótido que codifique un ARN guía. El promotor puede ser inducible o constitutivo. El promotor puede ser específico de tejido. En algunos casos, el promotor es un promotor U6, HI o de repetición terminal larga del virus formador de foco de bazo (SFFV, del inglés *spleen focus-forming virus*). En algunos casos, el promotor es un promotor de mamífero débil en comparación con el promotor del factor de elongación humano 1 (EF1A). En algunos casos, el promotor de mamífero débil es un promotor de ubiquitina C o un promotor de fosfoglicerato quinasa 1 (PGK). En algunos casos, el promotor de mamífero débil es un promotor de TetOn en ausencia de un inductor. En algunos casos, cuando se utiliza un promotor TetOn, la célula hospedadora también se pone en contacto con un transactivador de tetraciclina. En algunas realizaciones, la fuerza del promotor de ARN guía seleccionado se selecciona para expresar una cantidad de ARN guía que es proporcional a (por ejemplo, en aproximadamente 0,5 veces, 1 vez, 2 veces, 5 veces, 7,5 veces o 10 veces) la cantidad de Cas9 que se suministra. El casete de expresión puede estar en un vector, tal como un plásmido, un vector vírico, un vector lentivírico, *etc.* En algunos casos, el casete de expresión está en una célula hospedadora. El casete de expresión de ARN guía puede

ser episómico o puede estar integrado en la célula hospedadora.

En el presente documento también se describen casetes de expresión y vectores para producir los ARN guía mediante transcripción *in vitro*.

5

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

10 Ejemplo 1:

La genotecnología con células T es muy prometedora en inmunoterapias contra el cáncer y en terapias basadas en células para el VIH y enfermedades autoinmunitarias, aunque la manipulación genética de las células T humanas primarias ha resultado ser ineficaz. Los presentes inventores han desarrollado una forma de lograr un suministro de Cas9 de alta eficiencia. Este suministro de Cas9 de alta eficiencia, se puede usar para la edición del genoma de alta eficiencia, el silenciamiento de genes y la modificación de cromatina o cromosomas. La proteína Cas9 suministrada se puede suministrar como un complejo preensamblado con los ARN guía. Estas ribonucleoproteínas (RNP) Cas9 activas permitieron realizar, de manera satisfactoria, la primera reparación dirigida por homología (HDR) mediada por Cas9, en células T humanas primarias. Por tanto, se pueden reemplazar secuencias de nucleótidos específicas en las células inmunitarias maduras con alta eficiencia, un objetivo antiguo en el campo, que permite diversas aplicaciones terapéuticas y de investigación. Estos estudios establecen la tecnología Cas9 (por ejemplo, la RNP Cas9) para diversas aplicaciones genotecnológicas experimentales y terapéuticas, incluyendo el reemplazo eficiente de secuencias de ADN con HDR, en células T humanas primarias.

25 Introducción

El sistema CRISPR/Cas9 se ha usado cada vez más para editar secuencias de la línea germinal y de líneas celulares de mamíferos (1, 2). Se están realizando intentos considerables para emplear este potente sistema directamente en tejidos humanos primarios, pero su eficiencia ha sido limitada, especialmente en células hematopoyéticas primarias, tales como las células T CD4⁺ humanas. El suministro de *cas9* y de ARN guía pequeños (ARNgs) en plásmidos fue eficiente en otros tipos de células, pero solo realizó la ablación de un porcentaje del 1-5 % de la expresión de la proteína diana en células T CD4⁺ (3). La mejora de la capacidad para la ablación de dianas clave y corregir secuencias genómicas patógenas en células T humanas tiene aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, permitiendo editar células T *ex vivo* y después reintroduciéndolas en los pacientes.

35

Se han puesto en marcha múltiples ensayos científicos y clínicos para manipular genomas de células T con las tecnologías disponibles, incluyendo delecciones de genes con nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN, por las siglas del inglés *Transcription Activator-like Effector Nucleases*) y nucleasas de dedos de zinc (ZFN), e introducción de genes exógenos por transducción vírica (4). Se ha intentado realizar manipulaciones genéticas para inactivar los correceptores del VIH, CXCR4 y CCR5, en células T para aumentar la resistencia a la infección por VIH (5-7). También ha habido un éxito notable en cuanto al diseño de células T que reconozcan y destruyan neoplasias hematológicas, pero se requieren modificaciones genéticas adicionales para la inmunoterapia de tumores de órganos sólidos (8-10). Serían posibles oportunidades terapéuticas adicionales si pudieran corregirse locus genómicos de células T diana con secuencias de reemplazo específicas, en lugar de deleccionarse (11). La tecnología consistente para promover la recombinación homóloga en las células T puede permitir la corrección terapéutica de mutaciones que afectan a funciones especializadas de las células T, incluyendo mutaciones que interrumpen el desarrollo de células T reguladoras (Treg) y provocan graves enfermedades autoinmunitarias multiorgánicas en pacientes con síndrome de inmunodesregulación, poliendocrinopatía, enteropatía, ligado al cromosoma X (IPEX, del inglés *Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked*) (12, 13).

50

Informes recientes en líneas celulares de mamíferos demuestran que las ribonucleoproteínas Cas9 (las RNP; proteína Cas9 recombinante formando complejo con un ARN guía sencillo transcrito) pueden lograr una edición del genoma específica y eficiente (14-16). En el presente documento los inventores muestran que el suministro de Cas9 (por ejemplo, en forma de las RNP Cas9) a células hematopoyéticas primarias o a células madre hematopoyéticas primarias, se puede realizar con alta eficiencia. El suministro con alta eficiencia de Cas9 en forma de un complejo de ribonucleoproteína Cas9 con ARNgS conduce a una edición genómica sumamente eficiente de células T CD4⁺. Los inventores no solo pudieron realizar la ablación de la expresión de CXCR4 con mutaciones de inserción y delección aleatorias (reduciendo hasta en un 70 % el número de células con una alta expresión de CXCR4 en la superficie celular; 18 % frente a 60 % en células tratadas con control), sino que los inventores también pudieron introducir una secuencia genómica dirigida con precisión en células T primarias mediante reparación dirigida por homología (HDR) usando un molde de ADN monocatenario exógeno (reduciendo hasta en un 98 % el número de células con alta expresión en la superficie celular; 1 % frente a 60 % en células tratadas con control). Esta tecnología de 'inserción' genética, no comunicada anteriormente, con edición mediada por Cas9 en células T primarias, tuvo una eficiencia de ~15 % y representaba aproximadamente la mitad de las ediciones genómicas observadas, lo que demostraba que podía ser útil para el reemplazo terapéutico de mutaciones asociadas a enfermedades. Además, los inventores demuestran las consecuencias funcionales de la manipulación de genes usando la tecnología de RNP Cas9 para

65

mutar *FOXP3*, que codifica el factor de transcripción maestro de células Treg. Las RNP de Cas9 permitieron desarrollar un modelo humano *in vitro* de la enfermedad autoinmunitaria multiorgánica IPEX, donde las mutaciones de *FOXP3* alteran la diferenciación de las células T reguladoras. Estos estudios establecen la tecnología de RNP Cas9 para la edición experimental y terapéutica del genoma en células T humanas primarias.

5

Resultados

El objetivo de los inventores era superar antiguas dificultades en cuanto a la manipulación genética de células T primarias y establecer un conjunto de herramientas genotecnológico consistente. Informes recientes en líneas celulares de mamíferos sugieren que las RNP Cas9 pueden lograr una edición del genoma eficiente y específica (14-17). Dadas las importantes dificultades de la edición eficiente del genoma de las células T con el suministro de ADN de Cas9, los autores de la invención probaron la eficacia del suministro de RNP para la edición dirigida del genoma en células T humanas primarias (**Figura 1A**).

10

15 Ablación del correceptor del VIH, CXCR4, con las RNP de Cas9

Un objetivo importante en cuanto al diseño de células T es la ablación dirigida de receptores específicos de la superficie celular, incluidos los correceptores de la infección por VIH y los puntos de control inmunitarios coinhibidores que alteran la respuesta inmunitaria al tumor. En el presente documento, las RNP Cas9 se programaron para dirigirse a la secuencia codificante de *CXCR4*, que codifica un receptor de quimiocinas expresado en células T CD4⁺ que actúa como un correceptor para la entrada del VIH (18, 19). Se purificó la Cas9 recombinante de *Streptococcus pyogenes* que lleva dos secuencias de señal de localización nuclear (NLS, por las siglas del inglés *nuclear localization signal*) fusionadas en el extremo C. Esta proteína Cas9 se incubó *in vitro* con ARN guía sencillo (ARNgs) transcrito diseñado para reconocer exclusivamente la secuencia genómica humana de *CXCR4* (**Figura 1B**). Estos complejos de RNP preensamblados se sometieron a electroporación en células T CD4⁺ humanas aisladas de donantes sanos (**Métodos**).

20

25

La electroporación de las RNP Cas9 *CXCR4* provocó una edición eficiente, específica de sitio de ADN genómico. Las roturas bicatenarias inducidas por la RNP Cas9 en el gen *CXCR4*, probablemente se repararon mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ), una vía de reparación de ADN predominante en las células que da lugar a inserciones y deleciones (indeles) variables y, a menudo, da lugar a mutaciones del marco de lectura (20). La citometría de flujo reveló un aumento dependiente de la dosis de RNP en el porcentaje de células T que expresan niveles bajos de *CXCR4*, en consonancia con la mutación del gen *CXCR4* (**Figura 1C**). El ensayo con la endonucleasa 1 de T7 (T7E1) es un método conveniente para evaluar la edición del genoma. En el presente documento, la T7E1 confirmó la edición de ADN genómico en células tratadas con las RNP *CXCR4*, pero no en células de control tratadas con la proteína spCas9 no en complejo con un ARNg (CTRL) (**Figura 1D**). Las células tratadas con la RNP Cas9 se separaron basándose en la expresión de *CXCR4* con clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y se descubrió un enriquecimiento de la edición en células CXCR4^{lo} (15-17 %) en comparación con células CXCR4^{hi} (4-12 %). La secuenciación de Sanger del locus genómico *CXCR4* diana, realizada para identificar directamente acontecimientos de edición, sugirió que el ensayo con T7E1 subestimaba la eficiencia de edición. La secuenciación del gen *CXCR4* en células CXCR4^{lo} mostró que 8/9 clones tenían mutaciones/deleciones, mientras que dichas mutaciones/deleciones se observaron solo en 4/10 clones y 0/9 clones en células CXCR4^{hi} tratadas con *CXCR4*^{hi} y CTRL, respectivamente. Ninguna de las ediciones observadas en la población CXCR4^{hi} terminó la secuencia codificante (una mutación de sentido equivocado y tres deleciones en marco), en consonancia con el mantenimiento de la expresión de proteínas. Por el contrario, la población de CXCR4^{lo} se enriqueció con respecto a células con una carga de mutación más grande en el locus (**Figura 1E**). Estos hallazgos demostraron un direccionamiento genómico satisfactorio con las RNP Cas9 y un efecto funcional sobre la expresión de proteínas en células T CD4⁺ humanas. La FACS pudo purificar células editadas, proporcionando una herramienta útil adicional para aplicaciones de RNP Cas9 en células T primarias.

30

35

40

45

'Inserción' genética eficiente con reparación dirigida por homología (HDR)

La HDR mediada por molde exógeno es una técnica poderosa para realizar modificaciones génicas exactas que permite la edición experimental y terapéutica de secuencias variantes específicas. Dada la alta eficiencia de edición de las RNP Cas9, a continuación se probó si se podía obtener HDR mediada por molde exógeno en células T primarias. Se usó un molde de ADN oligonucleotídico monocatenario (ssODT) con brazos de homología de 90 nucleótidos (nt) para recombinar con el locus *CXCR4* en el sitio de escisión de la RNP Cas9 (15). El ssODT se diseñó para reemplazar 12 nt del genoma de referencia humano e introducir un nuevo sitio de escisión de la enzima de restricción HindIII (**Figura 2A**). Las RNP Cas9 se sometieron a electroporación en células T CD4⁺ primarias en presencia de cuatro concentraciones diferentes de ssODT (0, 50, 100 y 200 pmol). La RNP Cas9 sin ssODT volvió a reducir el porcentaje de células CXCR4^{hi}. Perceptiblemente, la adición de ssODT mejoró significativamente la eficacia de la ablación de *CXCR4*. En el experimento mostrado en el presente documento, se pudo obtener una reducción de hasta un 98 % en el número de células con una alta expresión de *CXCR4* en la superficie celular con 100 pmol de ssODT y la RNP Cas9 (1 % frente al 60 % en las células tratadas con control) (**Figuras 2B y C**).

50

55

60

En las células tratadas con la RNP Cas9 y con el ssODT, se observó una HDR extraordinariamente eficiente (**Figura 2D**). Se observó un 24 % de edición total (definida como la suma de todos los acontecimientos NHEJ y HDR que dan lugar a indeles en el sitio de escisión de Cas9) sin el ssODT, medido con ensayos de T7E1. Se observó hasta un 33 %

65

de edición total en presencia de 50 pmol de ssODT. A esta concentración, se observó un 14 % de HDR por digestión con HindIII del locus diana, lo que indica que >40% de la edición se debió a la HDR (~ el 60 % restante de la edición observada probablemente se debió a NHEJ). Aunque el porcentaje de HDR fue ligeramente menor con 100 pmol ssODT (12 %), se calculó una mayor proporción de HDR con respecto a la edición total (0,48 con 100 pm frente a 0,42 con 50 pmol). En esta situación, la pérdida casi completa de tinción de CXCR4 demuestra que la mutación introducida por HDR (84DLLFV88→ 84ESLDP88) influyó considerablemente en la expresión de CXCR4 en la superficie celular o su reconocimiento por el anticuerpo. (**Figuras 2B y C**). En este experimento, la eficiencia de la edición se redujo con 200 pmol de ssODT.

10 Tanto la edición total como la HDR se puedenriquecer clasificando la población de CXCR4^{lo}, aunque el efecto fue menos pronunciado que el observado en la **Figura 1**, en consonancia con la fracción más grande de células CXCR4^{lo} en la población sin clasificar. Hay que tener en cuenta que en estos experimentos se aplicó una ventana más estricta para separar las células con la expresión más alta de CXCR4, y que en esta población CXCR4^{hi} no se observó edición. Estos estudios demostraron en conjunto el poder de las RNP Cas9 junto con el ssODT para reemplazar con precisión las secuencias de ADN diana en las células T humanas primarias.

Efectos funcionales de la mutación FOXP3 durante la diferenciación de Treg

20 A continuación, se probó si la edición del genoma mediada por la RNP Cas9 podría alterar el equilibrio entre los subconjuntos de células T efectoras proinflamatorias, que están asociados a la protección contra patógenos y neoplasia maligna, y células Treg FOXP3⁺ supresoras, que son esenciales para impedir el desarrollo de autoinmunidad. FOXP3 es esencial para las células Treg funcionales en ratones (21-24). Las mutaciones en el gen FOXP3 en seres humanos, conduce a un desarrollo y a una función deteriorados de células Treg causando IPEX, un síndrome de autoinmunidad multiorgánica (12, 13). La edición del genoma mediada por la RNP Cas9 proporciona una oportunidad única para introducir experimentalmente mutaciones en el gen FOXP3 humano y probar sus efectos en el desarrollo de células Treg.

30 Para probar las consecuencias funcionales de mutaciones en FOXP3, los autores de la invención se dirigieron a dos sitios exónicos con las RNP Cas9 (**Figura 3A**). Para ayudar en la interpretación de la edición en el locus FOXP3 en el cromosoma X, estos experimentos se realizaron con células de donantes masculinos. Se probó la eficacia de las RNP Cas9 en células Treg CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} que se aislaron de donantes masculinos humanos como se ha descrito anteriormente (25). La edición satisfactoria del genoma se detectó mediante el ensayo con T7E1 en células Treg tratadas con las RNP Cas9 FOXP3, pero no en las células de control transfectadas solo con proteína Cas9 (**Figura 3B**). Las RNP Cas9 FOXP3 provocaron un mayor porcentaje de células FOXP3 negativas evaluadas por tinción intracelular (**Figura 3C**). Los resultados de la citometría de flujo mostraron que hasta un 40 % de las células perdieron la expresión de FOXP3 como resultado del tratamiento con la RNP Cas9 (85 % de FOXP3⁺ en células tratadas con control frente a 63 % con la RNP1 Cas9 FOXP3, 46 % con la RNP2 Cas9 FOXP3 y 54 % con la RNP 1 y 2 Cas9 FOXP3 combinadas). La fracción de células con ablación de FOXP3 probablemente sea mayor inicialmente, ya que el tratamiento con la RNP Cas9 FOXP3 pareció provocar un defecto de proliferación en células Treg (datos no mostrados).

45 La edición con la RNP Cas9 reveló las consecuencias fenotípicas de la ablación de FOXP3 en células Treg humanas primarias. La citometría de flujo confirmó expresión alterada del receptor de citocinas en las células tratadas con la RNP Cas9 FOXP3 con mayores niveles de CD127 (IL7R α) (**Figura 3D**). FOXP3 (25) reprime directamente a CD127 de manera transcripcional, lo que sugiere que el tratamiento con la RNP Cas9 provoca una desregulación esperada por la pérdida del regulador maestro de las células Treg. Los hallazgos estaban en consonancia con la desestabilización del programa de expresión génica necesario para la función de células Treg como resultado de la ablación de FOXP3 mediada por la RNP Cas9.

50 A continuación, se intentó recapitular *in vitro* la diferenciación defectuosa de células Treg asociada a mutaciones de FOXP3 en pacientes con IPEX. Las RNP Cas9 se suministraron a células T intactas estimuladas *ex vivo*, que posteriormente se cultivaron en IL-2 y TGF- β para promover la generación de iTreg (células T reguladoras inducibles) (26-28). En las células de control tratadas solo con la proteína Cas9, se desarrolló un 30 % de células iTreg FOXP3⁺. Todos los tratamiento con RNP 1 Cas9 FOXP3, RNP 2 Cas9 FOXP3 y con RNP 1 y 2 Cas9 FOXP3, dieron lugar a porcentajes reducidos de células iTreg FOXP3⁺ (8 %, 9 % y 11 % respectivamente) (**Figura 4A**). En tres experimentos independientes (**Figura 4B**), se observaron porcentajes reducidos de células iTreg FOXP3⁺ y pequeños aumentos aunque reproducibles en la fracción de células que producen la citocina proinflamatoria interferón- γ (IFN γ).

60 Para examinar más a fondo los efectos funcionales de las mutaciones FOXP3 durante la diferenciación de las células iTreg, las células tratadas con la RNP Cas9 se sometieron a análisis FACS de CTLA-4, un receptor clave de la superficie celular implicado en la supresión de Treg (29). El tratamiento con las RNP Cas9 FOXP3 redujo el porcentaje de células que expresaban CTLA-4 (**Figura 4C**). En las células de control, CTLA-4 se indujo en las células iTreg, así como en las células T efectoras FOXP3⁻ estimuladas. Se descubrió que el direccionamiento de FOXP3 disminuía considerablemente el porcentaje de células iTreg CTLA-4⁺FOXP3⁺, pero tenía efectos moderados sobre la expresión de CTLA-4 en células FOXP3⁻, en consonancia con los mecanismos dependientes de FOXP3 e independientes de FOXP3 que contribuyen a la expresión de CTLA-4 (23, 30). La electroporación con las RNP Cas9 de corta duración

alteró el posible desarrollo de las células T con ablación de FOXP3. Esta tecnología se puede usar para detectar genes o elementos reguladores adicionales necesarios para la diferenciación de células Treg humanas. Cabe destacar que, la edición sumamente eficiente del genoma en células T mediante la estrategia con la RNP Cas9, permitió desarrollar un modelo de enfermedad IPEX *in vitro* en seres humanos lo que confirma que las mutaciones de FOXP3 alteran la diferenciación de las iTreg (células reguladoras inducidas).

Análisis

El suministro eficiente de Cas9 a células hematopoyéticas primarias y/o a células madre hematopoyéticas primarias, proporciona una plataforma poderosa para la investigación elemental de la función de células, tejidos y sistemas, así como para el desarrollo y uso de terapias basadas en células. Por ejemplo, la genotecnología mediada por Cas9 se puede usar para dirigirse experimental y terapéuticamente a elementos de ADN cruciales en subconjuntos de células T humanas inflamatorias y supresoras. En el presente documento se informa sobre genotecnología satisfactoria en células T CD4⁺ humanas, convencionales y reguladoras, mediante el suministro *in vitro* de RNP Cas9 ensambladas y funcionales. La electroporación de las RNP Cas9 permitió la 'inactivación' dirigida del receptor de superficie celular de CXCR4. Las RNP también promovieron las primeras células T humanas primarias de 'inserción' genética satisfactoria mediada por Cas9. El reemplazo de ADN dirigido sumamente eficiente en células inmunitarias maduras logra un objetivo antiguo en el campo que permite diversas aplicaciones terapéuticas y de investigación. Finalmente, también se emplearon las RNP Cas9 para dirigirse a FOXP3, un regulador transcripcional maestro, en células T intactas y en células Treg humanas estimuladas para modelar el deterioro funcional de la diferenciación de células Treg en pacientes con IPEX. Los estudios establecen colectivamente un conjunto de herramientas de amplia aplicación para la manipulación genética de células T primarias humanas.

La genotecnología con el suministro transitorio de RNP presenta notables ventajas en comparación con otros métodos de suministro de CRISPR/Cas9. Un trabajo reciente informó sobre la ablación de marcadores de superficie celular en la mayor parte de células T CD4⁺ humanas por transfección del plásmido que lleva el gen *cas9* y la secuencia codificante de ARN guía (3). Aunque satisfactoria, la eficiencia fue notablemente baja en células T CD4⁺ en comparación con otros tipos de células, posiblemente debido a niveles subóptimos de translocación nuclear subóptima de Cas9 o de ARNs o a la formación de complejo RNP intracelular subóptimo (o alguna combinación de estos factores). El suministro basado en RNP elude estas dificultades. El suministro de las RNP Cas9 ofrece una acción de edición rápida y un rápido recambio de proteínas en las células, ya que, según se informa, supuestamente se degradan 24 horas después del suministro (14). Esta ventana temporal limitada de edición de Cas9, puede hacer que las RNP Cas9 sean más seguras para aplicaciones terapéuticas que otros modos de suministro en los que las células se exponen a Cas9 durante un período de tiempo más largo. Los hallazgos actuales de los autores de la invención muestran que las RNP Cas9 pueden editar de manera rápida y eficiente células T humanas.

En este caso, se pudo obtener una HDR extraordinariamente eficiente, con una reducción del 98 % en células CXCR4^{hi} con las RNP Cas9 y un molde de HDR dirigido a CXCR4 en un experimento. Las variables restantes que influyen la edición y la eficiencia de HDR en células T primarias se pueden optimizar para lograr una eficiencia de edición del genoma aún mayor. Por ejemplo, la variación en el tipo de célula y en la dinámica del ciclo celular puede alterar significativamente la eficiencia de la RNP Cas9 (15). En las células T humanas primarias, la eficiencia de la edición también puede verse afectada por factores específicos del donante de células T (por ejemplo, aspectos genéticos, infección reciente), estado de activación de células T *in vitro* y características del locus genómico diana (por ejemplo, secuencia de ADN, estado de la cromatina).

La capacidad para editar secuencias de ADN específicas en subconjuntos de células T humanas permite la investigación experimental de factores de transcripción, elementos reguladores en cis y genes diana implicados en funciones inflamatorias y supresoras de células T. En el presente documento se demuestra, como demostración preliminar, la capacidad para inactivar FOXP3, un regulador transcripcional clave, para evaluar los efectos funcionales sobre los programas de expresión posteriores y la diferenciación celular. Estos experimentos modelan *in vitro* la diferenciación de Treg asociada al síndrome autoinmunitario multiorgánico mendeliano, IPEX. Se han realizado amplios estudios para mapear circuitos reguladores de genes clave que controlan el desarrollo y la función de subconjuntos de células T diversos y especializados (31). Recientemente los autores de la invención han informado de que la mayoría de las variantes genéticas causales, que contribuyen al riesgo de enfermedades autoinmunitarias humanas, se mapean en elementos reguladores clave en las células T (32). La edición del genoma de las células T primarias proporciona una potente prueba de perturbación para evaluar la función de los elementos reguladores y caracterizar los efectos de la variación codificante y no codificante asociada a la enfermedad.

La edición terapéutica requiere técnicas mejoradas para identificar satisfactoriamente células editadas en una población. A diferencia de las líneas celulares transformadas, la selección de células editadas es especialmente difícil en células primarias que no se pueden mantener indefinidamente en cultivo. En el presente documento se demuestra el enriquecimiento por FACS de células editadas, basándose en cambios fenotípicos esperados en la expresión del receptor de superficie celular. El éxito de la HDR mediada por la RNP Cas9 también permite la introducción de marcadores genéticos para purificar células editadas homogéneamente para determinadas aplicaciones.

El diseño terapéutico de células T requiere una edición del genoma sumamente eficiente y dirigida con precisión en

células primarias. La tecnología de suministro de Cas9 sumamente eficiente, comunicada en el presente documento, puede proporcionar, por ejemplo, edición del genoma sumamente eficiente y dirigida con precisión en células primarias. Este suministro sumamente eficiente se puede usar para corregir variantes genéticas y diseñar la función de las células T humanas para el tratamiento de infecciones, autoinmunidad y cáncer.

5

Materiales y Métodos

Aislamiento y cultivo de células T humanas

10 De acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de investigación en seres humanos (CHR, *Committee on Human Research*) de la UCSF, se extrajo sangre completa de donantes humanos en tubos vacutainer (Becton Dickinson) heparinizados con sodio y se procesó en 12 horas. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. La sangre se mezcló en una proporción de 1: 1 con solución salina equilibrada de Hank (HBSS, *Hank's balanced salt solution*) sin Ca^{2+} y

15 Mg^{2+} , se transfirió a tubos Falcon de 50 ml (30 ml de mezcla HBSS y sangre/tubo) y se cubrió con 12 ml de Ficoll-Paque PLUS (Amersham/GE healthcare). Después de la centrifugación en gradiente de densidad (1000 g, 20 min, sin interrupción), la capa de PBMC se retiró cuidadosamente y las células se lavaron dos veces con HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} . Las células T CD4^{+} se enriquecieron previamente con el kit de enriquecimiento de células T CD4^{+} humanas Easysep (Stemcell technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células T CD4^{+} previamente enriquecidas se tiñeron con los siguientes anticuerpos: αCD4 -PerCp (SK3; Becton Dickinson), αCD25 -APC (BC96; TONBO Biosciences), αCD127 -PE (R34-34; TONBO Biosciences), αCD45RA -violetFluor450 (HI100; TONBO Biosciences) y αCD45RO -FITC (UCHL1; TONBO Biosciences). Usando un FACS Aria IIIu (Becton Dickinson), se aislaron células Treg $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD127}^{\text{lo}}$, células T efectoras (Tefect) $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{\text{lo}}\text{CD127}^{\text{hi}}$ y células T intactas (Tintactas) $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{\text{lo}}\text{CD127}^{\text{hi}}\text{CD45RA}^{\text{hi}}\text{CD45RO}^{-}$. La pureza de las células Treg, Tefect y Tintactas fue > 97 %.

25

Para la transfección con la RNP Cas9, las células Treg, Tefect o Tintactas se preactivaron durante 48 horas en placas recubiertas con αCD3 (UCHT1; BD Pharmingen) y αCD28 (CD28.2; BD Pharmingen). Las placas se recubrieron con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de αCD3 y αCD28 en PBS durante al menos 2 horas a 37 °C. Para la diferenciación de iTreg, las células Tintactas clasificadas por FACS se activaron con αCD3 y αCD28 recubiertos en placa en presencia de 100 UI/ml de IL-2 (Aldesleukin, UCSF Pharmacy) y 10 ng/ml de TGF- β 1 (Tonbo Biosciences). Un experimento de diferenciación de iTreg, realizado en presencia de anticuerpos bloqueantes anti IFN γ y anti IL-4, se excluyó del análisis en la Figura 4.

30

Las células Tefect se activaron en RPMI completo (RPMI-1640 (UCSF CCF) complementado con ácido 14-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin etanosulfónico 5 mmol/l (HEPES) (UCSF CCF), glutamax 2 mmol/l (Gibco), penicilina/estreptomina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Corning), 2-mercaptoetanol 50 $\mu\text{mol}/\text{l}$ (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales 5 mmol/l (Corning), piruvato sódico 5 mmol/l (UCSF CCF) y suero bovino fetal al 10 % (Atlanta Biologicals) en una densidad celular de 5×10^5 células/ml). Después de la electroporación, el medio se complementó con 40 UI/ml de IL-2.

35

Las Treg se activaron en RPMI completo. Después de la electroporación, se añadieron al medio 300 UI/ml de IL-2 para expandir más las células. Las células Treg, Tefec o Tintactas se complementaron adicionalmente con su medio respectivo el día 1, el día 3 y el día 5 después de la electroporación. Las células Tefec y Tintactas se mantuvieron a una densidad celular de $5 \times 10^5/\text{ml}$. Las células Treg se cultivaron a una densidad celular de $2,5 \times 10^5$ células/ml.

40

Expresión y purificación de Cas9

45

La Cas9 recombinante de *S. pyogenes* usada en este estudio lleva en el extremo C una etiqueta de HA y dos péptidos de señal de localización nuclear que facilitan el transporte a través de la membrana nuclear. La proteína se expresó en células Rosetta 2 de *E. coli* (EMD Millipore) del plásmido pMJ915, con una etiqueta de hexahistidina en el extremo N y una proteína de unión a maltosa. La etiqueta de His y la proteína de unión a maltosa se escindieron con la proteasa del TEV (por las siglas en inglés de *Tobacco Etch Virus*, virus del grabado del tabaco) y la Cas9 se purificó con los protocolos descritos en Jinek *et al.*, 2012. La Cas9 se conservó en HEPES 20 mM a pH 7,5, KCl 150 mM, glicerol al 10 %, tris(2-cloroetil) fosfato (TCEP) 1 mM a -80 °C.

50

Transcripción *in vitro* con T7 de ARNGs

55

El molde de ADN que codifica un promotor de T7, una secuencia diana de 20 nt y el armazón de ARNGs quimérico se ensambló a partir de oligonucleótidos sintéticos mediante PCR solapante. Resumiendo, para el molde de ARNGs de CXCR4, la reacción de PCR contiene una premezcla de 20 nM de SLKS3 (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA GCG TGA CAA AGA GGG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AAG G -3') y SLKS 1 (5'- GCA CCG ACT CGG TGC CAC TTT TTC AAG TTG ATA ACG GAC TAG CCT TAT TTT AAC TTG CTA TGC TGT TTC CAG C -3'), una premezcla de T25 1 μM (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3') and SLKS1 (5'- GCA CCG ACT CGG TGC CAC TTT TTC AAG -3'), dNTP 200 μM y polimerasa de fusión (NEB) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ajuste del termociclador consistió en 30 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 57 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 10 segundos. El producto de la PCR se extrajo una vez con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y después una vez con cloroformo, antes de la precipitación con isopropanol durante una noche a -20 °C. El sedimento de ADN se lavó tres veces con etanol al 70 %, se secó al vacío y se disolvió en agua tratada con DEPC. El molde de

65

ARNgs FOXP3 se ensambló a partir de T25, SLKS1, SLKS2 y SLKS4 (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGG AGC CTC GCC CAG CTG GAG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AAG G -3') con el mismo procedimiento.

5 Una reacción de transcripción *in vitro* de T7 de 100 µl consistía en Tris-HCl 30 mM (pH 8), MgCl₂ 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %, espermidina 2 mM, ditiotretitol reciente 10 mM, 5 mM de cada trifosfato de ribonucleótido, Pol T7 100 µg/ml y molde de ADN 0,1 µM. La reacción se incubó a 37 ° durante 4 h, y se añadieron 5 unidades de ADNsa I sin ARNsa (Promega) para digerir el molde de ADN a 37 °C durante 1 h. La reacción se desactivó con solución 2xSTOP (formamida desionizada al 95 %, azul de bromofenol al 0,05 % y EDTA 20 mM) a 60 °C durante 5 min. El ARN se purificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % que contenía urea 6 M. La banda de ARN se escindió del gel, se trituró en un tubo de 15 ml y se eluyó con 5 volúmenes de acetato de sodio 300 mM (pH 5) durante la noche a 4 °C. Se añadió un equivalente de isopropanol para precipitar el ARN a -20 °C. El sedimento de ARN se recogió por centrifugación, se lavó tres veces con etanol al 70 % y se secó al vacío. Para replegar el ARNgs, el sedimento de ARN se disolvió primero en HEPES 20 mM (pH 7,5), KCl 150 mM, glicerol al 10 % y TCEP 1 mM. El ARNgs se calentó a 70 °C durante 5 min y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió MgCl₂ a una concentración final de 1 mM. El ARNgs se calentó de nuevo a 50 °C durante 5 min, se enfrió a temperatura ambiente y se mantuvo en hielo. La concentración de ARNgs se determinó mediante DO_{260 nm} usando Nanodrop y se ajustó a 100 µM usando HEPES 20 mM (pH 7,5), KCl 150 mM, glicerol al 10 %, TCEP 1 mM y MgCl₂ 1 mM. El ARNgs se conservó a -80 °C.

20 Ensamblaje y electroporación de la RNP Cas9

La RNP Cas9 se preparó inmediatamente antes de los experimentos incubando Cas9 20 µM con ARNgs 20 µM a una proporción de 1: 1 en HEPES 20 µM (pH 7,5), KCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, glicerol al 10 % y TCEP 1 mM a 37 °C durante 10 min a una concentración final de 10 µM.

25 Las células T se sometieron a electroporación con un kit y dispositivo de transfección Neon (Invitrogen). Antes de la suspensión en 9 µl de tampón T (kit Neon, Invitrogen), 2 - 2,5 x10⁵ células T se lavaron tres veces con PBS. A la suspensión celular se añadieron la RNP Cas9 (1 - 2 µl de Cas9 10 µM solamente (CTRL) o la RNP Cas9:ARNgs; concentración final 0,9 - 1,8 µM) así como molde de HDR (0 - 200 pmol), se mezcló y se transfirió en las células con un dispositivo de electroporación Neon (Invitrogen; 1600 V, 10 mseg, 3 pulsos). El molde de HDR es un oligonucleótido monocatenario complementario (cadena -) a la secuencia diana y contiene una secuencia de restricción HindIII flanqueada por brazos de homología de 90 nt (secuencia: 5'- GGG CAA TGG ATT GGT CAT CCT GGT CAT GGG TTA CCA GAA GAA ACT GAG AAG CAT GAC GGA CAA GTA CAG GCT GCA CCT GTC AGT GGC CGA AAG CTT GGA TCC CAT CAC GCT TCC CTT CTG GGC AGT TGA TGC CGT GGC AAA CTG GTA CTT TGG GAA CTT CCT 35 ATG CAA GGC AGT CCA TGT CAT CTA CAC AGT-3').

Las células Treg, Tefec o Tintactas sometidas a electroporación, se transfirieron a 500 µl de su medio de cultivo respectivo en una placa de 48 pocillos recubierta con αCD3/CD28. Veinticuatro (24) horas después de la electroporación, las células se resuspendieron y se transfirieron a una placa de pocillos no recubierta. 4-6 días después de la electroporación, las células T se analizaron mediante FACS y ensayo con endonucleasa I de T7.

Amplificación por PCR de la región diana

45 En 100 µl de solución de extracción rápida (Epicenter) se resuspendieron 5x10⁴ - 2x10⁵ células y se añadieron para causar la lisis de las células y extraer el ADN genómico. El lisado celular se incubó a 65 °C durante 20 min y después a 95 °C durante 20 min, y se conservó a -20 °C. La concentración de ADN genómico se determinó con NanoDrop (Thermo Scientific).

50 Las regiones genómicas, que contenían los sitios diana de la diana CXCR4, la diana 1 de FOXP3 o la diana 2 de FOXP3, se amplificaron por PCR usando los siguientes conjuntos de cebadores. Para CXCR4: directo 5'- AGA GGA GTT AGC CAA GAT GTG ACT TTG AAA CC -3' e inverso 5'- GGA CAG GAT GAC AAT ACC AGG CAG GAT AAG GCC -3' (938 pb). Para la diana 1 de FOXP3: directo 5'- TTC AAA TAC TCT GCA CTG CAA GCC C-3' e inverso 5'- CAT GTA CCT GTG TTC TTG GTG TGT GT-3' (900 pb) For la diana 2 de FOXP3: directo 5'- GCT GAC ATT TTG ACT AGC TTT GTA AAG CTC TGT GG-3' e inverso reverse 5'- TCT CCC CGA CCT CCC AAT CCC-3' (900 pb). Los cebadores de CXCR4 se diseñaron para evitar la amplificación de los moldes de HDR mediante emparejamiento fuera de los brazos de homología. La reacción de PCR contenía 200 ng de ADN genómico y Kapa polimerasa de alta fidelidad de arranque en caliente (Kapa Biosystems) en tampón con alto contenido en GC de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ajuste del termociclador consistió en un ciclo de 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 98 °C durante 20 segundos, 62 °C (diana 2 de CXCR4 y FOXP3) o 60 °C (diana 1 de FOXP3) durante 15 segundos y 72 °C durante 1 min, y un ciclo de 72 °C durante 1 min. Los productos de la PCR se purificaron en un gel de agarosa al 2 % que contenía SYBR Safe (Life Technologies). Los productos de la PCR se eluyeron del gel de agarosa usando el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen). La concentración de ADN de la PCR se cuantificó con un dispositivo NanoDrop (Thermo Scientific). Se usaron 200 ng de ADN de la PCR para los análisis con la endonucleasa I de T7 y HindIII.

65 Análisis de la eficacia de la edición mediante el ensayo con la endonucleasa I de T7

La eficiencia de la edición se determinó mediante el ensayo con la endonucleasa I de T7. La endonucleasa I de T7 reconoce y escinde ADN heterodúplex con emparejamiento erróneo que surge de la hibridación de cadenas de ADN de tipo silvestre y mutante. La reacción de hibridación contenía 200 ng de ADN de la PCR en tampón KAPA con alto contenido en GC y KCl 50 mM, y se realizó en un termociclador con la siguiente configuración: 95 °C, 10 min, 95-85 °C a -2 °C/s, 85 °C durante 1 min, 85-75 °C a -2 °C/s, 75 °C durante 1 min, 75-65 °C a -2 °C/s, 65 °C durante 1 min, 65-55 °C a -2 °C/s, 55 °C durante 1 min, 55-45 °C a -2 °C/s, 45 °C durante 1 min, 45-35 °C a -2 °C/s, 35 °C durante 1 min, 35-25 °C a -2 °C/s, 25 °C durante 1 min y se mantuvo a 4 °C. Se añadieron tampón 2 y 5 unidades de endonucleasa I de T7 (NEB) para digerir el ADN re-emparejado. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, la reacción se desactivó con colorante de carga de gel azul 6x (Thermo Scientific) a 70 °C durante 10 min. El producto se resolvió en gel de agarosa al 2 % que contenía SYBR Gold (Life Technologies). La intensidad de la banda de ADN se cuantificó usando Image Lab. El porcentaje de edición se calculó usando la siguiente ecuación $(1 - (1 - (b + c / a + b + c))^{1/2}) \times 100$, en donde "a" es la intensidad de la banda del sustrato de ADN y "b" y "c" son los productos de escisión.

15 **Análisis de HDR por digestión con la enzima de restricción HindIII**

El molde de CXCR4 HDR introduce un sitio de restricción HindIII en el locus del gen. Se amplificó una región de 938 pb por PCR usando los cebadores 5'- AGA GGA GTT AGC CAA GAT GTG ACT TTG AAA CC -3' and 5'- GGA CAG GAT GAC AAT ACC AGG CAG GAT AAG GCC -3'. La reacción consistió en 200 ng de ADN de PCR y en 10 unidades de HindIII High Fidelity en tampón CutSmart (NEB). Después de 2 horas de incubación a 37 °C, la reacción se desactivó con un volumen de colorante de carga de gel a 70 °C durante 10 min. El producto se resolvió en gel de agarosa al 2 % que contenía SYBR Gold (Life Technologies). La intensidad de la banda se cuantificó usando Image Lab. El porcentaje de HDR se calculó usando la siguiente ecuación $(b + c / a + b + c) \times 100$, en donde "a" es la intensidad de la banda del sustrato de ADN y "b" y "c" son los productos de escisión.

25 **Análisis FACS de células T editadas**

La tinción de CXCR4 en la superficie celular se realizó con α CXCR4-APC (12G5; BD Pharmingen) durante 15 min en hielo. Las células se mantuvieron a 4 °C durante todo el procedimiento de tinción hasta la clasificación celular para evitar la internalización y degradación del anticuerpo mediadas por el anticuerpo. Las células se clasificaron usando un FACS Aria IIIu (Becton Dickinson).

Para el análisis de las células Treg e iTreg editadas con la RNP Cas9 se usaron los siguientes anticuerpos: α CD-PacificBlue (RPA-T4; BD Pharmingen), α FOXP3-AlexaFluor488 (206D; Biolegend), α CD25-APC (BC96; TONBO Biosciences), α CD127-PECy7 (HIL-7R-M21; BD Pharmingen), α IL-17a-PerCp-Cy5.5 (N49-653; BD Pharmingen), α IL-10-PE (JES3-9D7; BD Pharmingen), α IFN γ -AlexaFluor700 (B27; Biolegend), α CTLA-4-PE (L3D10; Biolegend).

Las células se estimularon durante 2 horas con PMA 100 ng/ml (Sigma-Aldrich) y con ionomicina 1 μ g/ml (Sigma-Aldrich). Se añadió monensina 1 μ M (Biolegend) durante 3 horas de estimulación celular adicional. Las células se tiñeron con respecto a marcadores de superficie durante 20 min a TA (temperatura ambiente) seguido de 30 min de incubación con FOXP3/Factor de Transcripción Fix/Perm (TONBO Biosciences). Para aumentar la señal de FOXP3, las Treg se incubaron con 100 U/ml de ADNsA I (Sigma-Aldrich) en tampón Perm de citometría de flujo (TONBO Biosciences). Las iTreg no se trataron con ADNsA I debido a la clasificación celular posterior y al análisis con T7EI. La tinción intracelular de citocina y de factor de transcripción, se llevó a cabo durante 30 min a TA. Las Treg se adquirieron con un LSRFortessaDual (Becton Dickinson), las iTreg se adquirieron y se clasificaron usando un FACS Aria IIIu (Becton Dickinson).

Datos estadísticos

Las cantidades de células secretoras de FOXP3⁺ y de IFN γ después del tratamiento con la RNP Cas9 FOXP3 en tres experimentos de diferenciación de iTreg, se compararon con las cantidades después del tratamiento de control usando una prueba de la *t*. Las desviaciones estándar se calcularon y se muestran como barras de error. Los resultados del análisis se muestran en la **Figura 4B**.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones que se describen el presente documento tienen únicamente fines ilustrativos.

Bibliografía

1. Doudna JA y Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346(6213): 1258096.
2. Hsu PD, Lander ES, y Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157(6):1262-1278.
3. Mandal PK, *et al.* (2014) Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 15(5):643-652.

4. Maus MV, *et al.* (2014) Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annual Review of Immunology* 32:189-225.
5. Tebas P, *et al.* (2014) Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *The New England Journal of Medicine* 370(10):901-910.
6. Didigu CA, *et al.* (2014) Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors *ccr5* and *cxcr4* protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood* 123(1):61-69.
7. Hutter G, *et al.* (2009) Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stemcell transplantation. *The New England Journal of Medicine* 360(7):692-698.
8. Restifo NP, Dudley ME, y Rosenberg SA (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews. Immunology* 12(4):269-281.
9. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, y June CH (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 365(8):725-733.
10. Moon EK, *et al.* (2014) Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20(16):4262-4273.
11. Genovese P, *et al.* (2014) Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature* 510(7504):235-240.
12. Bennett CL, *et al.* (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics* 27(1):20-21.
13. Wildin RS, *et al.* (2001) X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature Genetics* 27(1):18-20.
14. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, y Kim JS (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research* 24(6):1012-1019.
15. Lin S, Staahl B, Alla RK, y Doudna JA (2014) Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife* 3.
16. Zuris JA, *et al.* (2014) Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nature Biotechnology*.
17. Sung YH, *et al.* (2014) Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. *Genome Research* 24(1):125-131.
18. Berson JF, *et al.* (1996) A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *Journal of Virology* 70(9):6288-6295.
19. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, y Berger EA (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272(5263):872-877.
20. Symington LS y Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics* 45:247-271.
21. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, y Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature Immunology* 4(4):337-342.
22. Fontenot JD, Gavin MA, y Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology* 4(4):330-336.
23. Hori S, Nomura T, y Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609):1057-1061.
24. Brunkow ME, *et al.* (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics* 27(1):68-73.
25. Liu W, *et al.* (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+

T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine* 203(7):1701-1711.

26. Chen W, *et al.* (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine* 198(12):1875-1886.

27. Fantini MC, *et al.* (2004) Vanguardia: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *Journal of Immunology* 172(9):5149-5153.

28. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, y Horwitz DA (2002) Generation *ex vivo* of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25-precursors. *Journal of Immunology* 169(8):4183-4189.

29. Wing K, *et al.* (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322(5899):271-275.

30. Wu Y, *et al.* (2006) FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126(2):375-387.

31. Vahedi G, *et al.* (2013) Helper T-cell identity and evolution of differential transcriptomes and epigenomes. *Immunological Reviews* 252(1):24-40.

32. Farh KK, *et al.* (2014) Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*.

Ejemplo 2:

Se diseñaron ARNGs dirigidos al exón 1 de PD-1 (PD-1 diana 1, dirigida por ARNGs1 y PD-1 diana 2, dirigida por ARNGs2) y al exón 2 (PD-1 diana 3, dirigida por ARNGs3 y PD-1 diana 3, dirigida por ARNGs4) (**Figura 5A**). También se generaron oligonucleótidos HDR para proporcionar reparación dirigida por molde de roturas bicatenarias inducidas en los sitios diana de ARNGs (**Figura 5A**). Se generaron los ARNGs1-4 que contenían las RNA Cas9 y se suministraron a células T efectoras humanas primarias (CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}), y las células se recuperaron. El análisis de las células después de la recuperación por FACS, reveló una ablación de alta eficacia de PD-1 usando múltiples RNP Cas9 y combinaciones de las mismas. Los efectos funcionales de varias combinaciones de las RNP Cas9 que se dirigen a la secuencia codificante de PD-1 con dos moldes de HDR diferentes, se evaluaron mediante análisis FACS de la expresión de la superficie celular de PD-1. Se observó ablación con múltiples combinaciones de las RNP Cas9 con cada uno de los dos moldes de HDR (diseñados para delecionar una parte de la secuencia codificante e introducir codones de terminación prematuros y un nuevo sitio de digestión de la enzima de restricción HindIII).

También se editaron células T CD4⁺ y CD8⁺ que expresaban el receptor de antígeno quimérico (CAR). Las células T se editaron con las RNP Cas9 de PD-1 (PD-1 ARNGs 2) como se ha descrito anteriormente. Después de la nucleofección con las RNP Cas9 de PD-1 se realizó la transducción con el lentivirus CAR-GFP. La expresión de CAR-GFP y los niveles de expresión de superficie de PD-1 se evaluaron mediante FACS. Se pudieron generar células T Pd-1-/low CAR⁺.

Ejemplo 3:

Se proporcionó una mezcla de reacción que contenía la RNP Cas9, dextrano marcado con FITC, dextrano marcado con azul Pacífico (PB) y células T CD4⁺ no estimuladas y se comprimió a través de un dispositivo de compresión de células de la compañía SQZ (SQZ Biotech). Las células se clasificaron mediante FACS en una población de células doblemente marcadas (con FITC y PB) y células no marcadas. Las dos poblaciones de células se analizaron con respecto a la edición del genoma mediada por Cas9 usando un análisis con endonucleasa 1 de T7 (T7E1). Las células se clasificaron basándose en la captación de dextrano marcado con Azul Pacífico (PB) (3000 PM) y dextrano marcado con FITC (500 000 PM) y el ensayo con la endonucleasa 1 de T7 confirmó el enriquecimiento de la edición en las células que habían captado ambos dextranos. (**Figura 6**).

Ejemplo 4:

Introducción

Este ejemplo proporciona detalles adicionales de los experimentos realizados en el Ejemplo 1, así como métodos y resultados experimentales relacionados adicionales. Este investigador demuestra la capacidad de los métodos y de las composiciones que se describen el presente documento para la ablación un gen diana con las mutaciones de inserción y delección aleatorias que probablemente resulten de la reparación de unión de extremos no homólogos (NHEJ) de una rotura bicatenaria (DSB, el inglés *double-stranded break*) de ADN inducida por Cas9. Las células con ediciones genómicas en CXCR4 podrían enriquecerse por clasificación basándose en la expresión baja de CXCR4. Este ejemplo demuestra además la capacidad para usar métodos y las composiciones que se describen el presente documento para introducir reemplazos de nucleótidos dirigidos con precisión en células T primarias en CXCR4 y PD-1 mediante reparación dirigida por homología (HDR) usando las RNP Cas9 y moldes de ADN monocatenario exógeno. Esta tecnología permitió la generación, mediada por Cas9, de células T humanas primarias de 'inserción'. La

secuenciación profunda de un sitio diana confirmó que las RNP Cas9 promovían modificaciones genómicas de "inserción" con una eficiencia de hasta ~20 % (se obtuvo un porcentaje de ~22 % y de ~18 % con 50 pmol y 100 pmol de molde de HDR, respectivamente), lo que representó hasta aproximadamente un tercio del total de acontecimientos de edición. Estos hallazgos muestran que el reemplazo de nucleótidos, mediado por la RNP Cas9, puede resultar útil para la corrección terapéutica de mutaciones asociadas a enfermedades. Esto establece la utilidad de la tecnología con la RNP Cas9 para la edición experimental y terapéutica mediante inactivación (*knock-out*) e inserción (*knock-in*) del genoma en células T humanas primarias.

Resultados

Los métodos y las composiciones que se describen en el presente documento superan antiguas dificultades en la manipulación genética de células T primarias y establecen un conjunto de herramientas genotecnológico eficiente. Informes recientes en líneas celulares de mamíferos sugieren que las RNP Cas9 pueden lograr una edición del genoma eficiente y específica (15-18). Los experimentos descritos en el presente documento demuestran la eficacia del suministro de la RNP Cas9 para la edición dirigida del genoma en células T humanas primarias (Figura 7A).

Ablación del correceptor del VIH, CXCR4, con las RNP Cas9. Un objetivo importante en cuanto al diseño de células T es la ablación dirigida de receptores específicos de la superficie celular, incluidos los correceptores de la infección por VIH y los puntos de control inmunitarios coinhibidores que alteran la respuesta inmunitaria al tumor. Este ejemplo demuestra el uso de las RNP Cas9 programadas para dirigirse a la secuencia exónica de *CXCR4*, que codifica un receptor de quimiocina con múltiples funciones en la hematopoyesis y en el asentamiento celular que se expresa en células T CD4⁺ y que actúa como un correceptor para la entrada del VIH (19-21). Se utilizó la Cas9 recombinante de *Streptococcus pyogenes* purificada que llevaba dos secuencias de señal de localización nuclear (NLS) fusionadas en el extremo C. Esta proteína Cas9 se incubó *in vitro* con ARN guía sencillo (ARNgs) transcrito diseñado para reconocer exclusivamente la secuencia genómica humana de *CXCR4* (Figura 7B). Estos complejos de RNP Cas9 preensamblados se sometieron a electroporación en células T CD4⁺ humanas aisladas de donantes sanos.

La electroporación de las RNP Cas9 CXCR4 provocó una edición eficiente, específica de sitio de ADN genómico. Las DSB inducidas por la RNP Cas9 en el gen *CXCR4* probablemente se repararon por NHEJ, una vía de reparación de ADN predominante en las células que da lugar a inserciones y deleciones (indeles) variables y, a menudo, da lugar a mutaciones del marco de lectura y a la pérdida de función genética (22). La citometría de flujo reveló un aumento dependiente de la dosis de la RNP Cas9 en el porcentaje de células T que expresaban niveles bajos de CXCR4, en consonancia con la mutación del gen *CXCR4* (Figura 7C). El ensayo con la endonucleasa I de T7 (T7E1) es un método conveniente para evaluar la edición en sitios específicos del genoma. En el presente documento, el ensayo con T7E1 confirmó la edición de ADN genómico en el locus *CXCR4* en células tratadas con las RNP Cas9 CXCR4, pero no en las células de control tratadas solo con la proteína Cas9 (sin ARNgs; CTRL). Las células tratadas con la RNP Cas9, se separaron con clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, siglas del inglés *fluorescence activated cell sorting*) basándose en la expresión de CXCR4. Usando el ensayo con T7E1, se descubrió un enriquecimiento de edición en las células CXCR4^{lo} (15-17 %) en comparación con las células CXCR4^{hi} (4-12 % con dosis variables de la RNP Cas9) (Figura 7D). La secuenciación de Sanger del sitio genómico *CXCR4* diana, realizada para identificar directamente acontecimientos de edición, sugirió que el ensayo con T7E1 podía haber subestimado la eficiencia de edición. El ensayo con T7E1 utiliza la desnaturalización y la hibridación de las secuencias de tipo silvestre y mutante para crear un ADN bicatenario (dúplex) con emparejamiento erróneo que después digiere la endonucleasa T7. Sin embargo, la hibridación del dúplex con emparejamiento erróneo puede ser ineficaz, especialmente cuando la mutación indel es drásticamente diferente de la secuencia de tipo silvestre, lo que hace que la autohibridación sea un producto energéticamente más favorable. Otras posibles razones de la subestimación observada de la eficiencia de edición con ensayos de endonucleasas incluyen fusión incompleta del dúplex, escisión ineficaz de indeles de un solo par de bases, y desviación de los productos esperados de 300 y 600 pares de bases en el gel de agarosa como resultado de grandes ediciones del genoma (23). La secuenciación del gen *CXCR4* en células CXCR4^{lo} mostró que 5/6 clones tenían mutaciones/deleciones, mientras que dichas mutaciones/deleciones se observaron solo en 4/10 clones y en 0/9 clones en células CXCR4^{hi} y en células CXCR4^{lo} tratadas con CTRL, respectivamente. Cabe destacar que, ninguna de las ediciones observadas en la población CXCR4^{hi} terminó la secuencia codificante (una mutación de sentido equivocado y tres deleciones en marco), en consonancia con el mantenimiento de la expresión de proteínas. Por el contrario, la población CXCR4^{lo} se enriqueció con respecto a células con una carga mutacional más grande en el locus (Figura 7E). Estos hallazgos demostraron un direccionamiento genómico satisfactorio con las RNP Cas9 y un efecto funcional sobre la expresión de proteínas en células T CD4⁺ humanas. A través de FACS se pudo enriquecer la población de células editadas, proporcionando una herramienta útil adicional para aplicaciones de RNP Cas9 en células T primarias.

'Inserción' genética eficiente con reparación dirigida por homología (HDR). La HDR mediada por molde exógeno es una técnica poderosa para realizar modificaciones exactas de genes que puede permitir la edición experimental y terapéutica de secuencias variantes específicas. Dada la alta eficiencia de edición de las RNP Cas9, a continuación se probó si se podía lograr la HDR mediada por molde exógeno en células T primarias. Se usó un molde de ADN oligonucleotídico monocatenario (molde de HDR) con brazos de homología de 90 nucleótidos para recombinar con el locus *CXCR4* en el sitio de escisión de la RNP Cas9 (16). El molde CXCR4 HDR se diseñó para reemplazar 12 nucleótidos del genoma de referencia humano, incluyendo la secuencia del motivo adyacente al protoespaciador (PAM, *protospacer adjacent motif*) necesaria para la escisión del ADN mediada por CRISPR, e introducir un sitio de

escisión de la enzima de restricción HindIII (Figura 8A). Las RNP Cas9 se sometieron a electroporación en células T CD4⁺ primarias en presencia de cuatro concentraciones diferentes de molde CXCR4 HDR (0, 50, 100 y 200 pmol; véase Materiales y Métodos, información complementaria). La RNP Cas9 sin molde de HDR volvió a reducir el porcentaje de células CXCR4^{hi}. Perceptiblemente, en este experimento, la adición del molde de CXCR4 HDR mejoró la eficacia de la ablación de CXCR4, aunque este efecto sobre la expresión de la superficie celular no se observó en todos los experimentos (Figura 9A). En el experimento mostrado en el presente documento, ~60 % de las células perdieron expresión de CXCR4 a alto nivel en la superficie celular con 100 pmol de molde de HDR y RNP Cas9 (1 % frente a 60 % en células tratadas con control) (Figuras 8B y C).

Se observó HDR sumamente eficiente en células tratadas con la RNP Cas9 y con el molde de HDR oligonucleotídico monocatenario (Figura 8D). Se observó hasta un 33 % de edición total (definida como la suma de todos los acontecimientos NHEJ y HDR que dan lugar a indels en el sitio de escisión de Cas9) en presencia de 50 pmol de molde CXCR4 HDR, según lo estimado mediante los ensayos con T7E1. A esta concentración, se estimó una HDR de 14 % por digestión con HindIII del locus diana, lo que indicaba que una fracción elevada de la edición se debió a la HDR (véanse los resultados a continuación para una cuantificación adicional). La pérdida casi completa de tinción de CXCR4 con la adición del molde de HDR sugiere que la mutación introducida por HDR (84DLLFV88→84ESLDP88) influyó considerablemente en la expresión de CXCR4 en la superficie celular o en su reconocimiento por el anticuerpo (Figuras 8B y C). La eficiencia de edición se redujo con 200 pmol de molde de HDR, quizás como resultado de la toxicidad celular.

Tanto la edición total como la HDR se pueden mejorar clasificando la población de CXCR4^{lo}, aunque el efecto fue menos pronunciado que el observado en la Figura 7, en consonancia con la fracción más grande de células CXCR4^{lo} en la población sin clasificar. Hay que tener en cuenta que en estos experimentos se aplicó una ventana más estricta para separar las células con la expresión más alta de CXCR4, y que en esta población CXCR4^{hi} no se observó edición. En conjunto, estos estudios demostraron el poder de las RNP Cas9 acopladas con el molde de HDR oligonucleotídico monocatenario para reemplazar con precisión las secuencias de ADN diana en las células T humanas primarias.

Secuenciación profunda de ADN genómico diana. La secuenciación profunda de locus *CXCR4* diana permitió realizar un análisis más detallado y cuantitativo de los acontecimientos de edición del genoma. Los resultados resaltados en la Figura 10 muestran la frecuencia de las inserciones, deleciones y el reemplazo de nucleótidos mediado por HDR en células tratadas con la RNP Cas9 CXCR4 con o sin molde de CXCR4 HDR en comparación con células tratadas con control. En las células tratadas con la RNP Cas9 CXCR4, se descubrió que el 55 % de las lecturas se solapaban en el sitio *CXCR4* diana que contiene al menos un indel dentro de una ventana de 200 nucleótidos centrada alrededor del sitio de corte esperado (Figuras 10A, B). Como se ha indicado anteriormente, los ensayos con T7E1 son útiles para identificar locus editados, pero puede subestimar la eficiencia de edición real (la cuantificación del ensayo con T7E1 en la Figura 8D sugirió una edición del 33 % en comparación con la eficiencia de edición del 55 % calculada por secuenciación profunda). También se secuenciaron los dos sitios 'inespecíficos' predichos superiores para la RNP Cas9 CXCR4 (Figura 10B). Se observaron indels poco frecuentes en ambos sitios inespecíficos (~1-2 %), pero a una tasa comparable a la observada en esos sitios en las células de control tratadas solo con la proteína Cas9 (~1-2 %).

Los resultados de la secuenciación profunda permitieron realizar un análisis cuantitativo de las mutaciones indel observadas y su distribución espacial en la región diana. En consonancia con los informes de que la Cas9 de *S. pyogenes* corta -3 nucleótidos cadena arriba de la secuencia de PAM, se descubrió la frecuencia más alta de indels a 4 nucleótidos cadena arriba del PAM (Figura 10A). Los indels se distribuyeron por toda la región secuenciada (Figura 10C y D) con la mayor parte de los acontecimientos cerca de los sitios de corte (>94 % dentro de 40 nucleótidos). En las células tratadas con la RNP Cas9 CXCR4 dentro de +/-100 nucleótidos desde el sitio de corte, se observó que el 95 % de las lecturas con indels contenían un acontecimiento de deleción, mientras que el 10 % contenía un acontecimiento de inserción. Curiosamente, de las lecturas con acontecimientos de inserción, un -50 % también contenía al menos una deleción. Se observó una amplia serie de tamaños de inserción y deleción, mostrando muchas lecturas deleciones de hasta -80 nucleótidos de longitud (media de 18 nucleótidos, DT de 15 nucleótidos) y algunas inserciones de hasta -55 nucleótidos de longitud (media de 4,4 nucleótidos, DT de 4,8 nucleótidos) (Figuras 10C, D y 11). Este intervalo de tamaños y ubicaciones de indel estaba en consonancia con carga mutacional grande observada en la Figura 7 en la secuenciación de Sanger de células CXCR4^{lo} seleccionadas.

La secuenciación profunda verificó el reemplazo dirigido satisfactorio de 12 nucleótidos en el locus *CXCR4*, solo en células tratadas tanto con las RNP Cas9 como con el molde CXCR4 HDR. Se observó una incorporación del 25 % de la secuencia molde de HDR con 50 pmol de molde de HDR y del 21 % con 100 pmol de molde de HDR (Figura 10A). De las lecturas con la secuencia molde de HDR incorporada, -14 % de las lecturas de molde de HDR detectadas tenían indels no específicos adicionales alrededor del sitio HindIII incorporado u otras formas imperfectas de edición dentro de la ventana de 200 nucleótidos centrada en el sitio de corte predicho. Sin embargo, la frecuencia de indels en las lecturas con el sitio HindIII incorporado se redujo en comparación con las lecturas en las que no se detectó el sitio HindIII (Figuras 10C, D y 11). Curiosamente, hubo un patrón constante de acontecimientos de deleción entre la RNP Cas9 CXCR4 con y sin molde CXCR4 HDR con un enriquecimiento de deleciones de 2 nucleótidos (11 %) y 22 nucleótidos (5,4 %) (Figura 11). El reemplazo de la secuencia de PAM probablemente ayudó a limitar el recorte de la secuencia de 'inserción'. En general, el 18-22 % de las lecturas (con concentraciones variables de molde de HDR)

habían reemplazado correctamente los nucleótidos a lo largo del sitio genómico diana secuenciado, lo que sugiere que esta estrategia podría ser útil para la generación de células T humanas primarias experimentales y terapéuticas de 'inserción' de nucleótidos.

5 **Direccionamiento de 'inserción' específico de receptores clave de la superficie celular.** Para confirmar que las RNP Cas9 median en la HDR en otros sitios genómicos, se diseñó un ARN guía y un molde de HDR para dirigirse al locus *PD-1* (*PDCD1*). PD-1 es un receptor de superficie celular de "punto de control inmunitario" que se encuentra en la superficie de células T crónicamente activadas o exhaustas que puede inhibir la eliminación eficaz de cánceres mediada por células T. El bloqueo de PD-1 con anticuerpos monoclonales está aprobado para el tratamiento de neoplasia maligna avanzada y la delección genética de *PD-1* puede resultar útil en el diseño de células T para inmunoterapias contra el cáncer basadas en células (12). Las células T humanas primarias se sometieron a electroporación con una RNP Cas9 PD-1 y un molde de PD-1 HDR diseñado para generar una mutación del marco de lectura e 'insertar' un sitio de restricción HindIII en el primer exón de *PD-1* reemplazando así la secuencia de PAM (Figura 12A).

15 Para examinar la especificidad del direccionamiento mediado por la RNP Cas9, se comparó la expresión de PD-1 en la superficie celular después del tratamiento con la RNP Cas9 PD-1 frente a la RNP Cas9 CXCR4 (que no debería dirigirse al locus *PD-1*) o con la RNP Cas9 guía desordenada (sin corte previsto dentro del genoma humano). Se realizaron experimentos duplicados por pares con dos donantes de sangre diferentes y con ARNGs generados con dos protocolos de transcripción diferentes *in vitro* (véase Materiales y Métodos, información complementaria). Las RNP Cas9 de PD-1 sometidas a electroporación con molde de PD-1 HDR, redujeron significativamente el porcentaje de células con una alta expresión de superficie celular de PD-1 en relación con las RNP Cas9 de CXCR4 y las RNP Cas9 guía suministradas con el molde de PD-1 HDR (Figura 12B). De manera similar, las RNP Cas9 CXCR4 y el molde de CXCR4 HDR, provocaron una disminución en la población de células CXCR4^{hi} en relación con los tratamientos con PD-1 y con la RNP Cas9 guía desordenada con el molde de CXCR4 HDR (Figura 12C). La pérdida de CXCR4 no fue un efecto inespecífico del ADN monocatenario suministrado junto con la RNP Cas9 CXCR4; se observó un mayor porcentaje de células que expresaban CXCR4 después del tratamiento con la RNP Cas9 CXCR4 y el molde de HDR desordenado que con la RNP Cas9 CXCR4 y el molde CXCR4 HDR (Figura 9A). Estos hallazgos confirmaron la modulación específica de diana de la expresión del receptor de superficie celular en células T primarias con los tratamientos programables de RNP Cas9 y molde de HDR.

Después, se probó la especificidad de los moldes de HDR para el reemplazo de nucleótidos (Figura 12D; en la Figura 9B se muestran ejemplos de datos de expresión de superficie celular correspondientes). Como se esperaba, se observó una edición de *PD-1* eficiente con las RNP Cas9 PD-1 independientemente de si se suministraban con el molde de PD-1 HDR, con el molde de CXCR4 HDR o sin ningún molde de HDR. En cambio, el sitio HindIII solo se incorporó en *PD-1* en presencia tanto de la RNP Cas9 PD-1 como del molde de PD-1 HDR, pero no con el molde de CXCR4 HDR, que no debe recombinarse en el locus *PD-1* debido a la falta de homología de secuencia. De manera similar, después del tratamiento con la RNP Cas9 CXCR4 y el molde de CXCR4 HDR, solo se incorporó un sitio HindIII a *CXCR4*; no se observó HDR en el locus *CXCR4* con el molde de PD-1 HDR, el molde de HDR desordenado de control (con un sitio HindIII) o sin el molde de HDR (Figura 12D). Considerados en conjunto, estos estudios establecieron que el emparejamiento específico de una RNP Cas9 programado y el molde de HDR correspondiente puede proporcionar un reemplazo de nucleótidos dirigido en células T humanas primarias.

45 **Materiales y Métodos**

45 **Aislamiento y cultivo de células T humanas.** Las células T primarias humanas se aislaron de sangre completa reciente o de capas leucocitarias. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Las células T CD4⁺ se enriquecieron previamente con el kit de enriquecimiento de células T CD4⁺ humanas Easysep (Stemcell technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células T CD4⁺ previamente enriquecidas se tiñeron con los siguientes anticuerpos: αCD4-PerCp (SK3; Becton Dickinson), αCD25-APC (BC96; TONBO Biosciences), αCD127-PE (R34-34; TONBO Biosciences), αCD45RA-violetFluor450 (HI100; TONBO Biosciences) y αCD45RO-FITC (UCHL1; TONBO Biosciences). Las células T efectoras (Tefec) CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi} se aislaron usando un FACS Aria IIIu (Becton Dickinson).

55 **Ensamblaje y electroporación de la RNP Cas9.** Las RNP Cas9 se prepararon inmediatamente antes de los experimentos incubando Cas9 20 μM con ARNGs 20 μM en una proporción de 1: 1 en HEPES 20 μM (pH 7,5), KCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, glicerol al 10 % y TCEP 1 mM a 37 °C durante 10 min a una concentración final de 10 μM. Las células T se sometieron a electroporación con un kit y dispositivo de transfección Neon (Invitrogen).

60 **Análisis de edición del genoma.** La eficiencia de la edición se estimó mediante el ensayo con endonucleasa I de T7. Se diseñaron moldes de HDR para introducir un sitio de restricción HindIII en los locus de genes diana; el éxito de la HDR se confirmó mediante digestión con la enzima de restricción HindIII. La biblioteca de ADN genómico, que flanquea las regiones de los sitios diana de Cas9 para el CXCR4 específicos y dos genes inespecíficos predichos, se ensambló mediante el método de PCR de 2 etapas y se secuenció con el secuenciador Illumina HiSeq 2500.

65 **Materiales y métodos, información complementaria**

Aislamiento y cultivo de células T humanas. Las células T primarias humanas se aislaron de sangre completa reciente o de capas leucocitarias (Stanford Blood Center). Se extrajo sangre completa de donantes humanos en tubos vacutainer (Becton Dickinson) heparinizados con sodio, con la aprobación del comité de investigación en seres humanos (CHR) de la UCSF, y se procesó en 12 horas. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. La sangre reciente se mezcló en una proporción de 1: 1 con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) sin Ca^{2+} y Mg^{2+} . Las capas leucocitarias se diluyeron en una proporción de 1:10 con HBSS. Se transfirieron 30 ml de la solución de HBSS/sangre respectiva a tubos Falcon de 50 ml y se recubrieron con 12 ml de Ficoll-Paque PLUS (Amersham/GE healthcare). Después de la centrifugación en gradiente de densidad (1000 g, 20 min, sin interrupción), la capa de PBMC se retiró cuidadosamente y las células se lavaron dos veces con HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} . Las células T CD4^+ se enriquecieron previamente con el kit de enriquecimiento de células T CD4^+ humanas Easysep (Stemcell technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células T CD4^+ previamente enriquecidas se tiñeron con los siguientes anticuerpos: αCD4 -PerCp (SK3; Becton Dickinson), αCD25 -APC (BC96; TONBO Biosciences), αCD127 -PE (R34-34; TONBO Biosciences), αCD45RA -violetFluor450 (HI100; TONBO Biosciences) y αCD45RO -FITC (UCHL1; TONBO Biosciences). Las células T efectoras (Tefec) $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{lo}}\text{CD127}^{\text{hi}}$ se aislaron usando un FACS Aria IIIu (Becton Dickinson). La pureza de las células Tefec fue > 97 %.

Para las transfecciones con la RNP Cas9, las células T CD4^+ efectoras se aislaron de sangre completa y se preactivaron en αCD3 (UCHT1; BD Pharmingen) y αCD28 (CD28.2; BD Pharmingen) con placas recubiertas durante 48 horas. Las placas se recubrieron con 10 $\mu\text{g/ml}$ de αCD3 y αCD28 en PBS durante al menos 2 horas a 37 °C. Las células T procedentes de la capa leucocitaria se activaron en placas recubiertas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de αCD3 (en PBS durante al menos 2 horas a 37 °C) añadiendo 5 $\mu\text{g/ml}$ de αCD28 directamente al medio completo RPMI.

Las células T se activaron en RPMI completo (RPMI-1640 (UCSF CCF) complementado con ácido 4-(2-hidroxi)etil)-1-piperazin etanosulfónico 5 mmol/l (HEPES) (UCSF CCF), glutamax 2 mmol/l (Gibco), penicilina/estreptomicina 50 $\mu\text{g/ml}$ (Coming), 2-mercaptoetanol 50 $\mu\text{mol/l}$ (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales 5 mmol/l (Coming), piruvato sódico 5 mmol/l (UCSF CCF) y suero bovino fetal al 10 % (v/v) (Atlanta Biologicals)). Después de la electroporación, el medio se complementó con 40 UI/ml de IL-2.

Expresión y purificación de Cas9. La Cas9 recombinante de *S. pyogenes* usada en este estudio lleva en el extremo C una etiqueta de HA y dos péptidos de señal de localización nuclear que facilitan el transporte a través de la membrana nuclear. La proteína se expresó en células Rosetta 2 de *E. coli* (EMD Millipore) del plásmido pMJ915, con una etiqueta de hexahistidina en el extremo N y una proteína de unión a maltosa. La etiqueta de His y la proteína de unión a maltosa se escindieron con la proteasa del TEV y la Cas9 se purificó con los protocolos descritos en Jinek, *et al.* (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096):816-821. La Cas9 se conservó en HEPES 20 mM a pH 7,5, KCl 150 mM, glicerol al 10 % (v/v), tris(2-cloroetil) fosfato (TCEP) 1 mM a -80 °C.

Transcripción *in vitro* con T7 de ARNs con purificación mediante PAGE. El molde de ADN que codifica un promotor de T7, una secuencia diana de 20 nucleótidos (nt) y el almacén de ARNs quimérico se ensambló a partir de oligonucleótidos sintéticos mediante PCR solapante. Resumiendo, para el molde de ARNs de CXCR4, la reacción de PCR contiene una premezcla de 20 nM de SLKS3 (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA GCG TGA TGA CAA AGA GGG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AAG G -3') y SLKS1 (5'- GCA CCG ACT CGG TGC CAC TTT TTC AAG TTG ATA ACG GAC TAG CCT TAT TTT AAC TTG CTA TGC TGT TTC CAG C -3'), una premezcla de T25 1 μM (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3') and SLKS1 (5'- GCA CCG ACT CGG TGC CAC TTT TTC AAG -3'), dNTP 200 μM y polimerasa de fusión (NEB) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ajuste del termociclador consistió en 30 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 57 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 10 segundos. El producto de la PCR se extrajo una vez con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y después una vez con cloroformo, antes de la precipitación con isopropanol durante la noche a -20 °C. El sedimento de ADN se lavó tres veces con etanol al 70% (v/v), se secó al vacío y se disolvió en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). El molde de ARNs PD-1 se ensambló a partir de T25, SLKS1, SLKS2 y SLKS11 (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGA CTG GCC AGG GCG CCT GTG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AAG G -3') con el mismo procedimiento.

Una reacción de transcripción *in vitro* de T7 de 100 μl consistía en Tris-HCl 30 mM (pH 8), MgCl_2 20 mM, (/) Triton X-100 al 0,01 %, espermidina 2 mM, ditiotreitól reciente 10 mM, 5 mM de cada trifosfato de ribonucleótido, Pol T7 100 $\mu\text{g/ml}$ y molde de ADN 0,1 μM . La reacción se incubó a 37 °C durante 4 h, y se añadieron 5 unidades de ADNs I sin ARNs (Promega) para digerir el molde de ADN a 37 °C durante 1 h. La reacción se desactivó con una solución 2xSTOP (formamida desionizada al 95 % (v/v), azul de bromofenol al 0,05 % (p/v) y EDTA 20 mM) a 60 °C durante 5 min. El ARN se purificó mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) al 10 % que contenía urea 6 M. La banda de ARN se escindió del gel, se trituró en un tubo de 50 ml y se eluyó durante la noche en 25 ml de acetato de sodio 300 mM (pH 5) a 4 °C con oscilación suave. Después, la solución se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos y el sobrenadante de ARN se pasó a través de un filtro de 0,45 μm . Se añadió un equivalente de isopropanol al sobrenadante filtrado para precipitar el ARN durante la noche a -20 °C. El sedimento de ARN se recogió por centrifugación, se lavó tres veces con etanol al 70 % (v/v) y se secó al vacío. Para replegar el ARNs, el sedimento

de ARN se disolvió primero en HEPES 20 mM (pH 7,5), KCl 150 mM, glicerol al 10 % (v/v) y TCEP 1 mM. El ARNgs se calentó a 70 °C durante 5 min y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió MgCl₂ a una concentración final de 1 mM. El ARNgs se calentó de nuevo a 50 °C durante 5 min, se enfrió a temperatura ambiente y se mantuvo en hielo. La concentración de ARNgs se determinó mediante DO_{260 nm} usando Nanodrop y se ajustó a 100 µM usando HEPES 20 mM (pH 7,5), KCl 150 mM, glicerol al 10 % (v/v), TCEP 1 mM y MgCl₂ 1 mM. El ARNgs se conservó a -80 °C.

Transcripción *in vitro* con T7 de ARNgs con extracción de fenol/cloroformo. Se generaron moldes de ADN para la transcripción *in vitro* con T7 mediante emparejamiento de ultrámeros monocatenarios complementarios (secuencias ultraméricas: CXCR4_1: 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA GCG TGA TGA CAA AGA GGG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AA GGC TAG TCC GTT ATC AAC TTG AAA AAG TGG CAC CGA GTC GGT G-3'; CXCR4_2: 5'- CAC CGA CTC GGT GCC ACT TTT TCA AGT TGA TAA CGG ACT AGC CTT ATT TTA ACT TGC TAT GCT GTT TCC AGC ATA GCT CTA AAA CCC TCT TTG TCA TCA CGC TTC CTA TAG TGA GTC GTA TTA-3'; PD-1_1: 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGA CTG GCC AGG GCG CCT GTG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AAG GCT AGT CCG TTA TCA ACT TGA AAA AGT GGC ACC GAG TCG GTG C-3'; PD-1_2: 5'- GCA CCG ACT CGG TGC CAC TTT TTC AAG TTG ATA ACG GAC TAG CCT TAT TTT AAC TTG CTA TGC TGT TTC CAG CAT AGC TCT AAA ACA CAG GCG CCC TGG CCA GTC GCT ATA GTG AGT CGT ATT A-3'). Los ultrámeros se mezclaron en una proporción de 1: 1 en tampón dúplex sin nucleasa (IDT), se calentaron a una temperatura de 95 °C durante 2 min seguido de incubación a TA durante 30 min.

Una reacción de transcripción *in vitro* con T7 100 µl contenía 1x tampón optimizado para la transcripción (Promega), ditiotreitól reciente 10 mM, 2 mM de cada trifosfato de ribonucleótido, Pol T7 400 U (Promega), pirofosfatasa 0,5 U (Life technologies) y molde de ADN 2 µg. La reacción se incubó durante 4 h a 37 °C. Se añadieron 5 U de ADNsa I sin ARNsa (Promega) para digerir el molde de ADN a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo con 5 µl de EDTA 0,5 M.

Dada la preocupación por la posibilidad de intercambio de ácido nucleico entre pocillos durante la purificación con PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poli(acrilamida)), los ARNgs purificados con fenol/cloroformo se probaron por pares con los ARNgs purificados por PAGE como se indica en las Figuras 12 y 9A. La extracción con fenol/cloroformo se realizó después de la adición de 190 µl de H₂O sin los ARN. El ARNgs se precipitó con 80 µl de acetato de sodio 3 M y 420 µl de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 4 horas. El sedimento de ARN se lavó dos veces con EtOH al 70 % (v/v) y una vez con EtOH al 100 % (v/v). El sedimento secado al vacío se reconstituyó y los ARNgs se desplegaron como se describe en el apartado "Transcripción *in vitro* con T7 de ARNgs con purificación mediante PAGE".

Ensamblaje y electroporación de la RNP Cas9. Las RNP Cas9 se prepararon inmediatamente antes de los experimentos incubando Cas9 20 µM con ARNgs 20 µM en una proporción de 1: 1 en HEPES 20 µM (pH 7,5), KCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, glicerol al 10 % y TCEP 1 mM a 37 °C durante 10 min a una concentración final de 10 µM.

Las células T se sometieron a electroporación con un kit y dispositivo de transfección Neon (Invitrogen). Antes de la suspensión en 8 µl de tampón T (kit de Neon, Invitrogen), 2,5 x10⁵ células T se lavaron tres veces con PBS. A la suspensión celular se añadieron la RNP Cas9 (2 µl de Cas9 CTRL 10 µM sin ARNgs o 1 - 2 µl de RNP Cas9: ARNgs; concentración final 0,9 - 1,8 µM) así como molde de HDR (0 - 200 pmol como se indica) a un volumen final de 11 µl (ajustado con tampón de conservación de Cas9) y se mezcló. Con un dispositivo de electroporación Neon (Invitrogen; 1600 V, 10 msec, 3 pulsos), 10 µl de la suspensión se sometieron a electroporación. Los moldes de HDR para CXCR4 y PD-1 son un oligonucleótido monocatenario complementario (cadena antisentido) a la secuencia diana, y contienen una secuencia de restricción HindIII junto con brazos de homología de 90 nt. Después de una HDR satisfactoria, se eliminan los sitios de PAM respectivos, lo que debería impedir que las RNP Cas9 vuelvan a cortar el sitio editado. El molde de PD-1 HDR provoca además una mutación del marco de lectura y sin sentido desde la posición de aminoácido 25 reemplazando 12 nt por 11 nt (molde CXCR4 HDR: 5'- GGG CAA TGG ATT GGT CAT CCT GGT CAT GGG TTA CCA GAA GAA ACT GAG AAG CAT GAC GGA CAA GTA CAG GCT GCA CCT GTC AGT GGC CGA AAG CTT GGA TCC CAT CAC GCT TCC CTT CTG GGC AGT TGA TGC CGT GGC AAA CTG GTA CTT TGG GAA CTT CCT ATG CAA GGC AGT CCA TGT CAT CTA CAC AGT-3'; molde de PD-1 HDR: 5'- AAC CTG ACC TGG GAC AGT TTC CCT TCC GCT CAC CTC CGC CTG AGC AGT GGA GAA GGC GGC ACT CTG GTG GGG CTG CTC CAG GCA TGC AGA TAA TGA AAG CTT CTG GCC AGT CGT CTG GGC GGT GCT ACA ACT GGG CTG GCG GCC AGG ATG GTT CTT AGG TAG GTG GGG TCG GCG GTC AGG TGT CCC AGA GC-3'). El donante de control de CXCR4 HDR es una versión desordenada de secuencia en el molde de CXCR4 HDR original que contiene un sitio de restricción HindIII (molde de HDR de control CXCR4: 5'- TTC AAA ACT AGC GTC AGG GGC TCG ATT TAC TCG GGA CTT GCT ACA ACA TCG CAG TCA CGC GCA CGA TCC TTC CAG GAT TGG AGG TGG ACT TAG ATA AAG CTT CCG TGT GCA CCG TAT AGA TTC GTT GAT GCA GGC TAT TCC CGT GAT CCC ACG CGG AGG TGA TGG AGC GTC AAG CAT AGC TAG CAC AGA TGA -3')

Las células T sometidas a electroporación se transfirieron a 500 µl de su medio de cultivo respectivo en una placa de 48 pocillos recubierta con αCD3/CD28. Las placas se recubrieron con 10 µg/ml de αCD3 (UCHT1; BD Pharmingen) y αCD28 (CD28.2; BD Pharmingen) en PBS durante al menos 2 horas a 37 °C. Veinticuatro (24) horas después de la electroporación, las células se resuspendieron y se transfirieron a una placa de pocillos no recubierta. De 3 a 4 días después de la electroporación, las células T se analizaron mediante FACS y ensayo con endonucleasa I de T7.

Análisis FACS de células T editadas. La tinción de la superficie celular se realizó con α CXCR4-APC (12G5; BD Pharmingen) y α PD-1-PE (EH12.2H7; Biolegend) durante 15 min en hielo. Las células se mantuvieron a 4 °C durante todo el procedimiento de tinción hasta la clasificación celular para minimizar la internalización mediada por anticuerpos y la degradación del anticuerpo. Las células se clasificaron usando un FACS Aria IIIu (Becton Dickinson).

Amplificación por PCR de la región diana. En 100 μ l de solución de extracción rápida (Epicenter) se resuspendieron 5×10^4 - 2×10^5 células y se añadieron para causar la lisis de las células y extraer el ADN genómico. El lisado celular se incubó a 65 °C durante 20 min y después a 95 °C durante 20 min, y se conservó a -20 °C. La concentración de ADN genómico se determinó con NanoDrop (Thermo Scientific).

Las regiones genómicas, que contenían los sitios diana *CXCR4* o *PD-1*, se amplificaron por PCR usando los siguientes conjuntos de cebadores. Para *CXCR4*: directo 5'- AGA GGA GTT AGC CAA GAT GTG ACT TTG AAA CC -3' e inverso 5'- GGA CAG GAT GAC AAT ACC AGG CAG GAT AAG GCC -3' (938 pb). Para *PD-1*: directo 5'- GGG GCT CAT CCC ATC CTT AG -3' y reverse 5'- GCC ACA GCA GTG AGC AGA GA -3' (905 pb). Ambos conjuntos de cebadores se diseñaron para evitar la amplificación de los moldes de HDR emparejándose fuera de los brazos de homología. La reacción de PCR contenía 200 ng de ADN genómico y Kapa polimerasa de alta fidelidad de arranque en caliente (Kapa Biosystems) en tampón con alto contenido en GC de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ajuste del termociclador consistió en un ciclo de 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 98 °C durante 20 segundos, 62 °C para *CXCR4* o 68 °C para *PD-1* durante 15 segundos y 72 °C durante 1 min, y un ciclo de 72 °C durante 1 min. Los productos de la PCR se purificaron en gel de agarosa al 2 % (p/v) que contenía SYBR Safe (Life Technologies). Los productos de la PCR se eluyeron del gel de agarosa usando el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen). La concentración de ADN de la PCR se cuantificó con un dispositivo NanoDrop (Thermo Scientific). Se usaron 200 ng de ADN de la PCR para los análisis con la endonucleasa I de T7 y HindIII. Para la Figura 7E, el producto de la PCR se clonó con el kit de clonación de PCR TOPO Zero Blunt (Invitrogen) y se envió para la secuenciación de Sanger.

Análisis de eficiencia de edición mediante ensayo con endonucleasa I de T7. La eficiencia de la edición se estimó mediante el ensayo con endonucleasa I de T7. La endonucleasa I de T7 reconoce y escinde ADN heterodúplex con emparejamiento erróneo que surge de la hibridación de cadenas de ADN de tipo silvestre y mutante. La reacción de hibridación contenía 200 ng de ADN de la PCR en tampón KAPA con alto contenido en GC y KCl 50 mM, y se realizó en un termociclador con la siguiente configuración: 95 °C, 10 min, 95-85 °C a -2 °C/s, 85 °C durante 1 min, 85-75 °C a -2 °C/s, 75 °C durante 1 min, 75-65 °C a -2 °C/s, 65 °C durante 1 min, 65-55 °C a -2 °C/s, 55 °C durante 1 min, 55-45 °C a -2 °C/s, 45 °C durante 1 min, 45-35 °C a -2 °C/s, 35 °C durante 1 min, 35-25 °C a -2 °C/s, 25 °C durante 1 min y se mantuvo a 4 °C. Se añadieron tampón 2 y 5 unidades de endonucleasa I de T7 (NEB) para digerir el ADN re-emparejado. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, la reacción se desactivó con colorante de carga de gel azul 6x (Thermo Scientific) a 70 °C durante 10 min. El producto se resolvió en gel de agarosa al 2 % que contenía SYBR Gold (Life Technologies). La intensidad de la banda de ADN se cuantificó usando Image Lab. El porcentaje de edición se calculó usando la siguiente ecuación $(1 - (1 - (b + c / a + b + c))^{1/2}) \times 100$, en donde "a" es la intensidad de la banda del sustrato de ADN y "b" y "c" son los productos de escisión. Para la cuantificación del ensayo con T7E1 de *PD-1* (Figura 12D), la intensidad del sustrato de ADN se calculó como la suma de las dos bandas grandes observadas en todas las condiciones. El cálculo del % de edición total basado en los ensayos con T7E1 solo permite una estimación de la eficiencia de escisión.

Análisis de HDR por digestión con la enzima de restricción HindIII. Los moldes de HDR se diseñaron para introducir un sitio de restricción HindIII en el locus del gen diana. Para probar la introducción satisfactoria del sitio HindIII en el locus *CXCR4*, la región de 938 pb se amplificó por PCR usando los cebadores 5'- AGA GGA GTT AGC CAA GAT GTG ACT TTG AAA CC -3' y 5'- GGA CAG GAT GAC AAT ACC AGG CAG GAT AAG GCC -3'. Para el locus *PD-1* se amplificó una región de 905 pb usando los cebadores 5'- GGG GCT CAT CCC ATC CTT AG -3' and 5'- GCC ACA GCA GTG AGC AGA GA -3'. La reacción consistió en 200 ng de ADN de PCR y en 10 unidades de HindIII High Fidelity en tampón CutSmart (NEB). Después de 2 horas de incubación a 37 °C, la reacción se desactivó con un volumen de colorante de carga de gel a 70 °C durante 10 min. El producto se resolvió en gel de agarosa al 2 % (p/v) que contenía SYBR Gold (Life Technologies). La intensidad de la banda se cuantificó usando Image Lab. El porcentaje de HDR se calculó usando la siguiente ecuación $(b + c / a + b + c) \times 100$, en donde "a" es la intensidad de la banda del sustrato de ADN y "b" y "c" son los productos de escisión.

Análisis de secuenciación profunda de sitios específicos e inespecíficos. Las regiones genómicas que flanquean el sitio diana Cas9 para los genes *CXCR4* específico y dos genes inespecíficos se amplificaron mediante el método de PCR de 2 etapas usando los cebadores que se enumeran a continuación. Específico de *CXCR4* (5'- ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN NNC TTC CTG CCC ACC ATC TAC TCC ATC ATC TTC TTA ACT G-3' y 5'- GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TNN NNN CAG GTA GCG GTC CAG ACT GAT GAA GGC CAG GAT GAG GAC-3'), locus inespecífico n.º 1 (*isoforma 1 del factor de transcripción 1, dominio POU, clase 2 [POU2F1]*; 5'- ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN NNG CTA TAA TAG TAC AAG TAT ATG TTA AAT AAG AGT CAT AGC ATG-3' y 5'- GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TNN NNN CTG GCT TTA TAT ATA TAC ATA GAT AGA CGA TAT AGA TAG C-3') y locus inespecífico n.º 2 (*precursor de la isoforma 1 del receptor de glutamato 1 [GRIA1]*; 5'- ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN NNC CTG GTC CCA GCC CAG CCC CAG CTA TTC AGC ATC C-3' y 5'- GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT

CTT CCG ATC TNN NNN ACT CTG CAC TGG TAT ATC AAT ACA CTT GTT TTT CTC ATC CC-3'). En primer lugar, usando Kapa polimerasa de alta fidelidad de arranque en caliente (Kapa Biosystems), se amplificaron por PCR y de acuerdo con el protocolo del fabricante, 100-150 ng del ADN genómico de las muestras editadas y de control. El ajuste del termociclador consistió en un ciclo de 95 °C durante 5 min y 15-20 ciclos de 98 °C durante 20 s, 63 °C durante 15 s y 72 °C durante 15 s y un ciclo de 72 °C durante 1 min. Los amplicones resultantes se resolvieron en gel de agarosa al 2 % (p/v), se tiñeron con SYBR Gold y se extrajeron usando el kit de extracción en gel de Qiagen.

El adaptador Universal Illumina TruSeq (5'- AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T-3') y el cebador de código de barras de PCR para ARN de Illumina modificado (5'- CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT-Index- GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC T-3') se unieron al amplicón en la segunda etapa de la PCR usando Kapa polimerasa de alta fidelidad de arranque en caliente (Kapa Biosystems). El ajuste del termociclador consistió en un ciclo de 98 °C durante 30 s, 8-10 ciclos de 98 °C durante 20 s, 65 °C durante 15 s y 72 °C durante 15 s, y un ciclo de 72 °C durante 5 min. Los amplicones resultantes se resolvieron en gel de agarosa al 2 % (p/v), se tiñeron con SYBR Gold y se extrajeron usando el kit de extracción en gel de Qiagen. Las muestras de ADN con código de barras y purificadas se cuantificaron con el fluorímetro Qubit 2.0 (Life Technologies), su tamaño se analizó con BioAnalyzer (Agilent), se cuantificó con qPCR (PCR cuantitativa) y se agrupó en una proporción equimolar. Las bibliotecas de secuenciación se secuenciaron con el secuenciador Illumina HiSeq 2500.

Análisis de datos de secuenciación profunda. Las lecturas de secuenciación que contenían los 12 nt únicos resultantes del molde de HDR, se extrajeron y se analizaron por separado de las que no contenían la secuencia procedente del molde de HDR. Todas las lecturas que no contenían los 12 nt reemplazados se alinearon con el genoma hg19 de referencia, y todas las lecturas que contenían los 12 nt reemplazados se alinearon con un genoma de hg19 modificado con las sustituciones esperadas usando Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Después se usó el servicio mpileup de samtools para cuantificar el número total de lecturas que se mapearon a cada posición del gen *CXCR4* y se usó una secuencia de comandos (*script*) personalizada que examinaba la serie de CIGAR para estimar el número y la ubicación de las inserciones y deleciones de cada lectura. La eficiencia de inserción en el experimento con *CXCR4* RNP (sin molde de HDR) se estimó como: (número de lecturas con inserciones +/- 100 pb desde el sitio de corte) / (número total de lecturas +/- desde el sitio de corte). La eficiencia de deleción en el experimento con *CXCR4* RNP (sin molde de HDR) se estimó como: (número de lecturas con deleciones +/- 100 pb desde el sitio de corte) / (número total de lecturas +/- desde el sitio de corte). Para experimentos con *CXCR4* RNP + molde de HDR, las eficiencias de inserción y deleción se calcularon basándose únicamente en lecturas que no contenían el reemplazo de 12 nt procedente de HDR (estas son las fracciones mostradas en la Figura 10B). La eficiencia de edición total se estimó como (número de lecturas con indeles +/- 100 pb desde el sitio de corte) / (número total de lecturas +/- desde el sitio de corte). La eficiencia de la HDR se estimó como (número de lecturas que contienen el sitio HindIII +/- 100 pb desde el sitio de corte) / (número total de lecturas +/- 100 pb desde el sitio de corte). La distribución de los tamaños de inserción y deleción se estimó para una región de +/- 20 pb desde el sitio de corte. Los datos de secuenciación profunda están disponibles en el archivo de lectura de secuencia (SRA, *Sequence Read Archive*, BioProject: SUB996236) del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica).

Bibliografía

1. Doudna JA y Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346(6213):1258096.
2. Hsu PD, Lander ES, y Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157(6):1262-1278.
3. Mandal PK, *et al.* (2014) Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 15(5):643-652.
4. Maus MV, *et al.* (2014) Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annual Review of Immunology* 32:189-225.
5. Passerini L, *et al.* (2013) CD4(+) T cells from IPEX patients convert into functional and stable regulatory T cells by FOXP3 gene transfer. *Science Translational Medicine* 5(215):215ra174.
6. Hutter G, *et al.* (2009) Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stemcell transplantation. *The New England Journal of Medicine* 360(7):692-698.
7. Didigu CA, *et al.* (2014) Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors *ccr5* and *cxcr4* protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood* 123(1):61-69.
8. Tebas P, *et al.* (2014) Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *The New England Journal of Medicine* 370(10):901-910.

9. Restifo NP, Dudley ME, y Rosenberg SA (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews. Immunology* 12(4):269-281.
- 5 10. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, y June CH (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 365(8):725-733.
11. Moon EK, *et al.* (2014) Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors. *Clinical Cancer Research* 20(16):4262-4273.
- 10 12. Topalian SL, Drake CG, y Pardoll DM (2015) Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* 27(4):450-461.
13. John LB, *et al.* (2013) Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells. *Clinical Cancer Research* 19(20):5636-5646.
- 15 14. Genovese P, *et al.* (2014) Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature* 510(7504):235-240.
- 15 15. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, y Kim JS (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research* 24(6):1012-1019.
- 20 16. Lin S, Staahl B, Alla RK, y Doudna JA (2014) Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife* 3.
- 25 17. Zuris JA, *et al.* (2014) Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nature Biotechnology*.
18. Sung YH, *et al.* (2014) Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. *Genome Research* 24(1):125-131.
- 30 19. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, y Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393(6685):595-599.
20. Berson JF, *et al.* (1996) A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *Journal of Virology* 70(9):6288-6295.
- 35 21. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, y Berger EA (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272(5263):872-877.
- 40 22. Symington LS y Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics* 45:247-271.
23. Guschin DY, *et al.* (2010) A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods in Molecular Biology* 649:247-256.
- 45 24. Vahedi G, *et al.* (2013) Helper T-cell identity and evolution of differential transcriptomes and epigenomes. *Immunological Reviews* 252(1):24-40.
- 50 25. Farh KK, *et al.* (2015) Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature* 518(7539):337-343.

REIVINDICACIONES

1. Un método de edición del genoma de una célula, en donde la célula es una célula hematopoyética primaria o una célula madre hematopoyética primaria, comprendiendo el método:
- 5 a) proporcionar una mezcla de reacción que comprenda un complejo de ribonucleoproteína Cas9, un molde de ADN oligonucleotídico bicatenario o monocatenario y la célula, en donde el complejo de ribonucleoproteína Cas9 comprende un dominio de nucleasa Cas9 y un ARN guía, en donde el ARN guía se hibrida específicamente con una región diana del genoma de la célula; y en donde el molde tiene una longitud de 50, 75 o 100 b o pb a 110, 120, 125, 150, 200, 225, o 250 b o pb; y
- 10 b) introducir en la célula el complejo de ribonucleoproteína Cas9 y el molde de ADN mediante electroporación.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el método proporciona una eficiencia de edición del genoma de al menos 20 %.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en donde antes de proporcionar, como se indica en a), la célula no se inmortaliza ni se transforma, y en donde después de la introducción, como se indica en b), la célula no se inmortaliza ni se transforma.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en donde el complejo de ribonucleoproteína Cas9 en la mezcla de reacción está a una concentración de 0,25 μM a 5 μM .
5. El método de la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción contiene de 1×10^5 a 4×10^5 células hematopoyéticas primarias o células madre hematopoyéticas primarias.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en donde la célula es una célula hematopoyética primaria y la célula hematopoyética primaria es una célula inmunitaria.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la célula inmunitaria es una célula T, y en donde la célula T comprende un receptor de antígeno recombinante.
- 30 8. El método de la reivindicación 7, en donde la célula T es una célula T reguladora, una célula T efectora o una célula T intacta.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en donde la célula T reguladora, la célula T efectora o la célula T intacta es una célula T CD4+ o una célula T CD8+.
10. El método de la reivindicación 7, en donde la célula T se selecciona del grupo que consiste en una célula T reguladora CD4+CD25hiCD127lo, una célula T FOXP3+, una célula T efectora CD4+CD25loCD127hi y una célula T intacta CD4+CD25loCD127hiCD45RAhiCD45RO-.
- 40 11. El método de la reivindicación 1, en donde el molde de ADN oligonucleotídico es un molde de ADN oligonucleotídico monocatenario, y en donde el método comprende introducir el molde de ADN oligonucleotídico monocatenario en la célula, en donde el molde de ADN oligonucleotídico monocatenario está a una concentración de 9 μM a 180 μM .
- 45 12. El método de la reivindicación 11, en donde el molde de ADN oligonucleotídico monocatenario codifica un receptor de antígeno recombinante, una parte del mismo, o un componente del mismo.
- 50 13. El método de la reivindicación 1, en donde la célula es una célula T, y el método comprende además:
- c) después de la introducción, como se indica en b), transferir la mezcla de reacción a un medio de cultivo que contenga un agonista de CD3 y un agonista de CD28, y cultivar las células.
- 55 14. El método de la reivindicación 13, en donde el método comprende además:
- d) después del cultivo como se indica en c), transferir la mezcla de reacción a un medio de cultivo que no contenga un agonista de CD3 o un agonista de CD28, y cultivar las células.
- 60 15. El método de la reivindicación 1, en donde el complejo de ribonucleoproteína Cas9 comprende una nucleasa Cas9 o una nicasa Cas9.
- 65 16. El método de la reivindicación 1, en donde el complejo de ribonucleoproteína Cas9 comprende un dominio de nucleasa Cas9 fusionado con una endonucleasa de restricción, una nicasa, un modulador transcripcional o un modificador de la cromatina.

17. El método de la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción comprende al menos dos complejos de ribonucleoproteína Cas9 estructuralmente diferentes.

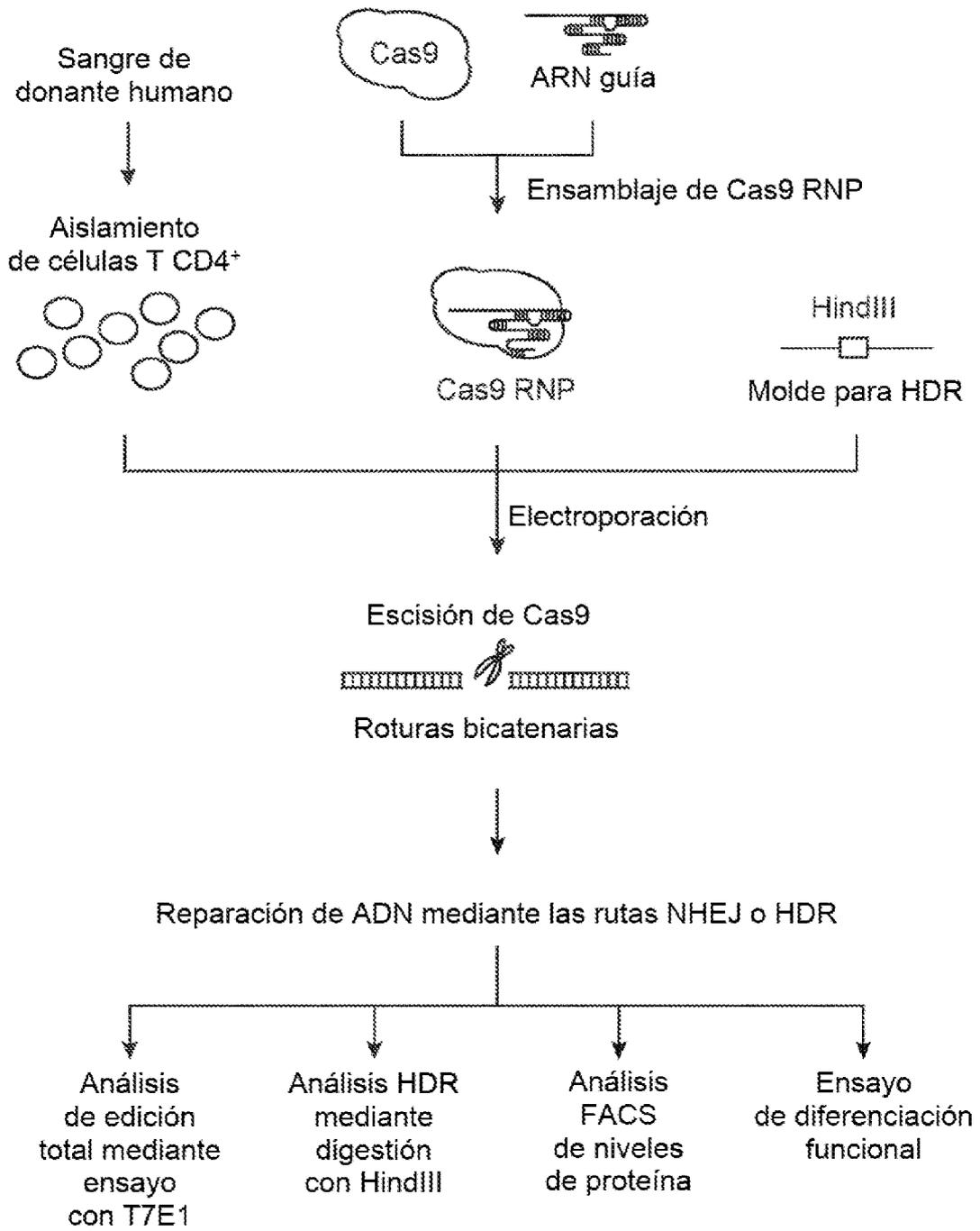


FIG. 1A

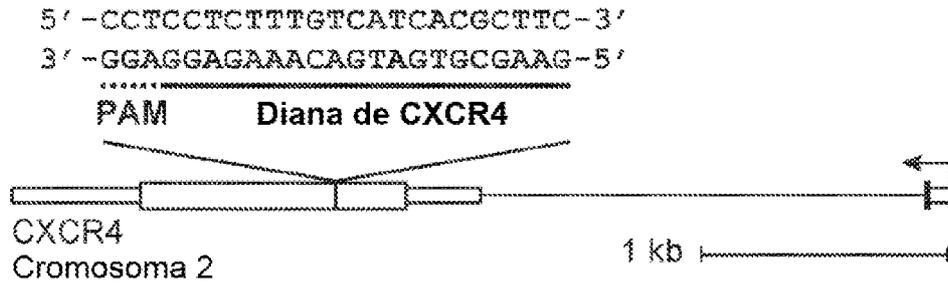


FIG. 1B

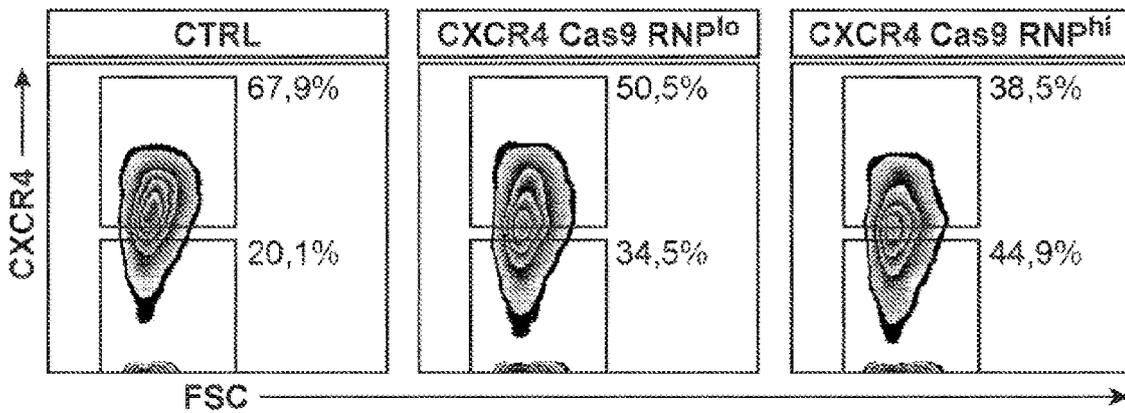


FIG. 1C

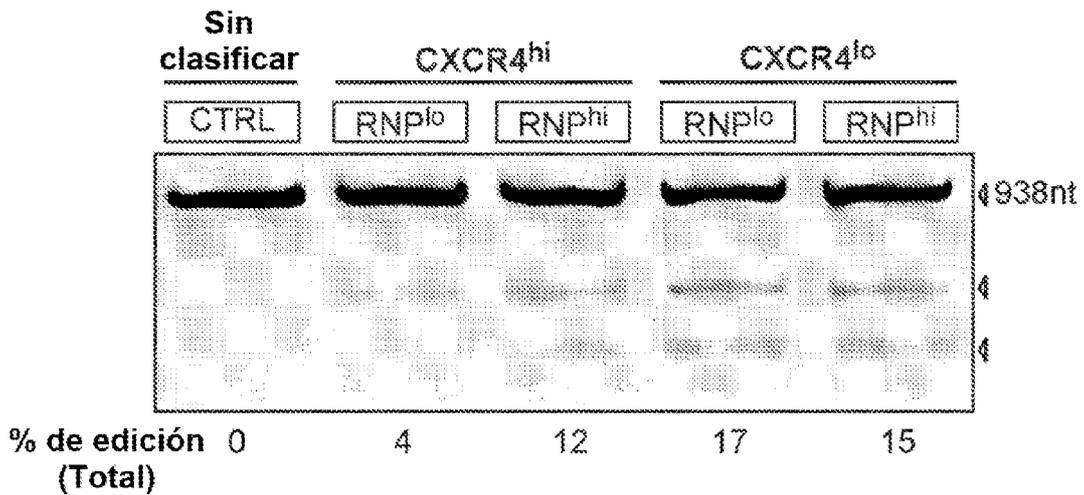


FIG. 1D

CXCR4^{lo}

REF GTTTGCCACGGGCATCAACTGTCCTCCAGAAAGGGAAGCGTGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTTGCAGCCCTGTA
 GTTTGCCACGGGCATCAACTGTCCTCCAGAAAGGGAAGCGTGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTTGCAGCCCTGTA

<p>16 17</p>

FIG. 1E (Cont.)

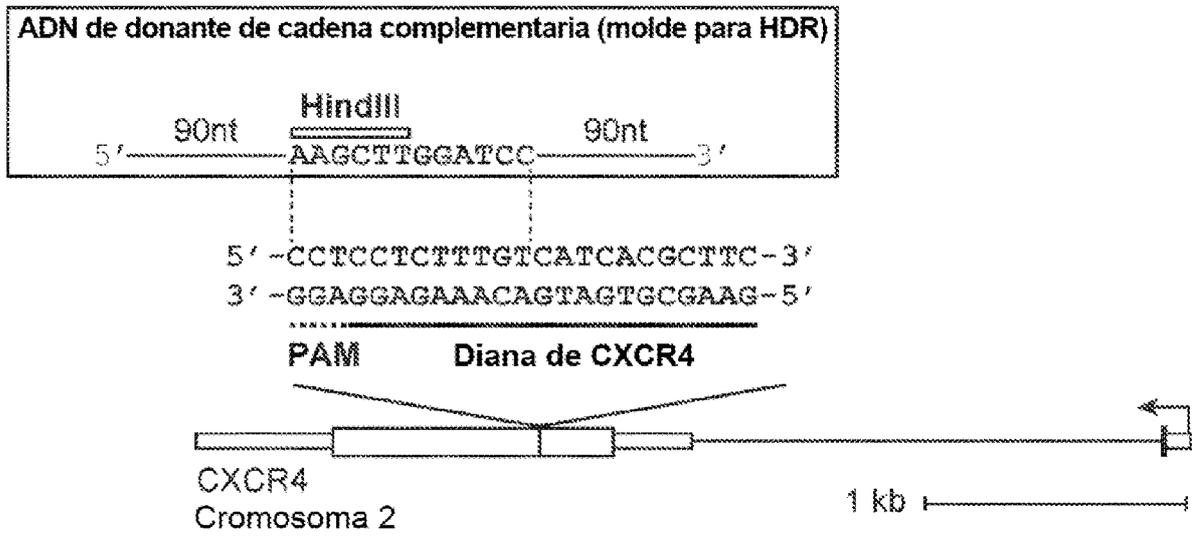


FIG. 2A

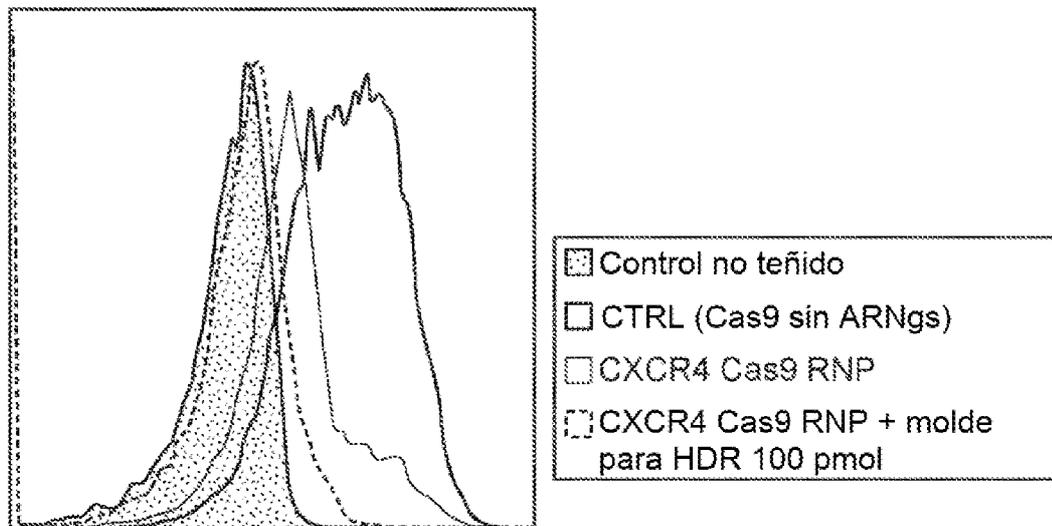


FIG. 2B

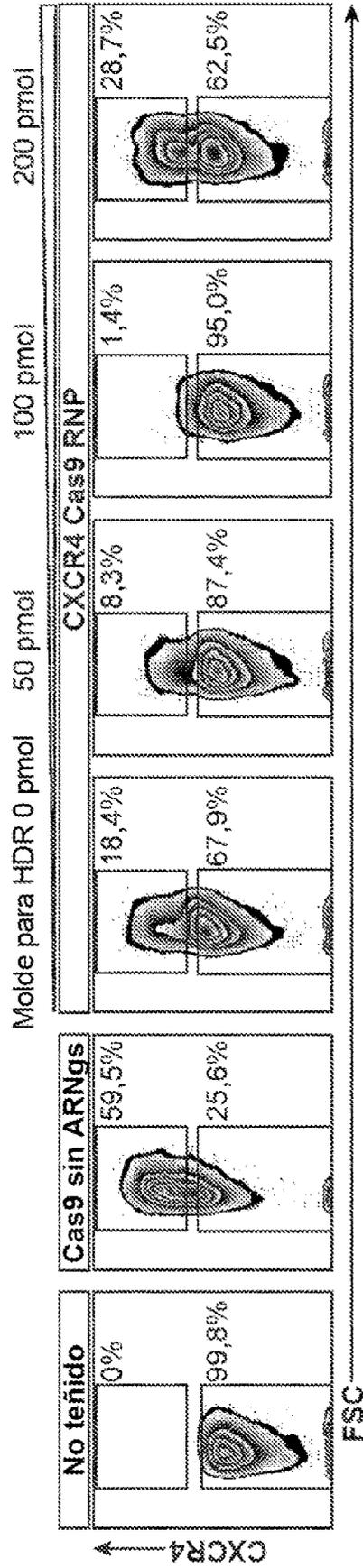


FIG. 2C

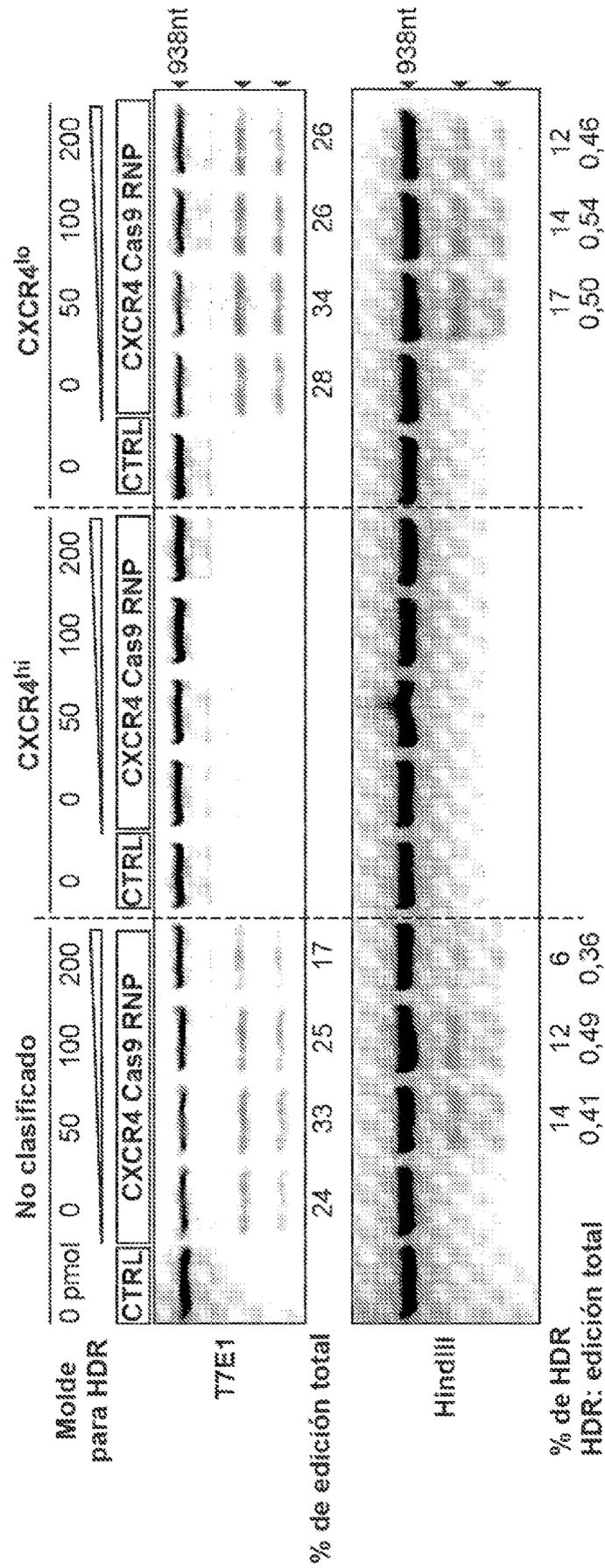


FIG. 2D

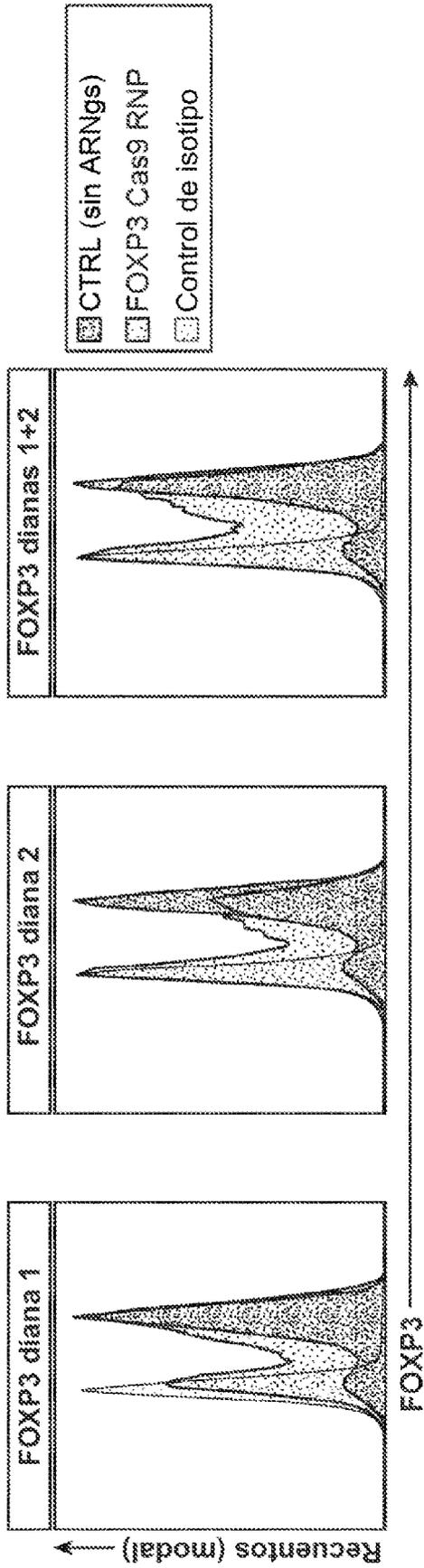


FIG. 3C

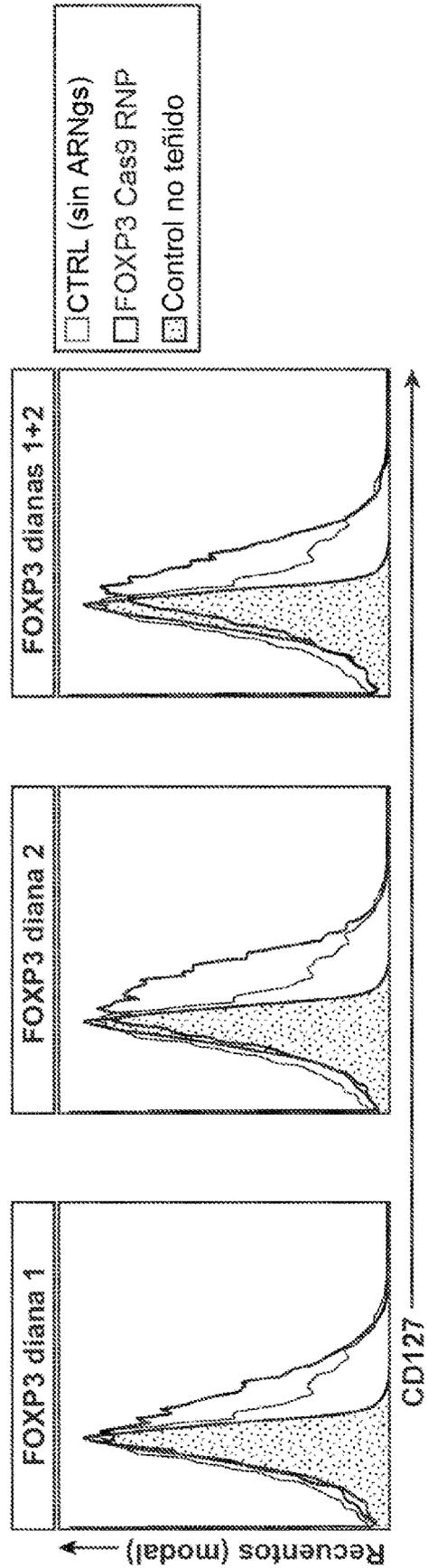


FIG. 3D

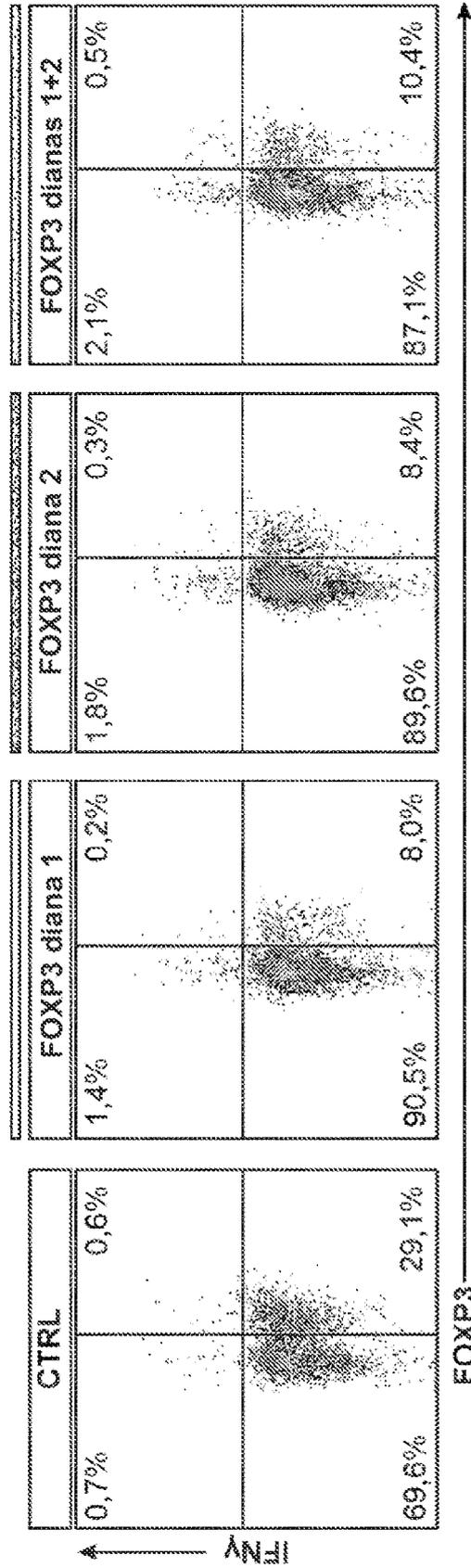


FIG. 4A

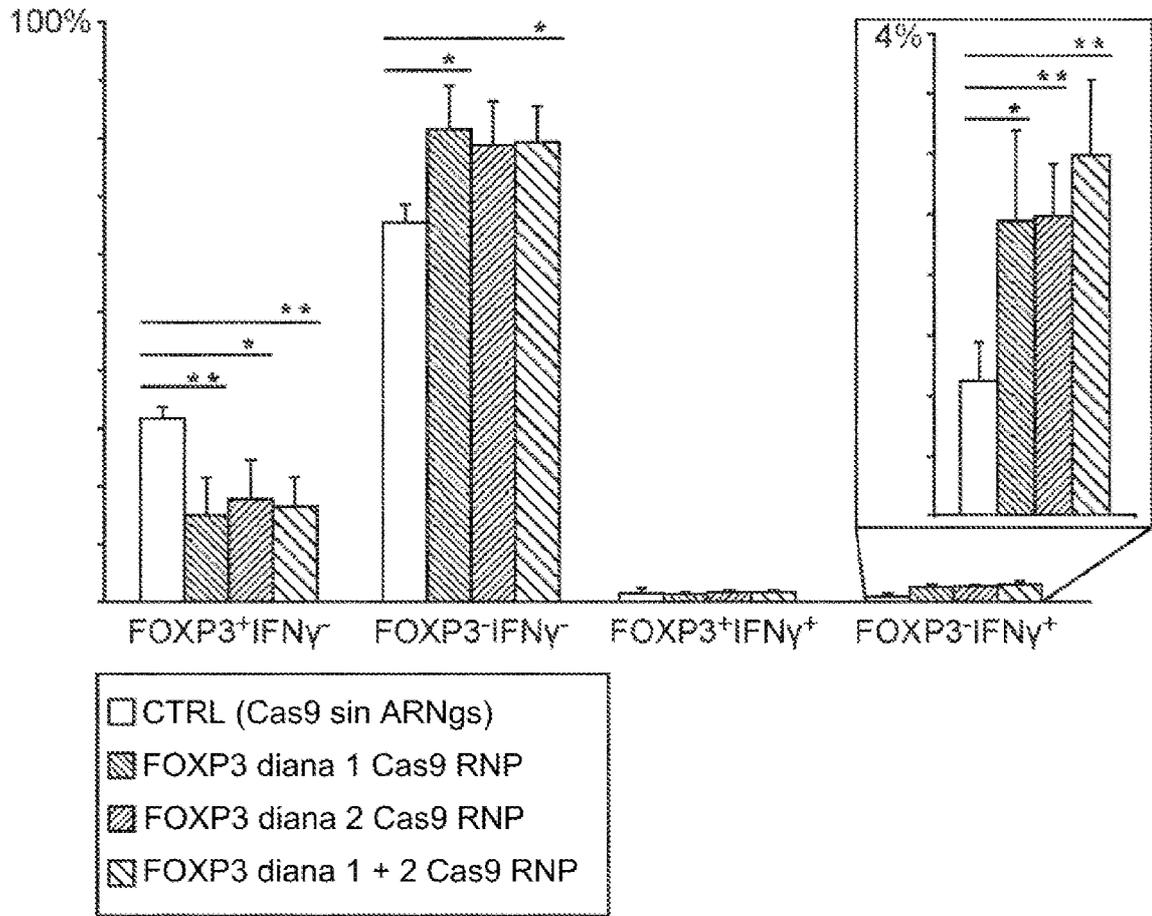


FIG. 4B

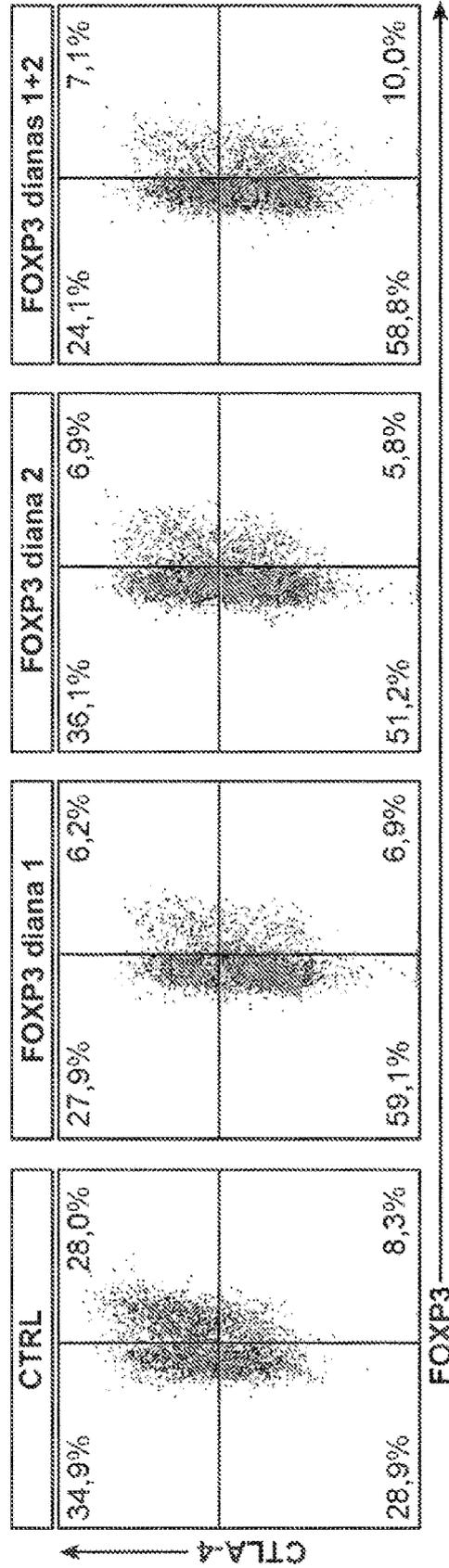


FIG. 4C

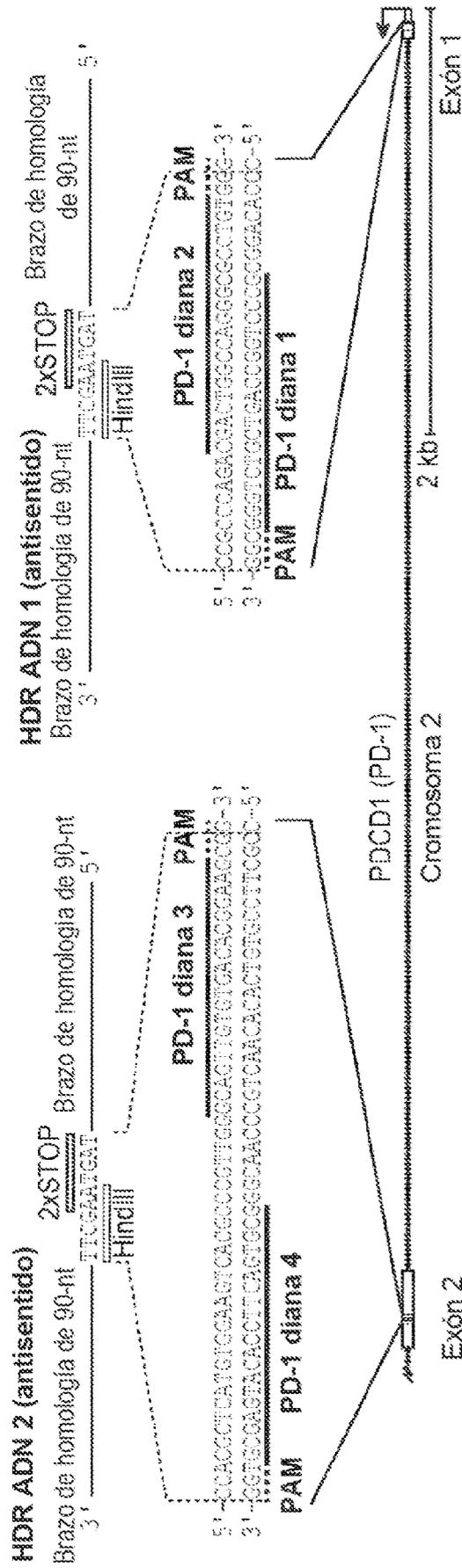


FIG. 5A

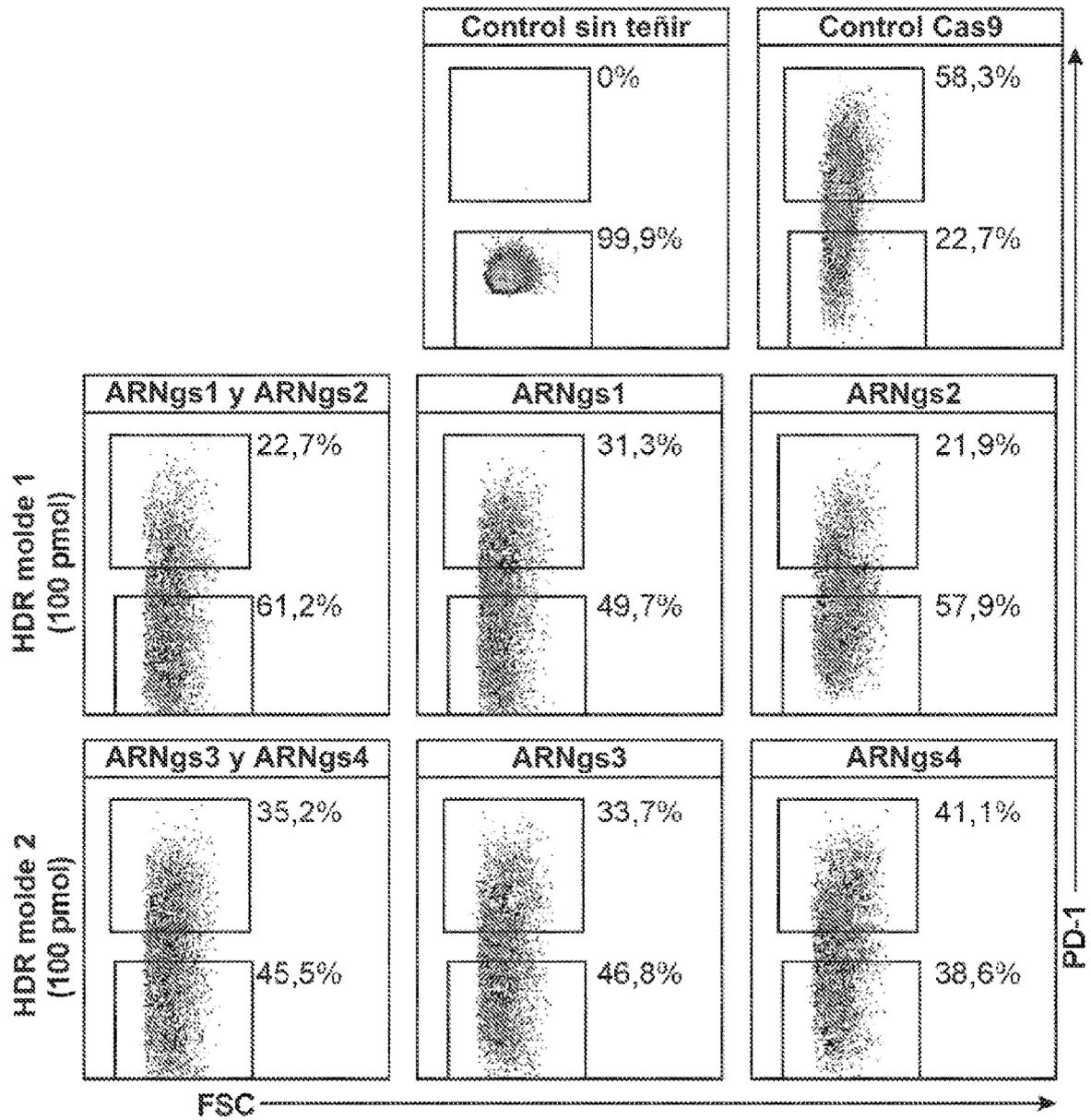


FIG. 5B

SQZ_Dextrano
Tef-SQZ con Cas9 o RNP3-2 +
dextrano 3k PB + dextrano 500k FITC;
células clasificadas doble positivas

RNP3 2
Cas9 ctrl FITC- FITC+

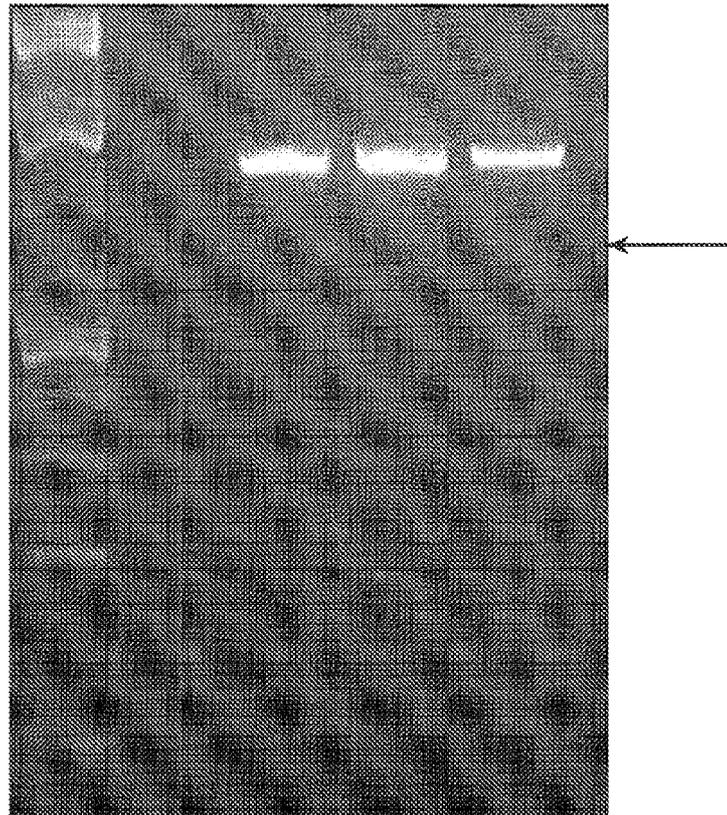


FIG. 6

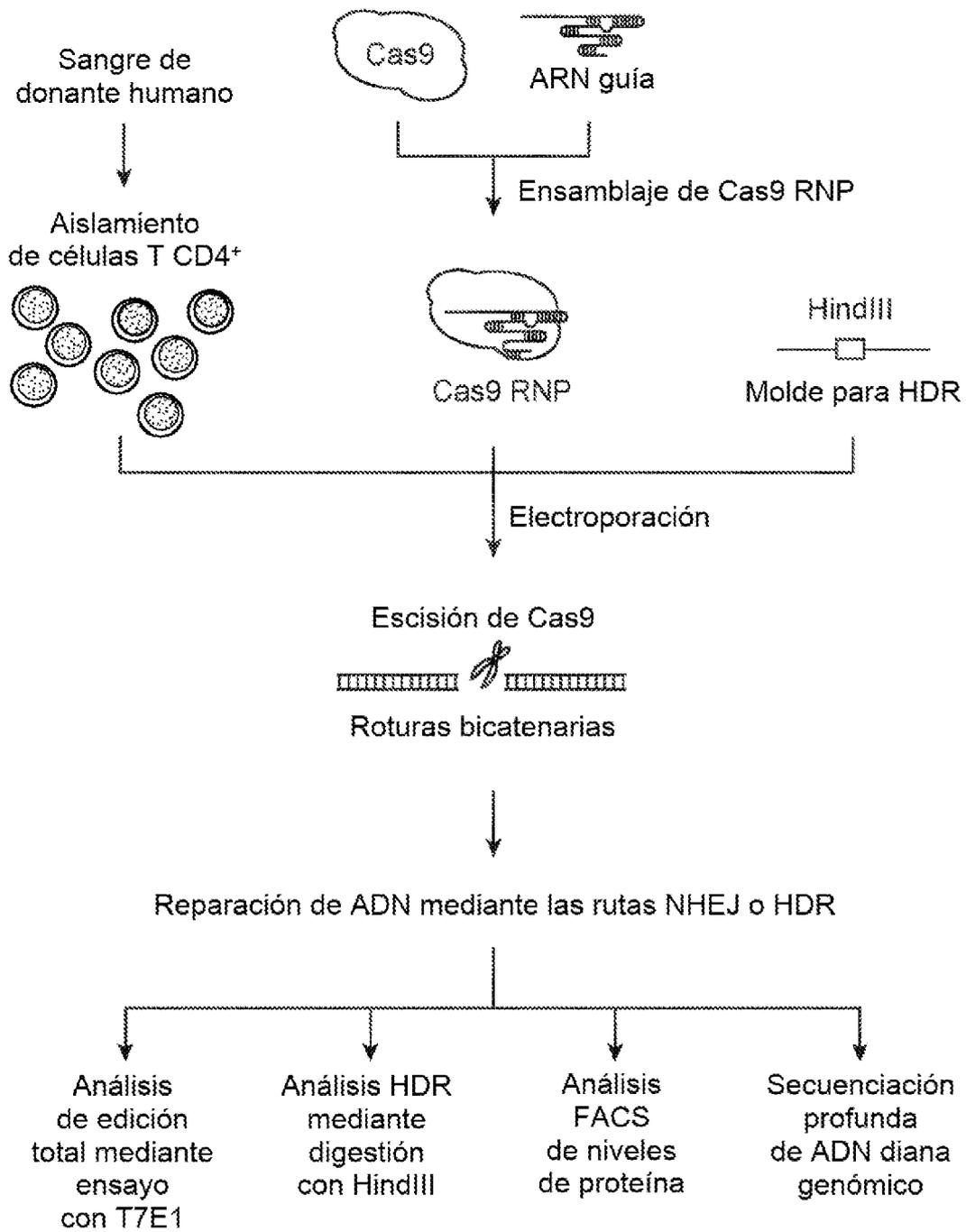


FIG. 7A

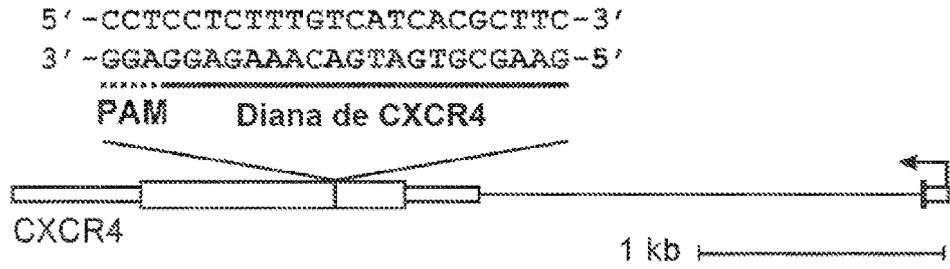


FIG. 7B

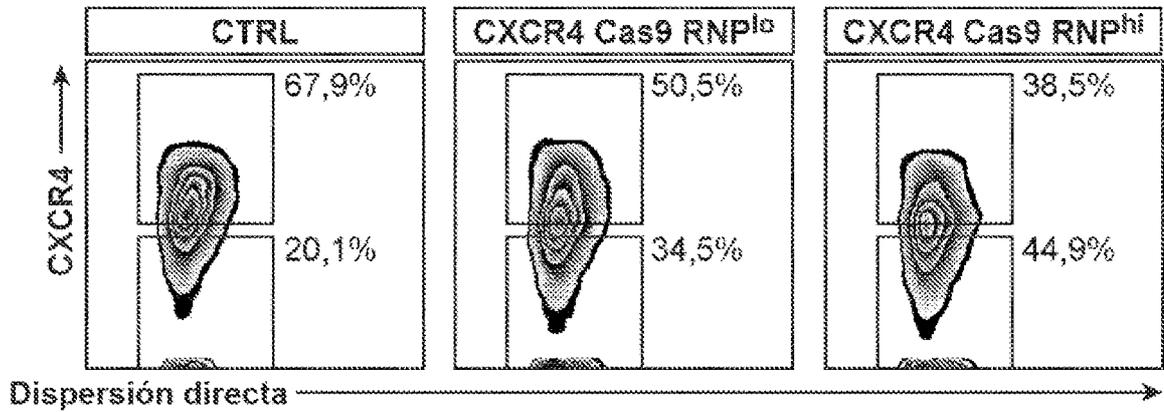


FIG. 7C

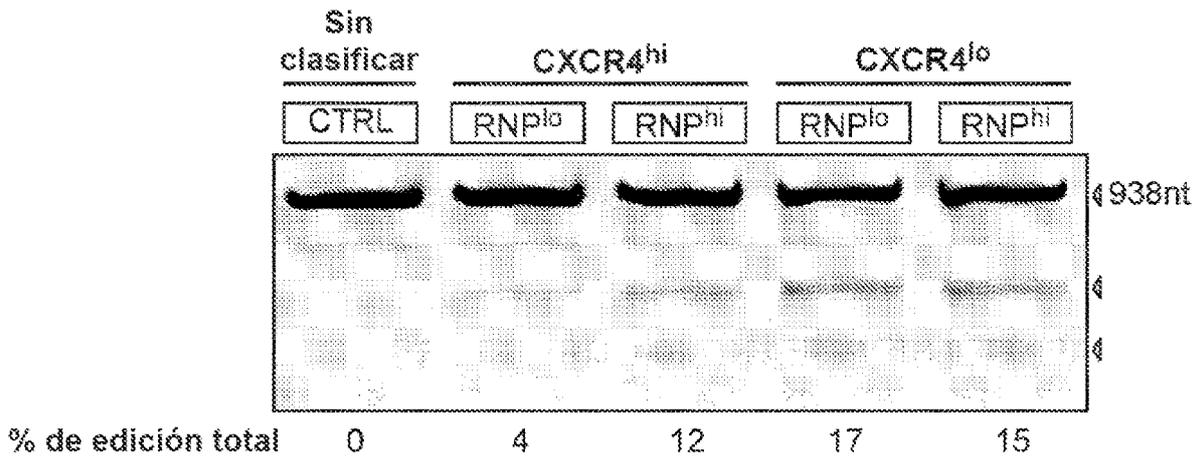


FIG. 7D

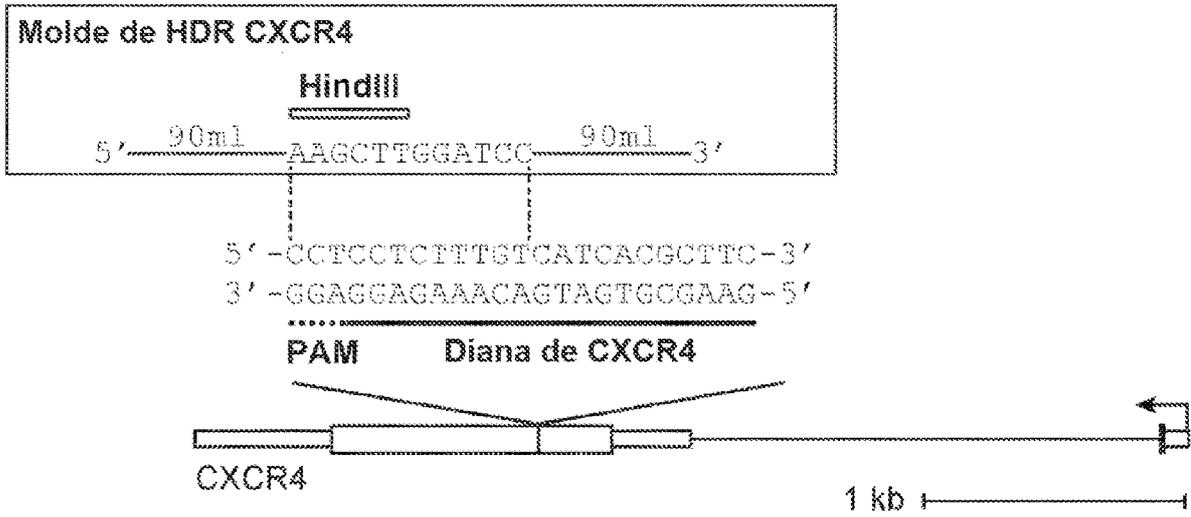


FIG. 8A

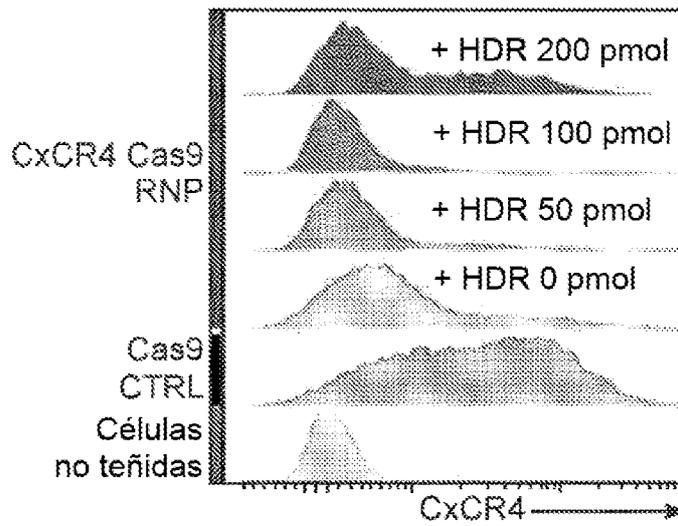


FIG. 8B

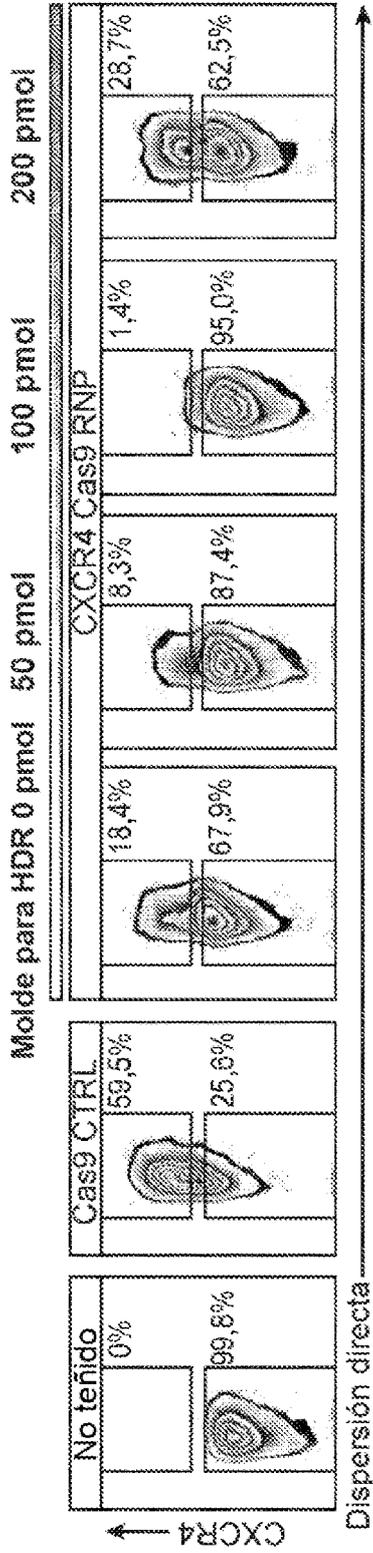


FIG. 8C

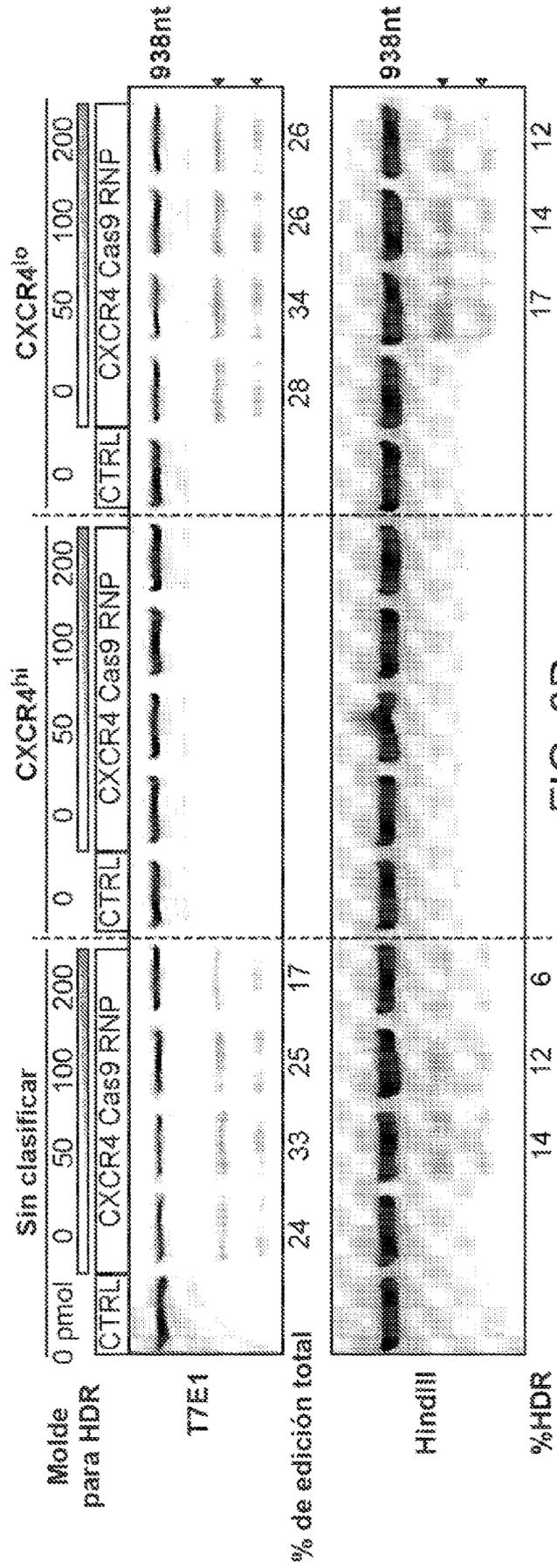


FIG. 8D

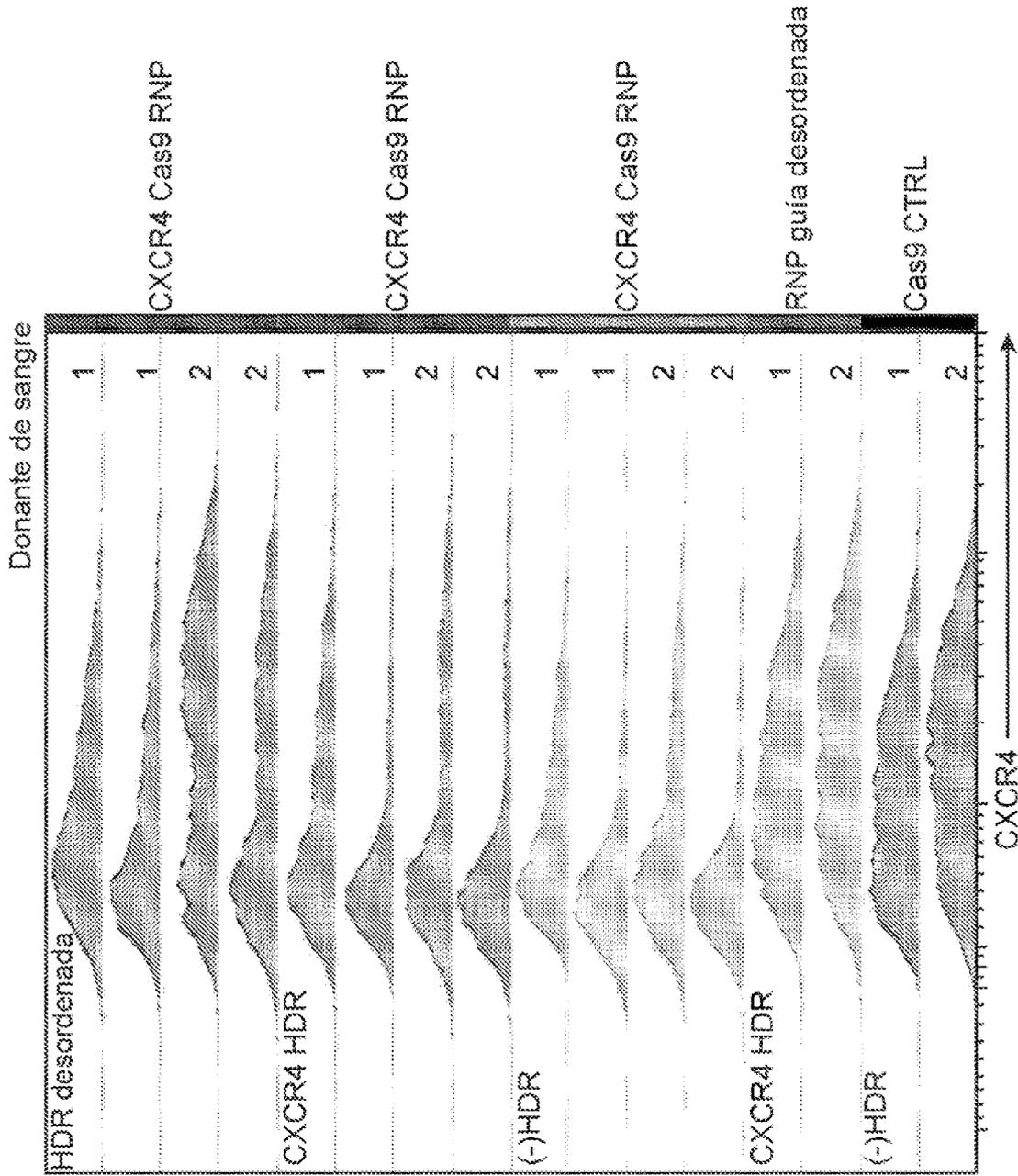


FIG. 9A

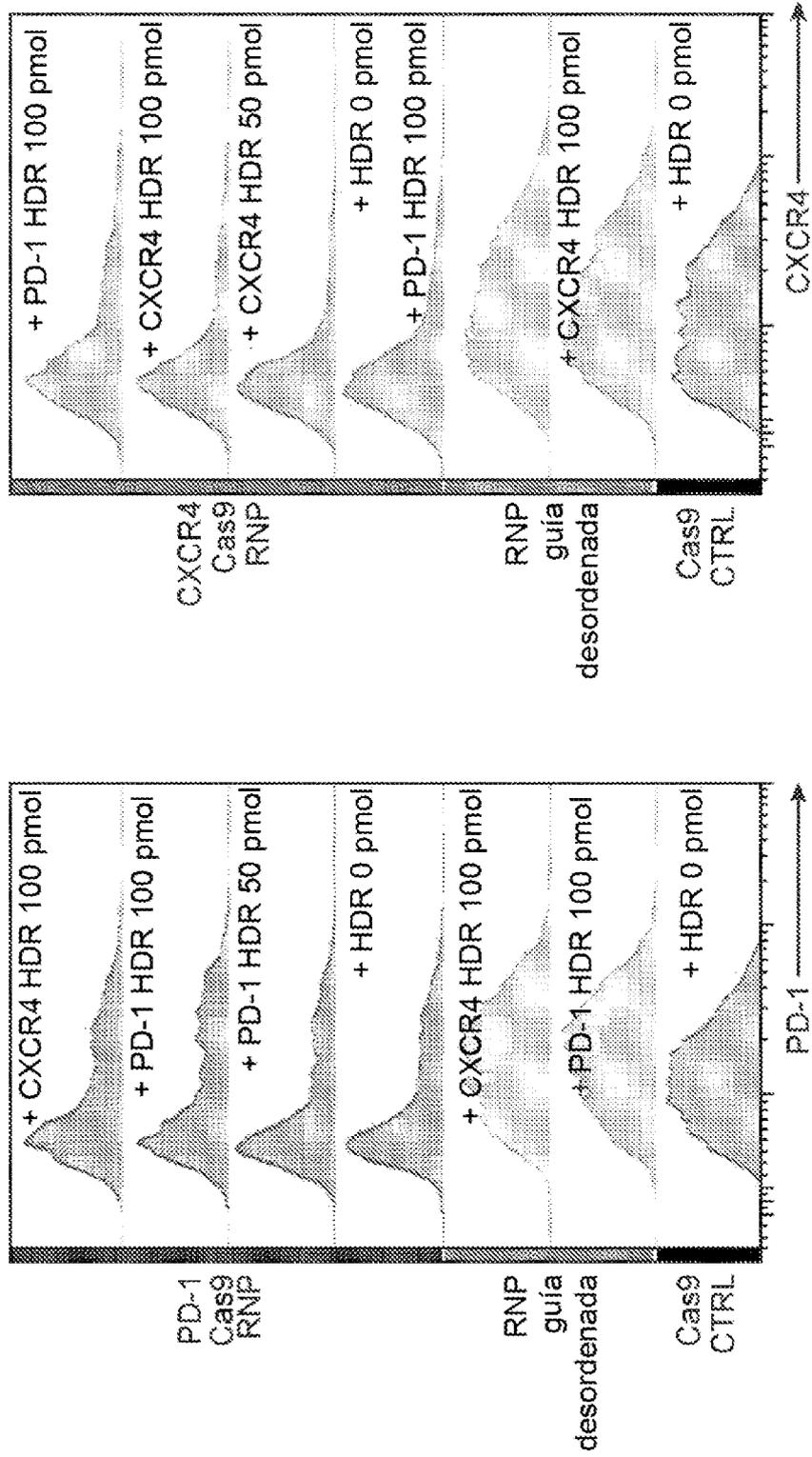


FIG. 9B

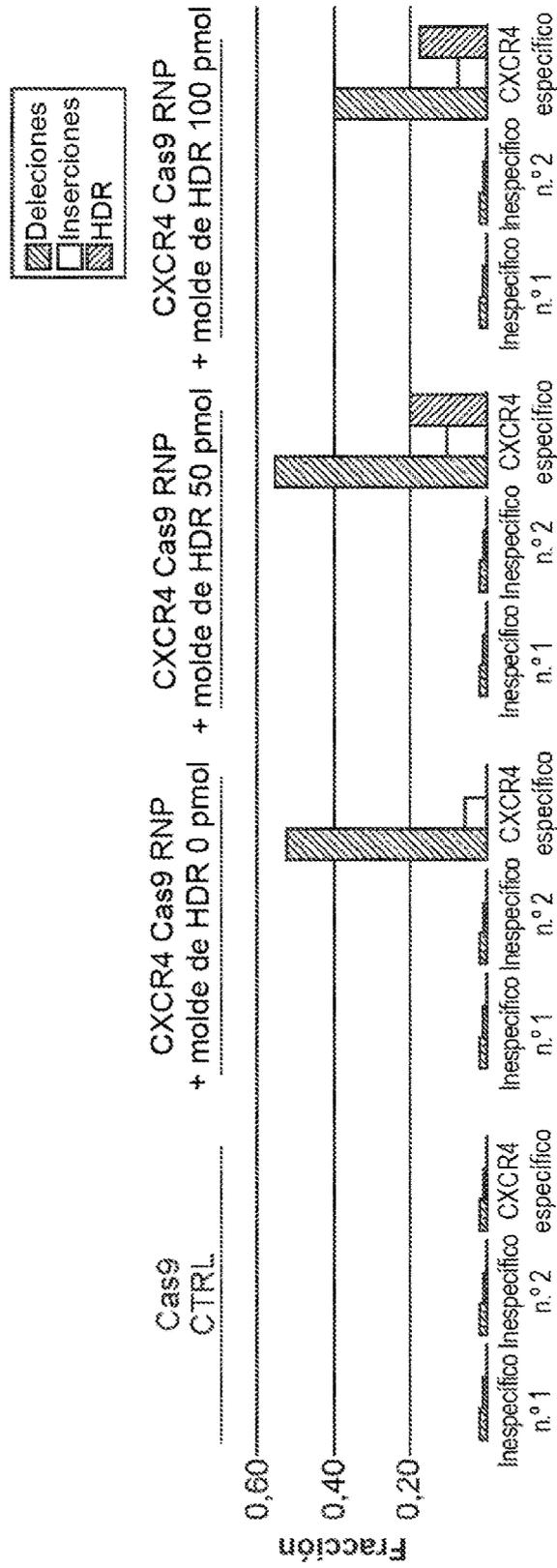


FIG. 10B

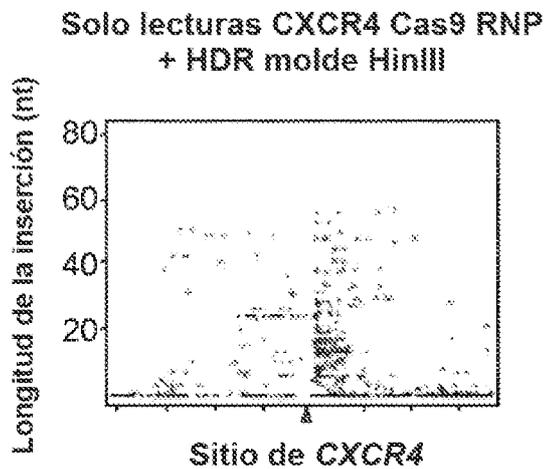
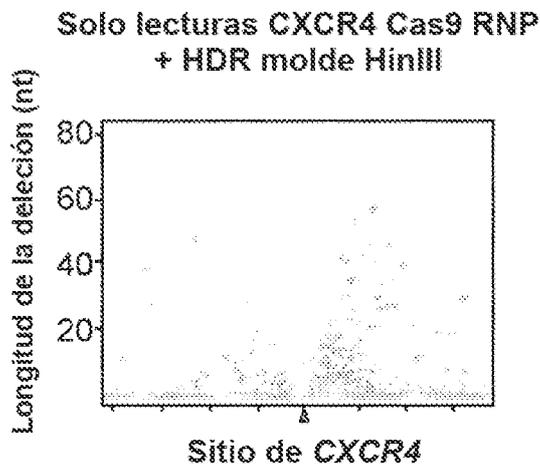
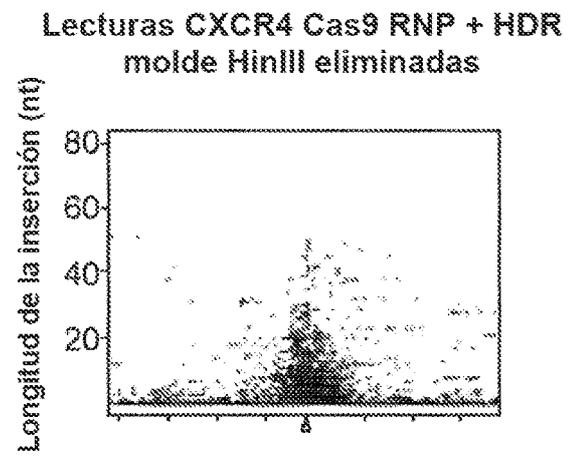
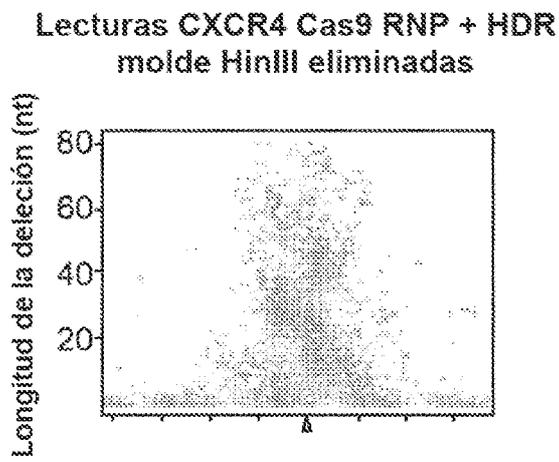
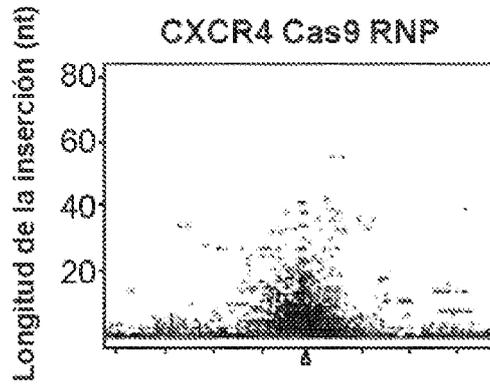
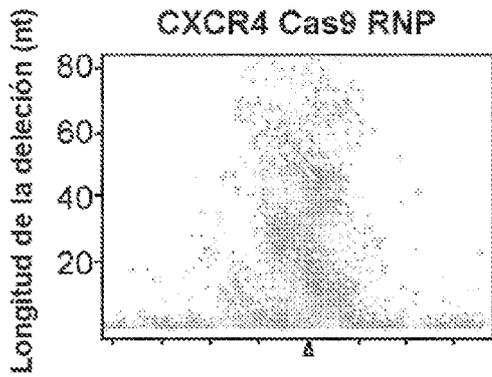
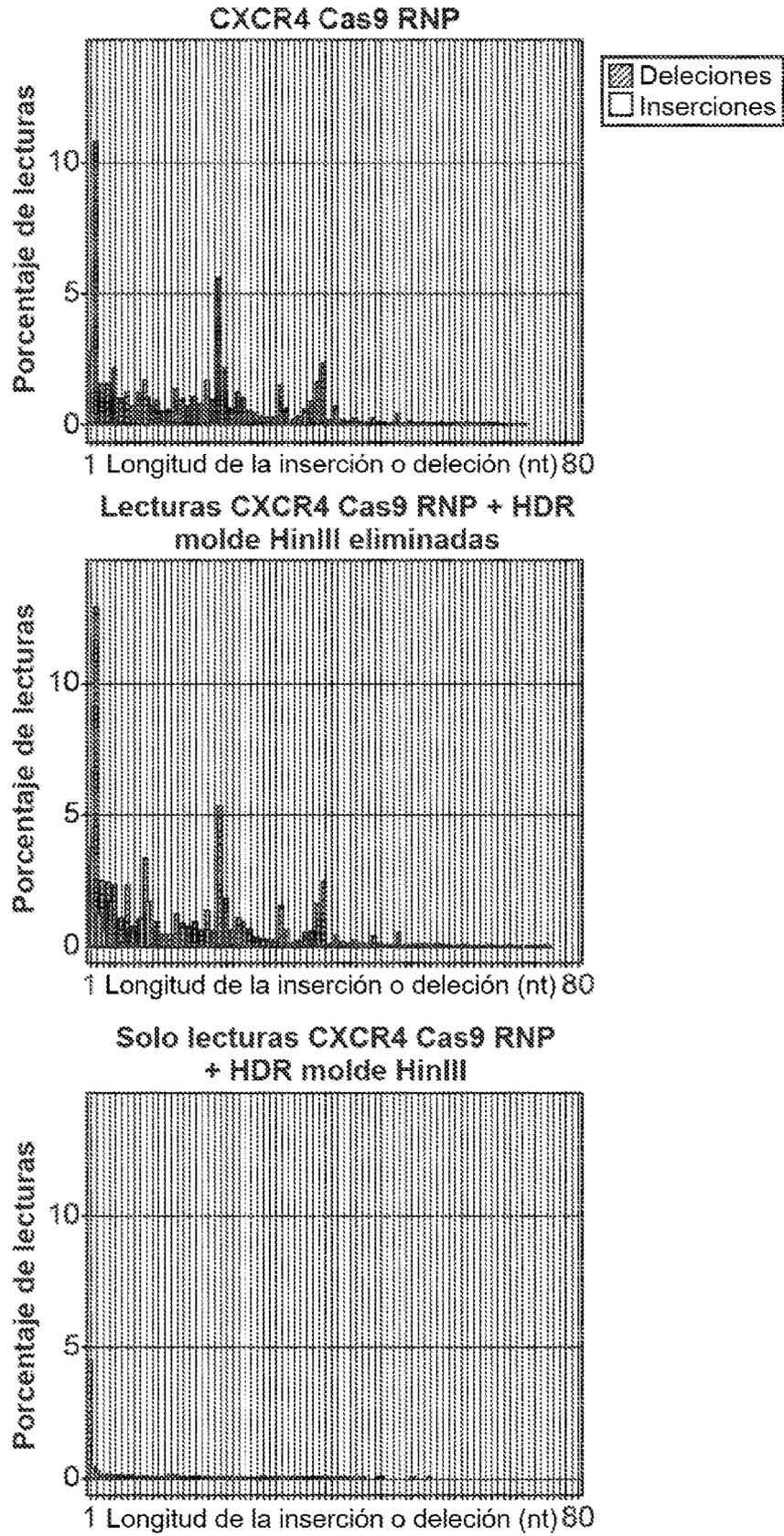


FIG. 10C

FIG. 10D



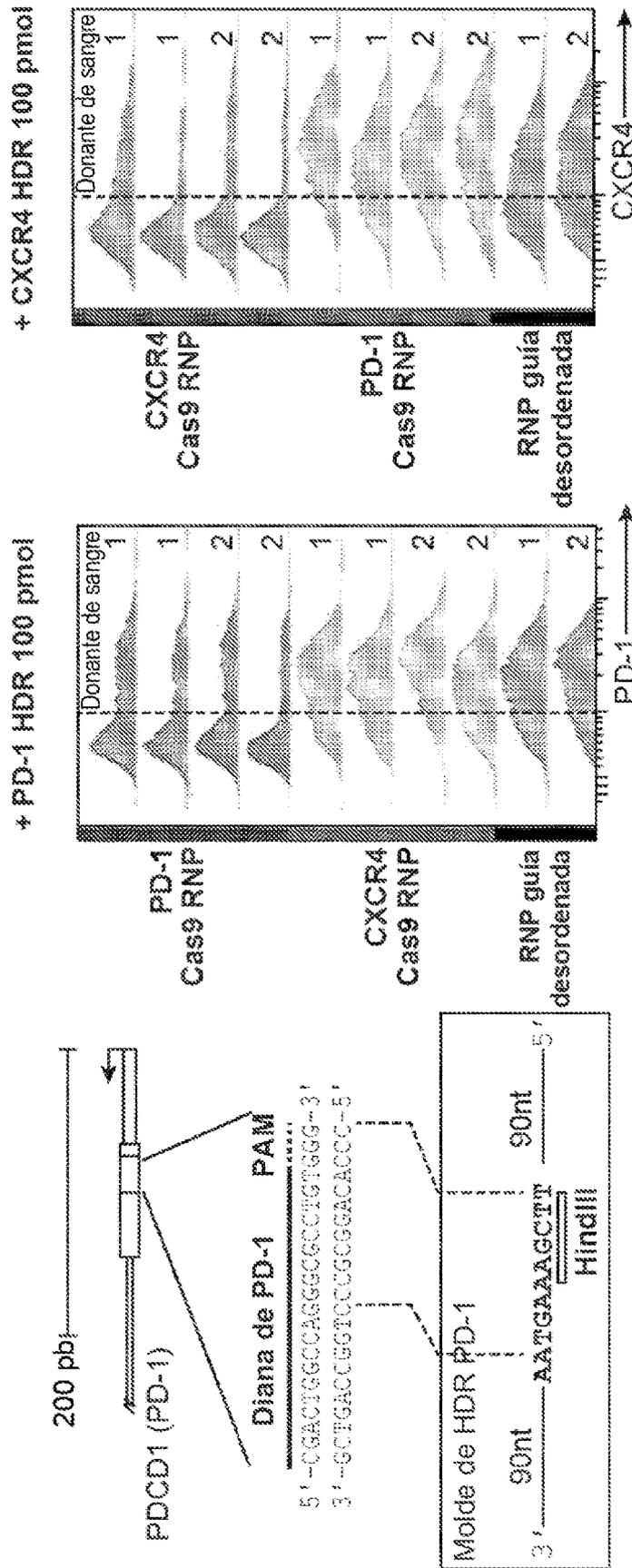


FIG. 12A

FIG. 12B

FIG. 12C

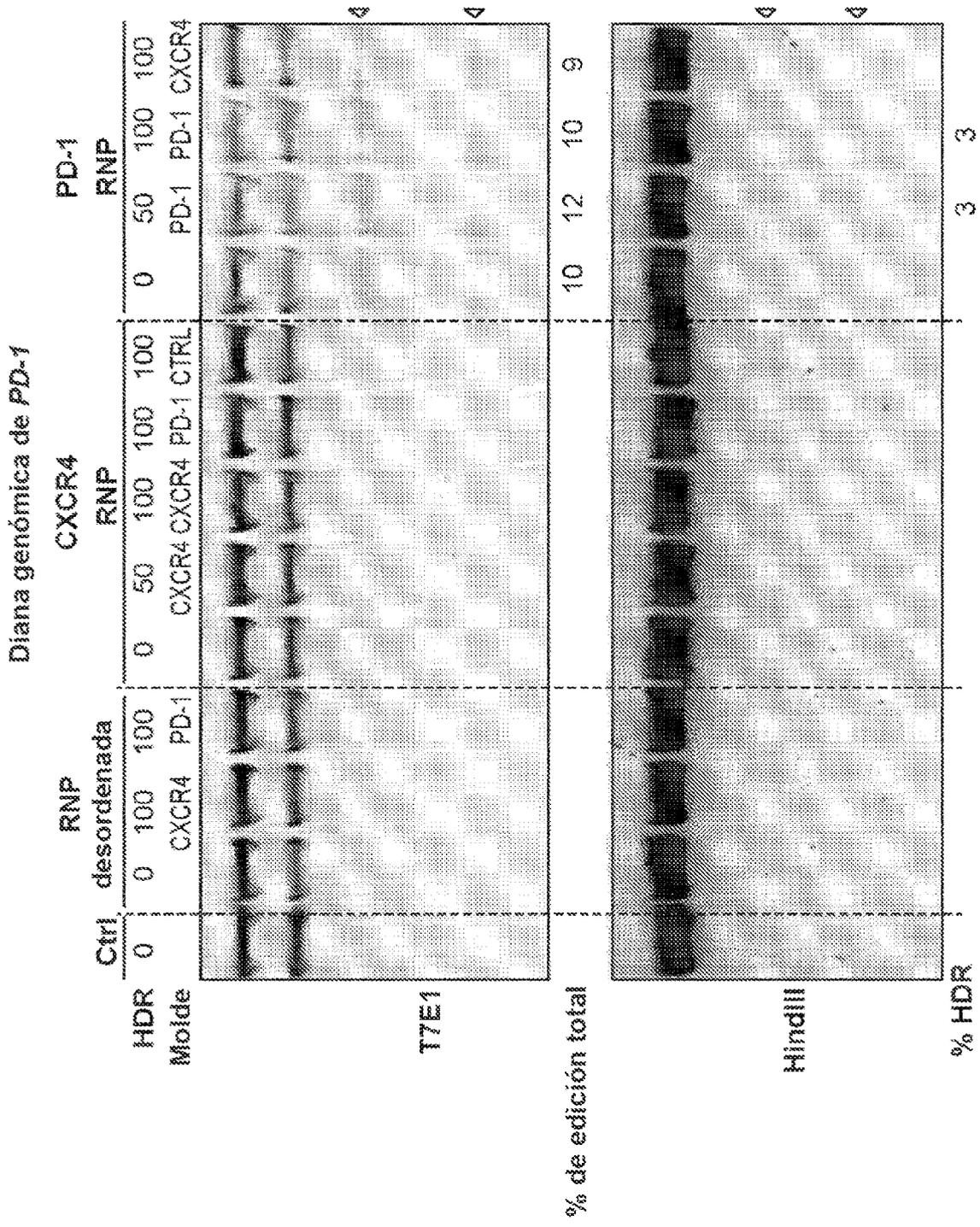


FIG. 12D

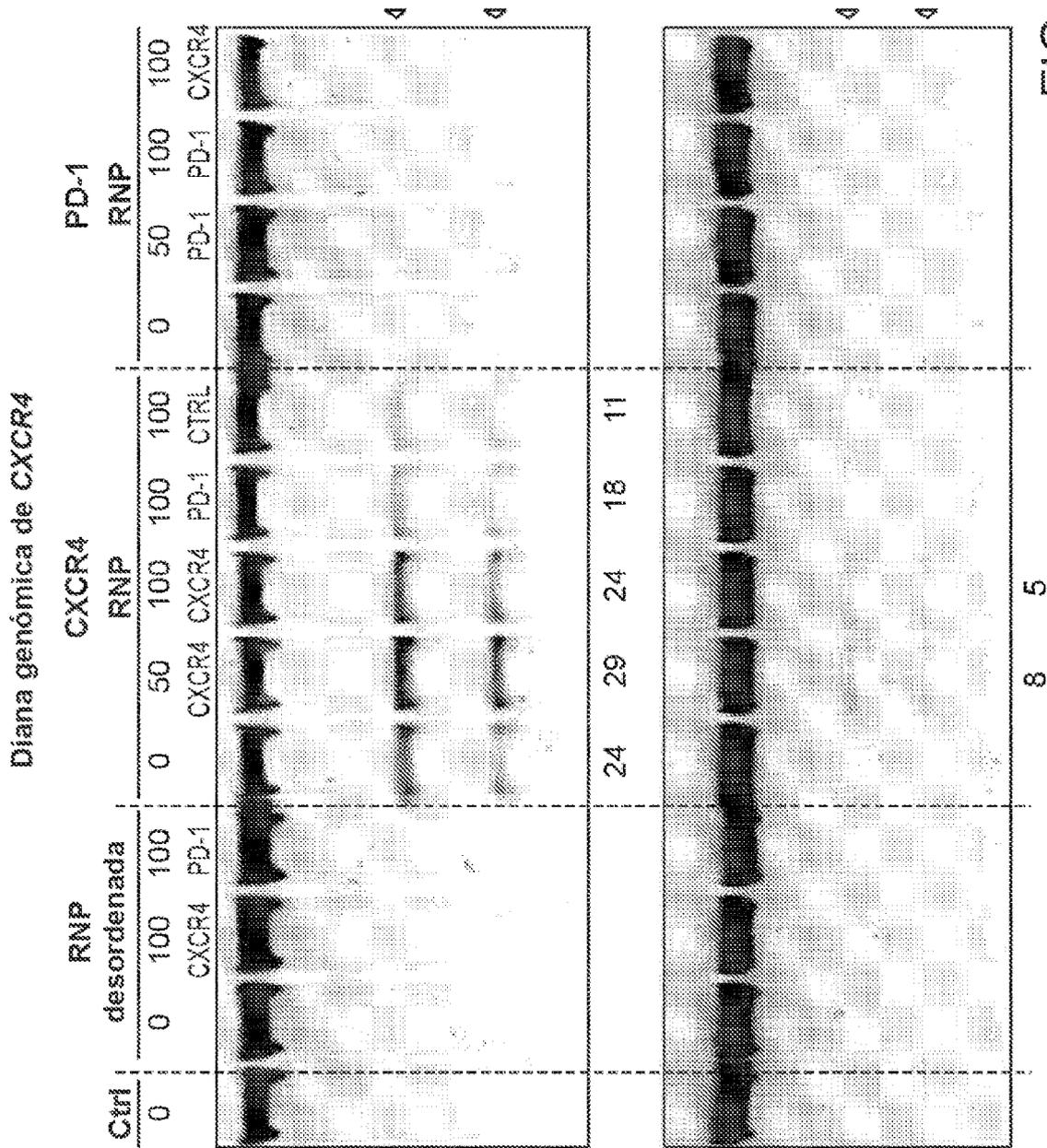


FIG. 12D (Cont.)