

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 901 000**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2016 PCT/US2016/068289**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017 WO17112859**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2016 E 16825979 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.09.2021 EP 3394253**

(54) Título: **Meganucleasas de ingeniería con secuencias de reconocimiento encontradas en el gen de la microglobulina beta-2 humana**

(30) Prioridad:

23.12.2015 US 201562387318 P
02.11.2016 US 201662416513 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2022

(73) Titular/es:

PRECISION BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
302 East Pettigrew Street, Dibrell Building, Suite A-100
Durham, NC 27701, US

(72) Inventor/es:

BARTSEVICH, VICTOR;
PHAM, CHRISTINA;
MARTIN, AARON;
JANTZ, DEREK;
SMITH, JAMES, JEFFERSON y
NICHOLSON, MICHAEL, G.

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 901 000 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Meganucleasas de ingeniería con secuencias de reconocimiento encontradas en el gen de la microglobulina beta-2 humana

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 La presente divulgación se refiere al campo de la biología molecular y la tecnología de ácidos nucleicos recombinantes. En particular, la presente divulgación se refiere a meganucleasas recombinantes de ingeniería para reconocer y escindir secuencias de reconocimiento que se encuentran en el gen de la microglobulina beta-2 humana. La presente divulgación se refiere además al uso de dichas meganucleasas recombinantes en procedimientos para producir células eucariotas modificadas genéticamente, y a una población de células modificadas genéticamente que tienen una expresión reducida de microglobulina beta-2 en la superficie celular.
- 10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- La inmunoterapia adoptiva con células T es un enfoque prometedor para el tratamiento del cáncer. Esta estrategia utiliza células T humanas aisladas que han sido modificadas genéticamente para mejorar su especificidad por un antígeno específico asociado al tumor. La modificación genética puede implicar la expresión de un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T exógeno para injertar la especificidad del antígeno en la célula T. A diferencia de los receptores exógenos de células T, los CAR derivan su especificidad de los dominios variables de un anticuerpo monoclonal. Así, las células T que expresan CARs inducen la inmunorreactividad del tumor de una manera no restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Hasta la fecha, la inmunoterapia adoptiva con células T se ha utilizado como terapia clínica para varios tipos de cáncer, incluyendo las neoplasias de células B (por ejemplo, la leucemia linfoblástica aguda (LLA), el linfoma no Hodgkin de células B (LNH) y la leucemia linfocítica crónica), el mieloma múltiple, el neuroblastoma, el glioblastoma, los gliomas avanzados, el cáncer de ovario, el mesotelioma, el melanoma y el cáncer de páncreas.

- A pesar de su utilidad potencial como tratamiento del cáncer, la inmunoterapia adoptiva se ha visto limitada, en parte, por la alorreactividad entre los tejidos del huésped y las células T CAR alogénicas. Una de las causas de la alorreactividad surge de la presencia de moléculas MHC de clase I que no son del huésped en la superficie celular de las células T CAR. Las moléculas MHC de clase I están formadas por dos cadenas polipeptídicas, α y β . En los seres humanos, la cadena α consta de tres subunidades, α_1 , α_2 y α_3 , que están codificadas por los genes polimórficos del antígeno leucocitario humano (HLA) en el cromosoma 6. La variabilidad de los loci HLA y de las subunidades de cadena α codificadas puede hacer que las células T CAR alogénicas sean vistas por el sistema inmunitario del huésped como células extrañas, ya que llevan moléculas MHC de clase I extrañas. Como resultado, las células T CAR administradas a un paciente pueden ser objeto de rechazo del huésped contra el injerto (HvG), donde son reconocidas y eliminadas por las células T citotóxicas del huésped.

- La cadena β de las moléculas MHC de clase I consiste en la microglobulina beta-2, que está codificada por el gen no polimórfico de la microglobulina beta-2 (B2M) en el cromosoma 15 (SEQ ID NO: 1). La microglobulina beta-2 está unida de forma no covalente a la subunidad α_3 y es común a todas las moléculas MHC de clase I. Además, la expresión de las moléculas MHC de clase I en la superficie celular requiere su asociación con la microglobulina beta-2. Como tal, la microglobulina beta-2 representa un objetivo lógico para suprimir la expresión de las moléculas MHC de clase I en las células T CAR, lo que podría hacer que las células fueran invisibles para las células T citotóxicas del huésped y reducir la alorreactividad.

- Otra causa de la alorreactividad a las células T CAR es la expresión del receptor endógeno de células T en la superficie celular. Los receptores de células T consisten típicamente en cadenas α y β variables o, en menor número, por cadenas γ y δ variables. El receptor de células T forma un complejo con proteínas accesorias, incluyendo la CD3, y funciona con los coreceptores de la superficie celular (por ejemplo, CD4 y CD8) para reconocer los antígenos unidos a las moléculas del CMH en las células presentadoras de antígenos. En el caso de las células T CAR alogénicas, la expresión de los receptores de células T endógenas puede hacer que la célula reconozca los antígenos del CMH del huésped tras su administración a un paciente, lo que puede provocar el desarrollo de una enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).

- Para evitar la alorreactividad, los ensayos clínicos se han centrado en gran medida en el uso de células T CAR autólogas, en las que se aíslan las células T de un donante, se modifican genéticamente para incorporar un receptor de antígeno quimérico y se reinfunden en el mismo sujeto. Un enfoque autólogo proporciona tolerancia inmunológica a las células T CAR administradas; sin embargo, este enfoque está limitado tanto por el tiempo como por el gasto necesario para producir células T CAR específicas para el paciente después de que se le haya diagnosticado el cáncer.

- Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar células T CAR alogénicas que carezcan de expresión de moléculas microglobulina beta-2 y MHC clase I, así como células que carezcan además de expresión de receptores de células T endógenas.

El documento WO 2008/102199 A1 divulga meganucleasas I-Crel variantes que pueden escindir el gen de la microglobulina beta-2.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación proporciona una meganucleasa recombinante que está diseñada para reconocer y escindir una secuencia de reconocimiento dentro del gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1). Dicha

5 meganucleasa es útil para interrumpir el gen de la microglobulina beta-2 y, en consecuencia, interrumpir la expresión y/o la función de los receptores endógenos de clase I del CMH. La escisión por meganucleasas puede alterar la función del gen, ya sea por la acción mutagénica de la unión en extremo no homóloga o por la promoción de la introducción de un polinucleótido exógeno en el gen a través de la recombinación homóloga. La presente divulgación proporciona además procedimientos que comprenden el suministro de una proteína meganucleasa recombinante, o de genes que

10 codifican una meganucleasa recombinante, a una célula eucariótica para producir una célula eucariótica modificada genéticamente.

La presente divulgación proporciona además células T CAR "disponibles en el mercado", preparadas utilizando células T de un tercer donante, que no son alorreactivas y no inducen el rechazo de HvG o la GVHD porque carecen de expresión de moléculas de microglobulina beta-2 y MHC de clase I y/o carecen además de expresión de receptores de células T endógenas. Estos productos pueden generarse y validarse antes del diagnóstico, y pueden ponerse a disposición de los pacientes tan pronto como sea necesario.

La presente divulgación se refiere además al uso de endonucleasas específicas del sitio, de corte raro y de anidamiento (también llamadas "meganucleasas") que están diseñadas para reconocer secuencias de ADN específicas en un locus de interés. Las endonucleasas de anidamiento son un grupo de nucleasas de origen natural que reconocen sitios de escisión de 15-40 pares de bases que se encuentran comúnmente en los genomas de plantas y hongos. Con frecuencia se asocian a elementos de ADN parásitos, como los intrones autoempalmados del grupo 1 y las inteínas. Promueven de forma natural la recombinación homóloga o la inserción de genes en lugares específicos del genoma del huésped al producir una rotura de doble cadena en el cromosoma, que recluta la maquinaria celular de reparación del ADN (Stoddard (2006), Q. Rev. Biophys. 38:49-95). Las endonucleasas de anidamiento se agrupan

20 comúnmente en cuatro familias: la familia LAGLIDADG (SEQ ID NO:11), la familia GIY-YIG, la familia His-Cys box y la familia HNH. Estas familias se caracterizan por motivos estructurales, que afectan a la actividad catalítica y a la secuencia de reconocimiento. Por ejemplo, los miembros de la familia LAGLIDADG (SEQ ID NO:11) se caracterizan por tener una o dos copias del motivo conservado LAGLIDADG (SEQ ID NO:11) (Chevalier et al. (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774). Las endonucleasas de referencia LAGLIDADG (SEQ ID NO:11) con una sola copia del motivo LAGLIDADG (SEQ ID NO:11) forman homodímeros, mientras que los miembros con dos copias del motivo LAGLIDADG (SEQ ID NO:11) se encuentran como monómeros.

30 Los procedimientos para producir meganucleasas recombinantes de ingeniería y específicas para cada sitio son conocidos en la técnica. I-Crel (SEQ ID NO:10) es un miembro de la familia LAGLIDADG (SEQ ID NO:11) de endonucleasas de anidamiento que reconoce y corta una secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases en el cromosoma del cloroplaso del alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Se han utilizado técnicas de selección genética para modificar la preferencia del sitio de escisión de I-Crel de tipo salvaje (Sussman et al. (2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41 Chames et al. (2005), Nucleic Acids Res. 33: e178 Seligman et al. (2002), Nucleic Acids Res. 30: 3870-9, Arnould et al. (2006), J. Mol. Biol. 355: 443-58). Más recientemente, se describió un procedimiento de diseño racional de las endonucleasas de anidamiento mono-LAGLIDADG (SEQ ID NO:11) que es capaz de rediseñar exhaustivamente la I-Crel y otras endonucleasas de anidamiento para dirigirse a sitios de ADN ampliamente divergentes, incluyendo sitios en genomas de mamíferos, levaduras, plantas, bacterias y virus (WO 2007/047859).

40 Como se describe por primera vez en el documento WO 2009/059195I-Crel y sus derivados de ingeniería son normalmente diméricos, pero pueden fusionarse en un solo polipéptido utilizando un enlace peptídico corto que une el terminal C de una primera subunidad con el terminal N de una segunda subunidad (Li, et al. (2009) Nucleic Acids Res. 37:1650-62; Grizot, et al. (2009) Nucleic Acids Res. 37:5405-19.) Así, una meganucleasa funcional de "cadena única" puede expresarse a partir de un único transcripto. Estas meganucleasas de ingeniería presentan una frecuencia extremadamente baja de corte de dianas ajenas. Mediante el suministro de un gen que codifica una meganucleasa de cadena única a una célula, es posible dirigirse específica y preferentemente, escindir e interrumpir el gen de la microglobulina beta-2.

50 El uso de meganucleasas de ingeniería para escindir dianas de ADN en el gen de la microglobulina beta-2 humana se divulgó previamente en la Publicación Internacional No WO 2008/102199 ("la solicitud '199") y WO 2008/102274 ("la solicitud '274"). La solicitud '199 y la solicitud '274 divulan cada una de las variantes de I-Crel que tienen sustituciones de aminoácidos que pretenden aumentar la selectividad de la meganucleasa para las secuencias de reconocimiento que se encuentran en el gen de la microglobulina beta-2. Sin embargo, las meganucleasas descritas sólo demostraron tener actividad contra las dianas de ADN de la microglobulina beta-2 en sistemas de células informadoras de levadura o CHO. La presente divulgación mejora las enseñanzas de la técnica anterior al proporcionar meganucleasas recombinantes que direccionan y escinden eficazmente secuencias de reconocimiento en el gen de la microglobulina beta-2 en células T humanas.

Así, en un aspecto, la divulgación proporciona una meganucleasa recombinante que reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento dentro del gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1). Dicha meganucleasa recombinante comprende una primera subunidad y una segunda subunidad, en la que la primera subunidad se une a un primer semi-sitio de reconocimiento de la secuencia de reconocimiento y comprende una primera región hipervariable (HVR1), y en la que la segunda subunidad se une a un segundo semi-sitio de reconocimiento de la secuencia de reconocimiento y comprende una segunda región hipervariable (HVR2), y en la que dicha meganucleasa recombinante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.

La secuencia de reconocimiento consiste en la SEQ ID NO:2 (es decir, la secuencia de reconocimiento B2M 13-14).

5 10 En una de estas realizaciones, la primera subunidad de meganucleasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de identidad de secuencia con los residuos 198-344 de la SEQ ID NO:12, y la segunda subunidad de meganucleasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de identidad de secuencia con los residuos 7-153 de la SEQ ID NO:12.

15 20 En otra realización de este tipo, la región HVR1 comprende Y en una posición correspondiente a la posición 215 de la SEQ ID NO:12. En otra realización de este tipo, la región HVR1 comprende F en una posición correspondiente a la posición 261 de la SEQ ID NO:12. En otra realización de este tipo, la región HVR1 comprende una o más de Y y F en las posiciones correspondientes a las posiciones 215 y 261, respectivamente, de la SEQ ID NO:12.

25 25 En otra realización de este tipo, la región HVR2 comprende Y en una posición correspondiente a la posición 24 de la SEQ ID NO:12. En otra realización de este tipo, la región HVR2 comprende Y en una posición correspondiente a la posición 42 de la SEQ ID NO:12.

En otra realización de este tipo, la región HVR1 comprende los residuos 215-270 de la SEQ ID NO:12. En otra realización de este tipo, la región HVR2 comprende los residuos 24-79 de la SEQ ID NO:12.

30 35 En otra realización de este tipo, la primera subunidad de meganucleasa comprende los residuos 198-344 de la SEQ ID NO:12. En otra realización de este tipo, la segunda subunidad de meganucleasas comprende los residuos 7-153 de la SEQ ID NO:12.

En otra realización, la meganucleasa recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa recombinante descrita en el presente documento.

40 45 En los diversos aspectos de la presente divulgación, el polinucleótido es un ARNm. En una realización, el ARNm puede codificar una única meganucleasa recombinante descrita en el presente documento. En otras realizaciones, el ARNm es un ARNm policistrónico (por ejemplo, bicistrónico, tricistrónico, etc.) que codifica al menos una meganucleasa descrita en el presente documento y un gen adicional. En realizaciones particulares, un ARNm policistrónico puede codificar dos o más meganucleasas de la presente divulgación que se dirigen a diferentes secuencias de reconocimiento dentro del mismo gen. En otras realizaciones, un ARNm policistrónico puede codificar una meganucleasa descrita en el presente documento y una segunda nucleasa que se dirige a una secuencia de reconocimiento diferente dentro del mismo gen o, alternativamente, se dirige a una secuencia de reconocimiento diferente dentro de otro gen. En una realización específica, un ARNm policistrónico puede codificar una meganucleasa descrita en el presente documento que reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento B2M descrita en el presente documento y una nucleasa que reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento dentro de la región constante del receptor de células T alfa.

50 55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un constructo de ADN recombinante que comprende un polinucleótido aislado, en el que el polinucleótido aislado comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa recombinante descrita en el presente documento. En una realización, el constructo de ADN recombinante codifica un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral puede ser un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector adenoviral o un vector viral adeno-asociado (AAV). En una realización particular, el vector viral es un vector AAV recombinante.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vector viral que comprende un polinucleótido aislado, en el que el polinucleótido aislado comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa recombinante descrita en el presente documento. En una realización, el vector viral es un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector adenoviral o un vector AAV. En una realización particular, el vector viral es un vector AAV recombinante.

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir una célula eucariota genéticamente modificada que comprende una secuencia exógena de interés insertada en un cromosoma de la célula eucariota, comprendiendo el procedimiento transfectar una célula eucariota con uno o más ácidos nucleicos que incluyen: (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa recombinante descrita en el presente

documento; y (b) una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de interés; en la que la meganucleasa recombinante produce un sitio de escisión en el cromosoma en una secuencia de reconocimiento que consiste en la SEQ ID NO:2, y en la que la secuencia de interés se inserta en el cromosoma en el sitio de escisión.

5 En una realización del procedimiento, la expresión de microglobulina beta-2 en la superficie celular se reduce en comparación con una célula de control.

En otra realización del procedimiento, la célula modificada genéticamente presenta una alorreactividad reducida y/o una alogenidad reducida cuando se introduce en un huésped o cuando se administra a un sujeto, en comparación con una célula de control.

10 En otra realización del procedimiento, el ácido nucleico que comprende la secuencia de interés comprende además secuencias homólogas a las secuencias que flanquean el sitio de escisión, y la secuencia de interés se inserta en el sitio de escisión por recombinación homóloga.

En otra realización del procedimiento, el ácido nucleico que comprende la secuencia de interés carece de homología sustancial con el sitio de escisión, y la secuencia de interés se inserta en el cromosoma por unión en extremo no homóloga.

15 En otra realización del procedimiento, la secuencia de interés codifica un receptor de antígeno quimérico. En otra realización del procedimiento, la secuencia de interés codifica un receptor de células T exógeno.

En otra realización del procedimiento, al menos el ácido nucleico que comprende la secuencia de interés se introduce en la célula eucariota mediante un vector viral. En otra realización del procedimiento, la secuencia de ácido nucleico que codifica la meganucleasa recombinante y la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de interés se introducen en la célula eucariota mediante el mismo vector viral o, alternativamente, mediante vectores virales separados. En algunas realizaciones del procedimiento, el vector viral es un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector adenoviral o un vector AAV. En determinadas realizaciones del procedimiento, el vector viral es un vector AAV recombinante.

25 En otra realización del procedimiento, al menos el ácido nucleico que codifica la secuencia de interés se introduce en la célula eucariota utilizando una plantilla de ADN de cadena simple.

En otra realización del procedimiento, la célula eucariota es una célula T humana, o una célula derivada de ella.

En otra realización del procedimiento, la célula eucariota ha sido modificada genéticamente para mostrar una expresión reducida en la superficie celular de un receptor endógeno de células T en comparación con una célula de control.

30 En otro aspecto, el procedimiento puede comprender además: (a) transfectar la célula eucariota con un ácido nucleico que codifica una endonucleasa que reconoce y escinde una segunda secuencia de reconocimiento; o (b) introducir en la célula eucariota una endonucleasa que reconoce y escinde una segunda secuencia de reconocimiento; en la que la segunda secuencia de reconocimiento está localizada en un gen que codifica un componente de un receptor endógeno de células T, y en la que la célula eucariota modificada genéticamente presenta una expresión reducida de microglobulina beta-2 y del receptor endógeno de células T en la superficie celular en comparación con una célula de control.

35 En una de estas realizaciones, la endonucleasa es una meganucleasa recombinante. En otra de dichas realizaciones, la segunda secuencia de reconocimiento se localiza en el gen de la región constante del receptor de células T humano alfa, como se establece en la SEQ ID NO:127. En otra realización de este tipo, la segunda secuencia de reconocimiento puede comprender las SEQ ID NO:128, 129 o 130 (es decir, las secuencias de reconocimiento TRC 1-2, TRC 3-4 y TRC 5-6, respectivamente).

40 En otra realización de este tipo, el ácido nucleico es un ARNm policistrónico que codifica tanto una meganucleasa recombinante descrita en el presente documento como la endonucleasa que reconoce y escinde una segunda secuencia de reconocimiento.

45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir una célula eucariota modificada genéticamente que comprende una secuencia exógena de interés insertada en un cromosoma de la célula eucariota, comprendiendo el procedimiento: (a) introducir una meganucleasa recombinante descrita en el presente documento en una célula eucariota; y (b) transfectar la célula eucariota con un ácido nucleico que comprende una secuencia de interés; en la que la meganucleasa recombinante produce un sitio de escisión en el cromosoma en una secuencia de reconocimiento que consiste en la SEQ ID NO:2, y en la que la secuencia de interés se inserta en el cromosoma en el sitio de escisión.

50 En una realización del procedimiento, la expresión de microglobulina beta-2 en la superficie celular se reduce en comparación con una célula de control.

En otra realización del procedimiento, la célula modificada genéticamente presenta una alorreactividad reducida y/o una alogenidad reducida cuando se introduce en un huésped o cuando se administra a un sujeto, en comparación con una célula de control.

- 5 En otra realización del procedimiento, el ácido nucleico que comprende la secuencia de interés comprende además secuencias homólogas a las secuencias que flanquean el sitio de escisión, y la secuencia de interés se inserta en el sitio de escisión por recombinación homóloga.
 - 10 En otra realización del procedimiento, el ácido nucleico que comprende la secuencia de interés carece de homología sustancial con el sitio de escisión, y la secuencia de interés se inserta en el cromosoma por unión en extremo no homóloga.
 - 15 En otra realización del procedimiento, la secuencia de interés codifica un receptor de antígeno quimérico. En otra realización del procedimiento, la secuencia de interés codifica un receptor de células T exógeno.
 - 20 En otra realización del procedimiento, el ácido nucleico que comprende la secuencia de interés se introduce en la célula eucariota mediante un vector viral. En algunas realizaciones del procedimiento, el vector viral es un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector adenoviral o un vector AAV. En determinadas realizaciones, el vector viral es un vector AAV recombinante.
 - 25 En otra realización del procedimiento, el ácido nucleico que codifica la secuencia de interés se introduce en la célula eucariota utilizando una plantilla de ADN monocatenario.
 - 30 En otra realización del procedimiento, la célula eucariota es una célula T humana, o una célula derivada de ella.
 - 35 En otra realización del procedimiento, la célula eucariota ha sido modificada genéticamente para mostrar una expresión reducida en la superficie celular de un receptor endógeno de células T en comparación con una célula de control.
 - 40 En otra realización, el procedimiento puede comprender además: (a) transfectar la célula eucariota con un ácido nucleico que codifica una endonucleasa que reconoce y escinde una segunda secuencia de reconocimiento; o (b) introducir en la célula eucariota una endonucleasa que reconoce y escinde una segunda secuencia de reconocimiento; en la que la segunda secuencia de reconocimiento está localizada en un gen que codifica un componente de un receptor endógeno de células T, y en la que la célula eucariota modificada genéticamente presenta una expresión reducida de microglobulina beta-2 y del receptor endógeno de células T en la superficie celular en comparación con una célula de control.
 - 45 En una de estas realizaciones, la endonucleasa es una meganucleasa recombinante. En otra de dichas realizaciones, la segunda secuencia de reconocimiento se localiza en el gen de la región constante del receptor de células T humano alfa, como se establece en la SEQ ID NO:127. En otra realización de este tipo, la segunda secuencia de reconocimiento puede comprender las SEQ ID NO:128, 129 o 130 (es decir, las secuencias de reconocimiento TRC 1-2, TRC 3-4 y TRC 5-6, respectivamente).
 - 50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir una célula eucariota modificada genéticamente mediante la interrupción de una secuencia diana en un cromosoma de la célula eucariota, comprendiendo el procedimiento transfectar la célula eucariota con un ácido nucleico que codifica una meganucleasa recombinante descrita en el presente documento o, alternativamente, introducir una meganucleasa recombinante descrita en el presente documento en la célula eucariota; en el que la meganucleasa produce un sitio de escisión en el cromosoma en una secuencia de reconocimiento que consiste en la SEQ ID NO:2, y en el que la secuencia diana se interrumpe por unión en extremo no homólogo en el sitio de escisión. En dicho procedimiento, la célula eucariota modificada genéticamente presenta una expresión reducida de microglobulina beta-2 en la superficie celular en comparación con una célula de control.
- En una realización del procedimiento, la célula modificada genéticamente presenta una alorreactividad reducida y/o una alogenidad reducida cuando se introduce en un huésped o cuando se administra a un sujeto, en comparación con una célula de control.
- En otra realización del procedimiento, la célula eucariota es una célula T humana, o una célula derivada de ella.
- En otra realización del procedimiento, la célula eucariota ha sido modificada genéticamente para mostrar una expresión reducida en la superficie celular de un receptor endógeno de células T en comparación con una célula de control.
- En otra realización, el procedimiento comprende además: (a) transfectar la célula eucariota con un ácido nucleico que codifica una endonucleasa que reconoce y escinde una segunda secuencia de reconocimiento; o (b) introducir en la célula eucariota una endonucleasa que reconoce y escinde una segunda secuencia de reconocimiento. En dicha realización, la endonucleasa es una meganucleasa recombinante. En otra realización de este tipo, la segunda secuencia de reconocimiento se localiza en un gen que codifica un componente de un receptor endógeno de células

T, y la célula eucariota modificada genéticamente presenta una expresión reducida en la superficie celular tanto de la microglobulina beta-2 como del receptor endógeno de células T en comparación con una célula de control.

En dicha realización, el ácido nucleico es un ARNm policistrónico que codifica tanto una meganucleasa recombinante descrita en el presente documento como la endonucleasa que reconoce y escinde una segunda secuencia de reconocimiento.

En otra realización del procedimiento, la célula eucariota expresa un receptor de antígeno quimérico de superficie celular. En otra realización del procedimiento, la secuencia de interés codifica un receptor de células T exógeno.

En otra realización, el procedimiento comprende además transfectar la célula eucariota con un ácido nucleico que comprende una secuencia exógena de interés. En dicha realización, el ácido nucleico que comprende la secuencia exógena de interés comprende además secuencias homólogas a las secuencias que flanquean el segundo sitio de escisión, y la secuencia de interés se inserta en el segundo sitio de escisión por recombinación homóloga. En otra realización de este tipo, el ácido nucleico que comprende la secuencia de interés carece de homología sustancial con el sitio de escisión, y la secuencia de interés se inserta en el cromosoma por unión en extremo no homóloga.

En otra realización de este tipo, la secuencia exógena de interés codifica un receptor de antígeno quimérico. En otra realización de este tipo, el exógeno de interés codifica un receptor de células T exógeno.

En otra realización de este tipo, al menos el ácido nucleico que comprende la secuencia exógena de interés se introduce en la célula eucariota mediante un vector viral. En otra realización de este tipo, la secuencia de ácido nucleico que codifica la endonucleasa y la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de interés se introducen en la célula eucariota mediante el mismo vector viral o, alternativamente, mediante vectores virales separados. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector adenoviral o un vector AAV. En una realización particular, el vector viral es un vector AAV recombinante.

En otra realización de este tipo, el ácido nucleico que codifica la secuencia de interés se introduce en la célula eucariota utilizando una plantilla de ADN monocatenario.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una célula modificada genéticamente que comprende en su genoma un gen de microglobulina beta-2 humana modificado, en el que el gen de microglobulina beta-2 modificado comprende de 5' a 3': (a) una región 5' del gen de la microglobulina beta-2 humana; b) un polinucleótido exógeno; y c) una región 3' del gen de la microglobulina beta-2 humana. La célula modificada genéticamente puede ser una célula T humana modificada genéticamente o una célula modificada genéticamente derivada de una célula T humana. Además, la célula modificada genéticamente puede tener una expresión reducida de microglobulina beta-2 en la superficie celular en comparación con una célula de control no modificada.

En una realización, el polinucleótido exógeno comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno químico, en el que el receptor de antígeno químico comprende un dominio de unión al ligando extracelular y uno o más dominios de señalización intracelular.

El polinucleótido exógeno se inserta en el gen de la microglobulina beta-2 en una posición dentro de una secuencia de reconocimiento que consiste en la SEQ ID NO:2 (es decir, la secuencia de reconocimiento B2M 13-14).

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una célula eucariota modificada genéticamente descrita en el presente documento para su uso como medicamento. En una de estas realizaciones, el medicamento es útil en el tratamiento del cáncer. En otra realización, el medicamento es útil en el tratamiento del cáncer mediante inmunoterapia.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de células eucariotas modificadas genéticamente. En una realización, la población comprende al menos 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^9 , 2×10^9 , 5×10^9 , o más, células eucariotas modificadas genéticamente.

En otra realización, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o más de las células eucariotas modificadas genéticamente en la población exhiben una expresión de superficie celular reducida de un receptor de células T endógeno en comparación con una célula de control, y al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o más de las células eucariotas modificadas genéticamente exhiben una expresión de superficie celular reducida de microglobulina beta-2 en comparación con una célula de control.

En otra realización, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o más de las células eucariotas expresan un receptor de antígeno químico.

En otra realización, las células eucariotas modificadas genéticamente son células T modificadas genéticamente, o células derivadas de ellas.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula eucariota modificada genéticamente, o una población de células eucariotas modificadas genéticamente, descrita en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, las células eucariotas modificadas genéticamente son células T modificadas genéticamente, o células derivadas de ellas. En determinadas

5 realizaciones, las células T modificadas genéticamente expresan un receptor de antígeno quimérico y presentan una expresión reducida en la superficie celular de microglobulina beta-2 y un receptor de células T endógeno. Dichas composiciones farmacéuticas de la divulgación son adecuadas para su uso como inmunoterapia para el tratamiento del cáncer.

10 En otros aspectos, las células T modificadas genéticamente muestran una alorreactividad reducida y/o una alogenicidad reducida cuando se introducen en un huésped o cuando se administran a un sujeto, en comparación con las células de control.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica descrita en el presente documento para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita. Este procedimiento representa la inmunoterapia para el tratamiento del cáncer.

15 En algunas realizaciones, un receptor de antígeno quimérico divulgado en el presente documento comprende al menos un dominio o fracción de unión al ligando extracelular y un dominio intracelular que comprende uno o más dominios de señalización y/o dominios coestimuladores. En algunas realizaciones, el dominio o la fracción de unión al ligando extracelular tiene la forma de un fragmento variable de cadena única (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal, que proporciona especificidad para un epítopo o antígeno particular (por ejemplo, un epítopo o antígeno presente preferentemente en la superficie de una célula, como una célula cancerosa u otra célula o partícula causante de la enfermedad). El scFv se une a través de una secuencia enlazadora. El dominio de unión al ligando extracelular es específico para cualquier antígeno o epítopo de interés. En algunas realizaciones, el scFv está humanizado o es totalmente humano. El dominio extracelular de un receptor de antígeno quimérico también puede comprender un autoantígeno (véase, Payne et al. (2016) Science, Vol. 353 (6295): 179-184), que es reconocido por los receptores de 20 células B específicos del autoantígeno en los linfocitos B, dirigiendo así a las células T para que se dirijan específicamente a los linfocitos B autorreactivos y los eliminen en las enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos. Dichos CARs se denominan receptores químicos de autoanticuerpos (CAARs), y su uso está abarcado 25 en la presente divulgación.

30 Lo anterior y otros aspectos y realizaciones de la presente divulgación pueden entenderse más plenamente por referencia a la siguiente descripción detallada y a las reivindicaciones. Ciertas características de la divulgación, que, para mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Todas las combinaciones de las realizaciones están específicamente comprendidas en la presente divulgación y se divulan aquí como si todas y cada una de las combinaciones se divulgaran individual y explícitamente. A la inversa, diversas características de la divulgación, que se describen, por brevedad, en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier 35 subcombinación adecuada. Todas las subcombinaciones de características enumeradas en las realizaciones también están específicamente incluidas en la presente divulgación y se divulan aquí como si todas y cada una de dichas subcombinaciones se divulgaran individualmente y explícitamente en este documento. Las realizaciones de cada uno de los aspectos de la presente divulgación divulgados aquí se aplican a cada uno de los otros aspectos de la divulgación *mutatis mutandis*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Secuencias de reconocimiento de B2M en el gen de la microglobulina beta-2 humana. Cada secuencia de reconocimiento a la que se dirige una meganucleasa recombinante de la divulgación comprende dos medios sitios de reconocimiento. Cada semisitio de reconocimiento comprende 9 pares de bases, separados 45 por una secuencia central de 4 pares de bases. La secuencia de reconocimiento B2M 13-14 (SEQ ID NO:2) abarca los nucleótidos 9115-9136 del gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1), y comprende dos medios sitios de reconocimiento denominados B2M13 y B2M14. La secuencia de reconocimiento B2M 5-6 (SEQ ID NO:4) abarca los nucleótidos 8951-8972 del gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1), y comprende dos medios sitios de reconocimiento denominados B2M5 y B2M6. La secuencia de reconocimiento B2M 7-8 (SEQ ID NO:6) abarca los nucleótidos 9182-9203 del gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1), y comprende dos medios sitios de reconocimiento denominados B2M7 y B2M8. La secuencia de reconocimiento B2M 11-12 (SEQ ID NO:8) abarca los nucleótidos 5057-5078 del gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1), y comprende dos medios sitios de reconocimiento denominados B2M11 y B2M12.

55 Fig. 2. Las meganucleasas recombinantes de la divulgación comprenden dos subunidades, en las que la primera subunidad que comprende la región HVR1 se une a un primer semisitio de reconocimiento (por ejemplo, B2M13, B2M5, B2M7 o B2M11) y la segunda subunidad que comprende la región HVR2 se une a un segundo semisitio de reconocimiento (por ejemplo, B2M14, B2M6, B2M8 o B2M12). En las realizaciones en las que la meganucleasa recombinante es una meganucleasa de cadena única, la primera subunidad que

comprende la región HVR1 puede colocarse como subunidad N-terminal o C-terminal. Asimismo, la segunda subunidad que comprende la región HVR2 puede situarse como subunidad N-terminal o C-terminal.

Fig. 3. Esquema del ensayo informador en células CHO para evaluar meganucleasas recombinantes dirigidas a secuencias de reconocimiento encontradas en el gen de la microglobulina beta-2 (SEQ ID NO:1). Para las meganucleasas recombinantes aquí descritas, se produjo una línea celular CHO en la que se integró de forma estable un casete informador en el genoma de la célula. El casete informador comprendía, en orden de 5' a 3': un promotor temprano de SV40; los 5' 2/3 del gen GFP; la secuencia de reconocimiento para una meganucleasa de ingeniería de la divulgación (por ejemplo, la secuencia de reconocimiento B2M 13-14, la secuencia de reconocimiento B2M 5-6, la secuencia de reconocimiento B2M 7-8 o la secuencia de reconocimiento B2M 11-12); la secuencia de reconocimiento para la meganucleasa CHO-23/24 (WO/2012/167192); y los 3' 2/3 del gen GFP. Las células transfectadas de forma estable con este casete no expresaron GFP en ausencia de un agente inductor de la rotura del ADN. Las meganucleasas se introdujeron por transducción de ADN plasmídico o ARNm que codifica cada meganucleasa. Cuando se indujo una rotura de ADN en cualquiera de las secuencias de reconocimiento de la meganucleasa, las regiones duplicadas del gen GFP se recombinaron entre sí para producir un gen GFP funcional. El porcentaje de células que expresan GFP podría entonces determinarse mediante citometría de flujo como una medida indirecta de la frecuencia de escisión del genoma por las meganucleasas.

Figs. 4A-4J. Eficiencia de las meganucleasas recombinantes para reconocer y escindir secuencias de reconocimiento en el gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1) en un ensayo de informador de células CHO. Cada una de las meganucleasas recombinantes expuestas en las SEQ ID NOs:12-126 fueron diseñadas para dirigirse a la secuencia de reconocimiento B2M 13-14 (SEQ ID NO:2), a la secuencia de reconocimiento B2M 5-6 (SEQ ID NO:4), a la secuencia de reconocimiento B2M 7-8 (SEQ ID NO:6), o a la secuencia de reconocimiento B2M 11-12 (SEQ ID NO:8), y se comprobó su eficacia en el ensayo informador de células CHO. Los resultados mostrados proporcionan el porcentaje de células que expresan GFP observadas en cada ensayo, lo que indica la eficacia de cada meganucleasa para escindir una secuencia de reconocimiento de la microglobulina beta-2 o la secuencia de reconocimiento de CHO-23/24. También se incluyó un control negativo (B2M bs) en cada ensayo. A) Meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento B2M 5-6. B) Meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento B2M 7-8. C) Meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento B2M 11-12. D-J) Meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento B2M 13-14.

Figs. 5A-5N. Eficacia de las meganucleasas recombinantes B2M 13-14 para inhibir la expresión de la superficie celular de la microglobulina beta-2 en células T humanas. 5A-5N) Las células T humanas CD3⁺ del donante fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y luego electroporadas con ARNm que codifica una meganucleasa B2M 13-14 determinada. Como control positivo, las células fueron electroporadas de forma simulada. En un control adicional de la eficacia de la electroporación, las células fueron electroporadas con ARNm que codificaba GFP. A los 3 días de la electroporación, las células se tiñeron con un anticuerpo que reconocía la microglobulina beta-2 y se analizaron por citometría de flujo.

Figs. 6A-6J. Eficacia de las meganucleasas recombinantes B2M 13-14 para inhibir la expresión de la superficie celular de la microglobulina beta-2 en células T humanas. Se diseñaron meganucleasas B2M 13-14 adicionales en las que la primera subunidad de la meganucleasa seguía siendo la misma que en B2M 13-14x.93, pero la segunda subunidad de la meganucleasa contenía nuevas sustituciones de aminoácidos en las posiciones de contacto con la secuencia de reconocimiento de B2M 13-14. 6A-6J) Las células T humanas CD3⁺ del donante se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y luego se electroporaron con ARNm que codificaba una meganucleasa B2M 13-14 determinada (1µg) utilizando el nucleofector Amaxa 4D (Lonza) según las instrucciones del fabricante. Se incluyó el B2M 13-14x.93 QE para poder compararlo con las variantes anteriores. A los 6 días de la electroporación, las células se tiñeron con un anticuerpo que reconocía la microglobulina beta-2, así como con un anticuerpo que reconoce la CD3. Los datos se presentan mediante gráficos de citometría de flujo.

Figs. 7A-7H. Eficacia de las meganucleasas recombinantes B2M 13-14 para inhibir la expresión de la superficie celular de la microglobulina beta-2 en células T humanas. Se generaron más meganucleasas B2M 13-14 y se evaluó su capacidad para eliminar la expresión de microglobulina beta-2 en la superficie de las células T humanas. Estas nucleasas se basaron en B2M 13-14x.169. Se realizaron sustituciones de aminoácidos en la primera subunidad de la meganucleasa para introducir contactos de base alternativos, mientras que la segunda subunidad de la meganucleasa siguió siendo la misma que en B2M 13-14x.169. 7A-7H) Las células T humanas CD3⁺ del donante fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y después se electroporaron con ARNm que codificaba una meganucleasa B2M 13-14 determinada utilizando el nucleofector Amaxa 4D. B2M 13-14x.202 se incluyó para permitir la comparación con las variantes anteriores mostradas en las Figs. 6A-6J. Las células se tiñeron con un anticuerpo que reconoce la microglobulina beta-2, así como con un anticuerpo que reconoce la CD3. Se muestran los datos de citometría de flujo para las meganucleasas B2M 13-14 que mostraron una eficiencia de con eliminación de B2M de >40 %.

- 5 Figs. 8A-8D. Doble knockout de la microglobulina beta-2 y del receptor de células T en células T humanas mediante nucleofección simultánea de dos ARNm que codifican diferentes meganucleasas. Las células T humanas CD3⁺ del donante se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 2 días, y luego se coelectroporaron con ARNm que codifica B2M 13-14x.202 y ARNm que codifica TRC 1-2x.87 EE utilizando el nucleofector Amaxa 4D. Como controles, las células T humanas fueron electroporadas de forma simulada o electroporadas con ARNm que codificaba una única meganucleasa, ya sea B2M 13-14x.202 o TRC 1-2x.87 EE. A los 6 días de la electroporación, las células se tiñeron con un anticuerpo contra CD3 y un anticuerpo contra B2M y se analizaron por citometría de flujo. A) Células electroporadas de prueba. B) Células nucleofectadas con TRC 1-2x.87 EE. C) Células B2M 13-14x.202 nucleofectadas. D) Células doblemente nucleofectadas con B2M 13-14x.202 y TRC 1-2x.87 EE.
- 10 Figs. 9A-9D. Doble knockout de la microglobulina beta-2 y del receptor de células T en células T humanas mediante nucleofección simultánea de dos ARNm que codifican diferentes meganucleasas. Las células T humanas CD3⁺ del donante se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 2 días, y luego se coelectroporaron con ARNm que codifica B2M 13-14x.169 y ARNm que codifica TRC 1-2x.87 EE utilizando el nucleofector Amaxa 4D. Como controles, las células T humanas fueron electroporadas de forma simulada o electroporadas con ARNm que codificaba una sola meganucleasa, ya sea B2M 13-14x. 169 o TRC 1-2x.87 EE. A los 6 días de la electroporación, las células se tiñeron con un anticuerpo contra CD3 y un anticuerpo contra B2M y se analizaron por citometría de flujo. A) Células nucleofectadas de prueba. B) Células nucleofectadas con TRC 1-2x.87 EE. C) Células B2M 13-14x.169 nucleofectadas. D) Células doblemente nucleofectadas con B2M 13-14x.169 y TRC 1-2x.87 EE.
- 15 Figs. 10A-10C. Doble knockout de la microglobulina beta-2 y del receptor de células T en células T humanas mediante nucleofección secuencial. Las células T humanas CD3⁺ del donante fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y luego se electroporaron con ARNm que codificaba B2M 13-14x.93 QE utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector. A los 4 días de la electroporación, se enriquecieron las células B2M negativas utilizando un anticuerpo anti-B2M biotinilado y un kit de cóctel de selección de biotina humana. Las células enriquecidas B2M-negativas se volvieron a estimular con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y luego se electroporaron con ARNm que codifica TRC 1-2x.87 EE utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector. A los 5 días de la electroporación, las células se tiñeron con anticuerpos contra B2M y TCR y se analizaron por citometría de flujo. A) Células nucleofectadas de prueba. B) Células B2M 13-14x.93 QE nucleofectadas. C) Células doblemente nucleofectadas con B2M 13-14x.93 QE y TRC 1-2x.87 EE.
- 20 30 Figs. 11A-11C. Enriquecimiento de una población de doble knockout de microglobulina beta-2 y receptor de células T. Las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) del donante se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 2 días, y luego se electroporaron con ARNm que codifica B2M 13-14x.93 QE utilizando el nucleofector Amaxa 4D. Se enriquecieron las células B2M-negativas, se reestimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días y se electroporaron con ARNm que codifica TRC 1-2x.87 EE. A los 6 días después de la electroporación, se enriquecieron las células CD3 negativas utilizando un kit de selección positiva de CD3, seguido de otro enriquecimiento de células B2M negativas utilizando un anticuerpo anti-B2M biotinilado y un kit de selección de biotina. Las células enriquecidas se incubaron durante 3 días en presencia de IL-2, IL-7 e IL-15, luego se tiñeron con anticuerpos contra B2M y CD3 y se analizaron por citometría de flujo. A) PBMC no nucleofectadas teñidas con el anticuerpo anti-CD3. B) PBMC no nucleofectadas teñidas con anticuerpos anti-CD3 y anti-B2M. C) Población enriquecida de células de doble knock de microglobulina beta-2 y receptor de células T teñidas con anticuerpos anti-CD3 y anti-B2M.
- 25 35 40 Figs. 12A-12H. Alogenidad reducida de las células T con eliminación de B2M. La alogenidad de las células T con eliminación de B2M se determinó en un ensayo de citotoxicidad alogénica utilizando células T de dos donantes (donante 36 y donante 75) y células dendríticas no coincidentes de otro donante. La citotoxicidad se midió mediante la señal VAD-FMK-FITC. A) Células T de tipo salvaje; células efectoras y donantes del donante 36. B) Células T de tipo salvaje; células efectoras del donante 36, células diana del donante 75. C) Células T de tipo salvaje; células efectoras y donantes del donante 75. D) Células T de tipo salvaje; células efectoras del donante 75, células diana del donante 36. E) Células T con eliminación de B2M; células efectoras y donantes del donante 36. F) Células T con eliminación de B2M; células efectoras del donante 36, células diana del donante 75. G) Células T con eliminación de B2M; células efectoras y donantes del donante 75. H) Células T B2M knockout; células efectoras del donante 75, células diana del donante 36.
- 45 50 55 Fig. 13. Alogenidad reducida de las células T con eliminación de B2M. Citotoxicidad determinada por la secreción de IFN-γ medida por ELISA.
- 55 Fig. 14. Alogenidad reducida de las células T con eliminación de B2M. Citotoxicidad determinada por la secreción de LDH.
- 60 Figs. 15A-15N. Eliminación simultánea de TRC y B2M utilizando ARNm bicistrónico. Las células T humanas del donante fueron electroporadas con 1μg de ARNm TRC1-2x.87EE o ARN B2M13-14x.479. Se electroporó una muestra adicional de células con 1 μg de cada uno de los ARNm de las nucleasas. Como controles, se

electroporaron células T humanas en ausencia de ARNm. A los 3 y 7 días después de la electroporación, las células electroporadas con ARNm bicistrónico se tiñeron con un anticuerpo contra CD3 (para determinar la anulación de TRC) y un anticuerpo contra B2M y se analizaron por citometría de flujo. A) Tratada de forma simulada. B) B2M 13-14x.479. C) TRC 1-2x.87 EE. D) TRC 1-2x.87 EE y B2M 13-14x.479. E) B2M-IRES-TRC. F) B2M-E2A-TRC. G) B2M-F2A-TRC. H) B2M-P2A-TRC. I) B2M-T2A-TRC. J) TRC-IRES-B2M. K) TRC-E2A-B2M. L) TRC-F2A-B2M. M) TRC-P2A-B2M. N) TRC-T2A-B2M.

Figs. 16A-16P. Valoración del ARNm bicistrónico en células T. Se introdujeron los ARNm B2M-IRES-TRC, B2M-T2A-TRC, TRC-P2A-B2M o TRC-T2A-B2M en células T humanas de donantes a concentraciones crecientes, y se determinó el porcentaje de anulación de CD3 de la superficie celular (indicando la anulación de TRC) y B2M. Para comparar, las células T humanas del donante fueron electroporadas con 1 μ g de TRC1-2x.87EE o 1 μ g de B2M13-14x.479. Además, las células T humanas del donante fueron electroporadas con ambas nucleasas codificadas en moléculas de ARN separadas, utilizando dosis de 0,5 μ g de cada nucleasa o 1 μ g de cada nucleasa. Como controles, se electroporaron células T humanas sin ARN. A los 7 días después de la electroporación, se enumeraron las células y se evaluó la viabilidad con azul tripán. Las células se tiñeron con un anticuerpo contra CD3 (para determinar la anulación de TRC) y un anticuerpo contra B2M y se analizaron por citometría de flujo, así como con Ghost Dye 780 para excluir las células muertas del análisis. A) B2MIRES-TRC 1 μ g. B) B2M-IRES-TRC 2 μ g. C) B2M-IRES-TRC 4 μ g. D) B2M-T2A-TRC 1 μ g. E) B2M-T2A-TRC 2 μ g. F) B2M-T2A-TRC 4 μ g. G) TRC-P2A-B2M 1 μ g. H) TRC-P2A-B2M 2 μ g. I) TRC-P2A-B2M 4 μ g. J) TRC-T2A-B2M 1 μ g. K) TRC-T2A-B2M 2 μ g. L) TRC-T2A-B2M 4 μ g. M) TRC 1-2x.87 EE. N) B2M 13-14x.479. O) TRC 1-2x.87 EE 0,5 μ g y B2M 13-14x.479 0,5 μ g. P) TRC 1-2x.87 EE 1,0 μ g y B2M 13-14x.479 1,0 μ g.

Figs. 17A-17H. Producción de células T CAR anti-CD 19 utilizando ARNm bicistrónico y AAV. El B2M-IRES-TRC bicistrónico se utilizó junto con un vector AAV para introducir una secuencia exógena de ácido nucleico, que codifica un receptor de antígeno químérico, en el genoma de las células T humanas en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 mediante recombinación homóloga, mientras que simultáneamente se eliminaba la expresión de la superficie celular tanto del receptor de células T como del B2M. El vector AAV comprendía un ácido nucleico que incluía la secuencia codificadora de CAR anti-CD19 descrita anteriormente, que estaba flanqueada por brazos de homología. La expresión del casete CAR fue dirigida por un promotor JeT. Como controles, las células fueron electroporadas con 1 μ g de ARN TRC1-2x87EE antes de la transducción del AAV. Además, las células electroporadas B2M-IRES-TRC y TRC 1-2x.87 EE fueron transducidas de forma simulada. A los 3 y 6 días después de la electroporación/transducción, las células editadas se tiñeron con un anticuerpo contra CD3 (para determinar la anulación de TRC) y un anticuerpo contra B2M, así como con una proteína de fusión CD19-Fc recombinante biotinilada para detectar el CAR. Se utilizó estreptavidina-PE como reactivo de detección secundario para la tinción de CAR. Los niveles de CD3, B2M y CAR se evaluaron mediante citometría de flujo. A) Tinción para CD3 (eje X) y B2M (eje Y) tras la nucleofeción con TRC 1-2x.87 EE. B) Tinción para CD3 (eje X) y B2M (eje Y) tras la nucleofeción con B2M-IRES-TRC. C) Tinción para CD3 (eje X) y CAR (eje Y) tras la nucleofeción con TRC 1-2x.87 EE y la transducción simulada. D) Tinción para CD3 (eje X) y CAR (eje Y) después de la nucleofeción con B2M-IRES-TRC y la transducción simulada. E) Tinción para CD3 (eje X) y CAR (eje Y) tras nucleofeción con TRC 1-2x.87 EE y transducción con AAV. F) Tinción para CD3 (eje X) y CAR (eje Y) tras la nucleofeción con B2M-IRES-TRC y la transducción con AAV. G) Tinción para B2M en células nucleofectadas con TRC 1-2x.87 EE y transducidas con AAV. H) Tinción para B2M en células nucleofectadas con B2MIRES-TRC y transducidas con AAV.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 establece la secuencia de ácido nucleico del gen de la microglobulina beta-2 humana.

SEQ ID NO:2 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento de B2M 13-14 (sentido).

SEQ ID NO:3 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento de B2M 13-14 (antisentido).

SEQ ID NO:4 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento B2M 5-6 (sentido).

SEQ ID NO:5 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento B2M 5-6 (antisentido).

SEQ ID NO:6 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento de B2M 7-8 (sentido).

La SEQ ID NO:7 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento de B2M 7-8 (antisentido).

SEQ ID NO:8 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento de B2M 11-12 (sentido).

- SEQ ID NO:9 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento de B2M 11-12 (antisentido).
- La SEQ ID NO:10 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa I-Crel.
- SEQ ID NO:11 establece la secuencia de aminoácidos del motivo LAGLIDADG.
- 5 La SEQ ID NO:12 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.479.
- SEQ ID NO: 13 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.287.
- La SEQ ID NO:14 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.377.
- La SEQ ID NO:15 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.169.
- La SEQ ID NO:16 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.202.
- 10 La SEQ ID NO:17 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93.
- La SEQ ID NO:18 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QE.
- La SEQ ID NO:19 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQ.
- La SEQ ID NO:20 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EE.
- La SEQ ID NO:21 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QQY66.
- 15 La SEQ ID NO:22 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QK66.
- La SEQ ID NO:23 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QQR66.
- La SEQ ID NO:24 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EY66.
- La SEQ ID NO:25 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EEK66.
- 20 La SEQ ID NO:26 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EER66.
- La SEQ ID NO:27 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQY66.
- La SEQ ID NO:28 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQK66.
- La SEQ ID NO:29 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQR66.
- La SEQ ID NO:30 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.3.
- 25 La SEQ ID NO:31 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.10.
- La SEQ ID NO:32 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.14.
- La SEQ ID NO:33 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.22.
- La SEQ ID NO:34 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.67.
- La SEQ ID NO:35 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.84.
- 30 La SEQ ID NO:36 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.85.
- La SEQ ID NO:37 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.96.
- La SEQ ID NO:38 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.97.
- La SEQ ID NO:39 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.102.
- La SEQ ID NO:40 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.105.
- La SEQ ID NO:41 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.106.
- 35 La SEQ ID NO:42 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.115.
- La SEQ ID NO:43 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.139.
- La SEQ ID NO:44 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.141.

La SEQ ID NO:45 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.146.
La SEQ ID NO:46 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.162.
La SEQ ID NO:47 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.165.
La SEQ ID NO:48 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.178.
5 La SEQ ID NO:49 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.182.
SEQ ID NO:50 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.198.
La SEQ ID NO:51 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.199.
La SEQ ID NO:52 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.207.
La SEQ ID NO:53 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.222.
10 La SEQ ID NO:54 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.245.
La SEQ ID NO:55 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.255.
La SEQ ID NO:56 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.259.
La SEQ ID NO:57 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.275.
La SEQ ID NO:58 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.280.
15 La SEQ ID NO:59 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.281.
La SEQ ID NO:60 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.283.
La SEQ ID NO:61 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.285.
SEQ ID NO:62 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.286.
La SEQ ID NO:63 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.295.
20 La SEQ ID NO:64 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.301.
La SEQ ID NO:65 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.306.
La SEQ ID NO:66 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.317.
La SEQ ID NO:67 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.325.
La SEQ ID NO:68 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.335.
25 La SEQ ID NO:69 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.338.
La SEQ ID NO:70 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.347.
La SEQ ID NO:71 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.361.
La SEQ ID NO:72 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.362.
La SEQ ID NO:73 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.365.
30 La SEQ ID NO:74 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.369.
La SEQ ID NO:75 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.371.
La SEQ ID NO:76 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.372.
La SEQ ID NO:77 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.375.
La SEQ ID NO:78 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.378.
35 La SEQ ID NO:79 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.385.
La SEQ ID NO:80 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.392.
La SEQ ID NO:81 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.432.

SEQ ID NO:82 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.433.
La SEQ ID NO:83 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.440.
La SEQ ID NO:84 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.449.
La SEQ ID NO:85 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.456.
5 La SEQ ID NO:86 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.457.
La SEQ ID NO:87 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.459.
La SEQ ID NO:88 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.464.
La SEQ ID NO:89 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.465.
SEQ ID NO:90 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.470.
10 La SEQ ID NO:91 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.471.
La SEQ ID NO:92 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.540.
La SEQ ID NO:93 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.543.
La SEQ ID NO:94 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.551.
La SEQ ID NO:95 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.554.
15 La SEQ ID NO:96 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.556.
La SEQ ID NO:97 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.76.
SEQ ID NO:98 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.82.
La SEQ ID NO:99 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.31.
La SEQ ID NO:100 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 13-14x.32.
20 SEQ ID NO:101 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.14.
SEQ ID NO:102 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.5.
SEQ ID NO:103 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.6.
SEQ ID NO:104 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.13.
SEQ ID NO:105 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.22.
25 SEQ ID NO:106 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.31.
La SEQ ID NO:107 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.69.
SEQ ID NO:108 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.73.
La SEQ ID NO:109 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.85.
SEQ ID NO:110 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.86.
30 SEQ ID NO:111 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.91.
SEQ ID NO:112 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.28.
SEQ ID NO:113 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 5-6x.3.
La SEQ ID NO:114 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 7-8x.88.
La SEQ ID NO:115 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 7-8x.7.
35 La SEQ ID NO:116 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 7-8x.23.
La SEQ ID NO:117 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 7-8x.30.
La SEQ ID NO:118 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 7-8x.53.

- La SEQ ID NO:119 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 7-8x.2.
- La SEQ ID NO:120 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 7-8x.3.
- SEQ ID NO:121 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 7-8x.6.
- La SEQ ID NO:122 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 7-8x.25.
- 5 SEQ ID NO:123 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 7-8x.78.
- SEQ ID NO:124 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 7-8x.85.
- La SEQ ID NO:125 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 11-12x.45.
- SEQ ID NO:126 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa B2M 11-12x.2.
- 10 La SEQ ID NO:127 establece la secuencia de ácido nucleico del gen de la región constante del receptor de células T humano alfa.
- SEQ ID NO:128 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 (sentido).
- SEQ ID NO:129 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento TRC 3-4 (sentido).
- 15 SEQ ID NO:130 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento de TRC 7-8 (sentido).
- La SEQ ID NO:131 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE.
- La SEQ ID NO:132 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.479.
- La SEQ ID NO:133 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.287.
- 20 SEQ ID NO: 134 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.377.
- La SEQ ID NO:135 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.169.
- SEQ ID NO: 136 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.202.
- SEQ ID NO: 137 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93.
- 25 La SEQ ID NO:138 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QE.
- SEQ ID NO: 139 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQ.
- La SEQ ID NO:140 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EE.
- 30 La SEQ ID NO:141 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QQY66.
- La SEQ ID NO:142 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QQK66.
- 35 La SEQ ID NO:143 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QQR66.
- La SEQ ID NO:144 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EEY66.
- La SEQ ID NO:145 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EEK66.
- 40 La SEQ ID NO:146 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EER66.
- La SEQ ID NO:147 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQY66.

- La SEQ ID NO:148 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQK66.
- La SEQ ID NO:149 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQR66.
- 5 La SEQ ID NO:150 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.3.
- La SEQ ID NO:151 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.10.
- La SEQ ID NO:152 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.14.
- La SEQ ID NO:153 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.22.
- La SEQ ID NO:154 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.67.
- 10 La SEQ ID NO:155 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.84.
- La SEQ ID NO:156 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.85.
- La SEQ ID NO:157 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.96.
- La SEQ ID NO:158 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.97.
- La SEQ ID NO:159 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.102.
- 15 La SEQ ID NO:160 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.105.
- La SEQ ID NO:161 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.106.
- La SEQ ID NO:162 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.115.
- La SEQ ID NO:163 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.139.
- La SEQ ID NO:164 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.141.
- 20 La SEQ ID NO:165 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.146.
- La SEQ ID NO:166 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.162.
- La SEQ ID NO:167 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.165.
- La SEQ ID NO:168 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.178.
- La SEQ ID NO:169 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.182.
- 25 La SEQ ID NO:170 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.198.
- La SEQ ID NO:171 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.199.
- La SEQ ID NO:172 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.207.
- La SEQ ID NO:173 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.222.
- La SEQ ID NO:174 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.245.
- 30 La SEQ ID NO:175 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.255.
- La SEQ ID NO:176 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.259.
- La SEQ ID NO:177 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.275.
- La SEQ ID NO:178 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.280.
- La SEQ ID NO:179 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.281.
- 35 La SEQ ID NO:180 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.283.
- La SEQ ID NO:181 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.285.
- La SEQ ID NO:182 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.286.

- La SEQ ID NO:220 establece la subunidad de unión al semisitio B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.32.
- La SEQ ID NO:221 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.479.
- La SEQ ID NO:222 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.287.
- La SEQ ID NO:223 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.377.
- 5 La SEQ ID NO:224 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.169.
- La SEQ ID NO:225 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.202.
- La SEQ ID NO:226 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93.
- La SEQ ID NO:227 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QE.
- 10 La SEQ ID NO:228 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQ.
- La SEQ ID NO:229 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EE.
- 15 La SEQ ID NO:230 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QQY66.
- La SEQ ID NO:231 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QQK66.
- La SEQ ID NO:232 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 QQR66.
- 20 SEQ ID NO:233 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EY66.
- La SEQ ID NO:234 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EEK66.
- 25 La SEQ ID NO:235 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EER66.
- La SEQ ID NO:236 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQY66.
- La SEQ ID NO:237 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQK66.
- 30 La SEQ ID NO:238 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.93 EQR66.
- La SEQ ID NO:239 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.3.
- La SEQ ID NO:240 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.10.
- La SEQ ID NO:241 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.14.
- 35 La SEQ ID NO:242 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.22.
- La SEQ ID NO:243 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.67.
- La SEQ ID NO:244 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.84.
- La SEQ ID NO:245 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.85.
- La SEQ ID NO:246 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.96.
- 40 La SEQ ID NO:247 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.97.
- La SEQ ID NO:248 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.102.
- La SEQ ID NO:249 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.105.

- La SEQ ID NO:287 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.378.
- La SEQ ID NO:288 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.385.
- La SEQ ID NO:289 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.392.
- La SEQ ID NO:290 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.432.
- 5 La SEQ ID NO:291 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.433.
- La SEQ ID NO:292 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.440.
- La SEQ ID NO:293 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.449.
- La SEQ ID NO:294 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.456.
- La SEQ ID NO:295 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.457.
- 10 La SEQ ID NO:296 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.459.
- La SEQ ID NO:297 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.464.
- La SEQ ID NO:298 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.465.
- La SEQ ID NO:299 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.470.
- La SEQ ID NO:300 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.471.
- 15 La SEQ ID NO:301 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.540.
- La SEQ ID NO:302 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.543.
- La SEQ ID NO:303 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.551.
- La SEQ ID NO:304 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.554.
- La SEQ ID NO:305 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.556.
- 20 La SEQ ID NO:306 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.76.
- La SEQ ID NO:307 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.82.
- La SEQ ID NO:308 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.31.
- La SEQ ID NO:309 establece la subunidad de unión al semisitio B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.32.
- La SEQ ID NO:310 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.14.
- 25 La SEQ ID NO:311 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.5.
- La SEQ ID NO:312 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.6.
- La SEQ ID NO:313 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.13.
- La SEQ ID NO:314 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.22.
- La SEQ ID NO:315 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.31.
- 30 La SEQ ID NO:316 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.69.
- La SEQ ID NO:317 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.73.
- La SEQ ID NO:318 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.85.
- La SEQ ID NO:319 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.86.
- La SEQ ID NO:320 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.91.
- 35 La SEQ ID NO:321 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.28.
- La SEQ ID NO:322 establece la subunidad de unión al semisitio B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.3.
- La SEQ ID NO:323 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.14.

La SEQ ID NO:324 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.5.
 La SEQ ID NO:325 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.6.
 La SEQ ID NO:326 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.13.
 La SEQ ID NO:327 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.22.
 5 La SEQ ID NO:328 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.31.
 SEQ ID NO:329 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.69.
 La SEQ ID NO:330 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.73.
 La SEQ ID NO:331 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.85.
 SEQ ID NO:332 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.86.
 10 La SEQ ID NO:333 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.91.
 La SEQ ID NO:334 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.28.
 La SEQ ID NO:335 establece la subunidad de unión al semisitio B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.3.
 La SEQ ID NO:336 establece la subunidad de unión al semisitio B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.88.
 La SEQ ID NO:337 establece la subunidad de unión al semisitio B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.7.
 15 La SEQ ID NO:338 establece la subunidad de unión al semisitio B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.23.
 La SEQ ID NO:339 establece la subunidad de unión al semisitio B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.30.
 La SEQ ID NO:340 establece la subunidad de unión al semisitio B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.53.
 La SEQ ID NO:341 establece la subunidad de unión al semisitio B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.2.
 La SEQ ID NO:342 establece la subunidad de unión al semisitio B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.3.
 20 La SEQ ID NO:343 establece la subunidad de unión al semisitio B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.6.
 La SEQ ID NO:344 establece la subunidad de unión al semisitio B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.25.
 La SEQ ID NO:345 establece la subunidad de unión al semisitio B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.78.
 La SEQ ID NO:346 establece la subunidad de unión al semisitio B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.85.
 La SEQ ID NO:347 establece la subunidad de unión al semisitio B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.88.
 25 La SEQ ID NO:348 establece la subunidad de unión al semisitio B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.7.
 La SEQ ID NO:349 establece la subunidad de unión al semisitio B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.23.
 La SEQ ID NO:350 establece la subunidad de unión al semisitio B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.30.
 La SEQ ID NO:351 establece la subunidad de unión al semisitio B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.53.
 La SEQ ID NO:352 establece la subunidad de unión al semisitio B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.2.
 30 La SEQ ID NO:353 establece la subunidad de unión al semisitio B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.3.
 La SEQ ID NO:354 establece la subunidad de unión al semisitio B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.6.
 La SEQ ID NO:355 establece la subunidad de unión al semisitio B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.25.
 La SEQ ID NO:356 establece la subunidad de unión al semisitio B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.78.
 La SEQ ID NO:357 establece la subunidad de unión al semisitio B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.85.
 35 La SEQ ID NO:358 establece la subunidad de unión al semisitio B2M11 de la meganucleasa B2M 11-12x.45.
 La SEQ ID NO:359 establece la subunidad de unión al semisitio B2M11 de la meganucleasa B2M 11-12x.2.
 La SEQ ID NO:360 establece la subunidad de unión al semisitio B2M12 de la meganucleasa B2M 11-12x.45.

- La SEQ ID NO:361 establece la subunidad de unión al semisitio B2M12 de la meganucleasa B2M 11-12x.2.
- SEQ ID NO:362 establece la secuencia de ácido nucleico de un elemento IRES.
- SEQ ID NO:363 establece la secuencia de ácido nucleico de un elemento T2A.
- SEQ ID NO:364 establece la secuencia de ácido nucleico de un elemento P2A.
- 5 SEQ ID NO:365 establece la secuencia de ácido nucleico de un elemento E2A.
- SEQ ID NO:366 establece la secuencia de ácido nucleico de un elemento F2A.
- SEQ ID NO:367 establece la secuencia de ácido nucleico de un ARNm bicistrónico TRC-IRES-B2M.
- SEQ ID NO:368 establece la secuencia de ácido nucleico de un ARNm bicistrónico TRC-T2A-B2M.
- SEQ ID NO:369 establece la secuencia de ácido nucleico de un ARNm bicistrónico TRC-P2A-B2M.
- 10 SEQ ID NO:370 establece la secuencia de ácido nucleico de un ARNm bicistrónico TRC-E2A-B2M.
- SEQ ID NO:371 establece la secuencia de ácido nucleico de un ARNm bicistrónico TRC-F2A-B2M.
- La SEQ ID NO:372 establece la secuencia de ácido nucleico de un ARNm bicistrónico B2M-IRES-TRC.
- SEQ ID NO:373 establece la secuencia de ácido nucleico de un ARNm bicistrónico B2M-T2A-TRC.
- La SEQ ID NO:374 establece la secuencia de ácido nucleico de un ARNm bicistrónico B2M-P2A-TRC.
- 15 SEQ ID NO:375 establece la secuencia de ácido nucleico de un ARNm bicistrónico B2M-E2A-TRC.
- La SEQ ID NO:376 establece la secuencia de ácido nucleico de un ARNm bicistrónico B2M-F2A-TRC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

1.1 Referencias y definiciones

- 20 La literatura científica y de patentes a la que se hace referencia en el presente documento establece conocimientos que están disponibles para los expertos en la técnica.
- La presente divulgación es realizada en diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones aquí expuestas. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación sea exhaustiva y completa, y transmita plenamente el ámbito de la divulgación a los expertos en la técnica. Por ejemplo, las características ilustradas con respecto a una realización pueden ser incorporadas a otras realizaciones, y las características ilustradas 25 con respecto a una realización particular pueden ser eliminadas de esa realización. Además, numerosas variaciones y adiciones a las realizaciones sugeridas en el presente documento serán evidentes para los expertos en el arte a la luz de la divulgación actual, que no se apartan de la divulgación actual.
- A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos normales en la técnica a la que pertenece esta divulgación. La terminología empleada en la descripción de la divulgación aquí expuesta tiene por objeto describir únicamente realizaciones particulares y no pretende ser limitativa de la divulgación.
- 30 Tal y como se utiliza aquí, "un", "uno, una" o "el, la" puede significar uno o más de uno. Por ejemplo, "una" célula puede significar una sola célula o una multiplicidad de células.
- Tal como se utiliza aquí, a menos que se indique específicamente lo contrario, la palabra "o" se utiliza en el sentido inclusivo de "y/o" y no en el sentido exclusivo de "o"
- 35 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "meganucleasa" se refiere a una endonucleasa que se une al ADN de doble cadena en una secuencia de reconocimiento que es superior a 12 pares de bases. Preferentemente, la secuencia de reconocimiento para una meganucleasa de la divulgación es de 22 pares de bases. Una meganucleasa es una endonucleasa derivada de la I-Crel, y puede referirse a una variante de ingeniería de la I-Crel que ha sido modificada en relación con la I-Crel natural con respecto a, por ejemplo, la especificidad de unión al ADN, la actividad de escisión del ADN, la afinidad de unión al ADN o las propiedades de dimerización. Los procedimientos para producir tales variantes modificadas de I-Crel son conocidos en la técnica (*por ejemplo* WO 2007/047859). Una meganucleasa, tal como se utiliza aquí, se une al ADN de doble cadena como un heterodímero. Una meganucleasa también puede ser una "meganucleasa de cadena única" en la que un par de dominios de unión al ADN se unen en un solo polipéptido utilizando un enlazador peptídico. El término "endonucleasa de anidamiento" es sinónimo del término "meganucleasa". Las meganucleasas de la divulgación son sustancialmente no tóxicas cuando se expresan en células, particularmente en células T humanas, de tal manera que las células pueden ser transfectadas y mantenidas a 37°C sin observar

efectos deletéreos en la viabilidad celular o reducciones significativas en la actividad de escisión de la meganucleasa cuando se mide utilizando los procedimientos descritos en el presente documento.

Tal como se utiliza aquí, el término "meganucleasa de cadena única" se refiere a un polipéptido que comprende un par de subunidades de nucleasa unidas por un enlazador. Una meganucleasa de cadena única tiene la organización:

5 Subunidad N-terminal - Enlazador - Subunidad C-terminal. Las dos subunidades de la meganucleasa serán generalmente no idénticas en la secuencia de aminoácidos y reconocerán secuencias de ADN no idénticas. Así, las meganucleasas de cadena única suelen escindir secuencias de reconocimiento pseudopalindrómicas o no palindrómicas. Una meganucleasa de cadena única se denomina "heterodímero de cadena única" o "meganucleasa heterodimérica de cadena única", aunque en realidad no es dimérica. Para mayor claridad, a menos que se especifique lo contrario, el término "meganucleasa" puede referirse a una meganucleasa dimérica o de cadena única.

10 Tal como se utiliza aquí, el término "enlazador" se refiere a una secuencia peptídica exógena utilizada para unir dos subunidades de meganucleasas en un solo polipéptido. Un enlazador puede tener una secuencia que se encuentra en las proteínas naturales, o es una secuencia artificial que no se encuentra en ninguna proteína natural. Un enlazador es flexible y carece de estructura secundaria o puede tener una propensión a formar una estructura tridimensional 15 específica en condiciones fisiológicas. Un enlazador puede incluir, sin limitación, los comprendidos en la Patente de EE.UU. nº 8.445.251. En algunas realizaciones, un enlazador puede tener una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 154-195 de cualquiera de las SEQ ID NO: 12-126.

20 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "TALEN" se refiere a una endonucleasa que comprende un dominio de unión al ADN con 16-22 repeticiones del dominio TAL fusionado a cualquier parte del dominio de la nucleasa FokI.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "TALEN compacto" se refiere a una endonucleasa que comprende un dominio de unión al ADN con 16-22 repeticiones del dominio TAL fusionadas en cualquier orientación a cualquier porción de la endonucleasa de anidamiento I-TevI.

25 Tal como se utiliza aquí, el término "nucleasa de dedos de zinc" o "ZFN" se refiere a una endonucleasa químérica que comprende un dominio de unión al ADN de dedos de zinc fusionado con el dominio nucleasa de la enzima de restricción FokI. El dominio del dedo de zinc puede ser rediseñado por medios racionales o experimentales para producir una proteína que se une a una secuencia de ADN predeterminada ~18 pares de bases de longitud, que comprende un par de medios sitios de nueve pares de bases separados por 2-10 pares de bases. La escisión por parte de una nucleasa de dedo de zinc puede crear un extremo romo o una sobrecarga 5' de longitud variable 30 (frecuentemente cuatro pares de bases).

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "CRISPR" se refiere a una endonucleasa basada en la caspasa que comprende una caspasa, como Cas9, y un ARN guía que dirige la escisión del ADN de la caspasa al hibridarse con un sitio de reconocimiento en el ADN genómico.

35 Tal y como se utiliza en este documento, el término "megaTAL" se refiere a una nucleasa de cadena única que comprende un dominio de unión al ADN similar al activador de la transcripción (TALE) con una endonucleasa de anidamiento específica de la secuencia de ingeniería.

40 Tal y como se utiliza aquí, con respecto a una proteína, el término "recombinante" significa que tiene una secuencia de aminoácidos alterada como resultado de la aplicación de técnicas de ingeniería genética a los ácidos nucleicos que codifican la proteína, y a las células u organismos que expresan la proteína. Con respecto a un ácido nucleico, el término "recombinante" significa que tiene una secuencia de ácido nucleico alterada como resultado de la aplicación de técnicas de ingeniería genética. Las técnicas de ingeniería genética incluyen, entre otras, las tecnologías de PCR 45 y de clonación de ADN; la transfección, la transformación y otras tecnologías de transferencia de genes; la recombinación homóloga; la mutagénesis dirigida al sitio; y la fusión de genes. De acuerdo con esta definición, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a una proteína de origen natural, pero producida por clonación y expresión en un huésped heterólogo, no se considera recombinante.

Tal y como se utiliza en este documento, el término "tipo salvaje" se refiere al alelo (*es decir, la secuencia de polinucleótidos*) más común que se produce de forma natural en la población de alelos del mismo tipo de gen, en el que un polipéptido codificado por el alelo de tipo salvaje tiene sus funciones originales. El término "tipo salvaje" también se refiere a un polipéptido codificado por un alelo de tipo salvaje. Los alelos (polinucleótidos) y polipéptidos de tipo salvaje se distinguen de los alelos y polipéptidos mutantes o variantes, que comprenden una o más mutaciones y/o sustituciones en relación con la(s) secuencia(s) de tipo salvaje. Mientras que un alelo o polipéptido de tipo salvaje puede conferir un fenotipo normal en un organismo, un alelo o polipéptido mutante o variante puede, en algunos casos, conferir un fenotipo alterado. Las nucleasas de tipo salvaje se distinguen de las nucleasas recombinantes o no naturales.

55 Tal como se utiliza en el presente documento con respecto a las proteínas recombinantes, el término "modificación" significa cualquier inserción, supresión o sustitución de un residuo de aminoácido en la secuencia recombinante en relación con una secuencia de referencia (*por ejemplo, una secuencia de tipo salvaje o nativa*).

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia de reconocimiento" se refiere a una secuencia de ADN que es unida y escindida por una endonucleasa. En el caso de una meganucleasa, una secuencia de reconocimiento comprende un par de "medios sitios" invertidos de 9 pares de bases que están separados por cuatro pares de bases. En el caso de una meganucleasa de cadena única, el dominio N-terminal de la proteína contacta con un primer semi-sitio y el dominio C-terminal de la proteína contacta con un segundo semi-sitio. La escisión por una meganucleasa produce cuatro pares de bases 3' "colgantes". Los "colgantes" o "extremos pegajosos" son segmentos cortos de ADN de una sola cadena que pueden producirse por la escisión de una endonucleasa de una secuencia de ADN de doble cadena. En el caso de las meganucleasas y las meganucleasas de cadena única derivadas de I-Crel, el colgante comprende las bases 10-13 de la secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases. En el caso de un TALEN compacto, la secuencia de reconocimiento comprende una primera secuencia CNNNGN que es reconocida por el dominio I-TevI, seguida de un espaciador inespecífico de 4 a 16 pares de bases de longitud, seguido de una segunda secuencia de 16 a 22 pb de longitud que es reconocida por el dominio del efecto TAL (esta secuencia suele tener una base 5' T). La escisión por un TALEN compacto produce dos pares de bases 3' colgantes. En el caso de un CRISPR, la secuencia de reconocimiento es la secuencia, normalmente de 16 a 24 pares de bases, a la que se une el ARN guía para dirigir la escisión de Cas9. La escisión mediante CRISPR produjo extremos romos.

Tal como se utiliza aquí, el término "sitio diana" o "secuencia diana" se refiere a una región del ADN cromosómico de una célula que comprende una secuencia de reconocimiento para una nucleasa.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "afinidad de unión al ADN" o "afinidad de unión" significa la tendencia de una meganucleasa a asociarse de forma no covalente con una molécula de ADN de referencia (*por ejemplo*, una secuencia de reconocimiento o una secuencia arbitraria). La afinidad de unión se mide por una constante de disociación, K_d . Tal como se utiliza en el presente documento, una nucleasa tiene una afinidad de unión "alterada" si la K_d de la nucleasa para una secuencia de reconocimiento de referencia aumenta o disminuye en una cantidad estadísticamente significativa ($p<0,05$) en relación con una nucleasa de referencia.

Tal y como se utiliza aquí, el término "recombinación homóloga" o "HR" se refiere al proceso celular natural en el que se repara una rotura de ADN de doble cadena utilizando una secuencia de ADN homóloga como plantilla de reparación (véase, *por ejemplo* Cahill et al. (2006), *Front. Biosci.* 11:1958-1976). La secuencia de ADN homóloga es una secuencia cromosómica endógena o un ácido nucleico exógeno que fue suministrado a la célula.

Tal y como se utiliza aquí, el término "unión en extremo no homóloga" o "NHEJ" se refiere al proceso celular natural en el que una rotura de ADN de doble cadena se repara mediante la unión directa de dos segmentos de ADN no homólogos (véase, *por ejemplo* Cahill et al. (2006), *Front. Biosci.* 11:1958-1976). La reparación del ADN mediante la unión en extremo no homóloga es propensa a los errores y con frecuencia da lugar a la adición o eliminación no prevista de secuencias de ADN en el lugar de la reparación. En algunos casos, la escisión en una secuencia de reconocimiento de la diana resulta en NHEJ en un sitio de reconocimiento de la diana. La escisión inducida por la nucleasa de un sitio diana en la secuencia codificante de un gen, seguida de la reparación del ADN por NHEJ, puede introducir mutaciones en la secuencia codificante, como las mutaciones de desplazamiento de marco, que alteran la función del gen. Así, las nucleasas de ingeniería pueden utilizarse para eliminar eficazmente un gen en una población de células.

Tal y como se utiliza en el presente documento, un "receptor de antígeno químérico" o "CAR" se refiere a un receptor de ingeniería que injerta la especificidad para un antígeno en una célula efectora inmunitaria (*por ejemplo*, una célula T humana). Un receptor de antígeno químérico comprende típicamente un dominio o fracción de unión al ligando extracelular y un dominio intracelular que comprende uno o más dominios estimuladores. En algunas realizaciones, el dominio o la fracción de unión al ligando extracelular puede estar en forma de fragmentos variables de cadena única (scFVs) derivados de un anticuerpo monoclonal, que proporcionan especificidad para un epítopo o antígeno particular (*por ejemplo*, un epítopo o antígeno presente preferentemente en la superficie de una célula cancerosa u otra célula o partícula causante de la enfermedad). Los scFVs pueden unirse mediante una secuencia de enlace. El dominio de unión al ligando extracelular puede ser específico para cualquier antígeno o epítopo de interés. En una realización particular, el dominio de unión al ligando es específico para CD19. En otras realizaciones, los scFv pueden ser humanizados o totalmente humanos. El dominio extracelular de un receptor de antígeno químérico también puede comprender un autoantígeno (véase, Payne et al. (2016) *Science*, Vol. 353 (6295): 179-184), que pueden ser reconocidos por los receptores de células B específicos de los autoantígenos en los linfocitos B, dirigiendo así a las células T para que se dirijan específicamente a los linfocitos B autorreactivos y los eliminan en las enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos. Dichos CARs pueden denominarse receptores químéricos de autoanticuerpos (CAARs), y su uso está contemplado en la divulgación.

En algunas realizaciones no limitantes, el dominio de unión al ligando extracelular del CAR puede tener especificidad para un antígeno de superficie asociado a un tumor, como CD19, CD123, CD22, CS1, CD20, ErbB2 (HER2/neu), FLT3R, antígeno carcinoembrionario (CEA), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFR variante III (EGFRvIII), CD30, CD40, CD44, CD44v6, disialogangliósido GD2, mucina ductal-epitelial, gp36, TAG-72, glicoesfingolípidos, antígeno asociado a glioma, Gonadotropina coriónica humana B, alfafetoproteína (AFP), AFP reactiva a la lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-Ca IX, transcriptasa inversa de la telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxilesterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno específico de la prostasa (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGA-1a, p53, prostein, PSMA, sobreviviente y telomerasa, antígeno

tumoral del carcinoma de próstata-1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrina B2, factor de crecimiento de la insulina (IGF)-I, IGF-II, Receptor IGFI, mesotelina, una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que presenta un epítopo peptídico específico del tumor, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, antígenos del estroma tumoral, el dominio extra A (EDA) y el dominio extra B (EDB) de la fibronectina y el dominio Al de la tenascina-C (TnC Al) y la proteína asociada a los fibroblastos (fap); un antígeno específico de linaje o de tejido como CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD33, CD34, CD133, CD138, CTLA-4, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), endoglinina, una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), BCMA (CD269, TNFRSF 17), o un antígeno de superficie específico de virus como un antígeno específico del VIH (como el VIH gpl20) un antígeno específico del VEB, un antígeno específico del CMV, un antígeno específico del VPH, un antígeno específico del virus de la gripe, así como cualquier derivado o variante de estos marcadores de superficie. En una realización particular de la invención, el dominio de unión al ligando es específico para CD19.

El dominio estimulador intracelular puede incluir uno o más dominios de señalización citoplasmática que transmiten una señal de activación a la célula efectora inmunitaria tras la unión del antígeno. El dominio estimulador intracelular puede ser cualquier dominio estimulador intracelular de interés. Dichos dominios de señalización citoplasmática pueden incluir, sin limitación, CD3-zeta. El dominio estimulador intracelular también puede incluir uno o más dominios coestimuladores intracelulares que transmiten una señal proliferativa y/o de supervivencia celular tras la unión del ligando. El dominio coestimulador intracelular puede ser cualquier dominio coestimulador intracelular de interés. Dichos dominios coestimuladores intracelulares pueden incluir, sin limitación, un dominio CD28, un dominio 4-1BB, un dominio OX40 o una combinación de los mismos. Un receptor de antígeno quimérico puede incluir además elementos estructurales adicionales, incluyendo un dominio transmembrana que se une al dominio de unión al ligando extracelular a través de una secuencia de bisagra o espaciador.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "receptor de células T exógeno" o "TCR exógeno" se refiere a un TCR cuya secuencia se introduce en el genoma de una célula efectora inmunitaria (*por ejemplo*, una célula T humana) que puede o no expresar endógenamente el TCR. La expresión de un TCR exógeno en una célula efectora inmunitaria puede conferir especificidad para un epítopo o antígeno específico (*por ejemplo*, un epítopo o antígeno presente preferentemente en la superficie de una célula cancerosa u otra célula o partícula causante de la enfermedad). Dichos receptores exógenos de células T pueden comprender cadenas alfa y beta o, alternativamente, pueden comprender cadenas gamma y delta. Los TCR exógenos útiles en la divulgación pueden tener especificidad para cualquier antígeno o epítopo de interés.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "reducido" se refiere a cualquier reducción en la expresión de un polipéptido endógeno (*por ejemplo*, microglobulina beta-2, un receptor endógeno de células T, etc.) en la superficie celular de una célula modificada genéticamente o en comparación con una célula de control. El término "reducido" también puede referirse a una reducción del porcentaje de células en una población de células que expresan un polipéptido endógeno en la superficie celular en comparación con una población de células de control. En cualquier caso, dicha reducción es de hasta el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o hasta el 100 %. Por lo tanto, el término "reducido" abarca tanto una anulación parcial como una anulación completa de un polipéptido endógeno.

Tal y como se utiliza aquí con respecto a las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos, los términos "porcentaje de identidad", "identidad de secuencia", "porcentaje de similitud", "similitud de secuencia" y similares, se refieren a una medida del grado de similitud de dos secuencias basada en un alineamiento de las secuencias que maximiza la similitud entre residuos de aminoácidos o nucleótidos alineados, y que es una función del número de residuos o nucleótidos idénticos o similares, el número de residuos o nucleótidos totales, y la presencia y longitud de huecos en el alineamiento de la secuencia. Existen diversos algoritmos y programas informáticos para determinar la similitud de las secuencias utilizando parámetros estándar. Tal como se utiliza aquí, la similitud de la secuencia se mide utilizando el programa BLASTp para las secuencias de aminoácidos y el programa BLASTn para las secuencias de ácidos nucleicos, ambos disponibles a través del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), y que se describen, por ejemplo, en, Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410 Gish y States (1993), Nature Genet. 3:266-272 Madden et al. (1996), Meth. Enzymol. 266:131-141 Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25:33 89-3402) Zhang et al. (2000), J. Comput. Biol. 7(1-2):203-14. Tal y como se utiliza aquí, el porcentaje de similitud de dos secuencias de aminoácidos es la puntuación basada en los siguientes parámetros del algoritmo BLASTp: tamaño de la palabra=3; penalización por apertura de brecha=-11; penalización por extensión de brecha=-1; y matriz de puntuación=BLOSUM62. Tal y como se utiliza aquí, el porcentaje de similitud de dos secuencias de ácidos nucleicos es la puntuación basada en los siguientes parámetros del algoritmo BLASTn: tamaño de la palabra=11; penalización por apertura de huecos=-5; penalización por extensión de huecos=-2; recompensa por coincidencia=1; y penalización por falta de coincidencia=-3.

Tal como se utiliza en el presente documento con respecto a las modificaciones de dos proteínas o secuencias de aminoácidos, el término "correspondiente a" se utiliza para indicar que una modificación especificada en la primera proteína es una sustitución del mismo residuo de aminoácido que en la modificación en la segunda proteína, y que la posición de aminoácidos de la modificación en las primeras proteínas corresponde o se alinea con la posición de aminoácidos de la modificación en la segunda proteína cuando las dos proteínas se someten a alineaciones de secuencia estándar (*por ejemplo*, utilizando el programa BLASTp). Así, la modificación del residuo "X" en el aminoácido "A" en la primera proteína corresponderá a la modificación del residuo "Y" en el aminoácido "A" en la segunda proteína

si los residuos X e Y se corresponden entre sí en un alineamiento de secuencias, y a pesar de que X e Y sean números diferentes.

Tal como se utiliza aquí, el término "semisitio de reconocimiento", "semisitio de secuencia de reconocimiento" o simplemente "semisitio" significa una secuencia de ácido nucleico en una molécula de ADN de doble cadena que es reconocida por un monómero de una meganucleasa homodimérica o heterodimérica, o por una subunidad de una meganucleasa de cadena única.

Tal como se utiliza aquí, el término "región hipervariante" se refiere a una secuencia localizada dentro de un monómero o subunidad de meganucleasa que comprende aminoácidos con una variabilidad relativamente alta. Una región hipervariante puede comprender aproximadamente 50-60 residuos contiguos, aproximadamente 53-57 residuos contiguos, o preferentemente aproximadamente 56 residuos. En algunas realizaciones, los residuos de una región hipervariante pueden corresponder a las posiciones 24-79 o a las posiciones 215-270 de cualquiera de las SEQ ID NOs:12-126. Una región hipervariante puede comprender uno o más residuos que entran en contacto con bases de ADN en una secuencia de reconocimiento y pueden ser modificados para alterar la preferencia de bases del monómero o subunidad. Una región hipervariante también puede comprender uno o más residuos que se unen a la columna vertebral del ADN cuando la meganucleasa se asocia con una secuencia de reconocimiento de ADN de doble cadena. Dichos residuos pueden modificarse para alterar la afinidad de unión a la meganucleasa con el esqueleto del ADN y la secuencia de reconocimiento de la diana. En diferentes realizaciones de la divulgación, una región hipervariante puede comprender entre aproximadamente 1-21 residuos que presentan variabilidad y pueden ser modificados para influir en la preferencia de bases y/o en la afinidad de unión al ADN. En algunas realizaciones, los residuos variables dentro de una región hipervariante corresponden a una o más de las posiciones 24, 26, 28, 29, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 66, 68, 69, 70, 72, 73, 75 y 77 de cualquiera de las SEQ ID NOs:12-126. En otras realizaciones, los residuos variables dentro de una región hipervariante corresponden a una o más de las posiciones 215, 217, 219, 220, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 248, 257, 259, 260, 261, 263, 264, 266 y 268 de cualquiera de las SEQ ID NOs:12-126.

Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos "gen de la microglobulina beta-2 humana", "gen B2M" y similares, se utilizan indistintamente y se refieren al gen humano identificado por NCBI Gene ID NO. 567 (Nº de acceso NG_012920.1), que se establece en la SEQ ID NO:1, así como variantes naturales del gen de la microglobulina beta-2 humana que codifican un polipéptido B2M funcional.

Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos "gen de la región constante del receptor de células T alfa", "gen de la región constante del TCR alfa" y similares, se utilizan indistintamente y se refieren al gen humano identificado por NCBI Gene ID NO. 28755, que se expone en la SEQ ID NO:127, así como variantes de origen natural del gen de la región constante del receptor de células T alfa que codifican un polipéptido funcional.

Los términos "constructo de ADN recombinante", "constructo recombinante", "casete de expresión", "constructo de expresión", "constructo químico" y "fragmento de ADN recombinante" se utilizan indistintamente en este documento y son fragmentos de ácido nucleico. Un constructo recombinante comprende una combinación artificial de fragmentos de ácido nucleico, incluyendo, sin limitación, secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por ejemplo, un constructo de ADN recombinante puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras derivadas de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras derivadas de la misma fuente y dispuestas de una manera diferente a la que se encuentra en la naturaleza. Este constructo se utiliza por sí mismo o junto con un vector.

Tal y como se utiliza en el presente documento, un "vector" o "vector de ADN recombinante" es un constructo que incluye un sistema de replicación y secuencias que son capaces de transcribir y traducir una secuencia codificadora de polipéptidos en una célula huésped determinada. Si se utiliza un vector, la selección del mismo depende del procedimiento que se utilizará para transformar las células huésped, como es bien sabido por los expertos en la técnica. Los vectores pueden incluir, sin limitación, vectores plasmídicos y vectores AAV recombinantes, o cualquier otro vector conocido en esa técnica adecuado para suministrar un gen que codifica una meganucleasa de la divulgación a una célula diana. Las personas experimentadas conocen bien los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector para transformar, seleccionar y propagar con éxito las células huésped que comprenden cualquiera de los nucleótidos aislados o secuencias de ácido nucleico de la divulgación.

Tal como se utiliza aquí, un "vector" también puede referirse a un vector viral. Los vectores virales pueden incluir, sin limitación, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales y vectores virales adenoasociados (AAV).

Tal como se utiliza aquí, un ARNm "policistrónico" se refiere a un único ARN mensajero que comprende dos o más secuencias codificantes (es decir, cistrones) y codifica más de una proteína. Un ARNm policistrónico puede comprender cualquier elemento conocido en la técnica para permitir la traducción de dos o más genes a partir de la misma molécula de ARNm, incluyendo, pero no limitados a, un elemento IRES, un elemento T2A, un elemento P2A, un elemento E2A y un elemento F2A.

Tal como se utiliza aquí, una "célula T humana" o "célula T" se refiere a una célula T aislada de un donante humano. Las células T humanas, y las células derivadas de ellas, incluyen células T aisladas que no han sido pasadas en

cultivo, células T que han sido pasadas y mantenidas en condiciones de cultivo celular sin inmortalización, y células T que han sido inmortalizadas y se mantienen en condiciones de cultivo celular indefinidamente.

Tal como se utiliza aquí, un "control" o "célula de control" se refiere a una célula que proporciona un punto de referencia para medir los cambios en el genotipo o fenotipo de una célula modificada genéticamente. Una célula de control puede comprender, por ejemplo: (a) una célula de tipo salvaje, es decir, del mismo genotipo que el material de partida para la alteración genética que dio lugar a la célula genéticamente modificada; (b) una célula del mismo genotipo que la célula genéticamente modificada pero que ha sido transformada con un constructo nulo (es decir, con un constructo que no tiene ningún efecto conocido sobre el rasgo de interés); o, (c) una célula genéticamente idéntica a la célula modificada genéticamente pero que no ha sido expuesta a condiciones, estímulos o modificaciones genéticas adicionales que podrían inducir la expresión de un genotipo o fenotipo alterado.

Tal y como se utiliza en este documento, la citación de un intervalo numérico para una variable pretende transmitir que la divulgación se practica con la variable igual a cualquiera de los valores dentro de ese intervalo. Así, para una variable que es intrínsecamente discreta, la variable es igual a cualquier valor entero dentro del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. Del mismo modo, para una variable que es inherentemente continua, la variable es igual a cualquier valor real dentro del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. A modo de ejemplo, y sin limitación, una variable que se describe con valores entre 0 y 2 puede tomar los valores 0, 1 o 2 si la variable es intrínsecamente discreta, y puede tomar los valores 0,0, 0,1, 0,01, 0,001, o cualquier otro valor real ≥ 0 y ≤ 2 si la variable es intrínsecamente continua.

2.1 Principio de la invención

La presente divulgación se basa, en parte, en la hipótesis de que las nucleasas de ingeniería se utilizan para reconocer y escindir las secuencias de reconocimiento que se encuentran dentro del gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1), de manera que la NHEJ en el sitio de escisión interrumpe la expresión del polipéptido de microglobulina beta-2 en la superficie de la célula, interfiriendo así con el ensamblaje y la activación de los receptores MHC de clase I endógenos codificados por los genes HLA. Además, según la divulgación, se inserta una secuencia exógena de polinucleótidos en el gen de la microglobulina beta-2 en el sitio de escisión de la nucleasa, por ejemplo, por recombinación homóloga. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica comprende una secuencia de interés que se expresa simultáneamente en la célula. Además, las nucleasas de ingeniería de la divulgación se utilizan para eliminar la expresión de la superficie celular de la microglobulina beta-2 en células eucariotas modificadas genéticamente para mostrar una o más eliminaciones adicionales (por ejemplo, eliminación de un receptor de células T endógeno) y/o modificadas genéticamente para expresar uno o más polipéptidos de interés (*por ejemplo*, un receptor de antígeno quimérico o un receptor de células T exógeno). Así, en una realización preferida, la presente divulgación permite la producción de una célula eucariota modificada genéticamente, como una célula T, que exhibe la eliminación tanto de la microglobulina beta-2 como de un receptor celular T endógeno en la superficie celular, mientras que expresa simultáneamente un receptor de antígeno quimérico o un receptor celular T exógeno. Dichas células pueden mostrar una aloreactividad reducida y/o una alogenicidad reducida cuando se administran a un sujeto.

2.2 Nucleasas para reconocer y escindir secuencias de reconocimiento dentro del gen de la microglobulina Beta-2 humana

Es conocido en la técnica que es posible utilizar una nucleasa específica de sitio para realizar una rotura de ADN en el genoma de una célula viva, y que dicha rotura de ADN puede dar lugar a una modificación permanente del genoma a través de la reparación mutagénica NHEJ o a través de la recombinación homóloga con una secuencia de ADN transgénica. NHEJ puede producir mutagénesis en el sitio de escisión, lo que resulta en la inactivación del alelo. La mutagénesis asociada a NHEJ puede inactivar un alelo a través de la generación de codones de parada tempranos, mutaciones de desplazamiento de marco que producen proteínas aberrantes no funcionales, o podría desencadenar mecanismos como la decadencia del ARNm mediada por el sinsentido. El uso de nucleasas para inducir la mutagénesis a través de NHEJ puede utilizarse para dirigir una mutación específica o una secuencia presente en un alelo de tipo salvaje. Se sabe que el uso de nucleasas para inducir una rotura de doble cadena en un locus diana estimula la recombinación homóloga, en particular de las secuencias de ADN transgénicas flanqueadas por secuencias homólogas a la diana genómica. De este modo, se pueden insertar secuencias de ácido nucleico exógenas en un locus objetivo. Dichos ácidos nucleicos exógenos pueden codificar, por ejemplo, un receptor antigénico quimérico, un TCR exógeno o cualquier secuencia o polipéptido de interés.

En diferentes realizaciones, una variedad de diferentes tipos de nucleasas son útiles para practicar la divulgación. En una realización, la divulgación se practica utilizando meganucleasas recombinantes. En otra realización, la divulgación se practica utilizando una nucleasa CRISPR o una nicasa CRISPR. Los procedimientos para fabricar CRISPRs y nicasas CRISPR que reconocen sitios de ADN predeterminados son conocidos en la técnica, por ejemplo Ran, et al. (2013) Nat Protoc. 8:2281-308. En otra realización, la divulgación se practica utilizando TALENs o TALENs compactos. Los procedimientos para fabricar dominios TALE que se unen a sitios predeterminados del ADN son conocidos en la técnica, por ejemplo Reyen et al. (2012) Nat Biotechnol. 30:460-5. En otra realización, la divulgación se practica utilizando megaTALs.

Las nucleasas utilizadas para poner en práctica la divulgación son meganucleasas de cadena simple. Una meganucleasa de cadena única comprende una subunidad N-terminal y una subunidad C-terminal unidas por un péptido enlazador. Cada uno de los dos dominios reconoce la mitad de la secuencia de reconocimiento (es decir, un semi-sitio de reconocimiento) y el sitio de escisión del ADN se encuentra en el centro de la secuencia de

5 reconocimiento, cerca de la interfaz de las dos subunidades. Las roturas de la cadena de ADN están desplazadas cuatro pares de bases, de modo que la escisión del ADN por una meganucleasa genera un par de colgantes de una sola cadena de cuatro pares de bases.

Las meganucleasas recombinantes de la divulgación han sido diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de 10 reconocimiento B2M 13-14 (SEQ ID NO:2). Dichas meganucleasas recombinantes se denominan colectivamente en el presente documento "meganucleasas B2M 13-14". Las meganucleasas B2M 13-14 ejemplares se proporcionan en las SEQ ID NOs: 12-100.

Las meganucleasas recombinantes de la divulgación comprenden una primera subunidad, que comprende una 15 primera región hipervariable (HVR1), y una segunda subunidad, que comprende una segunda región hipervariable (HVR2). Además, la primera subunidad se une a un primer semisitio de reconocimiento en la secuencia de reconocimiento (por ejemplo, el semisitio B2M13), y la segunda subunidad se une a un segundo semisitio de reconocimiento en la secuencia de reconocimiento (por ejemplo, el semisitio B2M14). En las realizaciones en las que la meganucleasa recombinante es una meganucleasa de una sola cadena, la primera y la segunda subunidad están 20 orientadas de tal manera que la primera subunidad, que comprende la región HVR1 y se une al primer semisitio, se sitúa como la subunidad N-terminal, y la segunda subunidad, que comprende la región HVR2 y se une al segundo semisitio, se sitúa como la subunidad C-terminal. En realizaciones alternativas, la primera y la segunda subunidad están orientadas de tal manera que la primera subunidad, que comprende la región HVR1 y se une al primer semisitio, se posiciona como la subunidad C-terminal, y la segunda subunidad, que comprende la región HVR2 y se une al segundo semi-sitio, se posiciona como la subunidad N-terminal. Las meganucleasas B2M 13-14 ejemplares de la divulgación se proporcionan en la Tabla 1.

25 **Tabla 1.** Meganucleasas recombinantes ejemplares diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento B2M 13-14 (SEQ ID NO:2)

Meganucleasa	AA SEQ ID	Residuos de la subunidad B2M13	Subunidad B2M13 SEQ ID	*B2M13 Subunidad %	Residuos de la subunidad B2M14	Subunidad B2M14 SEQ ID	*B2M14 Subunidad %
B2M 13-14x.479	12	198-344	132	100	7-153	221	100
B2M 13-14x.287	13	198-344	133	95,92	7-153	222	99,32
B2M 13-14x.377	14	198-344	134	94,56	7-153	223	97,96
B2M 13-14x.169	15	198-344	135	95,24	7-153	224	99,32
B2M 13-14x.202	16	198-344	136	95,24	7-153	225	97,96
B2M 13-14x.93	17	198-344	137	94,56	7-153	226	95,92
B2M 13-14x.93 QE	18	198-344	138	95,24	7-153	227	95,92
B2M 13-14x.93 EQ	19	198-344	139	94,56	7-153	228	96,6
B2M 13-14x.93 EE	20	198-344	140	95,24	7-153	229	96,6
B2M 13-14x.93 QQY66	21	198-344	141	94,56	7-153	230	95,92
B2M 13-14x.93 QQK66	22	198-344	142	94,56	7-153	231	95,24
B2M 13-14x.93 QQR66	23	198-344	143	94,56	7-153	232	95,24
B2M 13-14x.93 EY66	24	198-344	144	95,24	7-153	233	96,6

(continuación)

Meganucleasa	AA SEQ ID	Residuos de la subunidad B2M13	Subunidad B2M13 SEQ ID	*B2M13 Subunidad %	Residuos de la subunidad B2M14	Subunidad B2M14 SEQ ID	*B2M14 Subunidad %
B2M 13-14x.93 EEK66	25	198-344	145	95,24	7-153	234	95,92
B2M 13-14x.93 EER66	26	198-344	146	95,24	7-153	235	95,92
B2M 13-14x.93 EQY66	27	198-344	147	94,56	7-153	236	95,92
B2M 13-14x.93 EQK66	28	198-344	148	94,56	7-153	237	95,92
B2M 13-14x.93 EQR66	29	198-344	149	94,56	7-153	238	95,92
B2M 13-14x.3	30	198-344	150	91,84	7-153	239	92,52
B2M 13-14x.10	31	198-344	151	94,56	7-153	240	93,2
B2M 13-14x.14	32	198-344	152	91,84	7-153	241	95,24
B2M 13-14x.22	33	198-344	153	93,88	7-153	242	93,2
B2M 13-14x.67	34	198-344	154	94,56	7-153	243	93,2
B2M 13-14x.84	35	198-344	155	93,88	7-153	244	94,56
B2M 13-14x.85	36	198-344	156	94,56	7-153	245	93,2
B2M 13-14x.96	37	198-344	157	95,24	7-153	246	96,6
B2M 13-14x.97	38	198-344	158	95,24	7-153	247	98,64
B2M 13-14x.102	39	198-344	159	95,24	7-153	248	98,64
B2M 13-14x.105	40	198-344	160	95,24	7-153	249	98,64
B2M 13-14x.106	41	198-344	161	95,24	7-153	250	97,96
B2M 13-14x.115	42	198-344	162	95,24	7-153	251	98,64
B2M 13-14x.139	43	198-344	163	95,24	7-153	252	95,92
B2M 13-14x.141	44	198-344	164	95,24	7-153	253	97,96
B2M 13-14x.146	45	198-344	165	95,24	7-153	254	96,6
B2M 13-14x.162	46	198-344	166	95,24	7-153	255	97,96
B2M 13-14x.165	47	198-344	167	95,24	7-153	256	99,32
B2M 13-14x.178	48	198-344	168	95,24	7-153	257	99,32
B2M 13-14x.182	49	198-344	169	95,24	7-153	258	98,64
B2M 13-14x.198	50	198-344	170	95,24	7-153	259	98,64
B2M 13-14x.199	51	198-344	171	95,24	7-153	260	97,96
B2M 13-14x.207	52	198-344	172	95,24	7-153	261	96,6
B2M 13-14x.222	53	198-344	173	95,24	7-153	262	98,64
B2M 13-14x.245	54	198-344	174	95,24	7-153	263	99,32
B2M 13-14x.255	55	198-344	175	95,24	7-153	264	99,32
B2M 13-14x.259	56	198-344	176	95,24	7-153	265	97,96
B2M 13-14x.275	57	198-344	177	95,24	7-153	266	100
B2M 13-14x.280	58	198-344	178	95,92	7-153	267	99,32

(continuación)

Meganucleasa	AA SEQ ID	Residuos de la subunidad B2M13	Subunidad B2M13 SEQ ID	*B2M13 Subunidad %	Residuos de la subunidad B2M14	Subunidad B2M14 SEQ ID	*B2M14 Subunidad %
B2M 13-14x.281	59	198-344	179	94,56	7-153	268	99,32
B2M 13-14x.283	60	198-344	180	94,56	7-153	269	99,32
B2M 13-14x.285	61	198-344	181	95,24	7-153	270	99,32
B2M 13-14x.286	62	198-344	182	94,56	7-153	271	99,32
B2M 13-14x.295	63	198-344	183	96,6	7-153	272	99,32
B2M 13-14x.301	64	198-344	184	95,24	7-153	273	99,32
B2M 13-14x.306	65	198-344	185	95,24	7-153	274	99,32
B2M 13-14x.317	66	198-344	186	94,56	7-153	275	99,32
B2M 13-14x.325	67	198-344	187	95,24	7-153	276	99,32
B2M 13-14x.335	68	198-344	188	94,56	7-153	277	99,32
B2M 13-14x.338	69	198-344	189	95,24	7-153	278	99,32
B2M 13-14x.347	70	198-344	190	95,24	7-153	279	99,32
B2M 13-14x.361	71	198-344	191	95,24	7-153	280	99,32
B2M 13-14x.362	72	198-344	192	94,56	7-153	281	99,32
B2M 13-14x.365	73	198-344	193	95,24	7-153	282	99,32
B2M 13-14x.369	74	198-344	194	95,24	7-153	283	99,32
B2M 13-14x.371	75	198-344	195	94,56	7-153	284	99,32
B2M 13-14x.372	76	198-344	196	95,24	7-153	285	99,32
B2M 13-14x.375	77	198-344	197	95,92	7-153	286	97,96
B2M 13-14x.378	78	198-344	198	95,92	7-153	287	97,96
B2M 13-14x.385	79	198-344	199	95,92	7-153	288	97,96
B2M 13-14x.392	80	198-344	200	94,56	7-153	289	97,96
B2M 13-14x.432	81	198-344	201	96,6	7-153	290	97,96
B2M 13-14x.433	82	198-344	202	94,56	7-153	291	97,96
B2M 13-14x.440	83	198-344	203	94,56	7-153	292	97,96
B2M 13-14x.449	84	198-344	204	94,56	7-153	293	97,96
B2M 13-14x.456	85	198-344	205	94,56	7-153	294	97,96
B2M 13-14x.457	86	198-344	206	95,92	7-153	295	97,96
B2M 13-14x.459	87	198-344	207	95,24	7-153	296	97,96
B2M 13-14x.464	88	198-344	208	96,6	7-153	297	97,96
B2M 13-14x.465	89	198-344	209	96,6	7-153	298	97,96
B2M 13-14x.470	90	198-344	210	94,56	7-153	299	100
B2M 13-14x.471	91	198-344	211	96,6	7-153	300	100
B2M 13-14x.540	92	198-344	212	95,92	7-153	301	100
B2M 13-14x.543	93	198-344	213	94,56	7-153	302	100
B2M 13-14x.551	94	198-344	214	94,56	7-153	303	100
B2M 13-14x.554	95	198-344	215	95,92	7-153	304	100

(continuación)

Meganucleasa	AA SEQ ID	Residuos de la subunidad B2M13	Subunidad B2M13 SEQ ID	*B2M13 Subunidad %	Residuos de la subunidad B2M14	Subunidad B2M14 SEQ ID	*B2M14 Subunidad %
B2M 13-14x.556	96	198-344	216	94,56	7-153	305	100
B2M 13-14x.76	97	7-153	217	91,16	198-344	306	91,84
B2M 13-14x.82	98	7-153	218	93,88	198-344	307	92,52
B2M 13-14x.31	99	7-153	219	89,8	198-344	308	91,84
B2M 13-14x.32	100	7-153	220	93,88	198-344	309	94,56

**"Subunidad B2M13 %" y "Subunidad B2M14 %" representan la identidad de secuencia de aminoácidos entre las regiones de subunidad de unión a B2M13 y de unión a B2M14 de cada meganucleasa y las regiones de subunidad de unión a B2M13 y de unión a B2M14, respectivamente, de la meganucleasa B2M 13-14x.479.

2.3 Procedimientos para producir células modificadas genéticamente

- 5 La divulgación proporciona procedimientos para producir células modificadas genéticamente utilizando nucleasas de ingeniería que reconocen y escinden secuencias de reconocimiento que se encuentran dentro del gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1). La escisión en dichas secuencias de reconocimiento puede permitir la NHEJ en el sitio de escisión y la expresión interrumpida del polipéptido de microglobulina beta-2, interfiriendo así con el ensamblaje y la activación de los receptores endógenos del MHC de clase I codificados por los genes HLA. Además, la escisión en dichas secuencias de reconocimiento puede permitir la recombinación homóloga de secuencias de ácido nucleico exógeno directamente en el gen de la microglobulina beta-2.
- 10 En algunos aspectos, la divulgación proporciona además procedimientos para producir células eucariotas modificadas genéticamente que tienen una expresión reducida en la superficie celular de un receptor de células T endógeno. Estos procedimientos utilizan una endonucleasa de ingeniería para reconocer y escindir una secuencia de reconocimiento situada en un gen que codifica un componente de un receptor endógeno de células T. Dicho gen puede incluir, sin limitación, el gen que codifica el gen de la región constante del receptor humano de células T alfa (SEQ ID NO: 127). Las endonucleasas útiles en el procedimiento pueden incluir, sin limitación, meganucleasas recombinantes, CRISPRs, TALENs, TALENs compactas, nucleasas de dedo de zinc (ZFNs), megaTALs. En algunas realizaciones, la endonucleasa es una meganucleasa recombinante, y la secuencia de reconocimiento de la meganucleasa comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 128-130. Las meganucleasas recombinantes útiles para reconocer y escindir una secuencia de reconocimiento en el gen de la región constante del receptor de células T humano alfa pueden incluir, sin limitación, las divulgadas en las solicitudes estadounidenses nº 62/237.382 y 62/237.394. La escisión en las secuencias de reconocimiento del TCR puede permitir la NHEJ en el sitio de escisión y la expresión interrumpida del receptor de células T endógeno. Además, la escisión en las secuencias de reconocimiento del TCR puede permitir la recombinación homóloga de secuencias de ácido nucleico exógeno directamente en el gen diana.
- 15 20 25 30 35 40 45
- En algunos aspectos, la divulgación proporciona además procedimientos para producir células eucariotas modificadas genéticamente que tienen una expresión reducida en la superficie celular de un receptor de células T endógeno. Estos procedimientos utilizan una endonucleasa de ingeniería para reconocer y escindir una secuencia de reconocimiento situada en un gen que codifica un componente de un receptor endógeno de células T. Dicho gen puede incluir, sin limitación, el gen que codifica el gen de la región constante del receptor humano de células T alfa (SEQ ID NO: 127). Las endonucleasas útiles en el procedimiento pueden incluir, sin limitación, meganucleasas recombinantes, CRISPRs, TALENs, TALENs compactas, nucleasas de dedo de zinc (ZFNs), megaTALs. En algunas realizaciones, la endonucleasa es una meganucleasa recombinante, y la secuencia de reconocimiento de la meganucleasa comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 128-130. Las meganucleasas recombinantes útiles para reconocer y escindir una secuencia de reconocimiento en el gen de la región constante del receptor de células T humano alfa pueden incluir, sin limitación, las divulgadas en las solicitudes estadounidenses nº 62/237.382 y 62/237.394. La escisión en las secuencias de reconocimiento del TCR puede permitir la NHEJ en el sitio de escisión y la expresión interrumpida del receptor de células T endógeno. Además, la escisión en las secuencias de reconocimiento del TCR puede permitir la recombinación homóloga de secuencias de ácido nucleico exógeno directamente en el gen diana.
- Las nucleasas de ingeniería de la divulgación se suministran en una célula en forma de proteína o, preferentemente, como un ácido nucleico que codifica la nucleasa de ingeniería. Dicho ácido nucleico es ADN (por ejemplo, ADN plasmídico circular o linealizado o productos de PCR) o ARN. En el caso de las realizaciones en las que la secuencia codificante de la nucleasa de ingeniería se suministra en forma de ADN, debe estar vinculada de forma operativa a un promotor para facilitar la transcripción del gen de la meganucleasa. Los promotores de mamíferos adecuados para la divulgación incluyen promotores constitutivos como el promotor temprano del citomegalovirus (CMV) (Thomsen et al. (1984), Proc Natl Acad Sci USA. 81(3):659-63) o el promotor temprano del SV40 (Benoist y Chambon (1981), Nature. 290(5804):304-10) así como promotores inducibles como el promotor inducible por tetraciclina (Dingermann et al. (1992), Mol Cell Biol. 12(9):4038-45).
- En algunas realizaciones, el ARNm que codifica la nucleasa de ingeniería se suministra a la célula porque esto reduce la probabilidad de que el gen que codifica la nucleasa de ingeniería se integre en el genoma de la célula. Dicho ARNm que codifica una nucleasa de ingeniería se produce mediante procedimientos conocidos en la técnica, como la transcripción *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm se cubre con 7-metil-guanosina. En algunas realizaciones, el ARNm está poliadenilado.
- En realizaciones particulares, un ARNm que codifica una nucleasa de ingeniería de la divulgación es un ARNm policistrónico que codifica dos o más nucleasas que se expresan simultáneamente en la célula. Un ARNm policistrónico puede codificar dos o más nucleasas de la divulgación que se dirigen a diferentes secuencias de reconocimiento en el mismo gen diana. Alternativamente, un ARNm policistrónico puede codificar una o más nucleasas de la divulgación y una segunda nucleasa dirigida a una secuencia de reconocimiento separada posicionada en el mismo gen, o una segunda secuencia de reconocimiento posicionada en un segundo gen de manera que se produzcan sitios de escisión en ambos genes. Un ARNm policistrónico puede incluir cualquier elemento conocido en la técnica

que permita la traducción de dos genes (*es decir*, cistrones) a partir de la misma molécula de ARNm, incluyendo, pero sin limitarse a ello, un elemento IRES (por ejemplo, SEQ ID NO:362), un elemento T2A (por ejemplo, SEQ ID NO:363), un elemento P2A (por ejemplo, SEQ ID NO:364), un elemento E2A (por ejemplo, SEQ ID NO:365) y un elemento F2A (por ejemplo, SEQ ID NO:366). divulgación

- 5 Las proteínas nucleasas purificadas pueden ser suministradas en las células para escindir el ADN genómico, lo que permite la recombinación homóloga o la unión en extremo no homóloga en el sitio de escisión con una secuencia de interés, mediante una variedad de mecanismos diferentes conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, las proteínas nucleasas de ingeniería, o el ADN/ARN que codifica nucleasas de ingeniería, se acoplan a un péptido penetrante en la célula o a un ligando de orientación para facilitar la captación celular. Entre 10 los ejemplos de péptidos penetrantes de células conocidos en la técnica se encuentran la poli-arginina (Jearawiriyapaisarn, et al. (2008) Mol Ther. 16:1624-9), el péptido TAT del virus del VIH (Hudecz et al. (2005), Med. Res. Rev. 25: 679-736), MPG (Simeoni, et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2717-2724), Pep-1 (Deshayes et al. (2004) Biochemistry 43: 7698-7706y HSV-1 VP-22 (Deshayes et al. (2005) Cell Mol Life Sci. 62:1839-49. En una realización alternativa, las nucleasas de ingeniería, o el ADN/ARN que codifica las nucleasas de ingeniería, se acoplan de forma 15 covalente o no covalente a un anticuerpo que reconoce un receptor específico de la superficie celular expresado en las células diana, de forma que la proteína nucleasa/ADN/ARN se une a las células diana y es internalizada por las células diana. Alternativamente, la proteína nucleasa/ADN/ARN de ingeniería se acopla de forma covalente o no covalente al ligando natural (o a una porción del ligando natural) para dicho receptor de superficie celular. (McCall, et al. (2014) Tissue Barriers. 2(4):e944449; Dinda, et al. (2013) Curr Pharm Biotechnol. 14:1264-74 Kang, et al. (2014) Curr Pharm Biotechnol. 15(3):220-30 Qian et al. (2014) Expert Opin DrugMetab Toxicol. 10(11): 1491-508).

En algunas realizaciones, las proteínas nucleasas de ingeniería, o el ADN/ARN que codifica nucleasas de ingeniería, se acoplan de forma covalente o, preferentemente, no covalente a una nanopartícula o se encapsulan dentro de dicha nanopartícula utilizando procedimientos conocidos en la técnica (Sharma, et al. (2014) Biomed Res Int. 2014). Una nanopartícula es un sistema de suministro a nanoscala cuya escala de longitud es <1 μm, preferentemente <100 nm. 25 Dichas nanopartículas se diseñan utilizando un núcleo compuesto de metal, lípido, polímero o macromolécula biológica, y múltiples copias de las proteínas meganucleas recombinantes, ARNm o ADN se unen o encapsulan con el núcleo de la nanopartícula. Esto aumenta el número de copias de la proteína/ARN/ADN que se suministra a cada célula y, por tanto, aumenta la expresión intracelular de cada nucleasa de ingeniería para maximizar la probabilidad de que se corten las secuencias de reconocimiento de la diana. La superficie de dichas nanopartículas se modifica 30 además con polímeros o lípidos (por ejemplo, quitosano, polímeros catiónicos o lípidos catiónicos) para formar una nanopartícula con núcleo cuya superficie confiere funcionalidades adicionales para mejorar el suministro celular y la captación de la carga útil (Jian et al. (2012) Biomateriales. 33(30): 7621-30). Además, las nanopartículas pueden acoplarse ventajosamente a moléculas de orientación para dirigir la nanopartícula al tipo de célula apropiado y/o 35 aumentar la probabilidad de captación celular. Entre los ejemplos de estas moléculas de orientación se encuentran los anticuerpos específicos para los receptores de la superficie celular y los ligandos naturales (o porciones de los ligandos naturales) para los receptores de la superficie celular.

En algunas realizaciones, las nucleasas de ingeniería o el ADN/ARN que codifica las nucleasas de ingeniería, se encapsulan dentro de liposomas o se acompañan utilizando lípidos catiónicos (véase, por ejemplo , Lipofectamine™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA Zuris et al. (2015) Nat Biotechnol. 33: 73-80 Mishra et al. (2011) J Drug Deliv. 40 2011:863734). Las formulaciones de liposomas y lipoplex pueden proteger la carga útil de la degradación, y facilitar la captación celular y la eficiencia del suministro a través de la fusión con y/o la disrupción de las membranas celulares de las células.

En algunas realizaciones, las proteínas nucleasas de ingeniería, o el ADN/ARN que codifica nucleasas de ingeniería, se encapsulan dentro de andamios poliméricos (por ejemplo, PLGA) o se acompañan utilizando polímeros catiónicos (por ejemplo, PEI, PLL) (Tamboli et al. (2011) Ther Deliv. 2(4): 523-536).

En algunas realizaciones, las proteínas nucleasas de ingeniería, o el ADN/ARN que codifica nucleasas de ingeniería, se combinan con moléculas anfifílicas que se autoensamblan en micelas (Tong et al. (2007) J Gene Med. 9(11): 956-66). Las micelas poliméricas pueden incluir una cubierta micelar formada con un polímero hidrofilico (por ejemplo, polietilenglicol) que puede evitar la agregación, enmascarar las interacciones de carga y reducir las interacciones no 50 específicas fuera de la célula.

En algunas realizaciones, las proteínas nucleasas de ingeniería, o el ADN/ARN que codifica nucleasas de ingeniería, se formulan en una emulsión o una nanoemulsión (*es decir*, con un diámetro promedio de partícula de < 1nm) para su suministro a la célula. El término "emulsión" se refiere, sin limitación, a cualquier dispersión o gota de aceite en agua, de agua en aceite, de agua en aceite o de aceite en agua en aceite, incluidas las estructuras lipídicas que pueden 55 formarse como resultado de las fuerzas hidrófobas que alejan los residuos apolares (por ejemplo, las cadenas largas de hidrocarburos) del agua y los grupos de cabeza polares hacia el agua, cuando una fase inmiscible en agua se mezcla con una fase acuosa. Estas otras estructuras lipídicas incluyen, pero no se limitan a, vesículas lipídicas unilamelares, paucilamelares y multilamelares, micelas y fases laminares. Las emulsiones están compuestas por una fase acuosa y una fase lipofílica (que suele contener un aceite y un disolvente orgánico). Las emulsiones también 60 suelen contener uno o más tensioactivos. Las formulaciones en nanoemulsión son bien conocidas, por ejemplo, como

se describe en la Solicitud de patente estadounidense nº 2002/0045667 y 2004/0043041 y Pat. Números 6.015.832, 6,506,803, 6,635,676 y 6,559,189,.

En algunas realizaciones, las proteínas nucleasas de ingeniería, o el ADN/ARN que codifica nucleasas de ingeniería, se unen covalentemente a, o se asocian no covalentemente con, conjugados poliméricos multifuncionales, 5 dendrímeros de ADN y dendrímeros poliméricos (Mastorakos et al. (2015) Nanoscale. 7(9): 3845-56 Cheng et al. (2008) J Pharm Sci. 97(1): 123-43). La generación de dendrímeros puede controlar la capacidad y el tamaño de la carga útil, y puede proporcionar una alta capacidad de carga útil. Además, la visualización de múltiples grupos de superficie se aprovecha para mejorar la estabilidad y reducir las interacciones inespecíficas.

En algunas realizaciones, los genes que codifican una nucleasa de ingeniería se introducen en una célula utilizando 10 un vector viral. Tales vectores son conocidos en la técnica e incluyen vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales y vectores de virus adeno-asociados (AAV) (revisados en Vannucci, et al. (2013) New Microbiol. 36:1-22). Los vectores AAV recombinantes útiles en la divulgación pueden tener cualquier serotipo que permita la transducción del virus en la célula y la inserción del gen de la nucleasa en el genoma celular. En particular, los vectores AAV recombinantes tienen un serotipo de AAV2 o AAV6. Los vectores AAV recombinantes también pueden ser 15 autocomplementarios, de modo que no requieren la síntesis de ADN de segunda cadena en la célula huésped (McCarty, et al. (2001) Gene Ther. 8:1248-54).

Si los genes de las nucleasas de ingeniería se suministran en forma de ADN (por ejemplo, plásmido) y/o a través de 20 un vector viral (*por ejemplo*, AAV), deben estar vinculados de forma operativa a un promotor. En algunas realizaciones, se trata de un promotor viral, como los promotores endógenos del vector viral (por ejemplo, el LTR de un vector lentiviral) o los conocidos promotores tempranos del citomegalovirus o del virus SV40. En una realización preferida, los genes de las nucleasas están vinculados de forma operable a un promotor que impulsa la expresión del gen preferentemente en la célula diana (*por ejemplo*, una célula T humana).

La divulgación proporciona además la introducción de un ácido nucleico exógeno en la célula, de tal manera que la secuencia de ácido nucleico exógeno se inserta en el gen de la microglobulina beta-2 en un sitio de escisión de la nucleasa. En algunas realizaciones, el ácido nucleico exógeno comprende un brazo de homología 5' y un brazo de 25 homología 3' para promover la recombinación de la secuencia de ácido nucleico en el genoma celular en el sitio de escisión de la nucleasa.

Los ácidos nucleicos exógenos de la divulgación se introducen en la célula por cualquiera de los medios previamente 30 discutidos. En una realización particular, los ácidos nucleicos exógenos se introducen por medio de un vector viral, preferentemente un vector AAV recombinante. Los vectores AAV recombinantes útiles para introducir un ácido nucleico exógeno pueden tener cualquier serotipo que permita la transducción del virus en la célula y la inserción de la secuencia del ácido nucleico exógeno en el genoma celular. En particular, los vectores AAV recombinantes tienen un serotipo de AAV2 o AAV6. Los vectores AAV recombinantes también pueden ser autocomplementarios, de modo 35 que no requieren la síntesis de ADN de segunda cadena en la célula huésped.

En otra realización particular, se introduce un ácido nucleico exógeno en la célula utilizando una plantilla de ADN de 40 cadena simple. El ADN monocatenario puede comprender el ácido nucleico exógeno y, en realizaciones preferidas, puede comprender brazos de homología 5' y 3' para promover la inserción de la secuencia de ácido nucleico en el sitio de escisión de la nucleasa por recombinación homóloga. El ADN monocatenario puede comprender además una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) 5' de AAV corriente arriba del brazo de homología 5', y una secuencia ITR 3' de AAV corriente abajo del brazo de homología 3'.

2.4 Composiciones farmacéuticas

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula modificada genéticamente, o una población de células modificadas genéticamente, de la divulgación y un portador farmacéutico. Dichas composiciones farmacéuticas se preparan de acuerdo con técnicas conocidas. Véase, por 45 ejemplo Remington, The Science And Practice of Pharmacy (21st ed. 2005). En la fabricación de una formulación farmacéutica según la divulgación, las células se mezclan típicamente con un portador farmacéuticamente aceptable y la composición resultante se administra a un sujeto. Por supuesto, el portador debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente de la formulación y no debe ser perjudicial para el sujeto. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender además uno o más agentes 50 adicionales útiles en el tratamiento de una enfermedad en el sujeto. En otras realizaciones, cuando la célula genéticamente modificada es una célula T humana genéticamente modificada (o una célula derivada de ella), las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden incluir además moléculas biológicas, como citoquinas (por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-15, y/o IL-21), que promueven la proliferación celular *in vivo* y el injerto. Las composiciones farmacéuticas que comprenden células modificadas genéticamente de la divulgación se administran en la misma 55 composición que un agente o molécula biológica adicional o, alternativamente, se coadministran en composiciones separadas.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación son útiles para el tratamiento de cualquier estado de enfermedad al que se dirige la inmunoterapia adoptiva de células T. En una realización particular, las composiciones farmacéuticas

de la divulgación son útiles en el tratamiento del cáncer. Dichos cánceres pueden incluir, sin limitación, carcinoma, linfoma, sarcoma, blastomas, leucemia, cánceres de origen de células B, cáncer de mama, cáncer gástrico, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, rhabdomiosarcoma, leucemia y linfoma de Hodgkin. En ciertas realizaciones, los 5 cánceres de origen de células B incluyen, sin limitación, leucemia linfoblástica aguda de linaje B, leucemia linfocítica crónica de células B y linfoma no Hodgkin de células B.

2.5 Procedimientos para producir vectores AAV recombinantes

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona vectores AAV recombinantes para su uso en los procedimientos 10 de la divulgación. Los vectores AAV recombinantes suelen producirse en líneas celulares de mamíferos como HEK-293. Dado que los genes virales *cap* y *rep* se eliminan del vector para evitar su autorreplicación y dejar espacio al gen o genes terapéuticos que se van a suministrar (por ejemplo, el gen de la endonucleasa), es necesario proporcionarlos en *trans* en la línea celular de empaquetamiento. Además, es necesario proporcionar los componentes "ayudantes" (por ejemplo, adenovirales) necesarios para apoyar la replicación (Cots D, Bosch A, Chillon M (2013) Curr. Gene Ther. 13(5): 370-81). Con frecuencia, los vectores AAV recombinantes se producen utilizando una triple transfección en la 15 que una línea celular se transfecta con un primer plásmido que codifica los componentes "ayudantes", un segundo plásmido que comprende los genes *cap* y *rep*, y un tercer plásmido que comprende los ITR virales que contienen la secuencia de ADN intermedia que se empaquetará en el virus. Las partículas virales que comprenden un genoma (ITRs y gen(es) de interés) encerrado en una cápside se aíslan entonces de las células mediante ciclos de congelación-descongelación, sonicación, detergente u otros medios conocidos en la técnica. A continuación, las partículas se 20 purifican mediante centrifugación en gradiente de densidad con cloruro de cesio o cromatografía de afinidad y, posteriormente, se suministran al gen o genes de interés en células, tejidos u organismo, como un paciente humano.

Dado que las partículas recombinantes de AAV se producen (fabrican) típicamente en células, deben tomarse 25 precauciones al practicar la presente divulgación para asegurar que la endonucleasa específica del sitio NO se exprese en las células de empaquetamiento. Dado que los genomas virales de la divulgación comprenden una secuencia de reconocimiento para la endonucleasa, cualquier endonucleasa expresada en la línea celular de empaquetado será capaz de escindir el genoma viral antes de que se empaquete en partículas virales. Esto dará lugar a una menor eficacia del empaquetado y/o al empaquetado de genomas fragmentados. Se utilizan varios enfoques para evitar la expresión de la endonucleasa en las células de empaquetado, incluyendo:

30 1. La endonucleasa se coloca bajo el control de un promotor específico del tejido que no está activo en las células de empaquetado. Por ejemplo, si se desarrolla un vector viral para el suministro de (un) gen(es) de endonucleasa al tejido muscular, se utiliza un promotor específico para el músculo. Entre los ejemplos de promotores específicos para el músculo se encuentran el C5-12 (Liu, et al. (2004) Hum Gene Ther. 15:783-92), el promotor de la creatina quinasa específica del músculo (MCK) (Yuasa, et al. (2002) Gene Ther. 9:1576-88), o el promotor del músculo liso 22 (SM22) (Haase, et al. (2013) BMC Biotechnol. 13:49-54). Algunos ejemplos de promotores específicos del SNC (neuronas) son los promotores de NSE, Synapsin y MeCP2 (Lentz, et al. (2012) Neurobiol Dis. 48:179-88). 35 Algunos ejemplos de promotores específicos del hígado son los promotores de la albúmina (como Palb), la α1-antitripsina humana (como Pa1AT) y la hemopexina (como Phpx) (Kramer, MG et al., (2003) Mol. Terapia 7:375-85). Entre los ejemplos de promotores específicos para el ojo se encuentran la opsina y los promotores K12 específicos para el epitelio corneal (Martin KRG, Klein RL y Quigley HA (2002) Methods (28): 267-75) (Tong Y, et al., (2007) J Gene Med, 9:956-66). Estos promotores, u otros promotores específicos de tejido conocidos en la 40 técnica, no son altamente activos en las células HEK-293 y, por tanto, no se espera que produzcan niveles significativos de expresión del gen de la endonucleasa en las células de empaquetamiento cuando se incorporan a los vectores virales de la presente divulgación. Del mismo modo, los vectores virales de la presente divulgación contemplan el uso de otras líneas celulares con el uso de promotores específicos de tejidos incompatibles (es decir, la conocida línea celular HeLa (célula epitelial humana) y el uso del promotor de hemopexina específico del hígado). Otros ejemplos de promotores específicos de tejidos son: sarcomas sinoviales PDZD4 (cerebelo), C6 45 (hígado), ASB5 (músculo), PPP1R12B (corazón), SLC5A12 (riñón), regulación del colesterol APOM (hígado), ADPRHL1 (corazón) y síndromes de malformación monogénica TP73L (músculo). (Jacox E, et al., (2010) PLoS One v.5(8):e12274).

50 2. Alternativamente, el vector se empaqueta en células de una especie diferente en la que no es probable que se exprese la endonucleasa. Por ejemplo, las partículas virales se producen en células microbianas, de insectos o de plantas utilizando promotores de mamíferos, como los conocidos promotores del citomegalovirus o del virus SV40, que no son activos en las células de empaquetado no mamíferas. En una realización preferida, las partículas virales se producen en células de insectos utilizando el sistema de baculovirus descrito por Gao, et al. 55 (Gao, H., et al. (2007) J. Biotechnol. 131(2): 138-43). Es poco probable que una endonucleasa bajo el control de un promotor de mamífero se exprese en estas células (Airenne, KJ, et al. (2013) Mol. Ther. 21(4):739-49). Además, las células de los insectos utilizan motivos de empalme de ARNm diferentes a los de las células de los mamíferos. Así, es posible incorporar un intrón de mamífero, como el intrón de la hormona del crecimiento humano (HGH) o el intrón del antígeno T grande del SV40, en la secuencia de codificación de una endonucleasa. Dado 60 que estos intrones no se empalan eficazmente a partir de los transcritos de pre-ARNm en las células de los insectos, éstas no expresarán una endonucleasa funcional y empaquetarán el genoma completo. Por el contrario, las células de mamífero a las que se stran las partículas recombinantes AAV resultantes empalarán

correctamente el pre-ARNm y expresarán la proteína endonucleasa funcional. Haifeng Chen ha informado del uso de los intrones del antígeno HGH y del antígeno T grande del SV40 para atenuar la expresión de las proteínas tóxicas barnasa y fragmento A de la toxina de la difteria en células de empaquetamiento de insectos, lo que permite la producción de vectores AAV recombinantes que portan estos genes de toxinas (Chen, H (2012) Mol Ther Nucleic Acids. 1(11): e57).

3. El gen de la endonucleasa está vinculado de forma operativa a un promotor inducible de manera que se requiere un inductor de molécula pequeña para la expresión de la endonucleasa. Algunos ejemplos de promotores inducibles son el sistema Tet-On (Clontech Chen H., et al., (2015) BMC Biotechnol. 15(1):4)) y el sistema RheoSwitch (Intrexon Sowa G., et al., (2011) Spine, 36(10): E623-8). Ambos sistemas, al igual que otros similares conocidos en la técnica, se basan en factores de transcripción inducibles por ligando (variantes del represor Tet y del receptor Ecdysone, respectivamente) que activan la transcripción en respuesta a un activador de molécula pequeña (Doxiciclina o Ecdysone, respectivamente). La práctica de la presente divulgación utilizando dichos activadores de transcripción inducibles por ligando incluye: 1) colocar el gen de la endonucleasa bajo el control de un promotor que responda al factor de transcripción correspondiente, teniendo el gen de la endonucleasa (un) sitio(s) de unión para el factor de transcripción; y 2) incluir el gen que codifica el factor de transcripción en el genoma viral empaquetado. El último paso es necesario porque la endonucleasa no se expresará en las células o tejidos diana tras el suministro recombinante de AAV si el activador de la transcripción no se proporciona también a las mismas células. El activador de la transcripción induce entonces la expresión del gen de la endonucleasa sólo en las células o tejidos que son tratados con el activador de molécula pequeña afín. Este enfoque es ventajoso porque permite regular la expresión del gen de la endonucleasa de forma espacio-temporal, seleccionando cuándo y a qué tejidos se administra el inductor de moléculas pequeñas. Sin embargo, el requisito de incluir el inductor en el genoma viral, que tiene una capacidad de carga significativamente limitada, crea un inconveniente para este enfoque.

4. En otra realización preferida, las partículas AAV recombinantes se producen en una línea celular de mamífero que expresa un represor de la transcripción que impide la expresión de la endonucleasa. Los represores de la transcripción son conocidos en la técnica e incluyen el represor Tet, el represor Lac, el represor Cro y el represor Lambda. Muchos receptores hormonales nucleares, como el receptor de la ecdisona, también actúan como represores de la transcripción en ausencia de su ligando hormonal correspondiente. Para poner en práctica la presente divulgación, las células de empaquetamiento se transfecstan/transducen con un vector que codifica un represor de la transcripción y el gen de la endonucleasa en el genoma viral (vector de empaquetamiento) se vincula de forma operable a un promotor que se modifica para que comprenda sitios de unión para el represor, de forma que el represor silencie el promotor. El gen que codifica el represor de la transcripción se coloca en varias posiciones. Se codifica en un vector separado; se incorpora en el vector de empaquetado fuera de las secuencias ITR; se incorpora en el vector cap/rep o en el vector auxiliar adenoviral; o, lo que es más preferible, se integra de forma estable en el genoma de la célula de empaquetado de forma que se exprese constitutivamente. Los procedimientos para modificar promotores comunes de mamíferos para incorporar sitios represores de la transcripción son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Chang y Roninson modificaron los promotores fuertes y constitutivos del CMV y del RSV para que incluyeran operadores para el represor Lac y demostraron que la expresión génica de los promotores modificados estaba muy atenuada en las células que expresaban el represor (Chang BD, y Roninson IB (1996) Gene 183:137-42). El uso de un represor de la transcripción no humano garantiza que la transcripción del gen de la endonucleasa se reprimirá sólo en las células de empaquetamiento que expresan el represor y no en las células o tejidos diana transducidos con el vector AAV recombinante resultante.

2.6 Variantes de nucleasas de ingeniería

45 Las realizaciones de la divulgación abarcan las nucleasas de ingeniería, y particularmente las meganucleasas recombinantes, descritas en el presente documento, y sus variantes. Otras realizaciones de la divulgación abarcan polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica las meganucleasas recombinantes descritas en el presente documento, y variantes de dichos polinucleótidos.

50 Tal y como se utiliza en este documento, "variantes" significa secuencias sustancialmente similares. Por polipéptido "variante" se entiende un polipéptido derivado del polipéptido "nativo" por delección o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos de la proteína nativa y/o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios del polipéptido nativo. Tal y como se utiliza aquí, un polinucleótido o polipéptido "nativo" comprende una secuencia parental de la que se derivan variantes. Las variantes de los polipéptidos comprendidas en las realizaciones son biológicamente activas. Es decir, siguen poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa; es decir, la capacidad de reconocer y escindir las secuencias de reconocimiento que se encuentran en el gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1), incluida la secuencia de reconocimiento B2M 13-14 (SEQ ID NO:2). Estas variantes pueden ser el resultado, por ejemplo, de la manipulación humana. Las variantes biológicamente activas de un polipéptido nativo de las realizaciones (SEQ ID NO:12), o las variantes biológicamente activas de las subunidades de unión a semisitio de reconocimiento descritas en el presente documento, tendrán al menos aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 %, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del polipéptido nativo o de la subunidad nativa, según lo determinado por los programas de alineación de secuencias y los parámetros descritos en otra parte del presente documento. Una variante biológicamente activa de un polipéptido

o subunidad de las realizaciones puede diferir de ese polipéptido o subunidad en tan solo aproximadamente 1-10, tan solo aproximadamente 5, tan solo 4, 3, 2 o incluso 1 residuo de aminoácido.

Los polipéptidos de las realizaciones se alteran de varias maneras, incluyendo sustituciones de aminoácidos, 5 delecciones, truncamientos e inserciones. Los procedimientos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en el arte. Por ejemplo, las variantes de la secuencia de aminoácidos se preparan mediante mutaciones en el ADN. Los procedimientos de mutagénesis y alteración de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382 Pat. de EE.UU. Nº 4.873.192 Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nueva York) y las referencias citadas en él. En el modelo de Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Las sustituciones conservadoras, como el intercambio de un aminoácido por otro con propiedades similares, son óptimas.

Se ha identificado previamente un número sustancial de modificaciones de aminoácidos en el dominio de reconocimiento de ADN de la meganucleasa I-Crel de tipo salvaje (*por ejemplo*, U.S. 8,021,867) que, por separado o 15 en combinación, dan lugar a meganucleasas recombinantes con especificidades alteradas en bases individuales dentro de la secuencia de reconocimiento de ADN de semisitio, de manera que las meganucleasas resultantes diseñadas racionalmente tienen especificidades de semisitio diferentes de la enzima de tipo salvaje. La Tabla 5 proporciona las posibles sustituciones que pueden realizarse en un monómero o subunidad de meganucleasa 20 recombinante para mejorar la especificidad en función de la base presente en cada posición de semisitio (-1 a -9) de un semisitio de reconocimiento. Dichas sustituciones se incorporan a las variantes de las meganucleasas divulgadas en el presente documento.

Tabla 5

Pos.	Base de cadena en sentido favorecido										
	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
-1	Y75 L75* C75* Y139* C46* A46*	R70* H75* R75* H46* K46* R46*	K70 E70* E75* E46* D46*	Q70* C70 L70 Y75* Q75* H75* H139 Q46* H46*				T46*			G70 A70 S70 G46*
-2	Q70 T44* A44* V44* 144* L44* N44*	E70 D70 K44* R44*	H70 D44* E44*	Q44*	C44*						
-3	Q68 C24* I24*	E68 F68 K24* R24*	R68	M68 C68 L68 F68		H68		Y68	K68		
-4	A26* Q77	E77 K26*	R77 E26*					S77 P26*			S26*
-5		E42	R42			K28*	C28* P42				M66 K66
-6	Q40 C28*	E40 R28*	R40	C40 140 V40 C79 179 V79 Q28*	A40 A79 A28* H28*						S40 S28*
-7	N30* Q38	E38 K30* R30*	K38 R38 E30*	138 L38			C38				H38 N38 Q30*
-8	F33 Y33	E33 D33	F33 H33	L33 V33 133 F33 C33		R32*	R33				

(continuación)

Pos.	Base de cadena en sentido favorecida										
	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
-9		E32	R32	L32				D32			S32
			K32	V32 A32 C32				I32			N32 H32 Q32 T32

En el caso de los polinucleótidos, una "variante" comprende una supresión y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios dentro del polinucleótido nativo. Un experto en la técnica reconocerá que las variantes de los ácidos nucleicos de las realizaciones se construirán de manera que se mantenga el marco de lectura abierto. Para los polinucleótidos, las variantes conservativas incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos de las realizaciones. Los polinucleótidos variantes incluyen polinucleótidos derivados sintéticamente, como los generados, por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio, pero que siguen codificando una meganucleasa recombinante de las realizaciones.

Generalmente, las variantes de un polinucleótido particular de las realizaciones tendrán al menos aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o más de identidad de secuencia con ese polinucleótido particular como se determina por los programas de alineación de secuencia y los parámetros descritos en otra parte del presente documento. Las variantes de un polinucleótido particular de las realizaciones (*es decir*, el polinucleótido de referencia) también pueden evaluarse por comparación del porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por un polinucleótido variante y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia.

No se espera que las delecciones, inserciones y sustituciones de las secuencias proteicas aquí englobadas produzcan cambios radicales en las características del polipéptido. Sin embargo, cuando es difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, delección o inserción antes de hacerlo, un experto en la técnica apreciará que el efecto se evaluará examinando el polipéptido para ver su capacidad de reconocer y escindir preferentemente las secuencias de reconocimiento que se encuentran dentro del gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1).

25 EJEMPLOS

La presente divulgación se ilustra además con los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos. Los ejemplos que no están comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones son únicamente ilustrativos.

EJEMPLO 1

Caracterización de meganucleasas que reconocen y escinden secuencias de reconocimiento de B2M

30 **1. Meganucleasas que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento B2M 13-14**

Meganucleasas recombinantes (SEQ ID NOs: 12-100), denominadas colectivamente en el presente documento "meganucleasas B2M 13-14", fueron diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento B2M 13-14 (SEQ ID NO:2), presente en el gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1). Cada meganucleasa recombinante B2M 13-14 comprende una señal de localización de la nucleasa N-terminal derivada del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad de cada meganucleasa B2M 13-14 se une al semi-sitio de reconocimiento B2M13 de la SEQ ID NO:2, mientras que una segunda subunidad se une al semi-sitio de reconocimiento B2M14 (véase la Fig. 1).

Las subunidades de unión a B2M13 y las subunidades de unión a B2M14 comprenden cada una una región hipervariable de 56 pares de bases, denominadas HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a B2M13 están muy conservadas o, en muchos casos, son idénticas fuera de la región HVR1, excepto en la posición 80 o en la posición 271 (que comprende un residuo Q o E), y están muy conservadas dentro de la región HVR1. Del mismo modo, las subunidades de unión a B2M14 también están muy conservadas o, en muchos casos, son idénticas fuera de la región HVR2, excepto en la posición 80 o en la posición 271 (que comprende un residuo Q o E). Al igual que la región HVR1, la región HVR2 también está muy conservada.

45 Las regiones de unión a B2M13 de las SEQ ID NOs: 12-100 se proporcionan como SEQ ID NOs: 132-220, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs:132-220 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:132, que es la región de unión a B2M13 de la meganucleasa B2M 13-14x.479 (SEQ ID NO:12). Regiones de unión a B2M14 de las SEQ ID NOs: 12-100 se proporcionan como SEQ ID NOs:221-309, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs:221-309 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:221, que es la región de unión a B2M14 de la meganucleasa B2M 13-14x.479 (SEQ ID NO:12).

2. Meganucleasas de referencia que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento B2M 5-6

Meganucleasas recombinantes (SEQ ID NOs: 101-113), denominadas colectivamente en el presente documento "meganucleasas B2M 5-6", fueron diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento B2M 5-6 (SEQ ID NO:4), presente en el gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1). Cada meganucleasa recombinante

5 B2M 5-6 comprende una señal N-terminal de localización de la nucleasa derivada del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad de cada meganucleasa B2M 5-6 se une al semi-sitio de reconocimiento B2M5 de la SEQ ID NO:4, mientras que una segunda subunidad se une al semi-sitio de reconocimiento B2M6 (véase la Fig. 1).

10 Las subunidades de unión a B2M5 y de unión a B2M6 comprenden cada una una región hipervariable de 56 pares de bases, denominada HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a B2M5 están muy conservadas o, en muchos casos, son idénticas fuera de la región HVR1, excepto en la posición 80 o en la posición 271 (que comprende un residuo Q o E), y están muy conservadas dentro de la región HVR1. Del mismo modo, las subunidades de unión a B2M5 también están muy conservadas o, en muchos casos, son idénticas fuera de la región HVR2, excepto en la posición 80 o en la posición 271 (que comprende un residuo Q o E), y están muy conservadas dentro de la región HVR2.

15 Las regiones de unión a B2M5 de las SEQ ID NOs: 101-113 se proporcionan como SEQ ID NOs:310-322, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs:310-322 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:310, que es la región de unión a B2M5 de la meganucleasa B2M 5-6x.14 (SEQ ID NO:101). Regiones de unión a B2M6 de las SEQ ID NOs: 101-113 se proporcionan como SEQ ID NOs:323-335, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs:323-335 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:323, que es la región de unión a B2M6 de la meganucleasa B2M 5-6x.14 (SEQ ID NO:101).

3. Meganucleasas de referencia que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento B2M 7-8

Meganucleasas recombinantes (SEQ ID NOs: 114-124), denominadas colectivamente en el presente documento "meganucleasas B2M 7-8", fueron diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento B2M 7-8 (SEQ ID NO:6), presente en el gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1). Cada meganucleasa recombinante

20 B2M 7-8 comprende una señal N-terminal de localización de la nucleasa derivada del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad de cada meganucleasa B2M 7-8 se une al semi-sitio de reconocimiento B2M7 de la SEQ ID NO:6, mientras que una segunda subunidad se une al semi-sitio de reconocimiento B2M8 (véase la Fig. 1).

25 30 Las subunidades de unión a B2M7 y las subunidades de unión a B2M8 comprenden cada una una región hipervariable de 56 pares de bases, denominadas HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a B2M7 están muy conservadas o, en muchos casos, son idénticas fuera de la región HVR1, excepto en la posición 80 o en la posición 271 (que comprende un residuo Q o E), y están muy conservadas dentro de la región HVR1. Del mismo modo, las subunidades de unión a B2M8 también están muy conservadas o, en muchos casos, son idénticas fuera de la región HVR2, excepto en la posición 80 o en la posición 271 (que comprende un residuo Q o E), y están muy conservadas dentro de la región HVR2.

35 40 Las regiones de unión a B2M7 de las SEQ ID NOs: 114-124 se proporcionan como SEQ ID NOs:336-346, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs:336-346 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:336, que es la región de unión a B2M7 de la meganucleasa B2M 7-8x.88 (SEQ ID NO:114). Regiones de unión a B2M8 de las SEQ ID NOs: 114-124 se proporcionan como SEQ ID NOs:347-357, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs:347-357 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:347, que es la región de unión a B2M8 de la meganucleasa B2M 7-8x.88 (SEQ ID NO:114).

4. Meganucleasas de referencia que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento B2M 11-12

45 Las meganucleasas recombinantes (SEQ ID NOs:125 y 126), denominadas colectivamente en este documento como "meganucleasas B2M 11-12", fueron diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento B2M 11-12 (SEQ ID NO:8), que está presente en el gen de la microglobulina beta-2 humana (SEQ ID NO:1). Cada meganucleasa recombinante B2M 11-12 comprende una señal de localización de la nucleasa N-terminal derivada del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad de cada meganucleasa B2M 11-12 se une al semi-sitio de reconocimiento B2M11 de la SEQ ID

50 NO:8, mientras que una segunda subunidad se une al semi-sitio de reconocimiento B2M12 (véase la Fig. 1).

55 Las subunidades de unión a B2M11 y las subunidades de unión a B2M12 comprenden cada una una región hipervariable de 56 pares de bases, denominadas HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a B2M11 están muy conservadas o, en muchos casos, son idénticas fuera de la región HVR1, excepto en la posición 80 o en la posición 271 (que comprende un residuo Q o E), y están muy conservadas dentro de la región HVR1. Del mismo modo, las subunidades de unión a B2M12 también están muy conservadas o, en muchos casos, son idénticas fuera de la región HVR2, excepto en la posición 80 o en la posición 271 (que comprende un residuo Q o E), y están muy conservadas dentro de la región HVR2.

Las regiones de unión a B2M11 de las SEQ ID NOs:125 y 126 se proporcionan como SEQ ID NOs:358 y 359, respectivamente. Los SEQ ID NOs:358 y 359 comparten una identidad de secuencia del 99 %. Las regiones de unión a B2M12 de las SEQ ID NOs:125 y 126 se proporcionan como SEQ ID NOs:360 y 361, respectivamente. Los SEQ ID NOs:360 y 361 comparten un 99 % de identidad de secuencia.

5 **5. Escisión de secuencias de reconocimiento de B2M en un ensayo informador de células CHO**

Para determinar si las meganucleasas B2M 13-14, B2M 5-6, B2M 7-8 y B2M 11-12 podían reconocer y escindir sus respectivas secuencias de reconocimiento (SEQ ID NOs:2, 4, 6 y 8, respectivamente), se evaluó cada meganucleasa recombinante utilizando el ensayo informador de células CHO descrito anteriormente (véase WO/2012/167192 y las Figs. 8A-8D). Para realizar los ensayos, se produjeron líneas de células CHO informadoras que llevaban un casete de expresión del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) no funcional integrado en el genoma de las células. El gen de la GFP en cada línea celular fue interrumpido por un par de secuencias de reconocimiento de tal manera que la escisión intracelular de cualquiera de las secuencias de reconocimiento por una meganucleasa estimularía un evento de recombinación homóloga que daría lugar a un gen funcional de la GFP.

10 En las líneas celulares informadoras de CHO desarrolladas para este estudio, una secuencia de reconocimiento insertada en el gen GFP fue la secuencia de reconocimiento B2M 13-14 (SEQ ID NO:2), la secuencia de reconocimiento B2M 5-6 (SEQ ID NO:4), la secuencia de reconocimiento B2M 7-8 (SEQ ID NO:6), o la secuencia de reconocimiento B2M 11-12 (SEQ ID NO:8). La segunda secuencia de reconocimiento insertada en el gen GFP fue una secuencia de reconocimiento CHO-23/24, que es reconocida y escindida por una meganucleasa de control llamada "CHO-23/24". Las células informadoras CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento B2M 13-14 y la secuencia de reconocimiento CHO-23/24 se denominan en el presente documento "células B2M 13-14". Las células informadoras CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento B2M 5-6 y la secuencia de reconocimiento CHO-23/24 se denominan en el presente documento "células B2M 5-6". Las células informadoras CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento B2M 7-8 y la secuencia de reconocimiento CHO-23/24 se denominan en el presente documento "células B2M 7-8". Las células informadoras CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento B2M 11-12 y la secuencia de reconocimiento CHO-23/24 se denominan en el presente documento "células B2M 11-12".

15 Las células informadoras CHO se transfecaron con ADN plasmídico que codificaba sus correspondientes meganucleasas recombinantes (*por ejemplo*, las células B2M 13-14 se transfecaron con ADN plasmídico que codificaba meganucleasas B2M 13-14) o que codificaba la meganucleasa CHO-23/34. En cada ensayo, se transfecaron 4×10^5 células informadoras CHO con 50 ng de ADN plasmídico en una placa de 96 pocillos utilizando 20 Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) según las instrucciones del fabricante. A las 48 horas después de la transfección, las células se evaluaron por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas a la GFP en comparación con un control negativo no transfectado (*por ejemplo*, B2M 13-14bs). Como se muestra en las Figs. 4A-30 4J, todas las meganucleasas B2M 13-14, B2M 5-6, B2M 7-8 y B2M 11-12 probadas produjeron células positivas a la GFP en líneas celulares que comprendían su correspondiente secuencia de reconocimiento en frecuencias 35 significativamente superiores al control negativo.

Estos estudios demostraron que las meganucleasas B2M 13-14, las meganucleasas B2M 5-6, las meganucleasas B2M 11-12 y las meganucleasas B2M 13-14 comprendidas en la divulgación pueden dirigirse y escindir eficazmente sus respectivas secuencias de reconocimiento en las células.

EJEMPLO 2

40 **Supresión de la expresión de B2M de la superficie celular en las células T**

1. Supresión de la expresión de la superficie celular de B2M en las células T humanas

Este estudio demostró que un número selecto de meganucleasas B2M 13-14 abarcadas por la divulgación podían escindir la secuencia de reconocimiento B2M 13-14 en células T humanas obtenidas de un donante, lo que resultaba 45 en la supresión de la expresión de la superficie celular B2M. Para comprobar si las meganucleasas B2M podían escindir la secuencia de reconocimiento B2M 13-14 en las células T humanas, se estimularon las células del donante con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y luego se electroporaron con ARNm que codificaba una meganucleasa B2M 13-14 determinada (1 μ g) utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) según las instrucciones del fabricante. Como control positivo, las células fueron electroporadas de forma simulada. En un control adicional de la eficacia de la electroporación, las células se electroporaron con ARNm que codificaba GFP (1 μ g). A los 3 días 50 después de la electroporación, las células se tiñeron con un anticuerpo que reconoce la β -2 microglobulina (BD Biosciences) y se analizaron por citometría de flujo. Los gráficos de flujo se muestran en las Figs. 5A-5N y los datos 55 se resumen en la Tabla 6.

Las células de control positivo y las células electroporadas con GFP se tiñeron de forma abrumadoramente positiva para la expresión de B2M, con un 0,18 % y un 0,23 % de las células que se tiñeron de forma negativa, respectivamente (Figs. 5A y 5C, y Tabla 6). Las células de control no teñidas fueron 99,99 % negativas para la tinción de B2M (Fig. 5B y Tabla 6). Sorprendentemente, aunque todas las meganucleasas B2M 13-14 probadas tuvieron éxito en el ensayo informador de CHO, la B2M 13-14x.93 fue la única meganucleasa que mostró algún indicio de que podía generar indels en el gen B2M y reducir la expresión de la superficie celular de B2M, con un 2,18 % de células con tinción

negativa para B2M (Fig. 5N y Tabla 6). Las células electroporadas con cualquiera de las otras meganucleasas B2M 13-14 ensayadas mostraron células B2M-negativas más o menos equivalentes al control electroporado de prueba, oscilando entre el 0,01 %-0,14 % de negatividad (Figs. 5A-5M y Tabla 6). Estos resultados indicaron que, para el gen B2M, la escisión exitosa de una secuencia de reconocimiento de B2M en las células informadoras no asegura la escisión de la secuencia de reconocimiento en las células T y, posteriormente, la reducción de la expresión de B2M en la superficie celular.

Tabla 6

Meganucleasa	% B2M Negativo	% B2M Positivo
Control positivo	0,18 %	99,82 %
Control no teñido	99,99 %	0,01 %
GFP	0,23 %	99,77 %
B2M 13-14x.10	0,10 %	99,90 %
B2M 13-14x.32	0,03 %	99,97 %
B2M 13-14x.82	0,06 %	99,94 %
B2M 13-14x.84	0,01 %	99,99 %
B2M 13-14x.85	0,06 %	99,94 %
B2M 13-14x.3	0,00 %	100,00 %
B2M 13-14x.14	0,04 %	99,96 %
B2M 13-14x.22	0,06 %	99,94 %
B2M 13-14x.31	0,01 %	99,99 %
B2M 13-14x.76	0,14 %	99,86 %
B2M 13-14x.93	2,18 %	97,82 %

Dado que la B2M 13-14x.93 fue la única de las meganucleasas B2M 13-14 que demostró actividad contra la secuencia de reconocimiento B2M en células T humanas, esta meganucleasa se modificó adicionalmente para aumentar la actividad de nucleasa. Los inventores han demostrado previamente que las mutaciones en las posiciones de aminoácidos 80 y 66 de una subunidad de meganucleasas derivadas de I-Crel (que también corresponden a las posiciones 271 y 257, respectivamente, de una meganucleasa de cadena simple) pueden tener un impacto dramático en la actividad de las nucleasas, presumiblemente debido a interacciones no específicas con la columna vertebral del ADN cargada negativamente. Las sustituciones comunes incluyen E o Q en la posición 80 del aminoácido, e Y, K o R en la posición 66 del aminoácido. La posición del aminoácido 80 puede cambiarse en la primera subunidad de la meganucleasa y/o en la segunda subunidad de la meganucleasa, generando las siguientes combinaciones posibles: E en ambas subunidades de la meganucleasa, Q en ambas subunidades de la meganucleasa, E en la primera subunidad de la meganucleasa y Q en la segunda subunidad de la meganucleasa, o Q en la primera subunidad de la meganucleasa y E en la segunda subunidad de la meganucleasa. La posición 66 del aminoácido puede modificarse en cualquiera de las subunidades de la meganucleasa, pero en este caso sólo se modifica en la primera subunidad de la meganucleasa. La meganucleasa original B2M 13-14x.93 tenía una Q en la posición 80 del aminoácido en ambas subunidades de la meganucleasa.

La Tabla 7 muestra las variantes B2M 13-14x.93 generadas, con E o Q indicando el aminoácido en la posición 80 en la primera y segunda subunidad de la meganucleasa, respectivamente, seguido de la sustitución de aminoácidos realizada en la posición 66 en la primera subunidad de la meganucleasa. Por ejemplo, B2M 13-14x.93 EQY66 indica que el aminoácido 80 de la primera subunidad de la meganucleasa es E, el aminoácido 80 (es decir, 271) de la segunda subunidad de la meganucleasa es Q, y el aminoácido 66 de la primera subunidad de la meganucleasa es Y.

Para ensayar estas variantes de B2M 13-14x.93, se estimularon las células T humanas del donante con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y luego se electroporaron con ARNm que codificaba una meganucleasa B2M 13-14 determinada (1µg) utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) según las instrucciones del fabricante. A los 3 días después de la electroporación, las células se tiñeron con un anticuerpo que reconoce la β-2 microglobulina (BD Biosciences) y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados de la citometría de flujo se resumen en la Tabla 7. Todas las variantes B2M 13-14x.93 fueron capaces de interrumpir el gen B2M, con eficiencias de knockout que oscilaron entre el 1,58 % y el 37 % (Tabla 7). La variante B2M 13-14x.93 más activa fue B2M 13-14x.93 QE, que dio lugar a un 37 % de células B2M negativas (Tabla 7). Las dos siguientes variantes más activas de la meganucleasa B2M 13-14x.93 tenían una Q en la posición 80 de la segunda subunidad de la meganucleasa y una Y en la posición 66 (B2M 13-14x.93 QQY66 y B2M 13-14x.93 EQY66). Curiosamente, la mayoría de las variantes no eran

notablemente diferentes de la meganucleasa B2M 13-14x.93 original (B2M 13-14x.93EQ, QQK66, QQR66, EEY66, EEK66, EER66, EQK66 y EQR66).

Tabla 7

Meganucleasa	% B2M Negativo	% B2M Positivo
B2M 13-14x.93EE	18,3	81,7
B2M 13-14x.93QE	37	63
B2M 13-14x.93EQ	5,13	94,87
B2M 13-14x.93QQY66	19,2	80,8
B2M 13-14x.93QQK66	2,64	97,36
B2M 13-14x.93QQR66	5,05	94,95
B2M 13-14x.93EEY66	1,58	98,42
B2M 13-14x.93EEK66	3,84	96,16
B2M 13-14x.93EER66	7,07	92,93
B2M 13-14x.93EQY66	21,4	78,6
B2M 13-14x.93EQK66	6,81	93,19
B2M 13-14x.93EQR66	5,12	94,88
B2M 13-14x.93	3,95	96,05

5 Aunque estas sustituciones en las posiciones de aminoácidos 80 y 66 dieron lugar a meganucleasas B2M 13-14x.93 que eran más activas contra la secuencia de reconocimiento B2M 13-14 que la meganucleasa B2M 13-14x.93 original, se llevó a cabo una optimización adicional para maximizar la actividad de las meganucleasas B2M 13-14. Se diseñaron 10 nuevas meganucleasas B2M 13-14 en las que la primera subunidad de la meganucleasa seguía siendo la misma que en la B2M 13-14x.93, pero la segunda subunidad de la meganucleasa contenía nuevas sustituciones de aminoácidos en posiciones de contacto con la secuencia de reconocimiento B2M 13-14.

Para probar estas nuevas variantes de B2M 13-14, se estimularon las células T humanas del donante con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y luego se electroporaron con ARNm que codificaba una meganucleasa B2M 13-14 determinada (1µg) utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) según las instrucciones del fabricante. Se incluyó el B2M 13-14x.93 QE para poder compararlo con las variantes anteriores. A los 6 días de la electroporación, 15 las células se tiñeron con un anticuerpo que reconoce la β-2 microglobulina (BD Biosciences), así como con un anticuerpo que reconoce el CD3 (BioLegend), un marcador de células T. Los gráficos de citometría de flujo se muestran en las Figs. 6A-6J.

En este experimento, B2M 13-14x.93QE generó un 21,2 % de células B2M-negativas, comparado con el 0,49 % en 20 las células de control no electroporadas (Figs. 6B y 6A, respectivamente). Varias de las nuevas variantes, incluyendo B2M 13-14x.97, B2M 13-14x.199, B2M 13-14x.202, B2M 13-14x.169, y B2M 13-14x.275 fueron significativamente más activas que B2M 13-14x.93 QE, generando eficiencias de eliminación de B2M tan altas como el 58,4 % (Fig. 6J).

Se generó un último grupo de meganucleasas B2M 13-14 y se evaluó su capacidad para eliminar la expresión de B2M en la superficie de las células T humanas. Estas nucleasas se basaron en la B2M 13-14x.169, una de las variantes descritas anteriormente. Se realizaron cambios en la primera subunidad de la meganucleasa para introducir contactos de base alternativos, mientras que la segunda subunidad de la meganucleasa siguió siendo la misma que en B2M 13-14x.169.

Las células T humanas del donante se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y luego se electroporaron con ARNm que codificaba una meganucleasa B2M 13-14 determinada (1µg) utilizando el nucleofector Amaxa 4D (Lonza) según las instrucciones del fabricante. B2M 13-14x.202 se incluyó para permitir la comparación 30 con las variantes anteriores mostradas en las Figs. 6A-6J. Para buscar la pérdida de la expresión superficial de B2M, las células se tiñeron con un anticuerpo que reconoce la β-2 microglobulina (BD Biosciences), así como con un anticuerpo que reconoce el CD3 (BioLegend), un marcador de células T. Los datos de citometría de flujo para todo el panel de variantes en el día 3 post-electroporación se resumen en la Tabla 8, y los gráficos de flujo de las meganucleasas B2M 13-14 que mostraron una eficiencia de con eliminación de B2M de >40 % se muestran en las 35 Figs. 7A-7H.

De forma similar al experimento anterior, B2M 13-14x.202 mostró una eficiencia de knockout de B2M del 60,9 % (Tabla 8). Varias de las variantes de B2M 13-14 probadas mostraron eficiencias de eliminación superiores al 40 % (Figs. 7A-

7H) y dos variantes, B2M 13-14x.287 y B2M 13-14x.479, superaron la eficacia de B2M 13-14x.202 con poblaciones de tinción negativa del 75,7 % y 67,2 %, respectivamente.

Tabla 8

Meganucleasa	% B2M Negativo	% B2M Positivo
B2M 13-14x.281	53,6	46,4
B2M 13-14x.283	49,3	50,7
B2M 13-14x.285	22	78
B2M 13-14x.286	44,6	55,4
B2M 13-14x.287	75,7	24,3
B2M 13-14x.288	18,8	81,2
B2M 13-14x.317	3,91	96,09
B2M 13-14x.325	14,4	85,6
B2M 13-14x.338	4,68	95,32
B2M 13-14x.362	37,8	62,2
B2M 13-14x.365	27,4	72,6
B2M 13-14x.371	22,6	77,4
B2M 13-14x.377	75,9	24,1
B2M 13-14x.378	3,54	96,46
B2M 13-14x.381	44,1	55,9
B2M 13-14x.448	17,1	82,9
B2M 13-14x.456	15,7	84,3
B2M 13-14x.457	19,7	80,3
B2M 13-14x.464	8,24	91,76
B2M 13-14x.465	30,8	69,2
B2M 13-14x.479	67,2	32,8
B2M 13-14x.556	11,8	88,2
B2M 13-14x.551	40,3	59,7
B2M 13-14x.202	60,9	39,1

- 5 Los datos presentados anteriormente demuestran el éxito de la ingeniería de las meganucleasas diseñadas para dirigirse a una rotura de doble cadena en el gen de la microglobulina beta-2 y el uso de dichas meganucleasas para generar mutaciones en el gen de la microglobulina beta-2 en las células T humanas, lo que resulta en la anulación del gen. Sorprendentemente, sólo una de las once meganucleasas B2M 13-14 que tuvieron éxito en el ensayo informador de CHO fue capaz de eliminar la expresión del gen B2M. Además, la única de las meganucleasas iniciales B2M 13-14 que causó una delección en el gen B2M, B2M 13-14x.93, lo hizo con una frecuencia muy baja (2,18 %, Tabla 6). La B2M 13-14x.93 fue sometida a varias rondas de rediseño con el fin de optimizar su actividad y especificidad, dando lugar finalmente a varias meganucleasas B2M 13-14 capaces de generar eliminaciones de B2M con eficiencias en el intervalo del 60-75 % (Tabla 8).

EJEMPLO 3

15 Doble eliminación de B2M de la superficie celular y del receptor de células T en las células T

1. Doble eliminación por nucleofección simultánea

- En algunos casos, puede ser deseable eliminar tanto el gen de la microglobulina beta-2 como un receptor nativo de células T (TCR). Los inventores han descrito previamente meganucleasas diseñadas para causar una rotura de doble cadena en el gen constante del receptor de células T alfa (SEQ ID NO: 127) que, a su vez, interrumpe la expresión de la superficie celular del TCR endógeno. Una de estas meganucleasas se denomina TRC 1-2x.87 EE (SEQ ID NO: 131),

cuyo objetivo es la secuencia de reconocimiento establecida en la SEQ ID NO: 128. La pérdida del TCR puede observarse tiñendo las células con un anticuerpo contra la proteína CD3, que sólo se expresa en la superficie de las células si se expresa el TCR.

Para comprobar si las meganucleasas TRC 1-2x.87 EE y B2M 13-14 podían utilizarse para generar una población de células en las que se eliminaran tanto el gen TCR como el gen B2M, se realizaron experimentos en los que se suministraron simultáneamente ARNm separados que codificaban estas meganucleasas a células T humanas. En un primer estudio, se estimularon las células T humanas de los donantes con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 2 días, y luego se coelectroporaron con ARNm que codificaba B2M 13-14x.202 (1 μ g) y ARNm que codificaba TRC 1-2x.87 EE (1 μ g) utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) según las instrucciones del fabricante. Como controles,

las células T humanas fueron electroporadas de forma simulada o electroporadas con ARNm que codificaba una única meganucleasa, ya sea B2M 13-14x.202 o TRC 1-2x.87 EE. A los 6 días de la electroporación, las células se tiñeron con un anticuerpo contra CD3 y un anticuerpo contra B2M y se analizaron por citometría de flujo (Figs. 8A-8D). Las células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87 EE solo fueron 57,6 % negativas al TCR (Fig. 8B), comparado con 2,35 % en las células electroporadas de prueba (Fig. 8A), y las células que fueron electroporadas con B2M 13-14x.202 solo fueron 49,4 % negativas al B2M (Fig. 8C) comparado con 0,72 % en las células electroporadas de prueba (Fig. 8A). Las células que fueron coelectroporadas con ARNm que codifica B2M 13-14x.202 y ARNm que codifica TCR 1-2x.87 EE muestran una población clara en la que el 21,5 % de las células eran negativas tanto para B2M como para la expresión del TCR (Fig. 8D), en comparación con el 0,66 % en las células electroporadas de prueba (Fig. 8A). En las células que fueron coelectroporadas con ARNm para ambas meganucleasas, las eficiencias únicas de eliminación para TCR y B2M fueron del 28,3 % y 16,7 %, respectivamente.

En un segundo estudio, las células T humanas del donante se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 2 días, y luego se coelectroporaron con ARNm que codificaba B2M 13-14x.169 (1 μ g) y ARNm que codificaba TRC 1-2x.87 EE (1 μ g) utilizando el nucleofector Amaxa 4D (Lonza) según las instrucciones del fabricante. Como controles, las células T humanas fueron electroporadas de forma simulada o electroporadas con ARNm que codificaba una sola meganucleasa, ya sea B2M 13-14x.169 o TRC 1-2x.87 EE. A los 6 días de la electroporación, las células se tiñeron con un anticuerpo contra CD3 y un anticuerpo contra B2M y se analizaron por citometría de flujo (Figs. 9A-9D). Las células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87 EE solo fueron 57,6 % TCR negativo (Fig. 9B), comparado con 2,35 % en las células electroporadas de prueba (Fig. 9A), y las células que fueron electroporadas con B2M 13-14x.169 solo fueron 28,1 % B2M negativo (Fig. 9C) comparado con 0,72 % en las células electroporadas de prueba (Fig. 9A). Las células que fueron coelectroporadas con ARNm que codifica B2M 13-14x.169 y ARNm que codifica TCR 1-2x.87 EE muestran una población clara en la que el 15,4 % de las células eran negativas tanto para B2M como para la expresión del TCR (Fig. 9D), en comparación con el 0,66 % en las células electroporadas de prueba (Fig. 9A). En las células que fueron coelectroporadas con ARNm para ambas meganucleasas, las eficiencias únicas de eliminación para TCR y B2M fueron del 33,7 % y del 13,0 %, respectivamente.

2. Doble eliminación por nucleofeción secuencial

Si bien la electroporación simultánea de células T humanas con ARNm que codifica una meganucleasa B2M 13-14 y ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87EE es eficaz para generar una población doblemente negativa B2M/TCR, puede ser útil generar una población de doble eliminación utilizando la electroporación secuencial de ARNm de meganucleasas.

Para comprobarlo, se estimularon las células T humanas del donante con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y luego se electroporaron con ARNm que codificaba B2M 13-14x.93 QE (1 μ g) utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) según las instrucciones del fabricante. 4 días después de la electroporación, se enriquecieron las células B2M negativas utilizando un anticuerpo anti-B2M biotinilado (BioLegend) y un kit de cóctel de selección de biotina humana (StemCell technologies), lo que dio como resultado una población de células que eran negativas para B2M en un 88,15 % (Fig. 10B), tal y como muestra el análisis de citometría de flujo tras la tinción con un anticuerpo contra B2M. Las células enriquecidas B2M-negativas se volvieron a estimular con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y después se electroporaron con ARNm que codificaba TRC 1-2x.87 EE (1 μ g) utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) según las instrucciones del fabricante. A los 5 días después de la electroporación, las células se tiñeron con anticuerpos contra B2M y TCR y se analizaron por citometría de flujo (Fig. 10C). El 31,67 % de estas células eran negativas para la expresión de superficie tanto de B2M como de TCR, en comparación con el 0,58 % de la población inicial (Fig. 10A), lo que indica que la electroporación secuencial de células con ARNm que codifica B2M 13-14 y TRC 1-2 meganucleasas es también un procedimiento eficaz para generar una población doblemente negativa de células T humanas.

A continuación se determinó si se podía enriquecer una población altamente purificada de células B2M/TCR doblemente negativas. En este estudio, las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) del donante fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 2 días, y luego electroporadas con ARNm que codifica B2M 13-14x.93 QE (1 μ g) utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) según las instrucciones del fabricante. Las células B2M-negativas se enriquecieron como se ha descrito anteriormente. A continuación, las células se volvieron a estimular con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días y se electroporaron con ARNm que codifica TRC 1-2x.87 EE. 6 días después de la electroporación, se enriquecieron las células CD3 negativas utilizando un kit de selección positiva de CD3 (StemCell Technologies), seguido de otro enriquecimiento de células B2M negativas

utilizando un anticuerpo anti-B2M biotinilado y un kit de selección de biotina (StemCell Technologies). Las células enriquecidas se incubaron durante 3 días en presencia de IL-2, IL-7 e IL-15, luego se tiñeron con anticuerpos contra B2M y CD3 y se analizaron por citometría de flujo (Figs. 11A-11C). Figs. 11A y 11B muestran las PBMC de partida teñidas con anti-CD3 solo (Fig. 11A) o con anti-CD3 y anti-B2M (Fig. 11B). La electroporación secuencial con ARNm que codifica B2M 13-14, y luego ARNm que codifica TRC 1-2x.87 EE, seguida de un enriquecimiento para las células CD3 y B2M-negativas, dio como resultado una población que era 98,5 % B2M/TCR doblemente negativa (Fig. 11C).

3. Producción de una población enriquecida y ampliada de células T con doble eliminación de B2M/TCR

La coelectroporación de ARNm que codifica una meganucleasa B2M 13-14 y ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE puede permitir la producción y generación de una cantidad terapéuticamente relevante (*es decir*, >10 millones de células) de células T humanas doblemente negativas B2M/TCR. Para generar >10 millones de células B2M/TCR doblemente negativas, las células T humanas serán estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y luego electroporadas con ARNm que codifica B2M 13-14x.479 y ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza). En los experimentos típicos, se electroporarán 1 millón de células para cada muestra. Para producir una cantidad terapéuticamente relevante de células B2M/TCR doblemente negativas, se electroporarán hasta 10 millones de células. Tras la electroporación, las células se incubarán con medios que incluyen IL-2 (30 ng/mL) e IL-7 (10 ng/mL) durante 7 días. Las células B2M/TCR doblemente negativas se enriquecerán utilizando un kit de selección CD3 positivo (StemCell Technologies), seguido de un enriquecimiento para células B2M negativas utilizando un anticuerpo anti-B2M biotinilado y un kit de selección de biotina (StemCell Technologies). La pureza se evaluará mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos contra B2M y CD3. Las células B2M/TCR doblemente negativas se incubarán y expandirán con medios que incluyan IL-2 (30 ng/mL) e IL-7 (10 ng/mL) durante 7 días más.

EJEMPLO 4

Alogenidad reducida de las células T con eliminación de B2M

1. Evaluación de las células T con eliminación de B2M en el ensayo de citotoxicidad

El propósito de este estudio fue demostrar si las células T con eliminación de B2M exhiben una alogenidad reducida cuando se comparan con las células T B2M-positivas.

En este caso, se obtuvieron viales de PBMC congelados de dos donantes no coincidentes de ImmunoSpot (C.T.L. - Número de catálogo CTL-CP1 lote 20060906 (donante 36) y 20110525 (donante 75)). Su tipificación HLA clase I aparece en la Tabla 9.

Tabla 9

Donante 36		
Gen	Alelo 1	Alelo2
HLA A	2	68
HLA B	7	44
HLA C	w7	w7
Donante 75		
Gen	Alelo 1	Alelo2
HLA A	33	68
HLA B	14	48
HLA C	w8	w8

La estrategia consistió en cebar las células T de cada donante contra los aloantígenos utilizando células dendríticas (DC) no coincidentes (criadas del otro donante). Estas células T alosensibilizadas sirvieron como efectores en los ensayos de citotoxicidad. En resumen, las DC se generaron descongelando PBMC congeladas y cultivándolas en X-VIVO 15 (Lonza) con un 2 % de HABS. Las células se cultivaron en un matraz T75 y se incubaron durante 1 hora para permitir la adhesión de los precursores de monocitos. Las células no adherentes se retiraron y se cultivaron por separado en 10ng/mL de IL-2. Las células adherentes se cultivaron con 20mL de X-VIVO + 2 % HABS complementado con 800 U/mL de GM-CSF humano recombinante y 500 U/mL de rIL-4. Las DCs adherentes se recolectaron utilizando un tampón de disociación sin enzimas (Life Technologies). Las DCs recolectadas se co-cultivaron durante 5 días con células T CD8⁺ enriquecidas magnéticamente en una relación 5:1 de células T:DC.

En cultivos separados, las células T de cada donante se editaron con la meganucleasa B2M 13-14x.479. Las células T B2M-negativas y B2M-positivas sirvieron de diana en los ensayos de citotoxicidad. En resumen, las células T

humanas del donante fueron estimuladas con ImmunoCult, un reactivo comprado a Stem Cell Technologies que consiste en multímeros de anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y anti-CD2. La estimulación se llevó a cabo durante 3 días, antes de la electroporación con 1 µg de ARNm B2M13-14x479 utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) según las instrucciones del fabricante. Como controles, se electroporaron células T humanas en ausencia de ARNm. A los 6 días después de la electroporación, las células electroporadas con ARNm B2M 13-14x.479 se enriquecieron en busca de células B2M negativas con un anticuerpo biotinilado contra B2M y un kit de separación magnética antibiotina (Stem Cell Technologies). Las células B2M-negativas y las B2M-positivas de control se marcaron con 2µM de CellTrace Violet (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para medir la citotoxicidad, las células T alosensibilizadas del donante 36 se cultivaron con células T marcadas con violeta CellTrace positivas o B2M negativas del donante 36 (controles singénicos) o del donante 75 (muestras alogénicas). También se realizaron cocultivos utilizando células T alosensibilizadas del donante 75 y células T marcadas con violeta CellTrace positivas o B2M negativas del donante 75 (controles singénicos) o del donante 36 (muestras alogénicas). Los co-cultivos se llevaron a cabo durante 7 horas en una relación 5:1 efecto:objetivo. Tras 7 horas de incubación, las células se marcaron con VAD-FMK-FITC (CaspACE - Promega) a la concentración recomendada por el proveedor, así como con un anticuerpo fluorescente contra B2M. Se cultivaron placas por duplicado durante 18 horas y se recogieron los sobrenadantes para analizar las sustancias secretadas, como el IP_Ny (por ELISA, utilizando un kit de BioLegend) y la lactato deshidrogenasa (LDH) (utilizando un kit de Thermo-Fisher).

Las dianas fueron identificadas en base a su señal CellTrace Violet, y la frecuencia con la que fueron eliminadas por las células T CD8⁺ fue evaluada por su señal VAD-FMK-FITC. Los resultados del ensayo CTL se presentan en las Figs. 12A-12H. Las células T alosensibilizadas no inducen una señal significativa de VAD-FMK-FITC en las dianas singénicas, aunque las dianas alogénicas presentan un 24-27 % de VAD-FMK-FITC⁺, lo que indica que la perforina A y la granzima B generadas por los efectores están induciendo la apoptosis en las dianas no coincidentes. La señal de VAD-FMK-FITC sólo se detecta en los cultivos alogénicos en los que las células diana son B2M-suficientes. Las células diana con eliminación de B2M no son destruidas por las células T sensibilizadas a los aloantígenos.

Esta observación se apoya en los análisis de las sustancias secretadas en los sobrenadantes de los cultivos de 18 horas. La secreción de IFNy por parte de las células T alogénicas se reduce en un 66-75 % en los cocultivos que contienen dianas B2M negativas en comparación con los cultivos que contienen dianas B2M positivas (Fig. 13). La liberación de LDH por parte de las células diana muertas se reduce igualmente cuando las células diana carecen de expresión de B2M (Fig. 14).

Por lo tanto, se observó que las células con eliminación de B2M exhiben una susceptibilidad reducida a la muerte por linfocitos citotóxicos cebados con aloantígenos.

EJEMPLO 5

Expresión de un receptor de antígeno químérico en células T con sobre eliminación de TCR y B2M

1. Vectores AAV recombinantes

En este estudio, se diseñarán vectores AAV recombinantes para introducir una secuencia de ácido nucleico exógena, que codifica un receptor de antígeno químérico, en el genoma de las células T humanas en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 (SEQ ID NO: 128) mediante recombinación homóloga. Cada vector AAV recombinante se preparará utilizando el protocolo de triple transfección descrito anteriormente. Los vectores AAV recombinantes preparados para este estudio pueden ser vectores AAV autocomplementarios o monocatenarios. En cualquier caso, el vector AAV recombinante comprenderá generalmente secuencias para un ITR 5', un brazo de homología 5', una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno químérico, una secuencia de señal de poli(A) SV40, un brazo de homología 3' y un ITR 3'. Estos estudios incluirán además el uso de un vector AAV que codifica GFP (GFP-AAV), que se incorporará como control positivo de la eficiencia de transducción del AAV.

2. Introducción simultánea de una secuencia de receptor de antígeno químérico en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 y eliminación de B2M.

Se llevarán a cabo estudios para determinar la eficacia de la eliminación de B2M mientras se utilizan simultáneamente vectores AAV recombinantes junto con TRC 1-2x.87EE para insertar una secuencia de receptor de antígeno químérico en el gen de la región constante del TCR alfa. La inserción del CAR en la región constante del TCR alfa eliminará la expresión del TCR endógeno, por lo que las células en las que el B2M también está eliminado por la meganucleasa B2M 13-14 serán CAR-positivas, B2M/TCR doblemente negativas.

En general, las células T humanas se coelectroporan con ARNm que codifica una meganucleasa B2M 13-14 y ARNm que codifica 1-2x.87 EE, y luego se transducen inmediatamente con un vector AAV que codifica un CAR flanqueado por homología al locus del sitio de reconocimiento TRC 1-2. La meganucleasa B2M 13-14 causará delecciones en el gen B2M, dando lugar a una eliminación de B2M en la superficie celular, mientras que la meganucleasa TRC 1-2 causará una rotura de doble cadena en el sitio de reconocimiento TRC 1-2, estimulando la recombinación con el vector AAV a través de la recombinación homóloga.

En estos estudios, se obtendrán células T CD3⁺ humanas y se estimularán con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, y luego se coelectroporarán con ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE y ARNm que codifica una meganucleasa B2M 13-14 utilizando el nucleofector Amaxa 4D (Lonza) según las instrucciones del fabricante. Las células se transducirán inmediatamente con un vector AAV recombinante que codifica un CAR flanqueado por homología con el locus del sitio de reconocimiento TRC 1-2. La meganucleasa B2M 13-14 causará delecciones en el gen B2M, dando lugar a una eliminación de B2M en la superficie celular, mientras que la meganucleasa TRC 1-2 causará una rotura de doble cadena en el sitio de reconocimiento TRC 1-2, estimulando la recombinación con el vector AAV a través de la recombinación homóloga. Para confirmar la eficacia de la transducción, un grupo separado de células T CD3⁺ humanas transfectadas con meganucleasas se transducirán con GFP-AAV ($1e^5$ genomas virales por célula) inmediatamente después de la transfección, como se ha descrito anteriormente. Las células serán analizadas por citometría de flujo para la expresión de GFP a las 72 horas post-transducción para determinar la eficiencia de la transducción.

Como controles de sólo transducción, las células serán transfectadas de forma simulada (con agua) y transducidas con el vector AAV recombinante. Para un control de sólo meganucleasas, las células serán cotransfectadas con ARNm que codifique TRC 1-2x.87 EE y ARNm que codifique una meganuclea B2M 13-14, y luego se hará una transducción simulada (con agua) inmediatamente después de la transfección.

La inserción de la secuencia del receptor de antígeno químérico se confirmará mediante la secuenciación del sitio de escisión en el gen de la región constante del TCR alfa. La expresión de la superficie celular del receptor de antígeno químérico se confirmará mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo anti-Fab o, en casos específicos, un anticuerpo anti-CD 19. La eliminación del receptor endógeno de las células T y de la B2M en la superficie celular se determinará mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

EJEMPLO 6

ARNm bicistrónico que codifica dos meganucleasas dirigidas a secuencias de reconocimiento separadas

1. Diseño y evaluación de variantes de ARNm bicistrónico

El propósito de este estudio fue evaluar el uso de un ARNm bicistrónico que codifica simultáneamente dos meganucleasas para la anulación de múltiples objetivos génicos en células T humanas. Se diseñaron varias variantes de ARNm utilizando la secuencia de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE y la secuencia B2M 13-14x.479 en diferentes orientaciones, en las que las secuencias estaban separadas por una secuencia IRES, T2A, P2A, E2A o F2A como se indica a continuación:

30

Tabla 10

SEQ ID NO:	5' Nucleasa	Péptido	3' Nucleasa
367	TRC	IRES	B2M
368	TRC	T2A	B2M
369	TRC	P2A	B2M
370	TRC	E2A	B2M
371	TRC	F2A	B2M
372	B2M	IRES	TRC
373	B2M	T2A	TRC
374	B2M	P2A	TRC
375	B2M	E2A	TRC
376	B2M	F2A	TRC

En este estudio, las células T humanas del donante fueron estimuladas con ImmunoCult (Stem Cell Technologies) que consiste en multímeros de anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y anti-CD2. La estimulación se llevó a cabo durante 3 días, antes de la electroporación con 1 µg de uno de los ARNm bicistrónicos anteriores utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) según las instrucciones del fabricante. Además, las células T humanas del donante fueron electroporadas con 1µg de ARNm TRC1-2x.87EE o ARN B2M13-14x.479. Se electroporó una muestra adicional de células con 1 µg de cada uno de los ARNm de las nucleasas. Como controles, se electroporaron células T humanas en ausencia de ARNm. A los 3 y 7 días después de la electroporación, las células electroporadas con ARNm bicistrónico se tiñeron con un anticuerpo contra CD3 (para determinar la anulación de TRC) y un anticuerpo contra B2M y se analizaron por citometría de flujo.

La evaluación del número y la viabilidad de las células se realizó el día 3 (no mostrado) y el día 7 después de la electroporación, como se muestra en la Tabla 11. El análisis citométrico identificó las células en las que se editó el gen TRAC (TRC KO), el gen B2M (B2M KO) o ambos genes (dKO) (Figs. 15A-15N).

Tabla 11

	Célula viva # d7 (x10^6)	Viabilidad	TRC KO %	B2M KO %	dKO %	# dKO (x10^6)
Simulación	11,31	98	0	0	0	
TRCx87EE	8,46	85	40	0	0	
B2M13-14x479	4,86	76	0	50,8	0	
TRC + B2M	3	89	39,4	36,9	17,1	0,513
TRC-IRES-B2M	5,97	88	31,2	32,2	11,3	0,675
B2M-IRES-TRC	5,01	82	31,1	44,8	16,3	0,817
B2M-E2A-TRC	5,64	87	24,8	44,8	12,6	0,711
B2M-F2A-TRC	6,42	83	20,6	31,9	8,13	0,522
B2M-P2A-TRC	6,66	87	21,9	37,8	9,18	0,611
B2M-T2A-TRC	6,96	88	25,1	45,1	12,8	0,891
TRC-E2A-B2M	8,52	87	22,9	28,7	7,4	0,630
TRC-F2A-B2M	9,15	92	18,4	29	6,66	0,609
TRC-P2A-B2M	7,68	85	30	28,2	10	0,768
TRC-T2A-B2M	9,12	93	28,4	24,8	8,14	0,742

Como se muestra en la Tabla 11 y en las Figs. 15A-15N, el suministro de los dos ARN de nucleasas individualmente produjo la mayor frecuencia de células dKO (17,1 %), seguido de B2M-IRES-TRC (16,3 %), B2M -T2A-TRC (12,8 %), B2M -E2A-TRC (12,6 %), y TRC-IRES- B2M (11,3 %). Las nucleasas restantes generaron aproximadamente la mitad de la frecuencia de células dKO que los ARN individuales. Los ARN mostraron toxicidad para las células T en diversos grados. Además, aunque el uso de cada meganucleasa individual dio el mayor porcentaje de dKO, el número total de células dKO producidas fue mayor cuando se utilizó B2M-T2A-TRC ($0,891 \times 10^6$), B2M-IRES-TRC ($0,817 \times 10^6$) y TRC-P2A-B2M ($0,768 \times 10^6$).

Estos experimentos demuestran claramente la utilidad de usar ARNm bicistrónico para suministrar dos meganucleasas a las células eucariotas para editar y/o anular simultáneamente dos objetivos génicos separados, en este caso las secuencias de reconocimiento TRC y B2M. Al considerar la viabilidad y la expansión de las células durante el periodo de cultivo de 7 días, los cultivos que contenían la mayor frecuencia de células dKO no eran necesariamente los que contenían el mayor número de células dKO. B2M-T2A-TRC y B2M-IRES-TRC permitieron la mejor edición de ambos genes y la expansión de células viables editadas.

2. Valoración del ARNm bicistrónico

- El propósito de este estudio fue determinar la concentración óptima de ARNm bicistrónico para direccionar las secuencias de reconocimiento TRC y B2M en células T humanas. Como se ha descrito en el Ejemplo anterior, se desarrollaron varios ARNm bicistrónicos que comprendían una secuencia TRC 1-2x.87 EE y una secuencia B2M-13-14x.479 para su expresión y direccionamiento simultáneos en una célula T humana. Entre las probadas, se seleccionaron B2M-IRES-TRC, B2M-T2A-TRC, TRC-P2A-B2M y TRC-T2A-B2M para su posterior evaluación.
- En este caso, se introdujeron los ARNm B2M-IRES-TRC, B2M-T2A-TRC, TRC-P2A-B2M o TRC-T2A-B2M en células T humanas de donantes a concentraciones crecientes, y se determinó el porcentaje de anulación de CD3 de la superficie celular (indicado por la anulación de TRC) y B2M. En resumen, las células T humanas del donante se estimularon con ImmunoCult durante 3 días antes de la electroporación con 1, 2 o 4 µg de los ARNm B2M-IRES-TRC, B2M-T2A-TRC, TRC-P2A-B2M o TRC-T2A-B2M mencionados anteriormente utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) según las instrucciones del fabricante. Para comparar, las células T humanas del donante fueron electroporadas con 1µg de TRC1-2x.87 EE o 1µg de B2M13-14x.479. Además, las células T humanas del donante fueron electroporadas con ambas nucleasas codificadas en moléculas de ARN separadas, utilizando dosis de 0,5µg de cada nucleasa o 1µg de cada nucleasa. Como controles, se electroporaron células T humanas sin ARN. A los 7 días después de la electroporación, se enumeraron las células y se evaluó la viabilidad con azul tripán. Las células se tiñeron con un anticuerpo contra CD3 (para determinar la anulación de TRC) y un anticuerpo contra B2M y se analizaron por citometría de flujo, así como con Ghost Dye 780 para excluir las células muertas del análisis.

Como se muestra en las Figs. 16A-16P y en la Tabla 12, el aumento de la cantidad de ARNm bicistrónico electroporado en las células T humanas del donante generalmente aumentó la frecuencia de células dKO en el cultivo pero, en algunos casos, redujo el número total de células viables presentes en el día 7 post-electroporación.

Tabla 12

Nucleasa	μg de ARN	célula viva # ($\times 10^6$)	dKO %	Célula diana #	Viabilidad (%)
B2M-IRES-TRC	1	2,45	4,59	112455	79
B2M-IRES-TRC	2	2,35	9,34	219490	84
B2M-IRES-TRC	4	2,56	5,35	136960	82
B2M-T2A-TRC	1	1,92	4,07	78144	67
B2M-T2A-TRC	2	1,77	11,1	196470	79
B2M-T2A-TRC	4	2,23	13,4	298820	87
TRC-P2A-B2M	1	2,14	3,86	82604	83
TRC-P2A-B2M	2	2,39	7,82	186898	79
TRC-P2A-B2M	4	1,62	12,1	196020	73
TRC-T2A-B2M	1	2,23	6,65	148295	87
TRC-T2A-B2M	2	1,43	8,89	127127	83
TRC-T2A-B2M	4	1,01	11	111100	80
TRC	1	2,7			83
B2M	1	2,97			94
TRC+B2M	0,5+0,5	3,2	2,73	87360	85
TRC+B2M	1+1	3,05	9,19	280295	85

5

Para B2M-IRES-TRC, las dosis más altas de ARN fueron bien toleradas, pero no siempre aumentaron la frecuencia o el número de células dKO. En el caso de B2M-T2A-TRC, las cantidades más altas de ARN fueron bien toleradas y produjeron una mayor frecuencia de dKO y más células dKO. Este fue también el caso de TRC-P2A-B2M, aunque la viabilidad de las células disminuyó a dosis más altas de ARN. El TRC-T2A-B2M parecía ser bien tolerado a dosis altas, pero evidentemente no permitía una expansión celular robusta. En este experimento, la B2M-T2A-TRC parece generar una frecuencia y un número de células dKO ligeramente superior a la electroporación de células T con las dos nucleasas en moléculas de ARNm separadas.

10

Por lo tanto, al aumentar la cantidad de ARNm bicistrónico, se podrían lograr mayores frecuencias y números de células dKO. En concreto, 4 μg de B2M-T2A-TRC produjeron la mayor cantidad de células objetivo en este experimento, superando a 1 μg de cada uno de los TRC y B2M por separado.

15

EJEMPLO 7

Producción de células T CAR anti-CD 19 utilizando ARNm bicistrónico y AAV

1. Electroporación de células T con ARNm bicistrónico y transducción con AAV

20

El propósito de este estudio fue evaluar el uso de ARNm bicistrónico para producir células CAR-T CD19 con doble anulación del receptor de células T y B2M. Como se ha descrito en los Ejemplos anteriores, se desarrollaron varios ARNm bicistrónicos que comprendían una secuencia TRC 1-2x.87 EE y una secuencia B2M 13-14x.479 para su expresión y orientación simultáneas en una célula T humana. Entre los probados, se seleccionó el B2M-IRES-TRC para su posterior evaluación tras determinar su concentración óptima.

25

Aquí, B2M-IRES-TRC se utilizó junto con un vector AAV para introducir una secuencia de ácido nucleico exógeno, que codifica un receptor de antígeno químérico, en el genoma de las células T humanas en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 a través de la recombinación homóloga, mientras que simultáneamente se elimina la expresión de la superficie celular tanto del receptor de células T como de B2M. El vector AAV comprendía un ácido nucleico que incluía la secuencia codificadora de CAR anti-CD 19 descrita anteriormente, que estaba flanqueada por brazos de homología. La expresión del casete CAR fue impulsada por un promotor JeT. El vector AAV fue preparado por Virovek (Hayward, CA) a partir de un plásmido donante.

30

En estos experimentos, se obtuvieron células T humanas de donantes y se estimularon con ImmunoCult (Stem Cell Technologies) durante 3 días antes de la electroporación. A continuación, se electroporaron $3\mu\text{g}/1\times10^6$ células con el ARNm bicistrónico B2M-IRES-TRC descrito anteriormente utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) según las instrucciones del fabricante. Las células se transducen inmediatamente con un vector AAV recombinante que codifica un CAR anti-CD 19 flanqueado por brazos de homología al locus del sitio de reconocimiento TRC 1-2. Como controles, las células fueron electroporadas con $1\mu\text{g}$ de ARN TRC1-2x87EE antes de la transducción del AAV. Además, las células electroporadas B2M-IRES-TRC y TRC 1-2x.87 EE fueron transducidas de forma simulada.

A los 3 y 6 días después de la electroporación/transducción, las células editadas se tiñeron con un anticuerpo contra CD3 (para determinar la anulación de TRC) y un anticuerpo contra B2M, así como una proteína de fusión CD19-Fc recombinante biotinilada para detectar el CAR. La estreptavidina-PE se utilizó como reactivo de detección secundario para la tinción de CAR. Los niveles de CD3, B2M y CAR se evaluaron mediante citometría de flujo.

2. Resultados

Las mediciones citométricas de los niveles de expresión de CD3, B2M y CAR se realizaron el día 6 después de la electroporación y aparecen en las Figs. 17A-17H. TRC 1-2x.87 EE generó una población de eventos CD3⁺ (67,3 %) (Fig. 17A) pero no alteró la expresión de B2M. B2M-IRES-TRC generó poblaciones que carecían de la expresión de CD3 (17,3 %), de la expresión de B2M (19,7 %) o de la expresión de ambos marcadores (30,7 %) (17B). Se utilizaron cultivos transductores simulados para establecer la línea de base para la tinción de CAR (17C y 17D), y se determinó la expresión de CAR en los cultivos transductores electroporados bien sea con TRC 1-2x.87 EE (22,2 % CD3/CAR+) (17E) o B2M-IRES-TRC (15,7 % CD3/CAR+) (17F). La regulación de los eventos CAR^{+/CD3⁻} muestra que el 67 % de las células T CAR carecen de expresión B2M en la superficie celular en los cultivos B2M-IRES-TRC (17H).

3. Conclusiones

El ARNm bicistrónico fue eficaz cuando se utilizó en combinación con un AAV para producir células CAR-T que son negativas para el TRC y B2M de la superficie celular.

REIVINDICACIONES

1. Una meganucleasa recombinante que reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento consistente en la SEQ ID NO: 2 dentro del gen de la microglobulina beta-2 humana, donde dicha meganucleasa recombinante comprende una primera subunidad y una segunda subunidad, en la que dicha primera subunidad se une a un primer semi-sitio de reconocimiento de dicha secuencia de reconocimiento y en la que dicha segunda subunidad se une a un segundo semi-sitio de reconocimiento de dicha secuencia de reconocimiento, y en la que dicha meganucleasa recombinante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.
- 5 2. La meganucleasa recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha primera subunidad comprende los residuos 198-344 de la SEQ ID NO: 12, y/o en la que dicha segunda subunidad comprende los residuos 7-153 de la SEQ ID NO: 12, y/o en la que dicha meganucleasa recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.
- 10 3. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha meganucleasa recombinante de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, opcionalmente en el que dicho polinucleótido aislado es un ARNm.
- 15 4. Una Un constructo de ADN recombinante que comprende dicho polinucleótido aislado de la reivindicación 3, opcionalmente en el que dicho constructo de ADN recombinante codifica un vector de virus adeno-asociado (AAV) recombinante.
- 5 5. Un vector AAV recombinante que comprende dicho polinucleótido aislado de la reivindicación 3.
- 20 6. Un procedimiento para producir una célula eucariota genéticamente modificada que comprende una secuencia exógena de interés insertada en un cromosoma de dicha célula eucariota, comprendiendo dicho procedimiento transfectar una célula eucariota con uno o más ácidos nucleicos que incluyen:
- 25 (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha meganucleasa recombinante de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2; y
 (b) una secuencia de ácido nucleico que comprende dicha secuencia de interés;
 en el que dicha meganucleasa recombinante produce un sitio de escisión en dicho cromosoma en una secuencia de reconocimiento que consiste en la SEQ ID NO: 2, y en el que dicha secuencia de interés se inserta en dicho cromosoma en dicho sitio de escisión.
- 30 7. Un procedimiento para producir una célula eucariota modificada genéticamente que comprende una secuencia exógena de interés insertada en un cromosoma de dicha célula eucariota, comprendiendo dicho procedimiento:
- (a) introducir dicha meganucleasa recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en una célula eucariota; y
 (b) transfectar dicha célula eucariota con un ácido nucleico que comprende dicha secuencia de interés;
 en el que dicha meganucleasa recombinante produce un sitio de escisión en dicho cromosoma en una secuencia de reconocimiento que consiste en la SEQ ID NO: 2, y en el que dicha secuencia de interés se inserta en dicho cromosoma en dicho sitio de escisión.
- 35 8. El procedimiento de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, en el que dicho ácido nucleico que comprende dicha secuencia de interés comprende además secuencias homólogas a las secuencias que flanquean dicho sitio de escisión, y en el que dicha secuencia de interés se inserta en dicho sitio de escisión por recombinación homóloga.
- 40 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que dicha secuencia de interés codifica un receptor de antígeno químérico.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que al menos dicho ácido nucleico que comprende dicha secuencia de interés se introduce en dicha célula eucariota mediante un vector AAV recombinante.
- 45 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que dicha célula eucariota es una célula T humana, o una célula derivada de ella.
12. Un procedimiento para producir una célula eucariota modificada genéticamente mediante la interrupción de una secuencia diana en un cromosoma de dicha célula eucariota, comprendiendo dicho procedimiento :
 transfectar dicha célula eucariota con un ácido nucleico que codifica dicha meganucleasa recombinante de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2;
 en el que dicha meganucleasa recombinante produce un sitio de escisión en dicho cromosoma en una secuencia de reconocimiento que consiste en la SEQ ID NO: 2, y en el que dicha secuencia diana se

interrumpe por unión en extremo no homóloga en dicho sitio de escisión, y en el que dicha célula eucariota genéticamente modificada no expresa microglobulina beta-2 endógena en la superficie celular.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho ácido nucleico que codifica dicha meganucleasa recombinante es un ARNm.

5 14. Un procedimiento para producir una célula eucariota modificada genéticamente mediante la interrupción de una secuencia diana en un cromosoma de dicha célula eucariota, que comprende:

introducir dicha meganucleasa recombinante de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 en dicha célula eucariota;

10 en el que dicha meganucleasa recombinante produce un sitio de escisión en dicho cromosoma en una secuencia de reconocimiento que consiste en la SEQ ID NO:2, y en el que dicha secuencia diana se interrumpe por unión en extremo no homóloga en dicho sitio de escisión, y en el que dicha célula eucariota modificada genéticamente no expresa microglobulina beta-2 endógena en la superficie celular.

15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que dicha célula eucariota es una célula T humana, o una célula derivada de ella.

15

B2M 13 - 14	B2M13 SEMISITIO	B2M14 SEMISITIO	
SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO	CTATCTTGTACTACACTGAA GATAGAGAACATGATGTGACTT		SEQ ID NO:2 SEQ ID NO:3
B2M 5 - 6	B2M5 SEMISITIO	B2M6 SEMISITIO	
SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO	CAGGTTTACTCAC GTCAATCCAG GTCCAAATGAGTGCAGTAGGTC		SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:5
B2M 7 - 8	B2M7 SEMISITIO	B2M8 SEMISITIO	
SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO	GTGACTTTGTCACAGCCCCAAGA CACTGAAACAGTGTGGTTCT		SEQ ID NO:6 SEQ ID NO:7
B2M 11 - 12	B2M11 SEMISITIO	B2M12 SEMISITIO	
SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO	CGAGATGTCTCGCTCCGTGGCC GCTCTACAGAGCGAGGCACCGG		SEQ ID NO:8 SEQ ID NO:9

FIG. 1

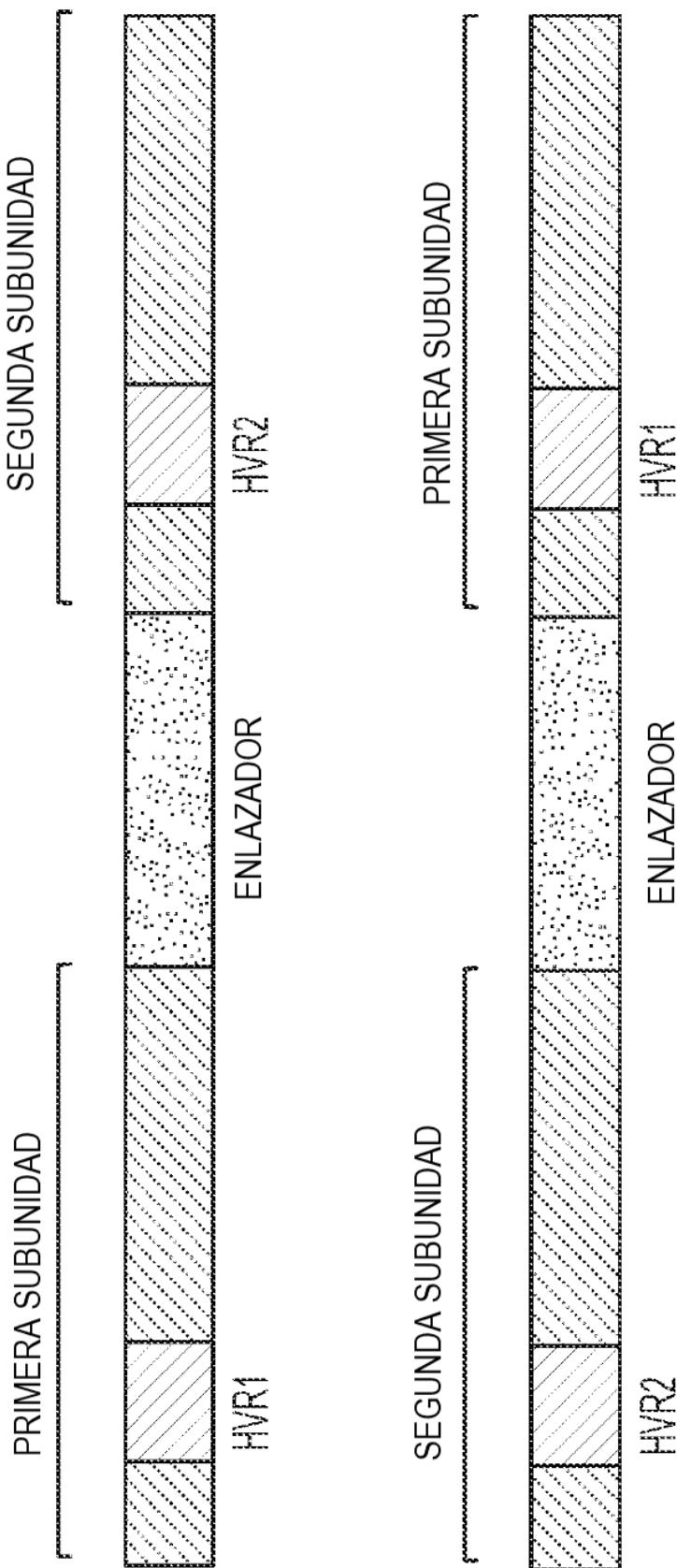


FIG. 2

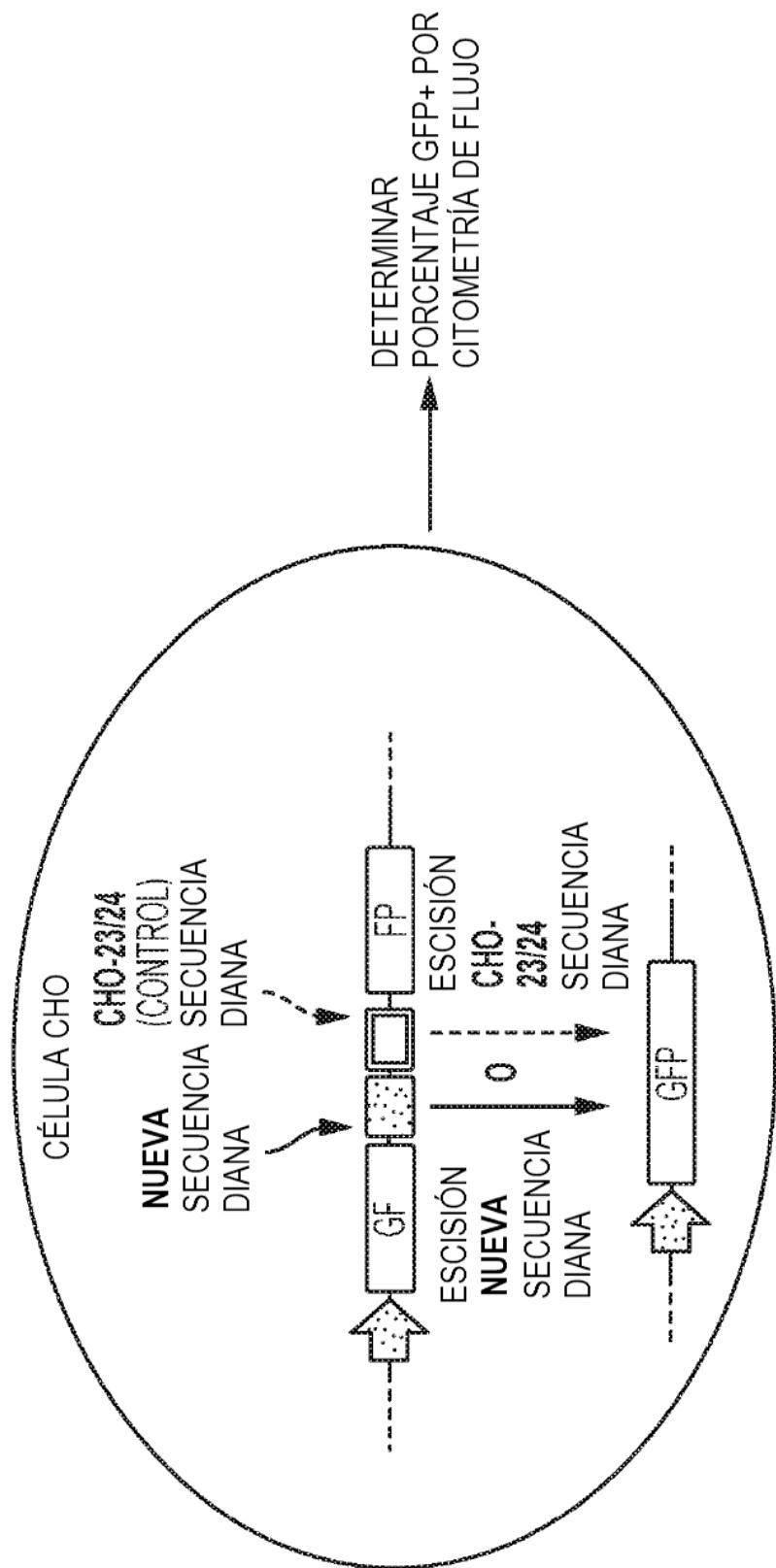


FIG. 3

FIG. 4A

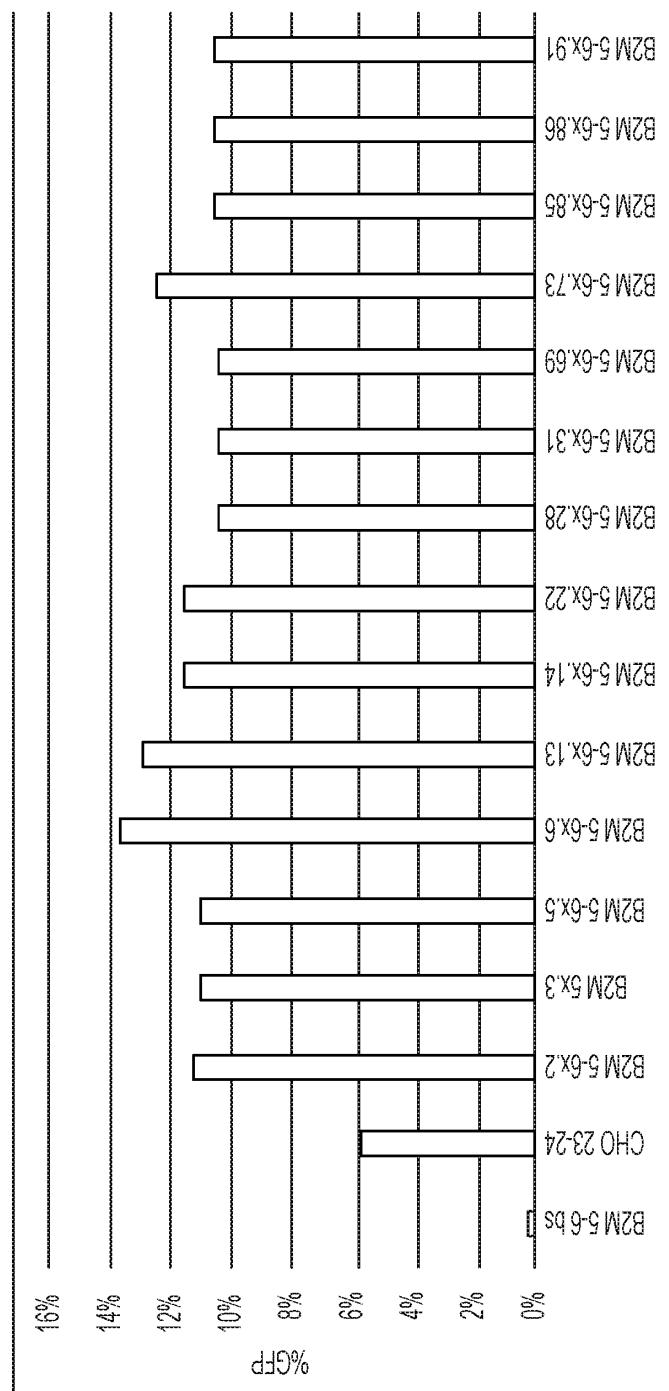


FIG. 4B

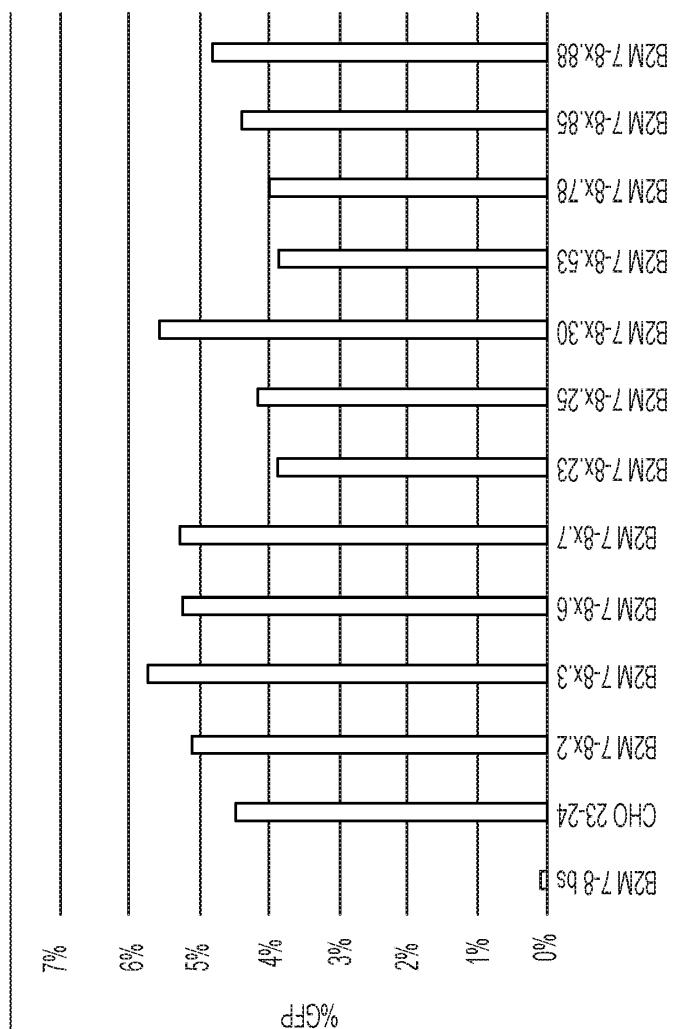


FIG. 4C

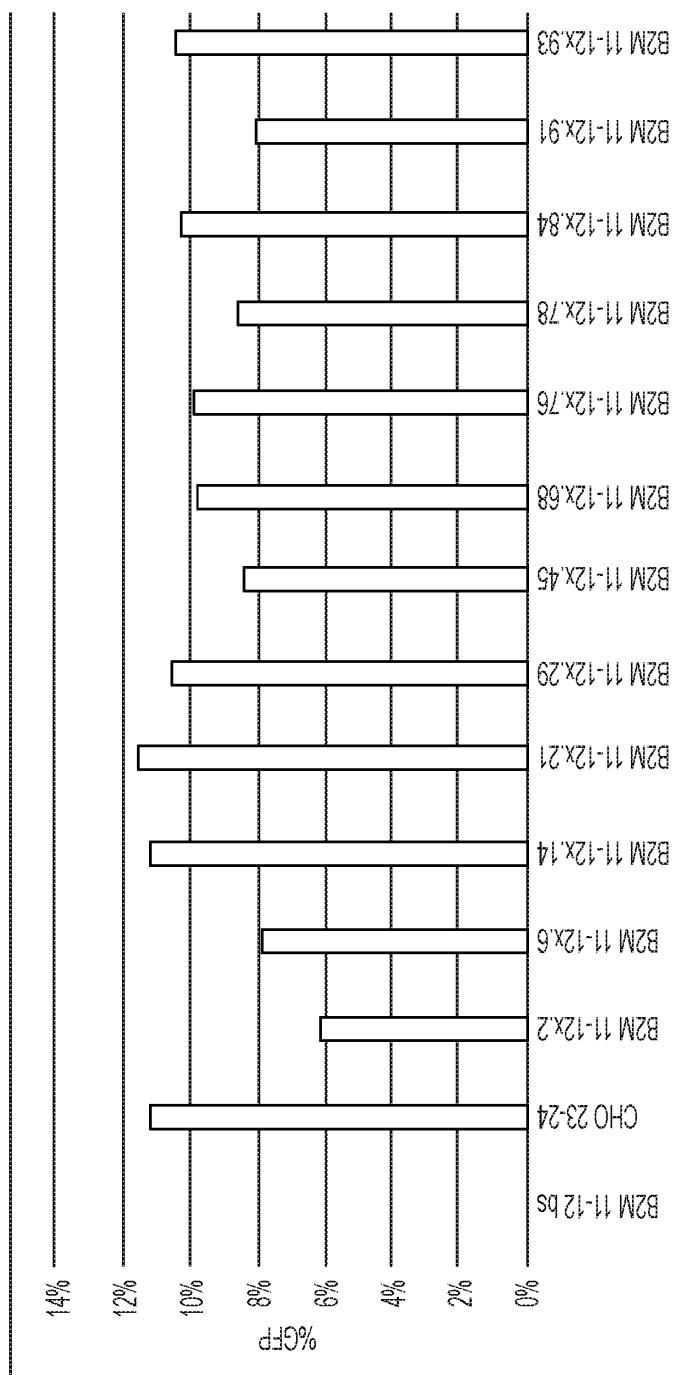


FIG. 4D

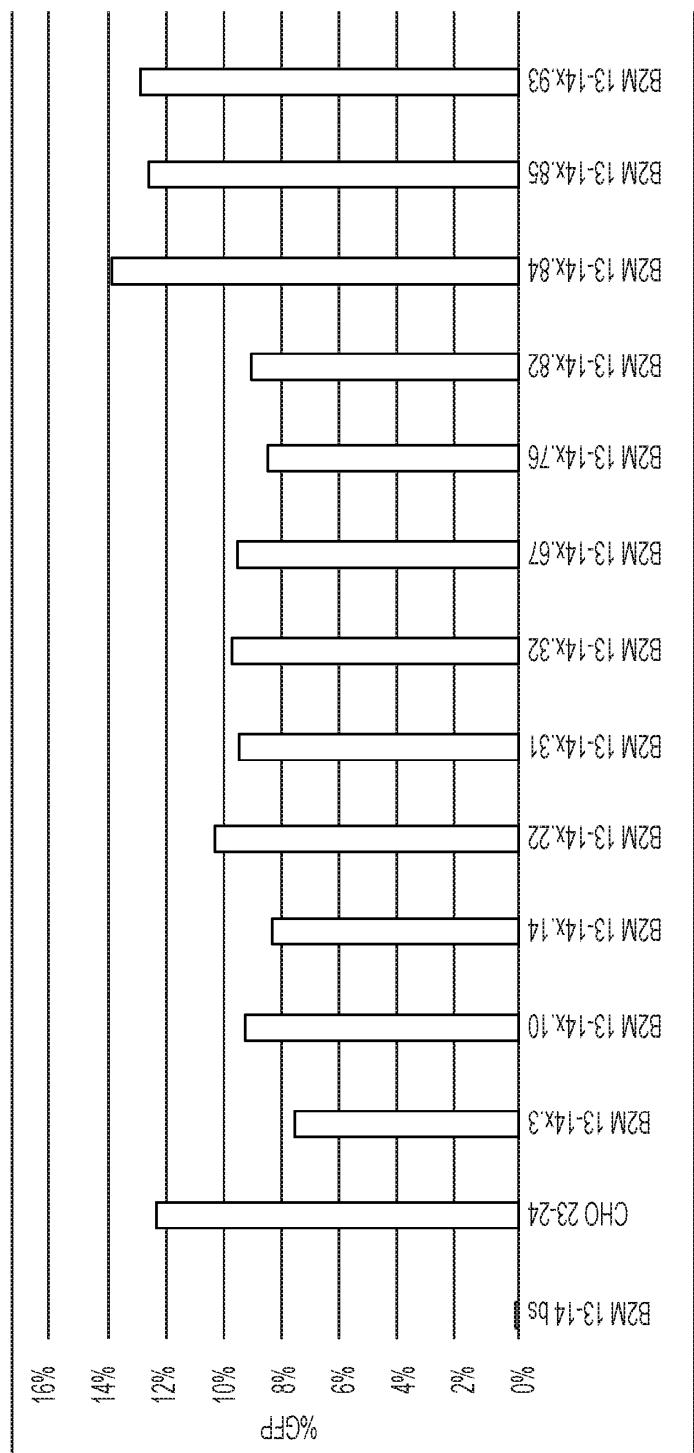
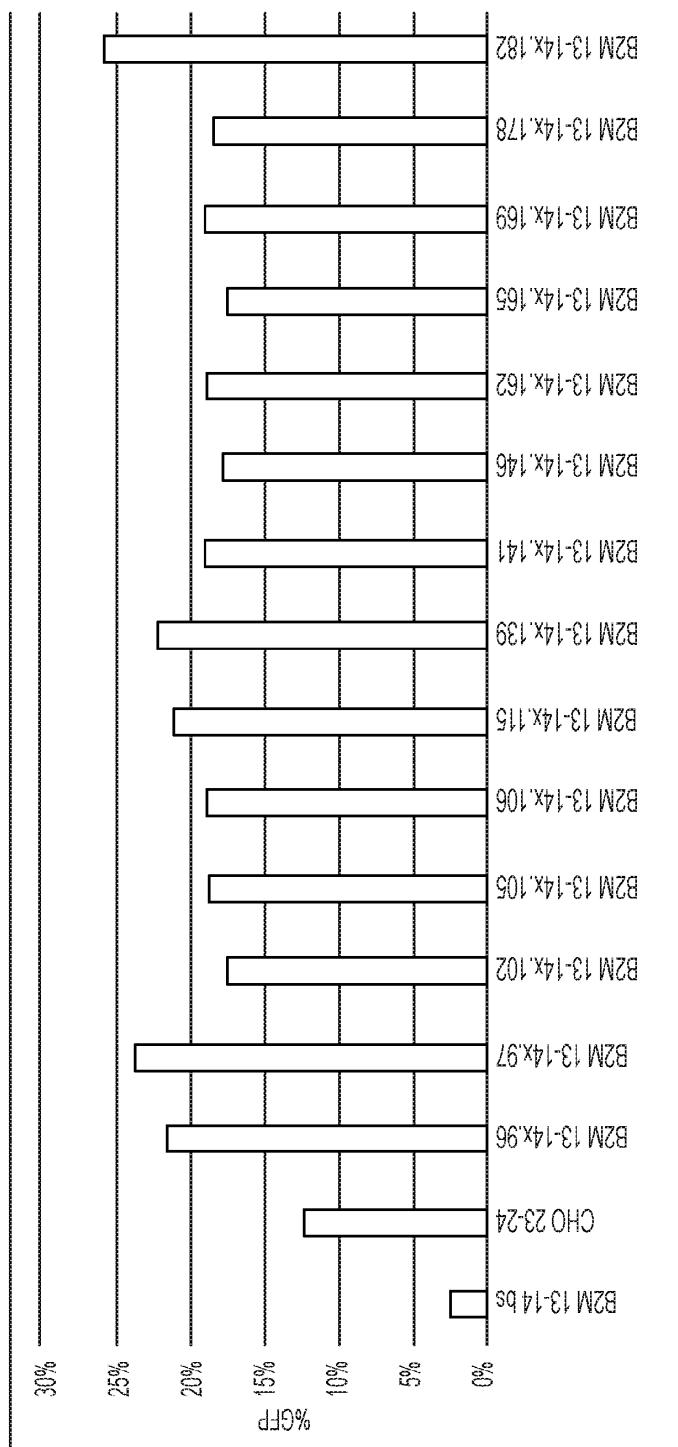


FIG. 4E



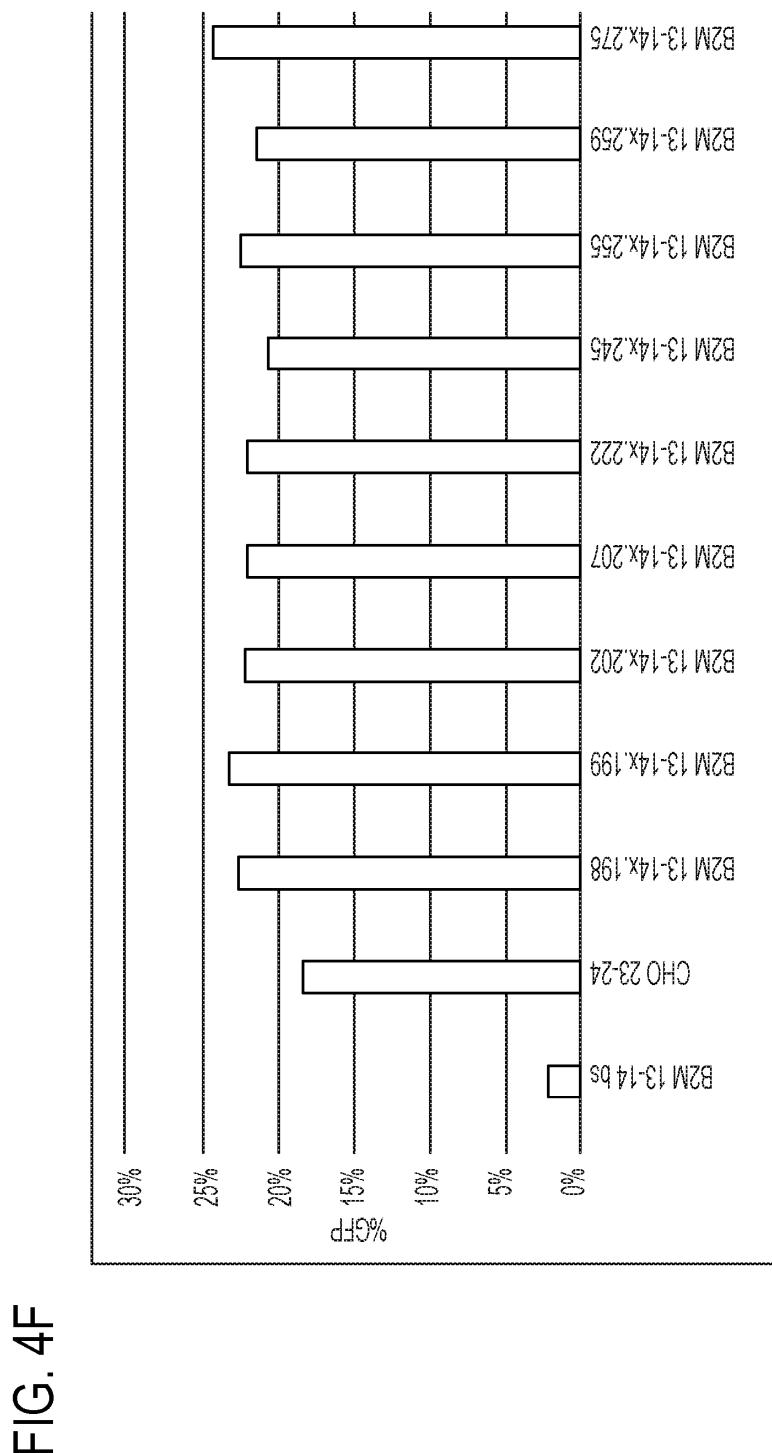


FIG. 4F

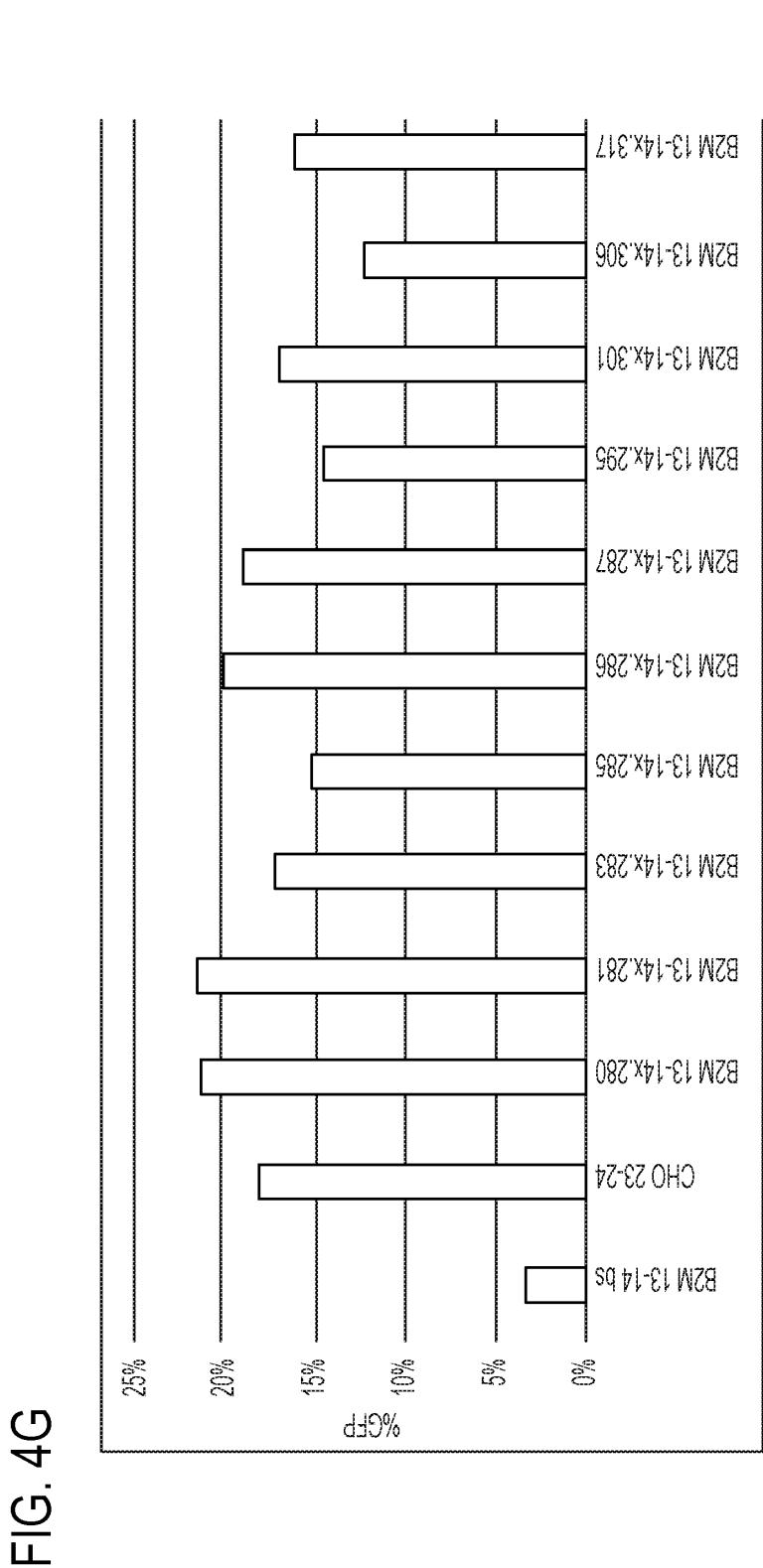
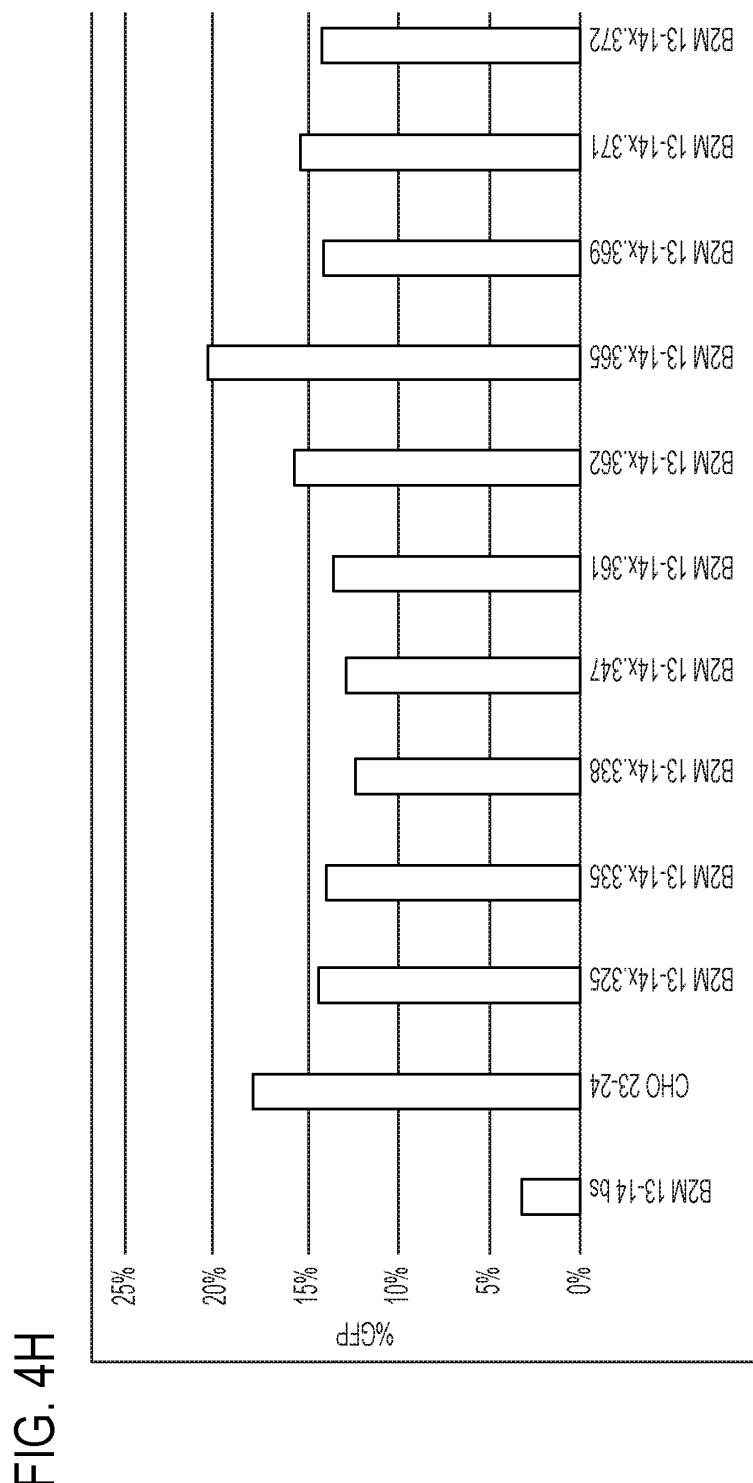
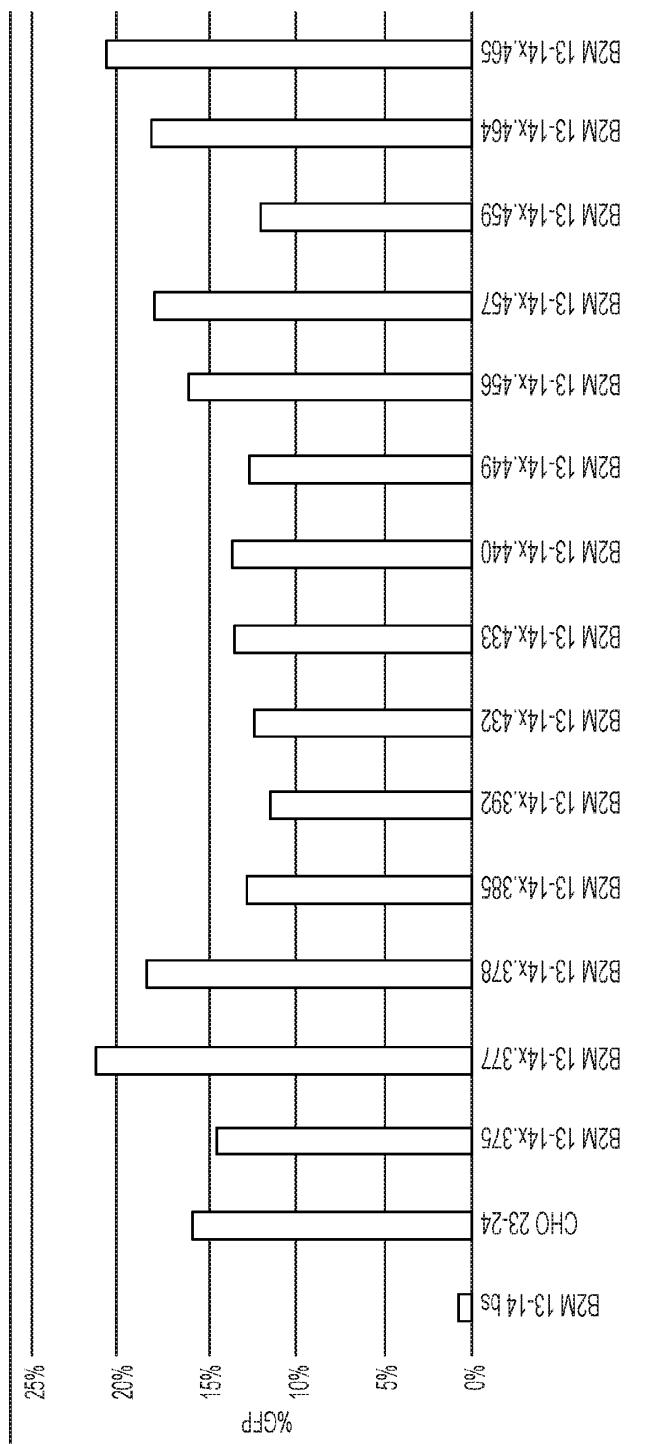


FIG. 4G



|G. 4|



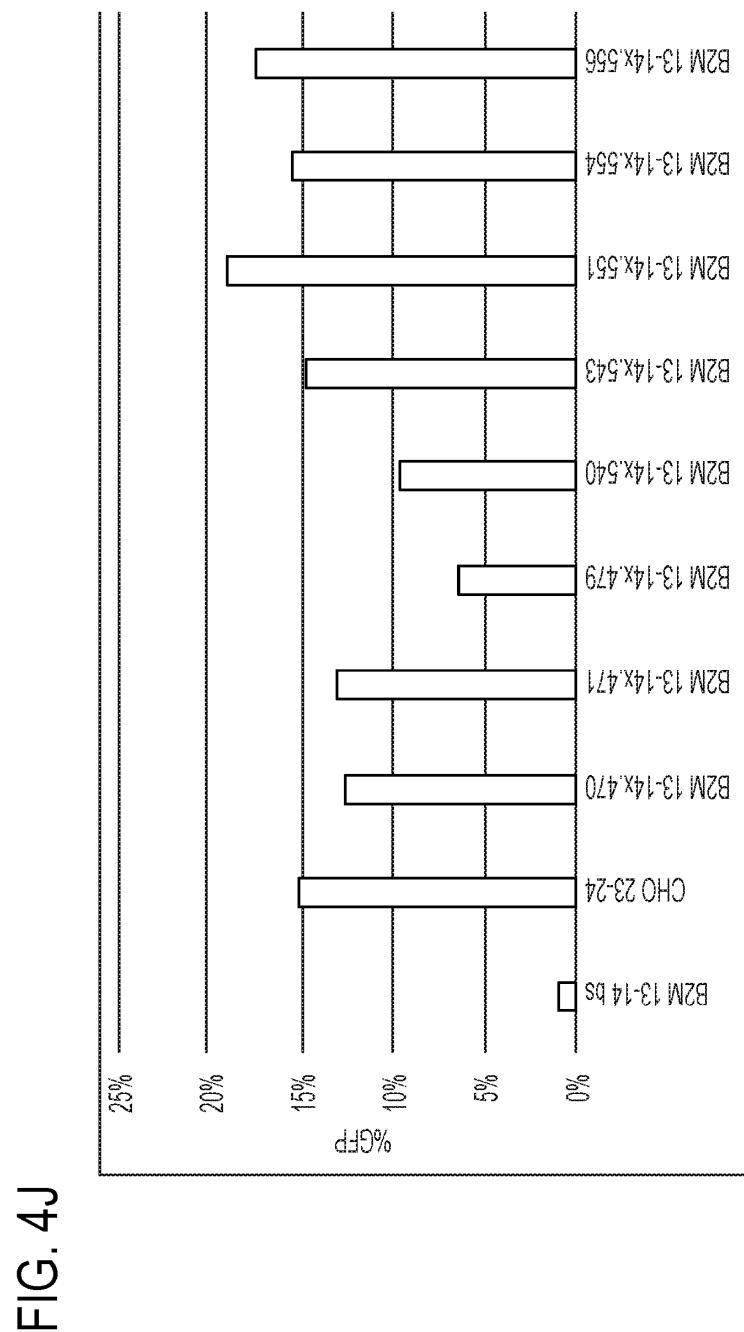
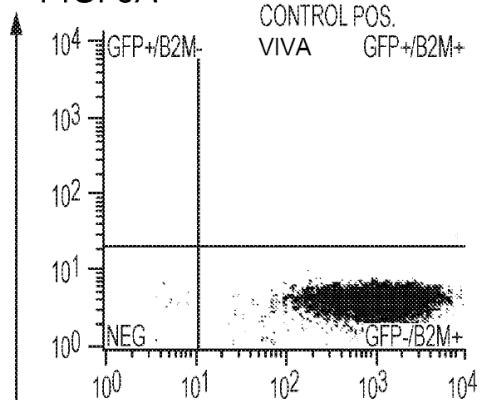
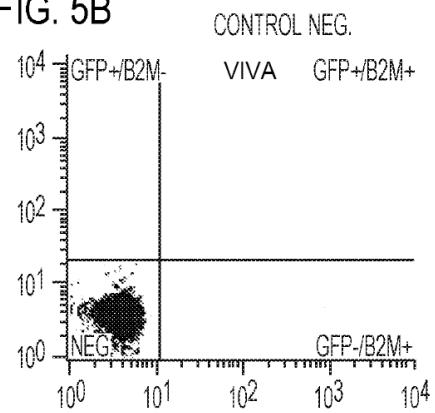
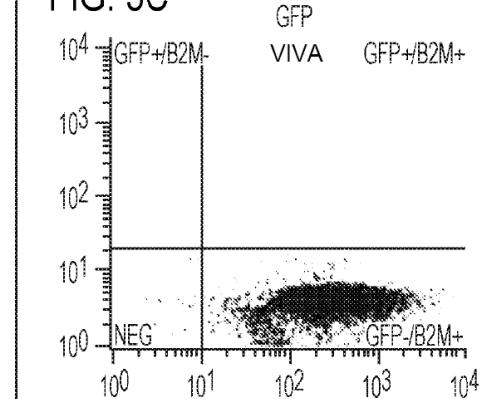
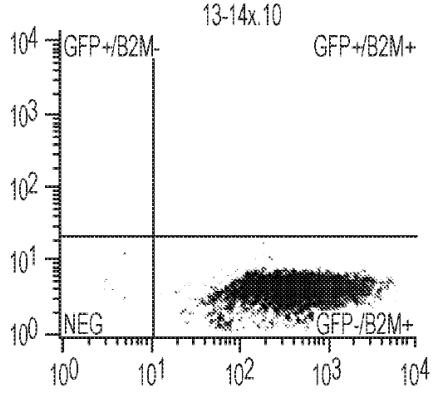
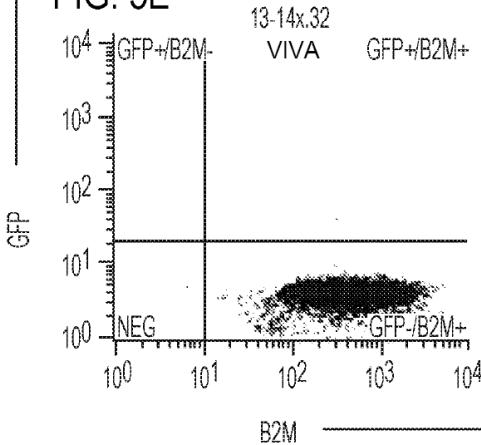
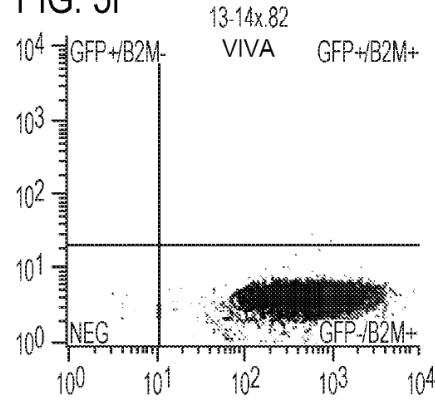


FIG. 4J

FIG. 5A**FIG. 5B****FIG. 5C****FIG. 5D****FIG. 5E****FIG. 5F**

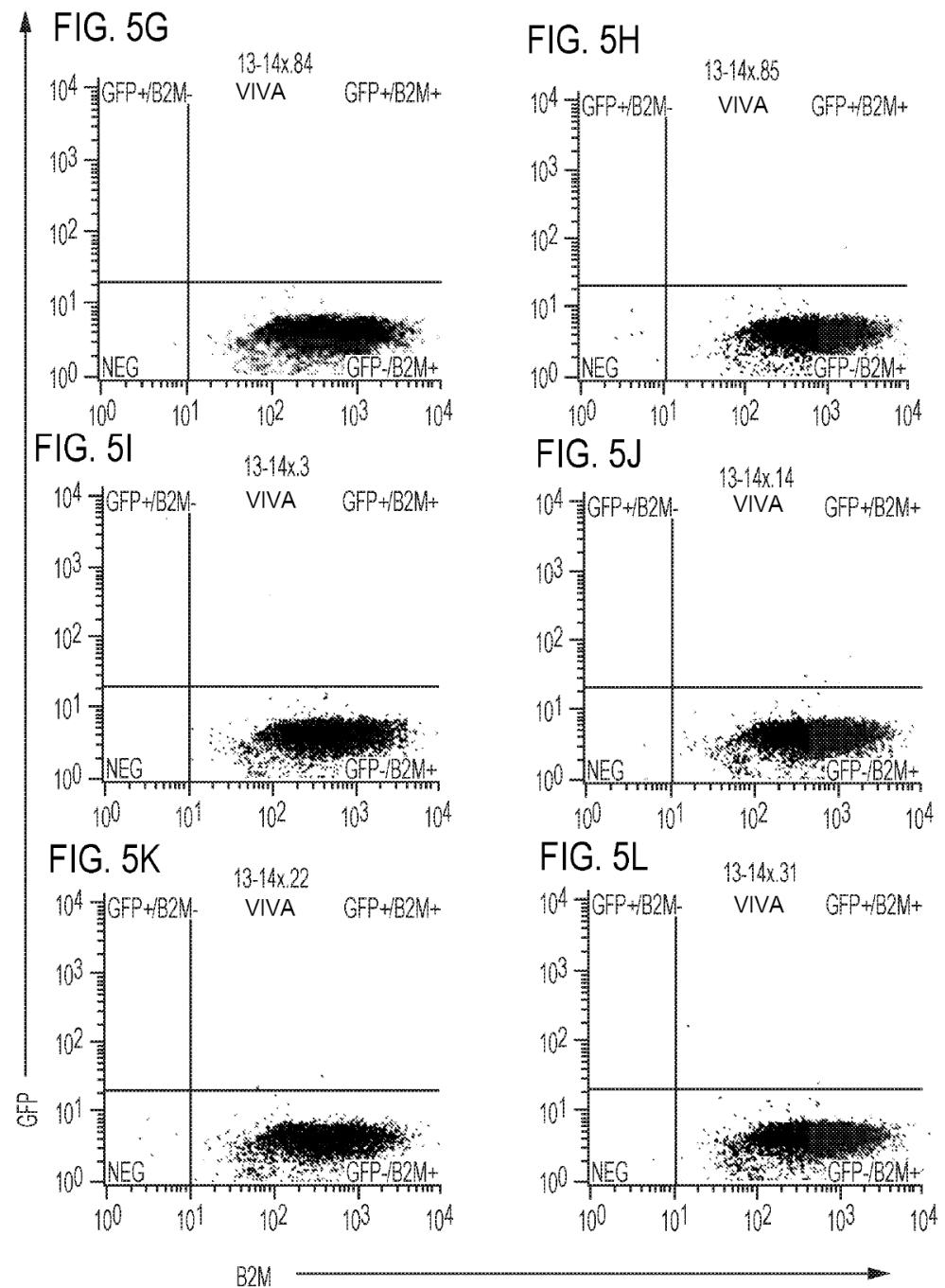


FIG. 5M

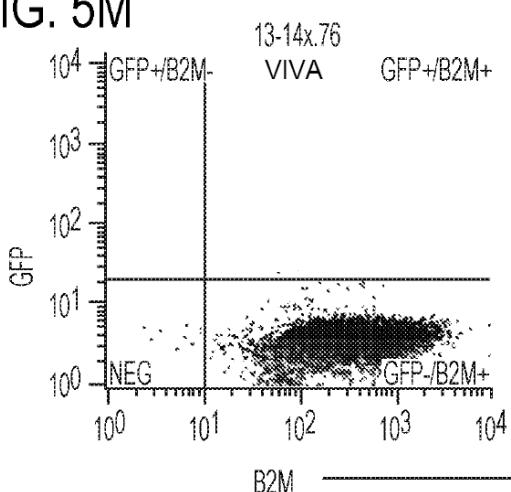
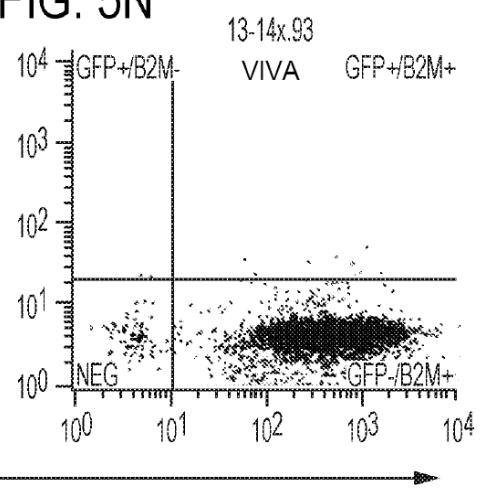


FIG. 5N



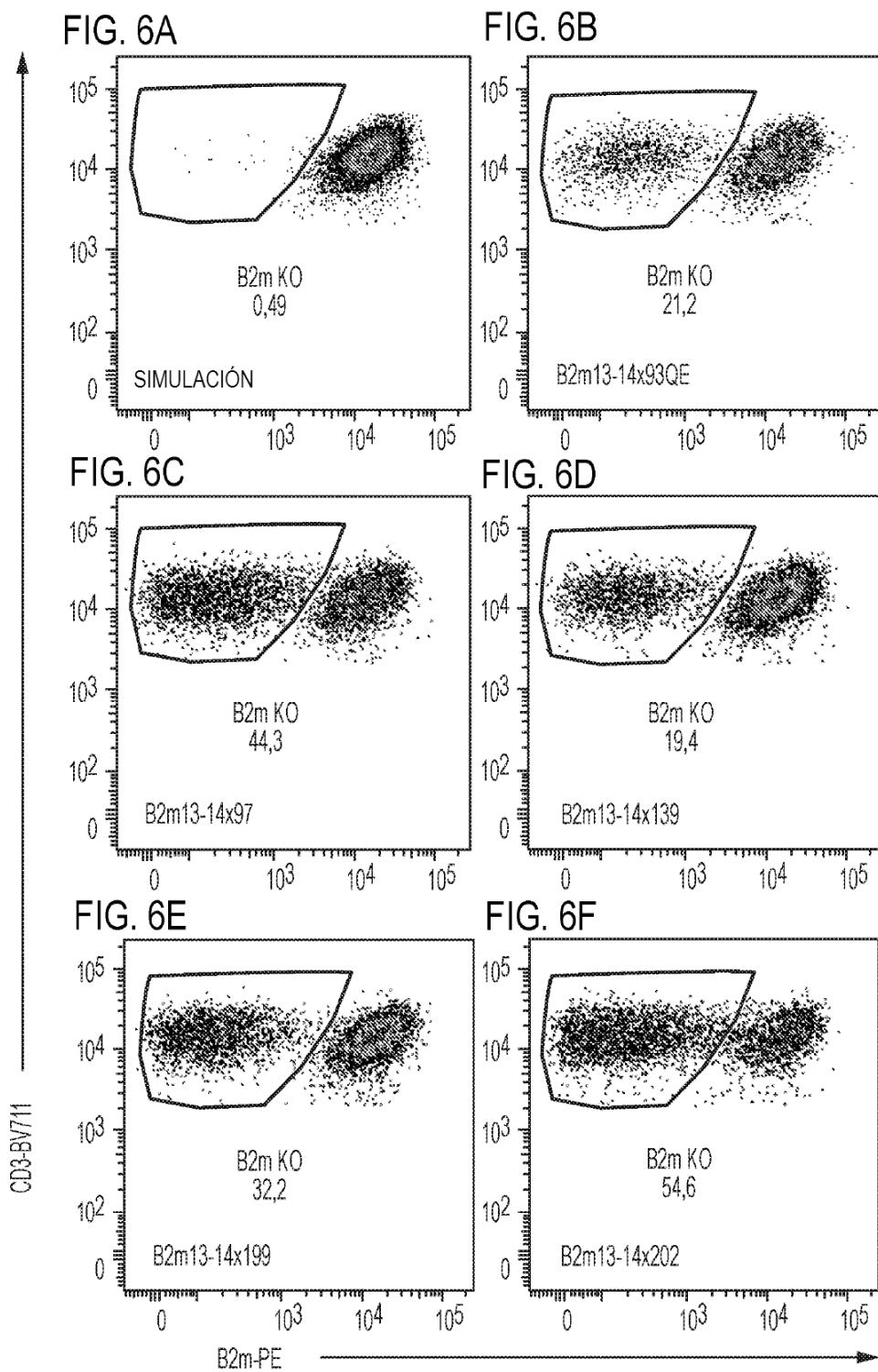


FIG. 6G

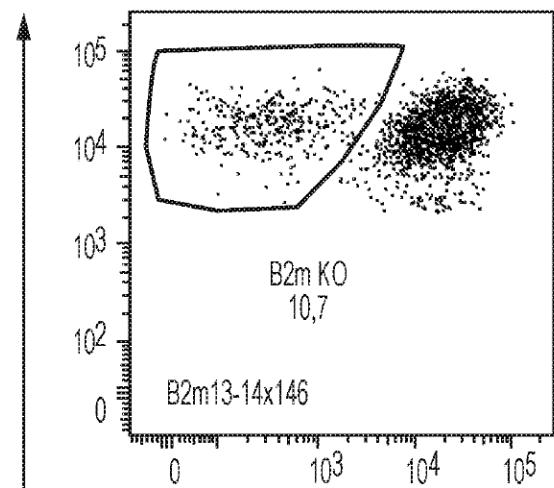


FIG. 6H

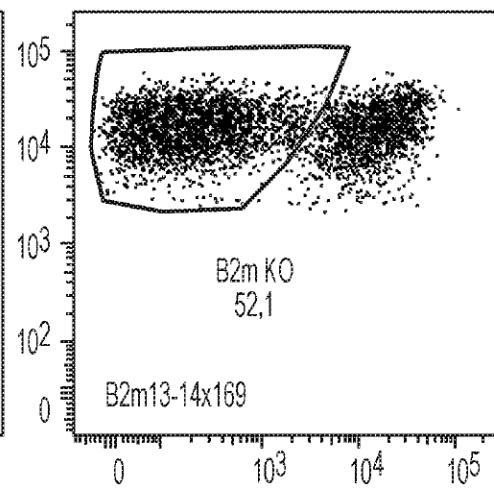


FIG. 6I

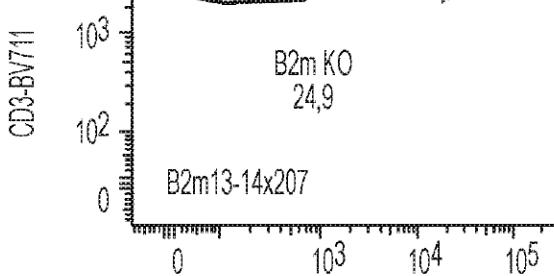
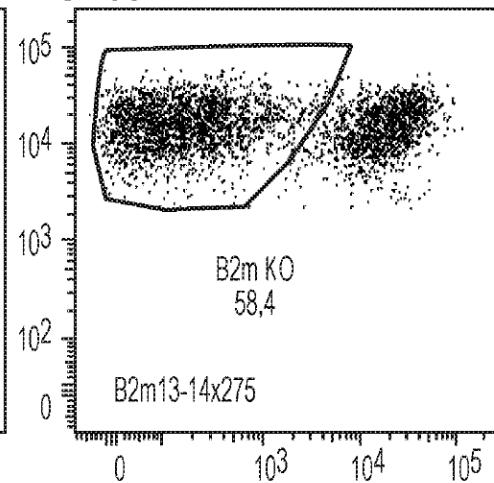


FIG. 6J



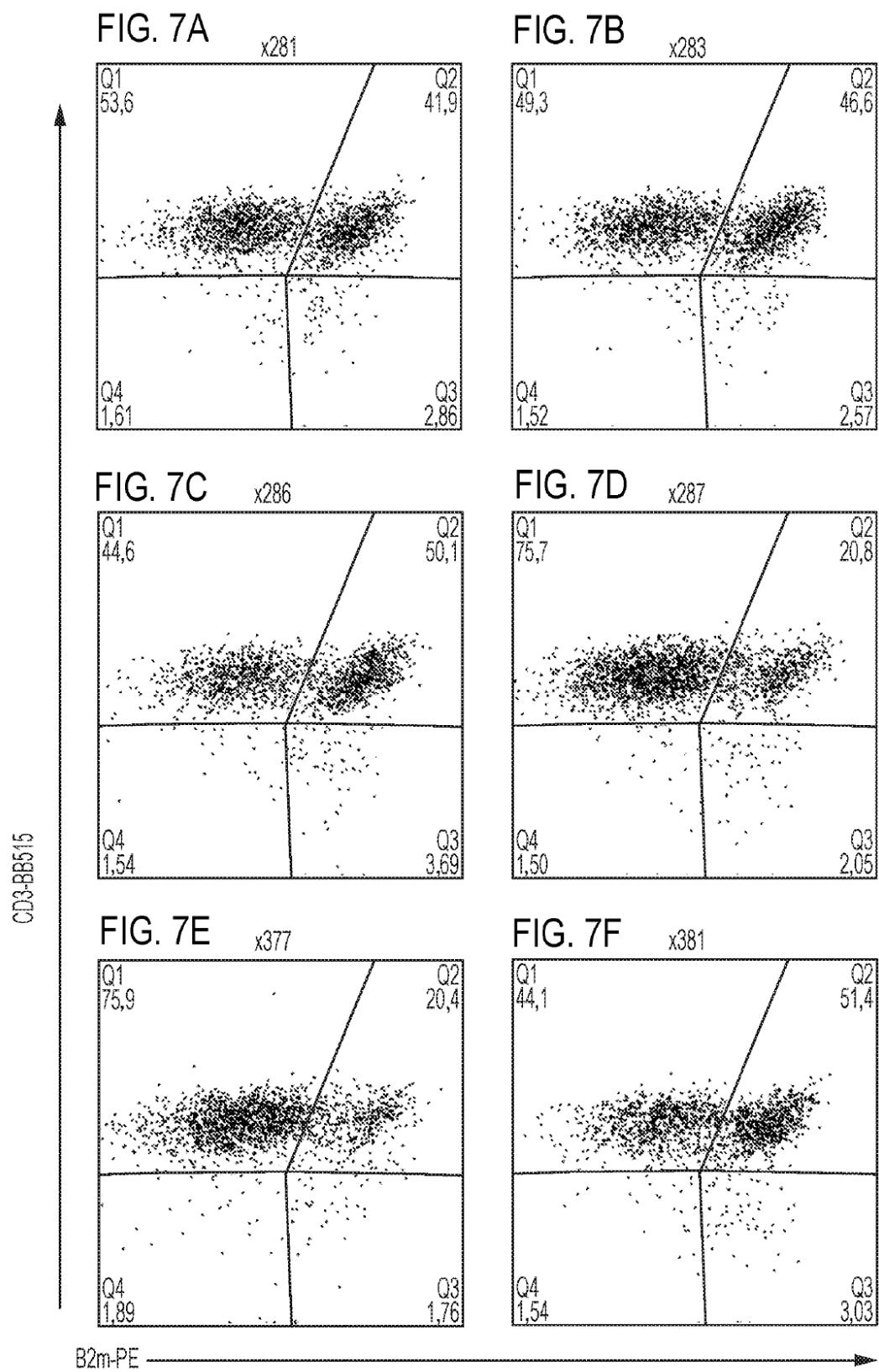


FIG. 7G x474

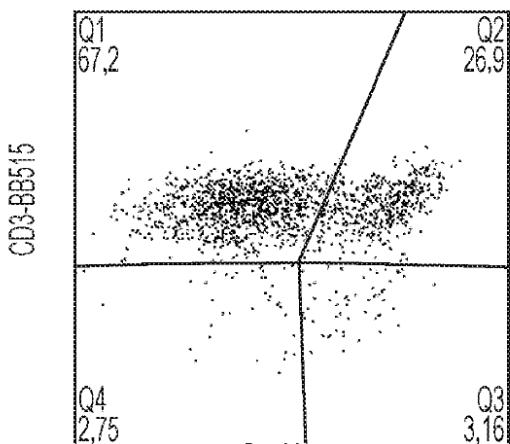


FIG. 7H x551

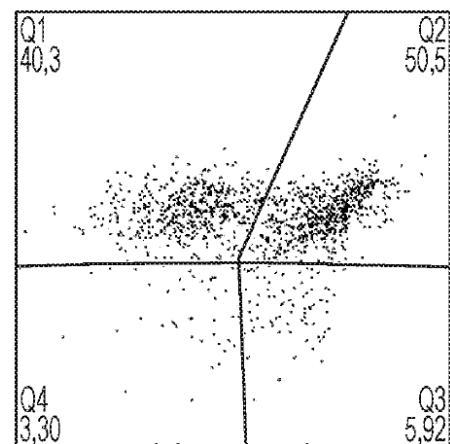


FIG. 8A

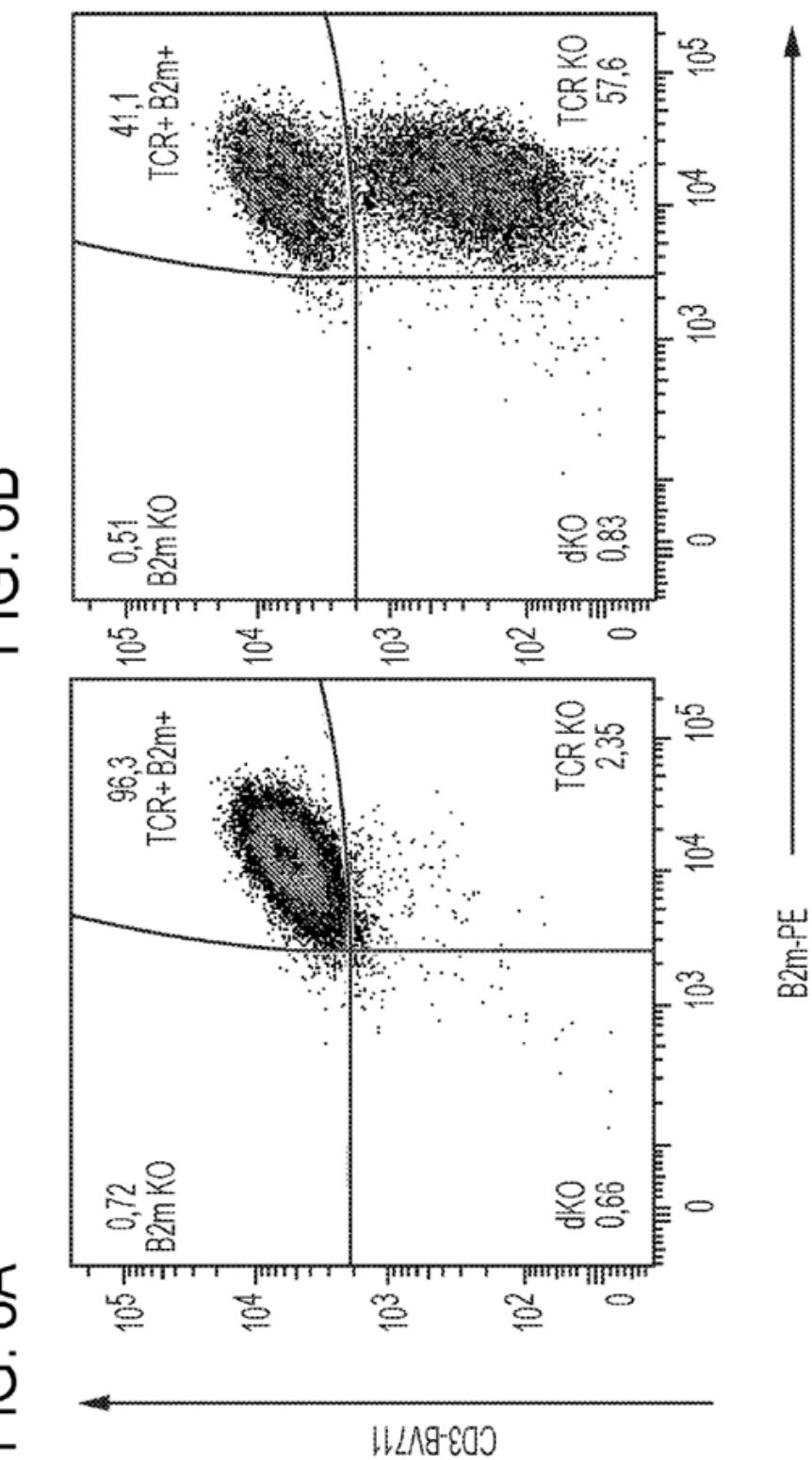


FIG. 8B

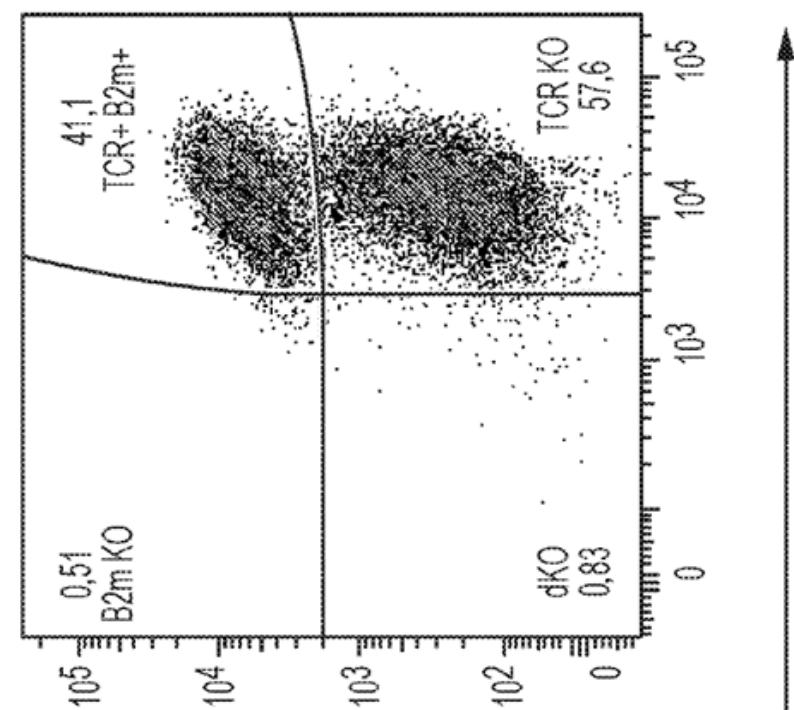


FIG. 8C

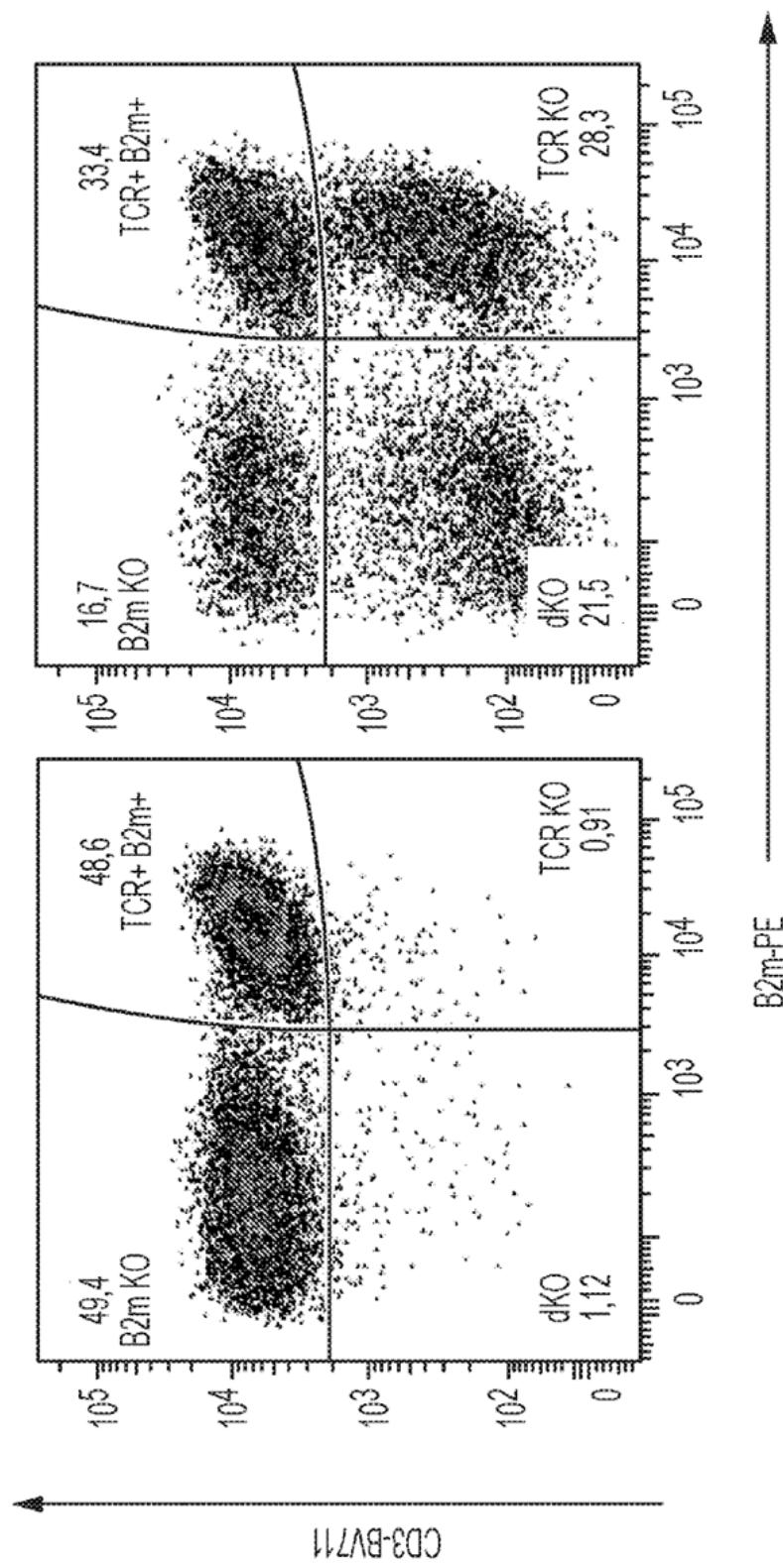


FIG. 8D

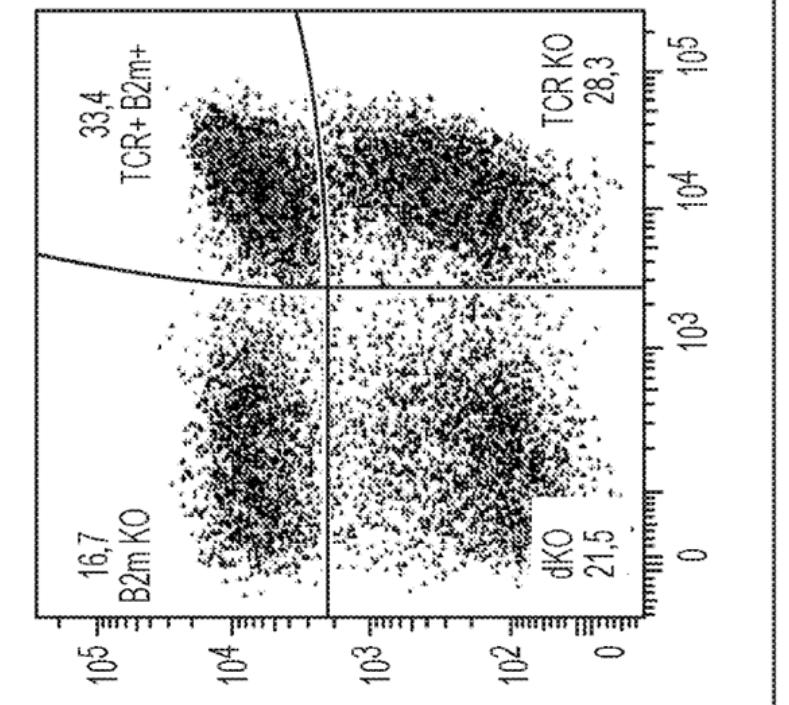


FIG. 9A

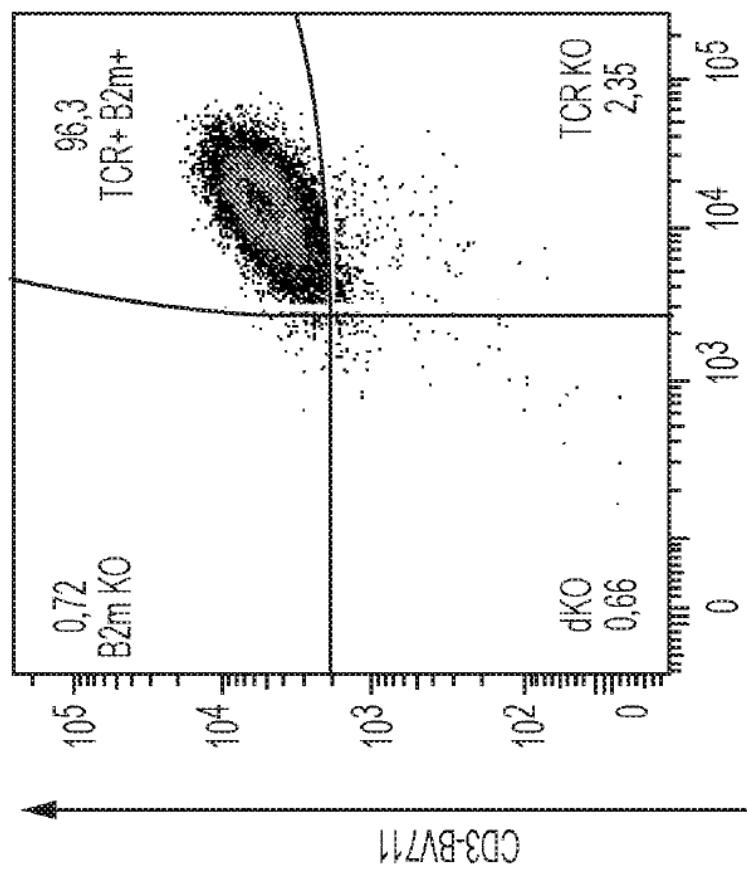


FIG. 9B

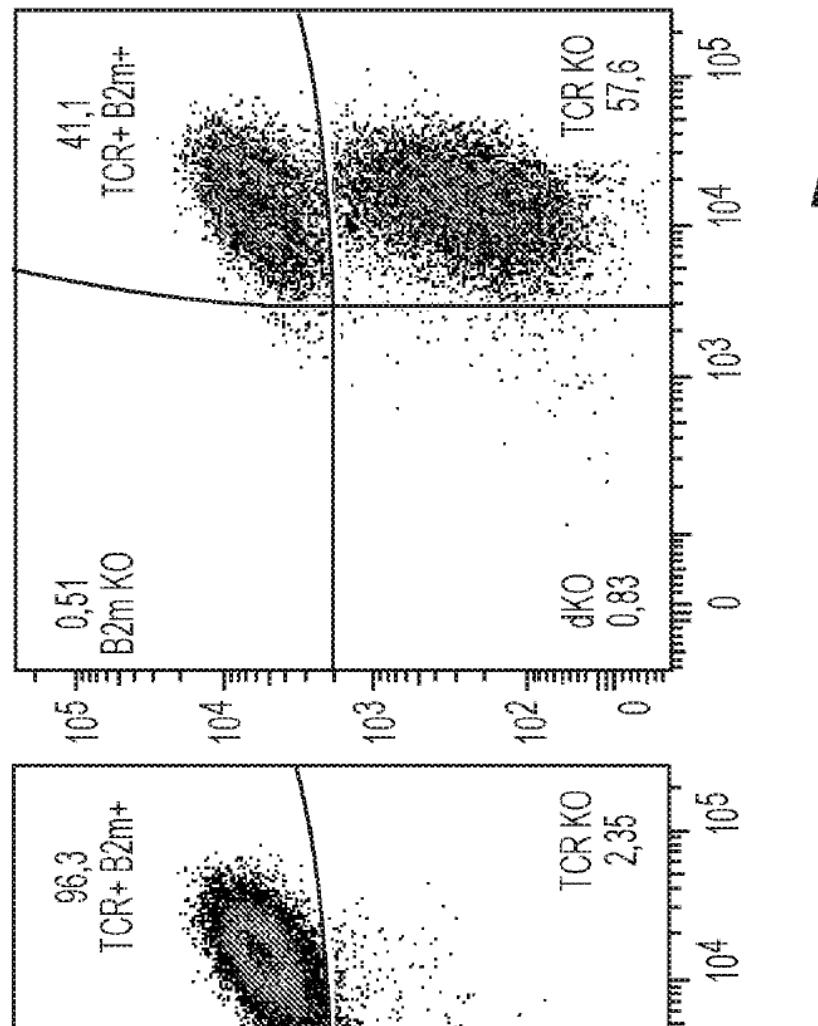
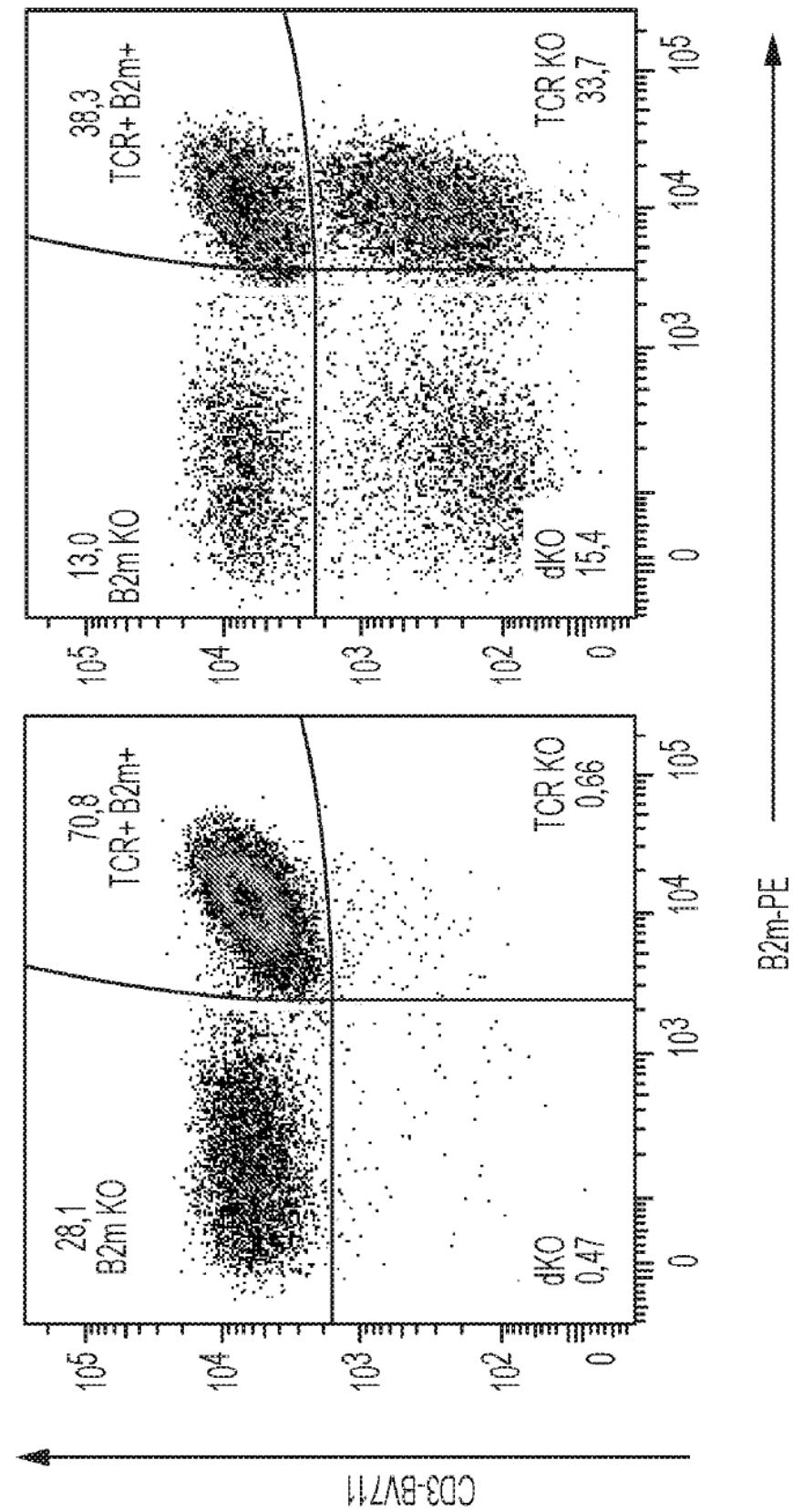


FIG. 9C



TRC1-2x87EE
B2M13-14x.93QE

- + - + + +

FIG. 10A

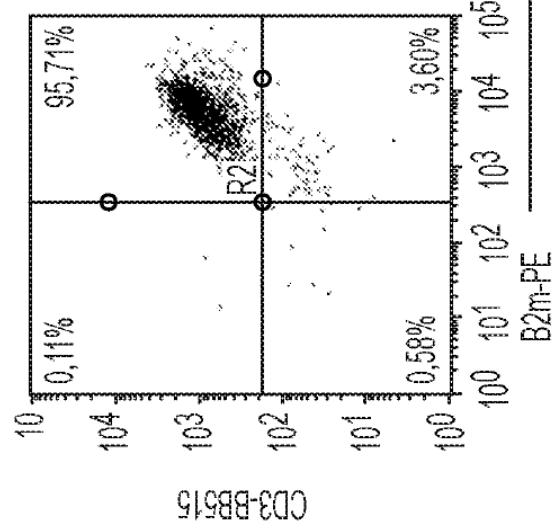


FIG. 10B

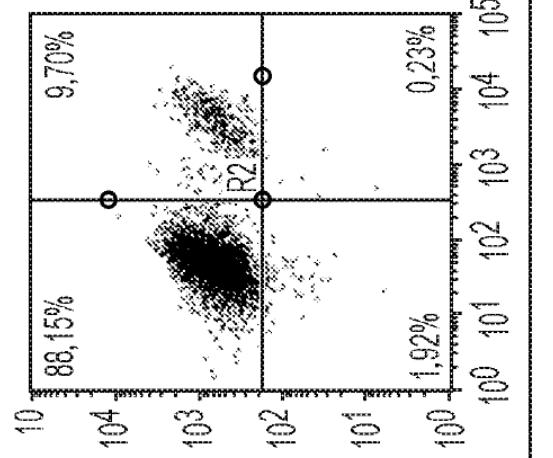
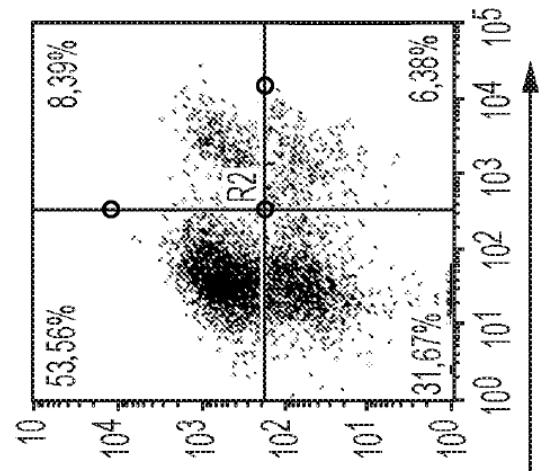
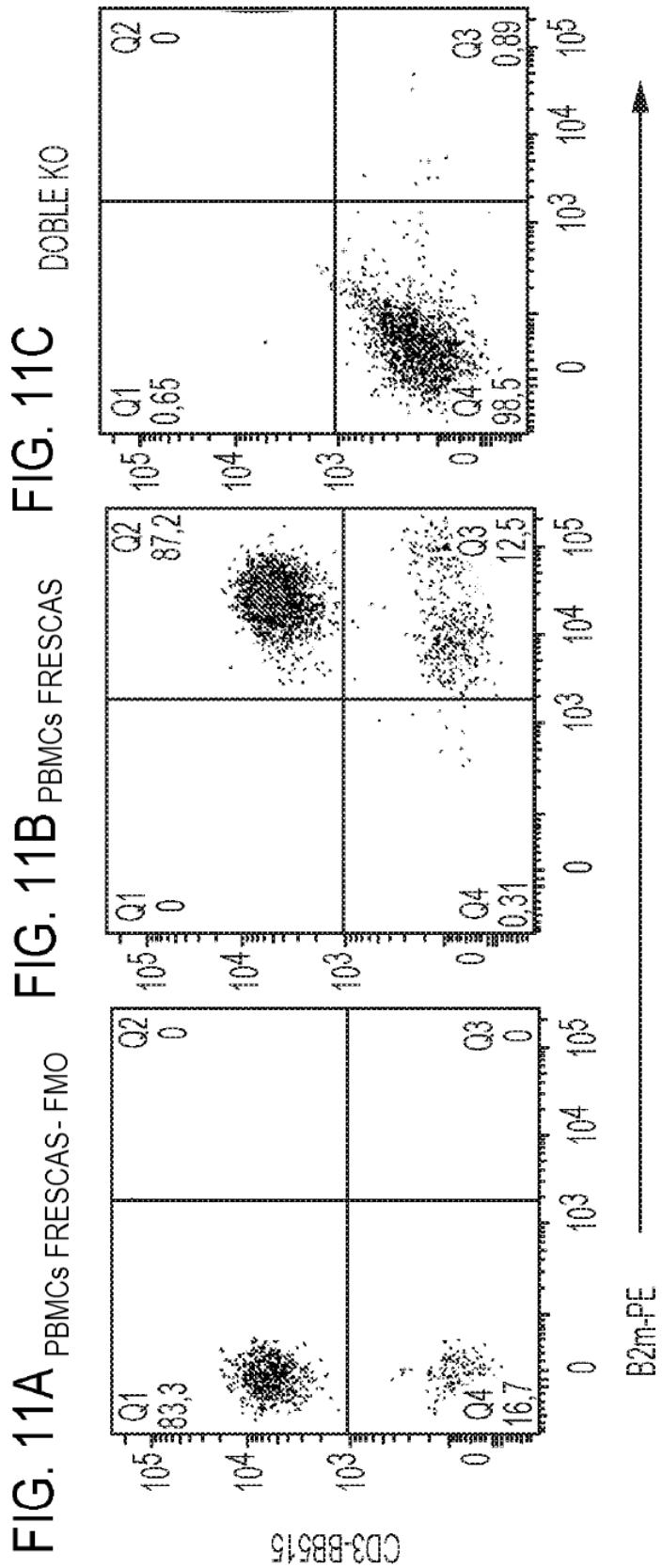
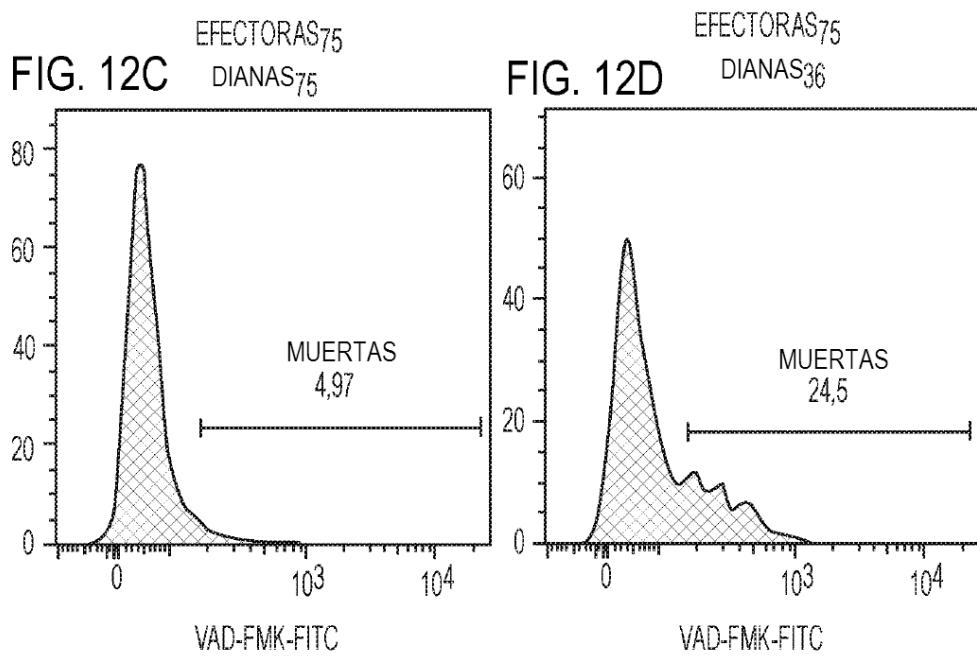
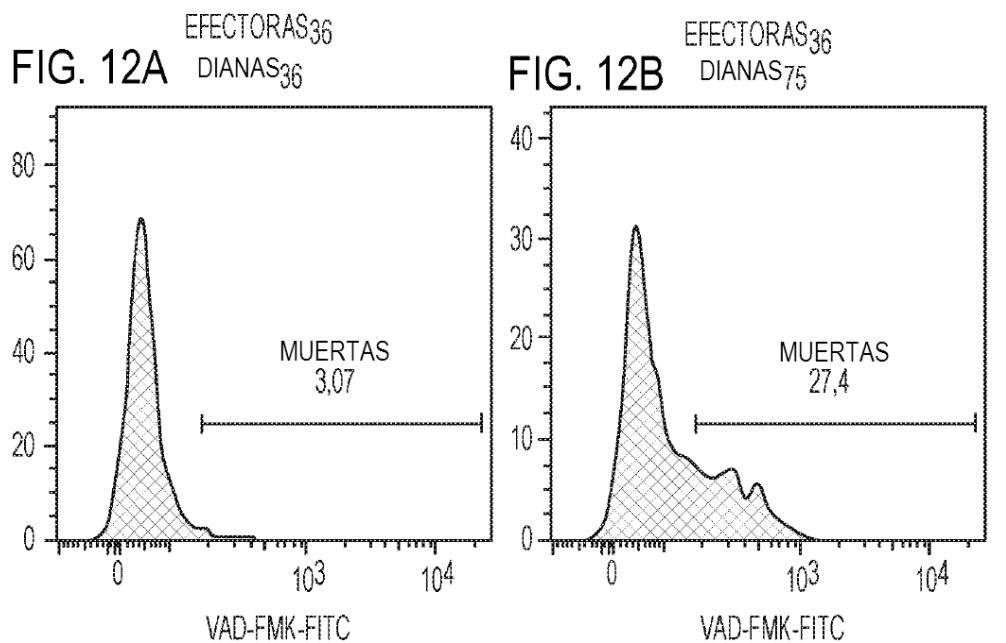


FIG. 10C

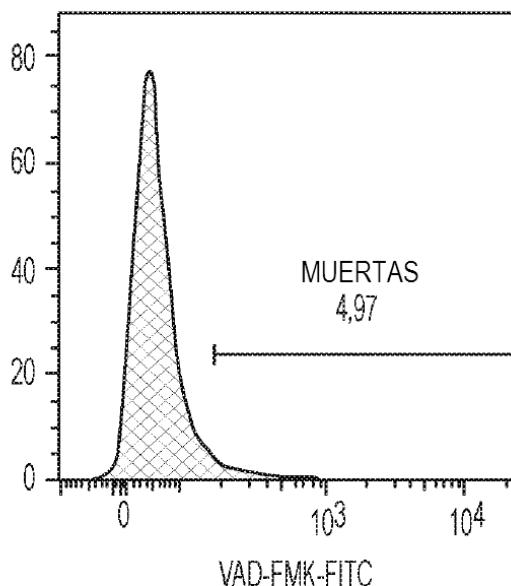
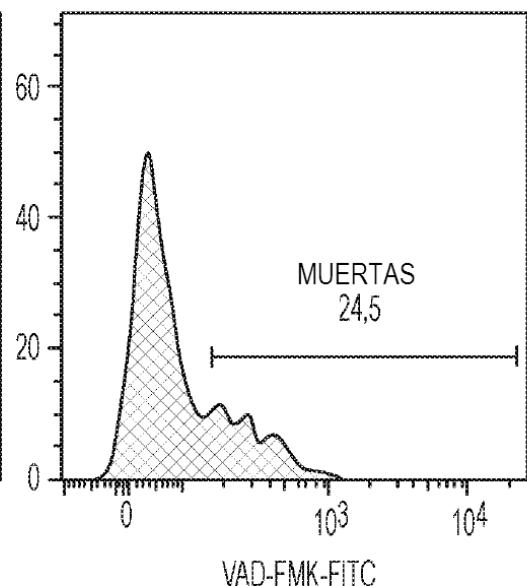
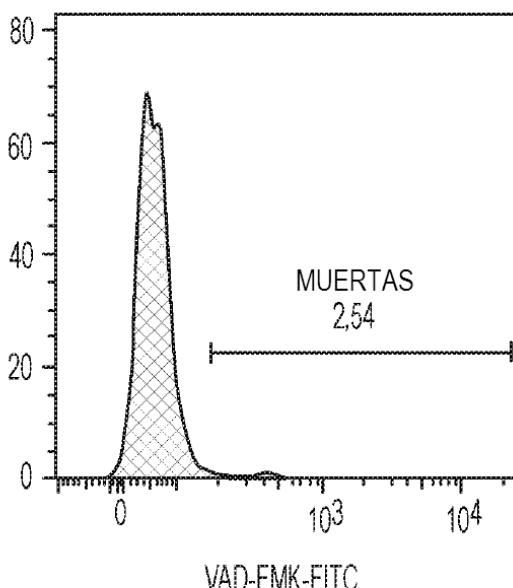
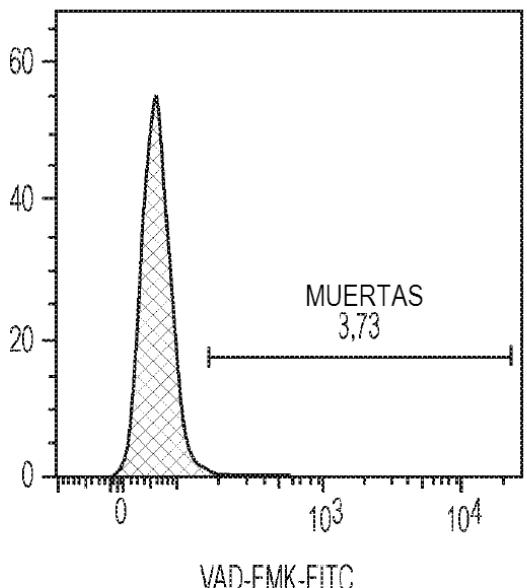




DIANAS WT



DIANAS KO B2M

FIG. 12E EFECTORAS₃₆
DIANAS₃₆**FIG. 12F** EFECTORAS₃₆
DIANAS₇₅**FIG. 12G** EFECTORAS₇₅
DIANAS₇₅**FIG. 12H** EFECTORAS₇₅
DIANAS₃₆

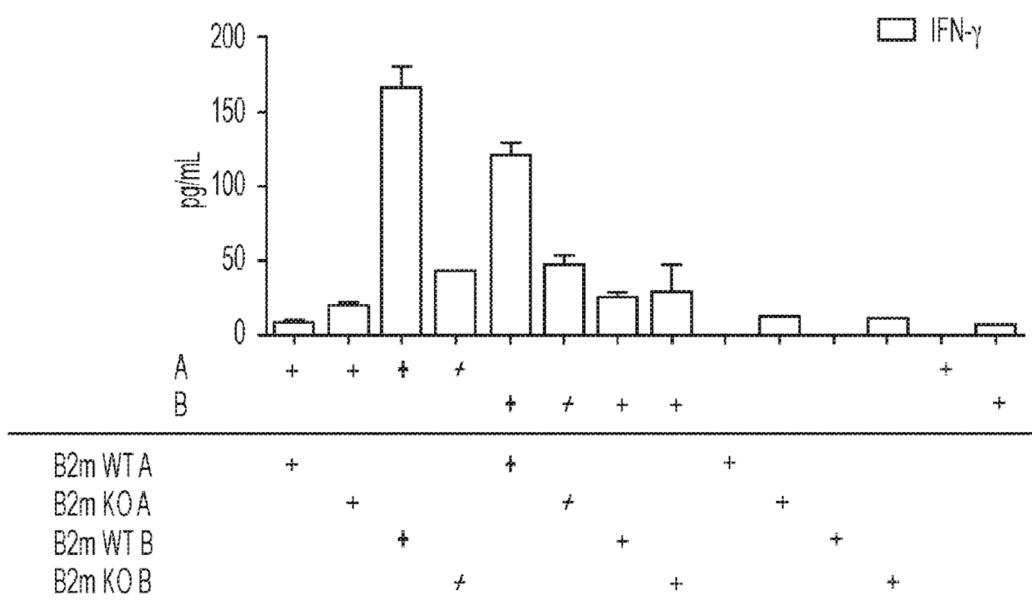


FIG. 13

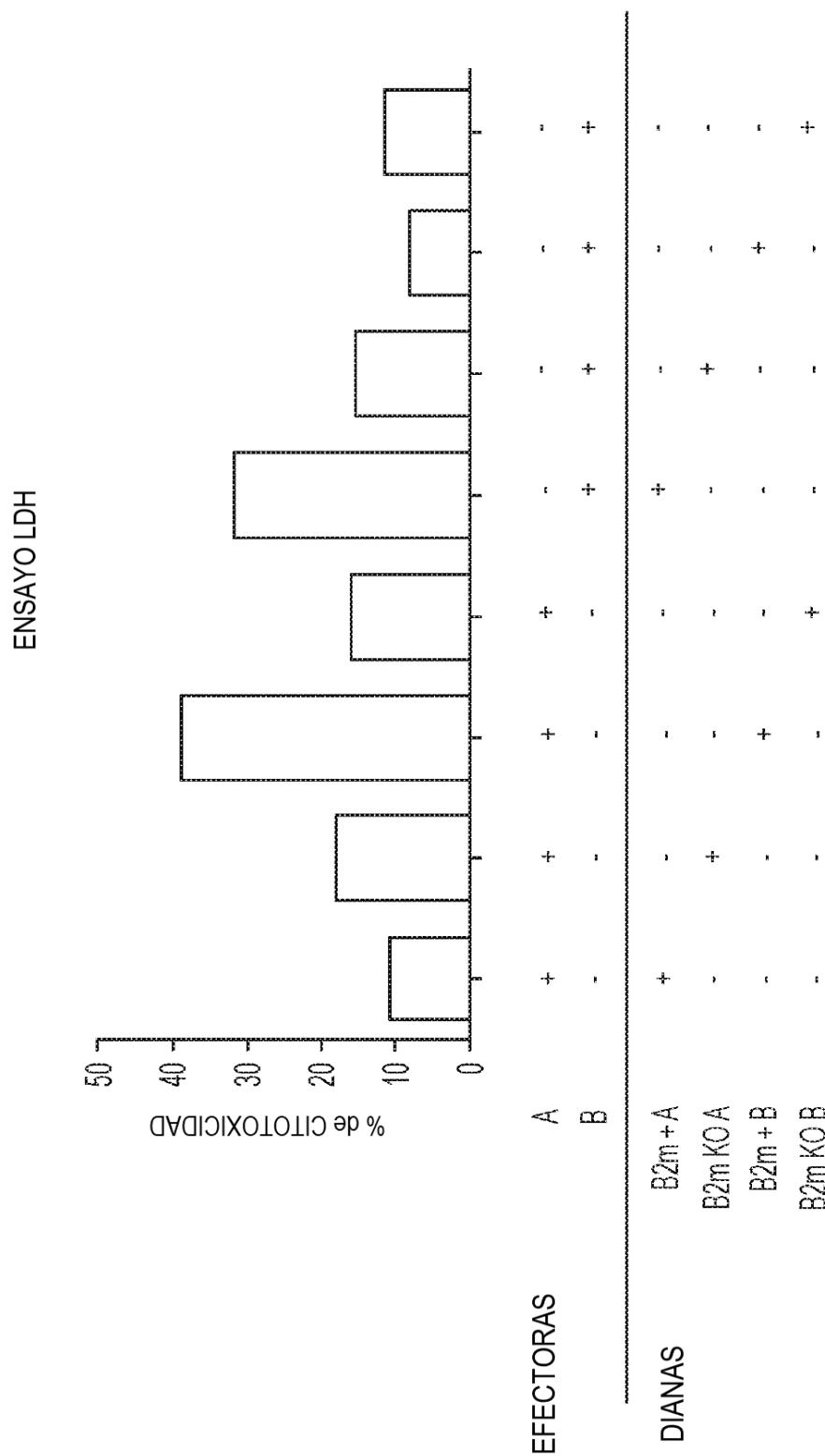


FIG. 14

FIG. 15A

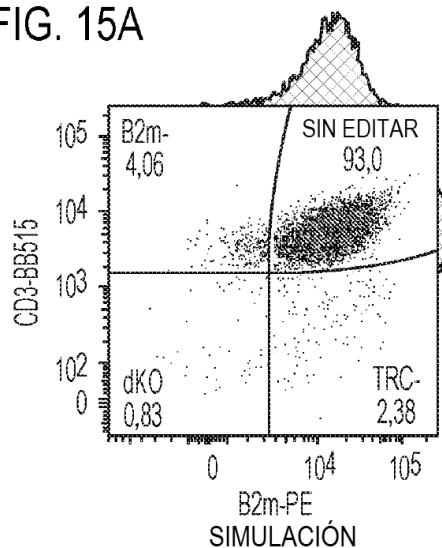


FIG. 15B

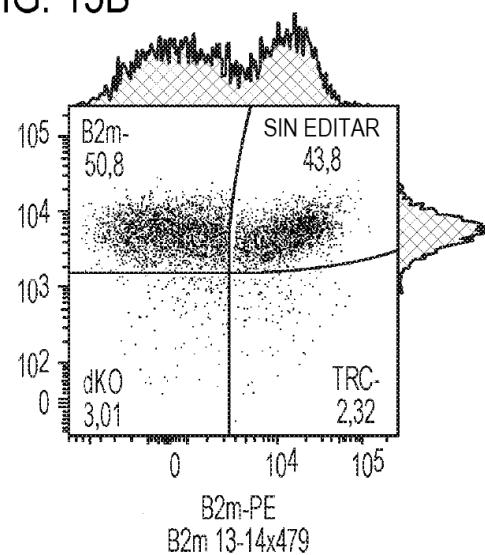


FIG. 15C

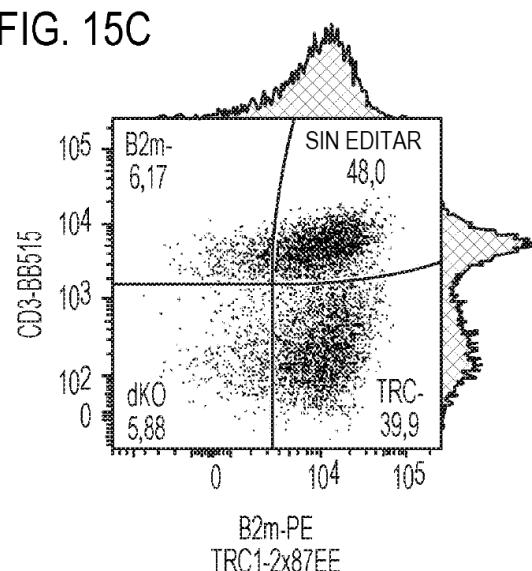


FIG. 15D

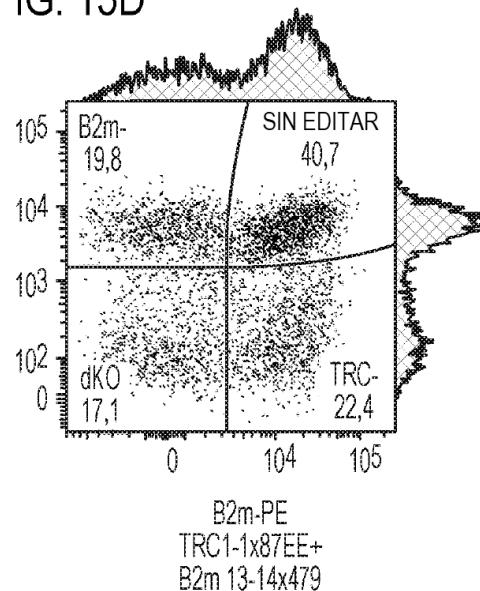


FIG. 15E

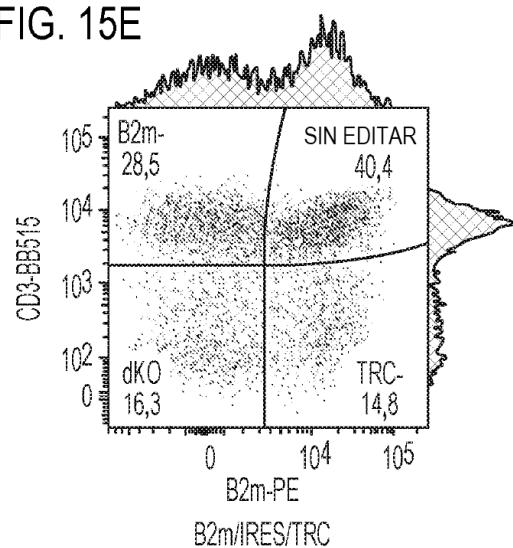


FIG. 15F

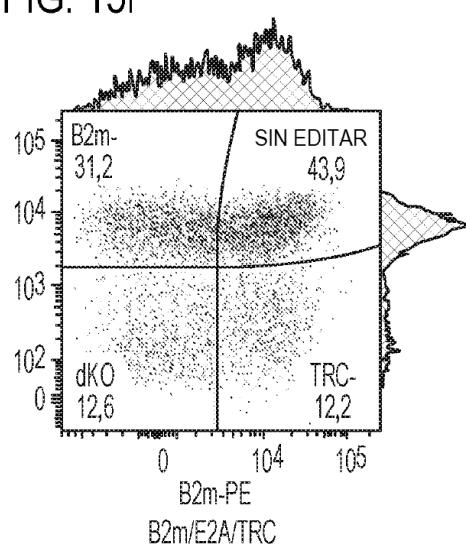


FIG. 15G

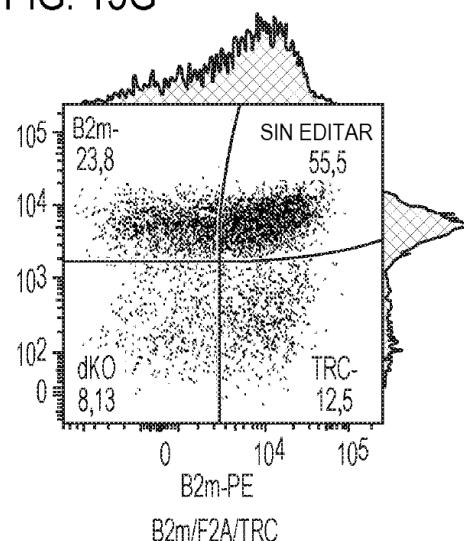


FIG. 15H

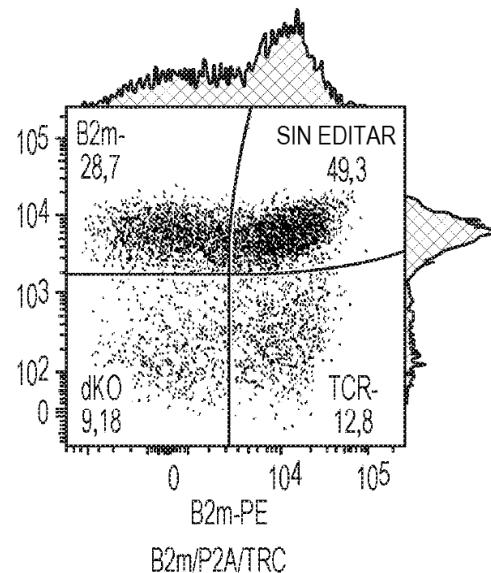


FIG. 15I

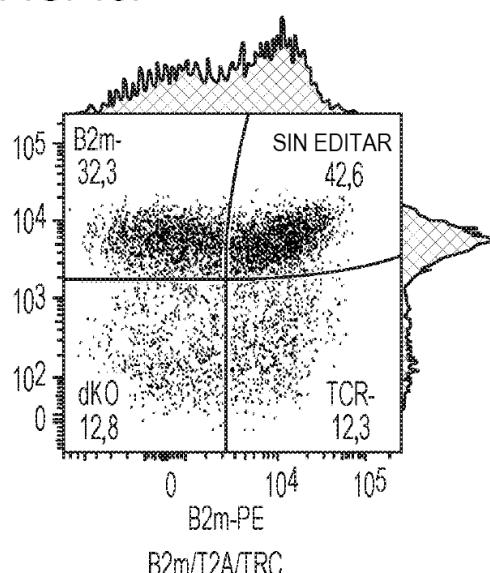


FIG. 15J

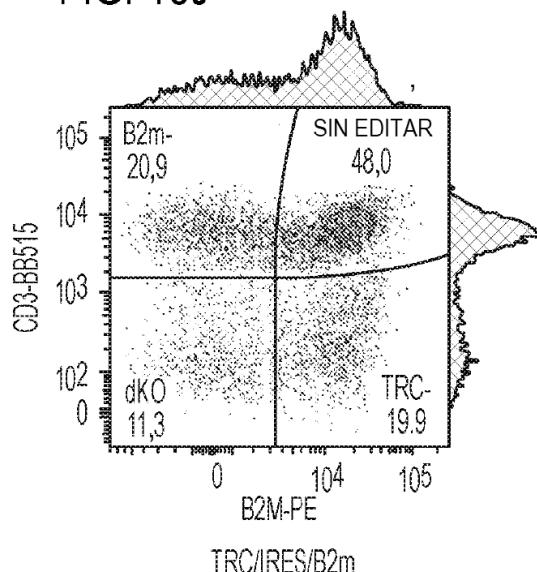


FIG. 15K

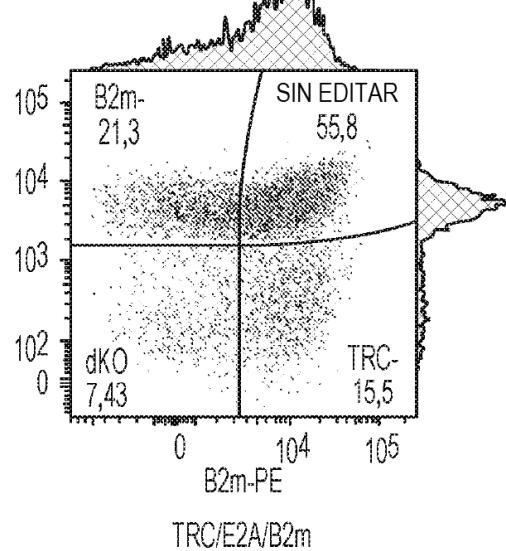


FIG. 15L

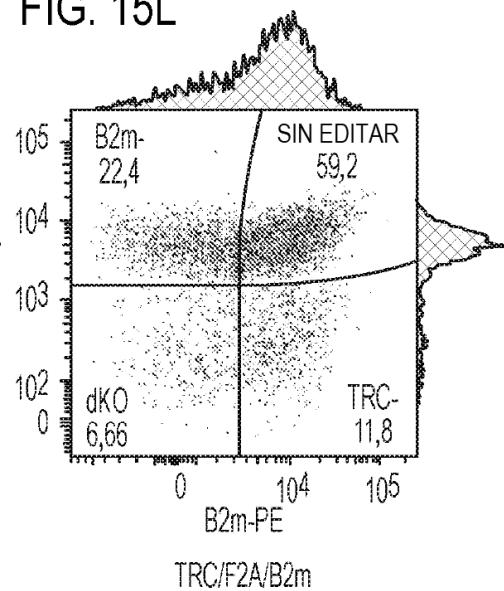


FIG. 15M

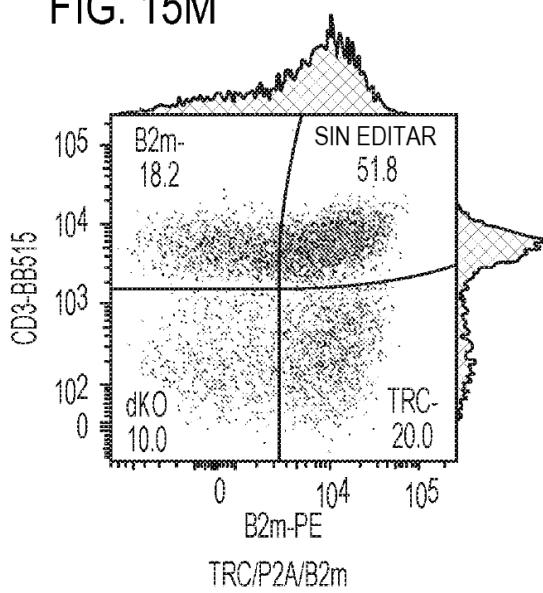


FIG. 15N

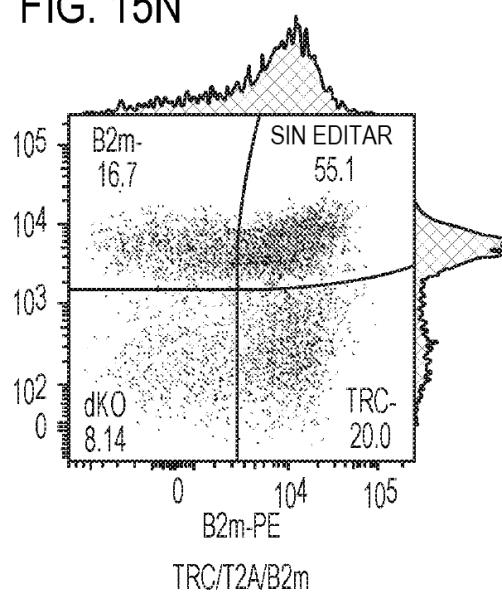


FIG. 16A

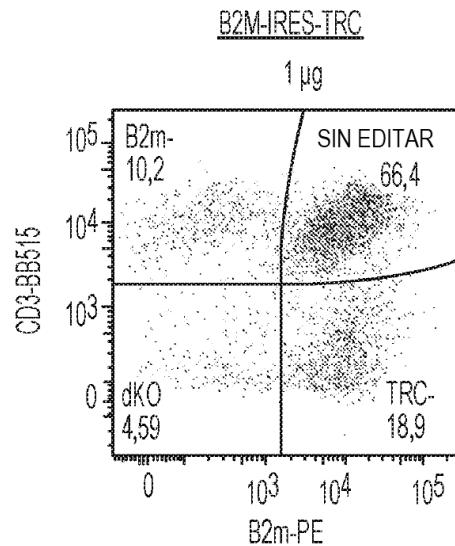


FIG. 16B

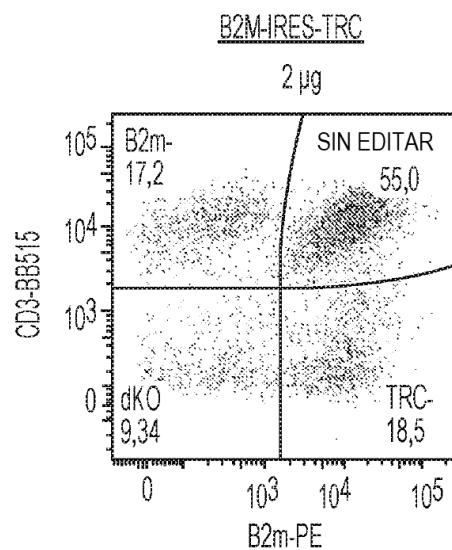


FIG. 16C

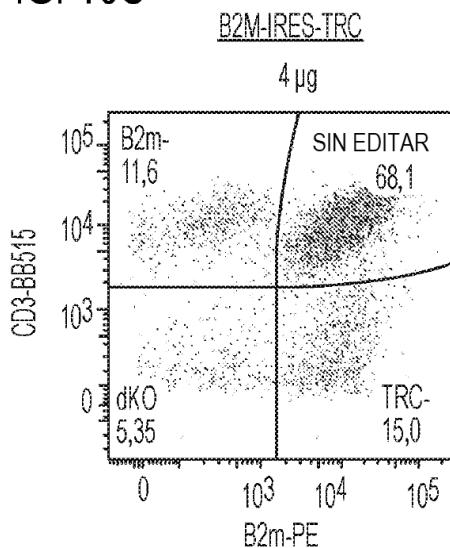


FIG. 16D

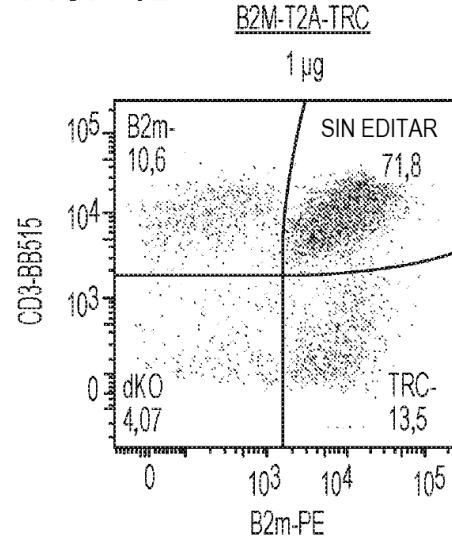


FIG. 16E

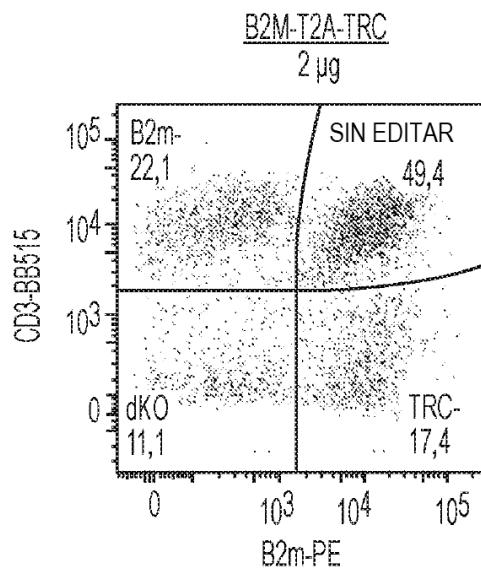


FIG. 16F

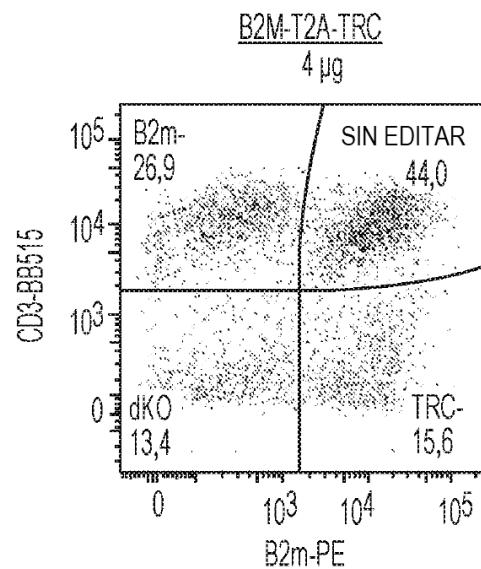


FIG. 16G

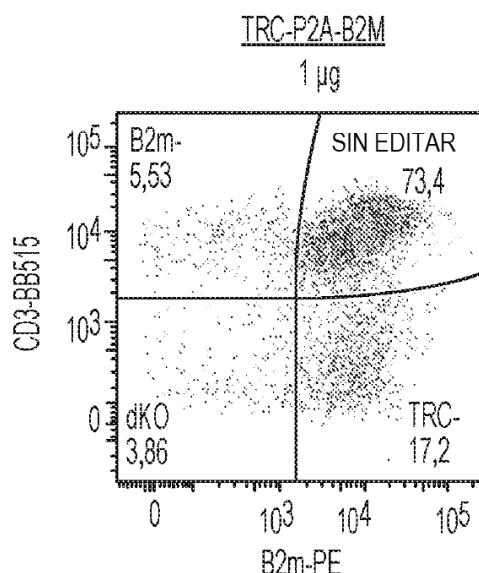


FIG. 16H

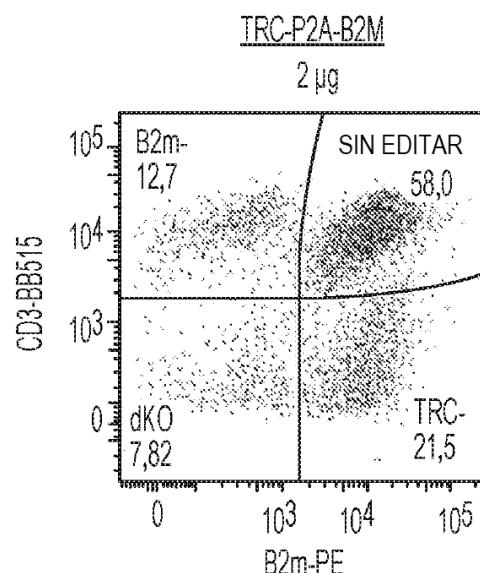


FIG. 16I

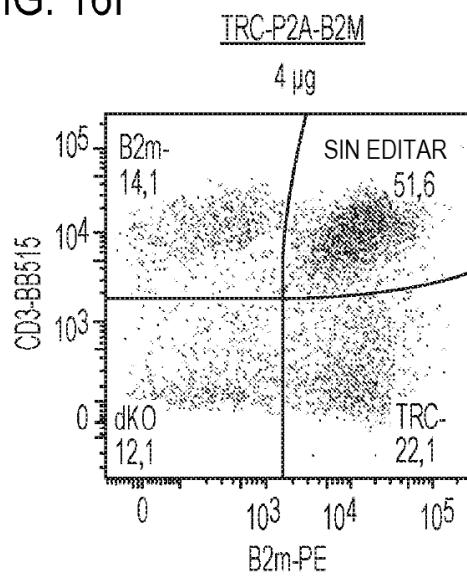


FIG. 16J

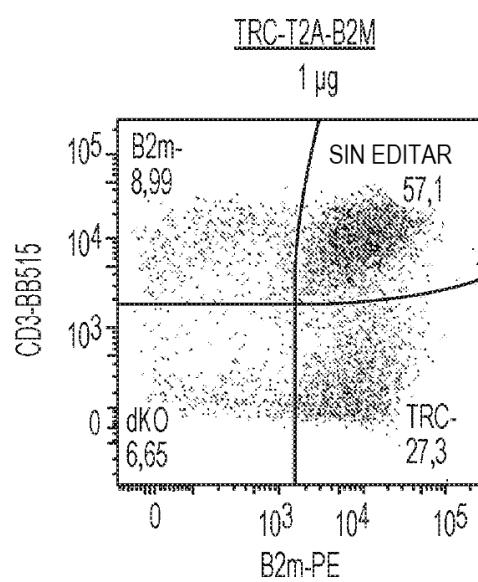


FIG. 16K

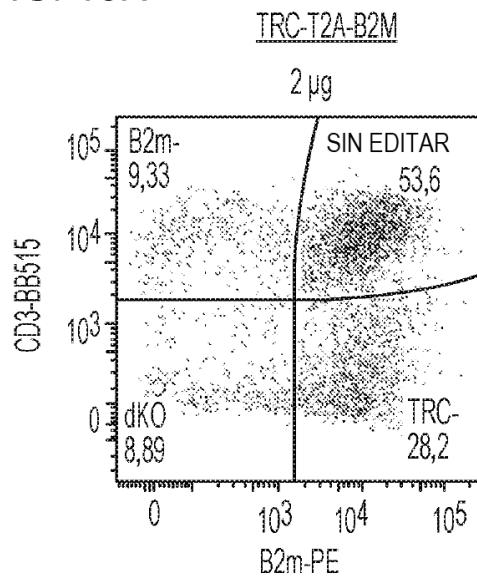


FIG. 16L

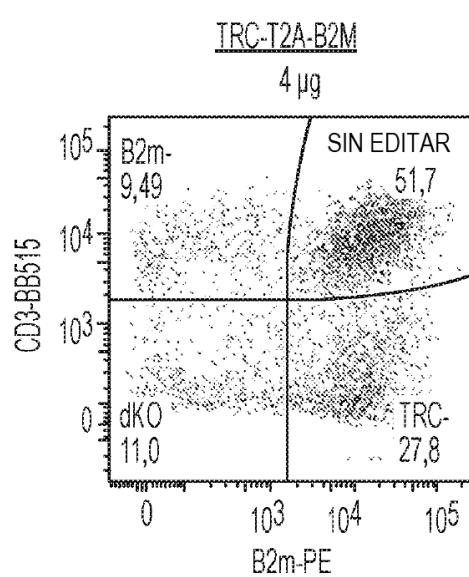


FIG. 16M

TRC 1-2x.87 EE

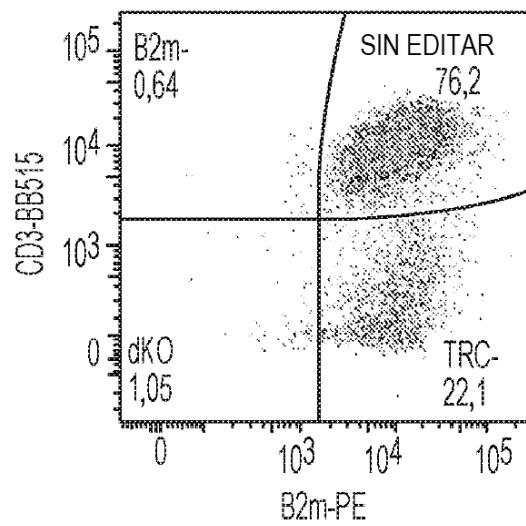
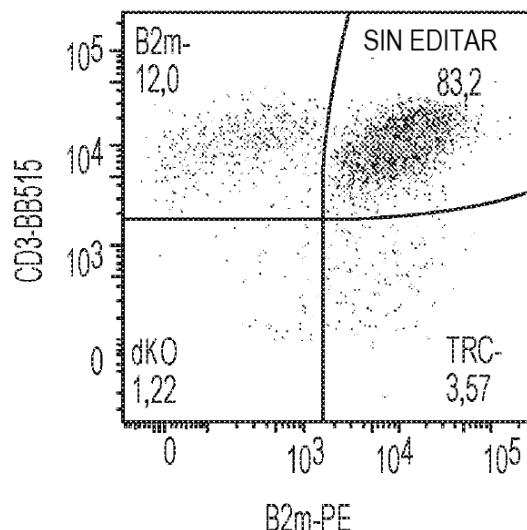


FIG. 16N

B2M 13-14x.479



TRC 1-2x.87 EE + B2M 13-14x.479

FIG. 16O

0.5µg EACH

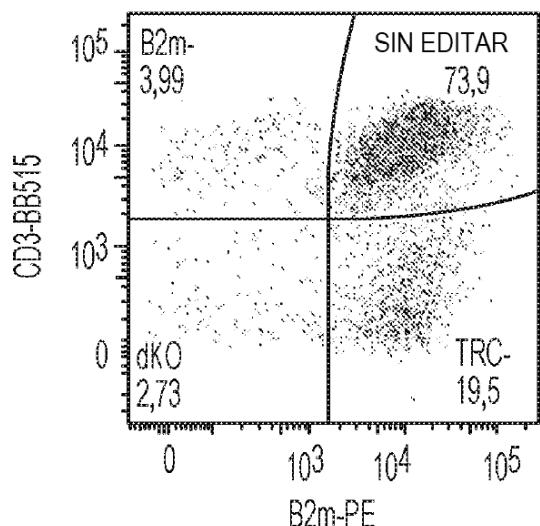
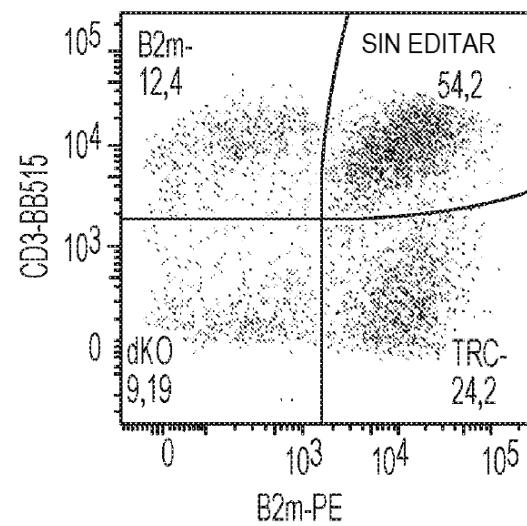


FIG. 16P

1µg EACH



CD3 vs. B2m -NUCLEASA +MUESTRAS AAV

FIG. 17A

TRC 1-2x.87 EE

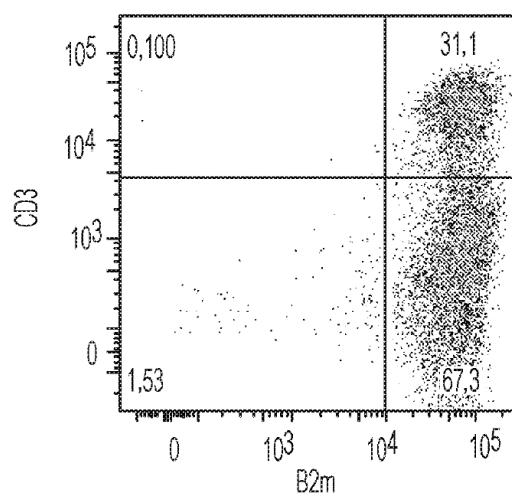
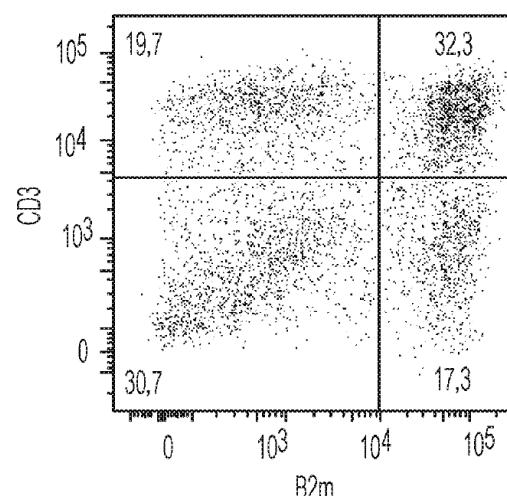


FIG. 17B

B2M-IRES-TRC



CD3 vs. CAR - MUESTRAS TRANSDUCIDAS SIMULADAS

FIG. 17C

TRC 1-2x.87 EE

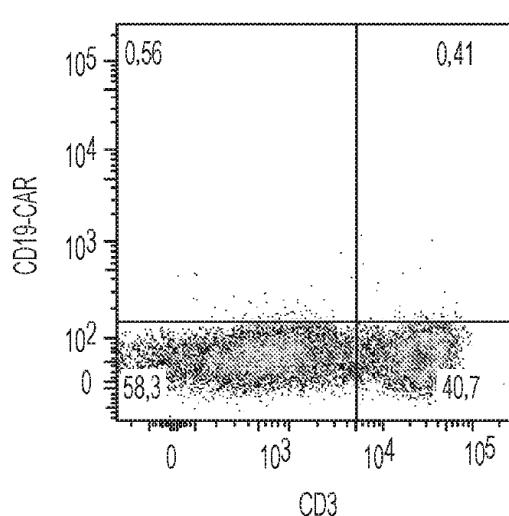
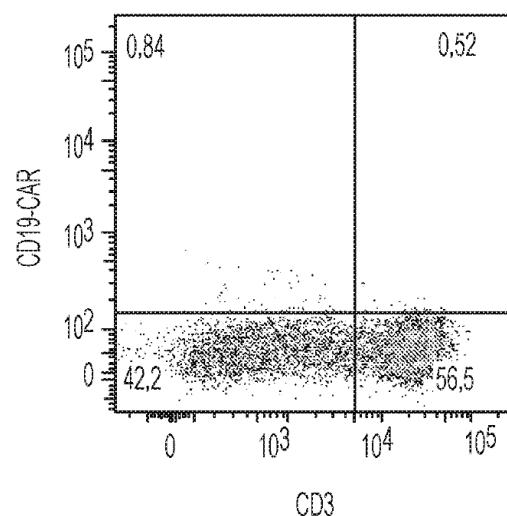


FIG. 17D

B2M-IRES-TRC



CD3 vs. CAR-NUCLEASA +MUESTRAS AAV

FIG. 17E

TRC 1-2x.87 EE

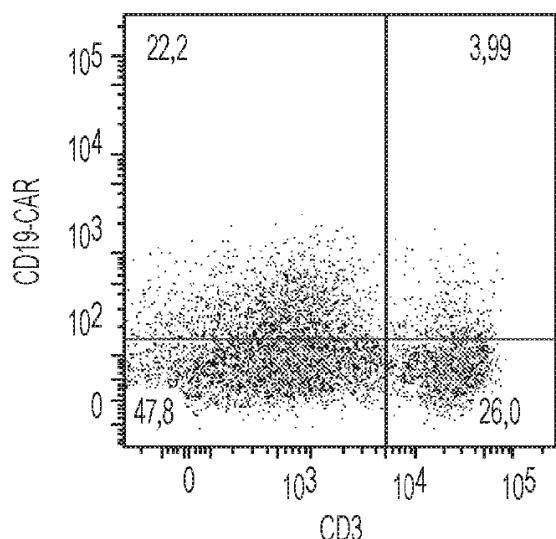
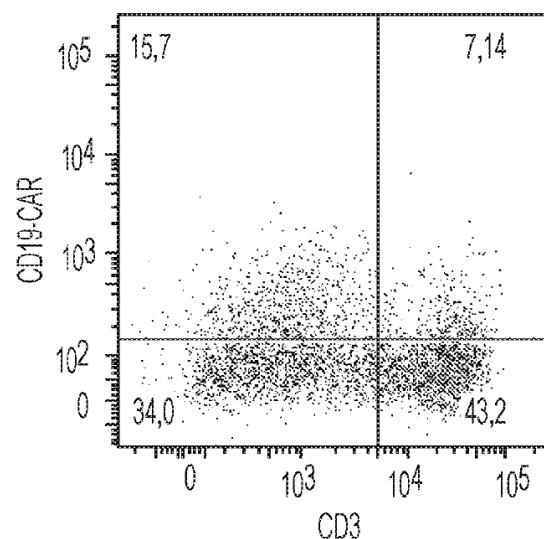


FIG. 17F

B2M-IRES-TRC



EXPRESIÓN B2m -CDR-CAR+ EVENTOS

FIG. 17G

TRC 1-2x.87 EE

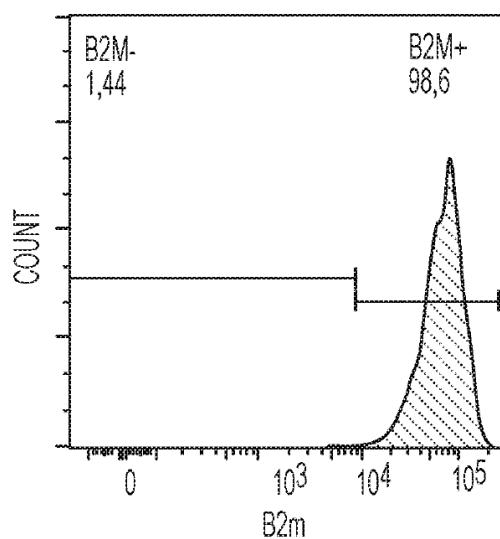


FIG. 17H

B2M-IRES-TRC

