

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 969**

51 Int. Cl.:

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2017 PCT/EP2017/077826**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2018 WO18083071**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2017 E 17797585 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3535392**

54 Título: **Variantes de la superficie celular inmunológicamente discernibles para uso en terapia celular**

30 Prioridad:

**02.11.2016 EP 16196860
02.11.2016 EP 16196858
25.04.2017 WO PCT/EP2017/059799
23.10.2017 EP 17197820**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.09.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT BASEL (100.0%)
Vizerektorat Forschung, Petersgraben 35
4001 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**JEKER, LUKAS;
KORNETE, MARA;
BORDOLI SCHWEDE, LORENZA;
SCHWEDE, TORSTEN;
LEPORE, ROSALBA;
MATTER MARONE, ROMINA y
RECHER, MIKE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 977 969 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

Variantes de la superficie celular inmunológicamente discernibles para uso en terapia celular

La presente divulgación se refiere al uso en aplicaciones médicas de células que tienen una proteína de la superficie celular mutante pero funcional, en donde es deseable un agotamiento o enriquecimiento selectivo de poblaciones celulares. Se pueden introducir proteínas de la superficie celular mutantes pero funcionales en las células mediante métodos de edición de genes que incluyen la reparación dirigida por homología, de roturas de la cadena doble de ADN, en particular utilizando la edición de genes CRISPR/Cas, o mediante el uso de editores de bases. La divulgación se refiere además a un agente y a un método para un agotamiento selectivo de células editadas *in vivo*.

La terapia celular es una opción terapéutica muy poderosa, pero a menudo se asocia con efectos secundarios graves no deseados. Los transgenes y/o la modificación genética de las células transferidas pueden provocar una transformación maligna. La transferencia de células CAR-T puede provocar efectos graves dentro y fuera de la diana (síndrome de liberación de citocinas) y la transferencia de linfocitos T alogénicos puede provocar la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH). El éxito de una terapia celular en oncología probablemente impulsará las terapias celulares para otras indicaciones, incluidas las enfermedades no malignas. Para aumentar la seguridad de las terapias celulares, especialmente si se utilizan en el tratamiento de enfermedades no letales, es importante garantizar que las células transferidas permanezcan seguras durante años, después de la transferencia. En los casos en los que se desarrollan efectos secundarios graves no deseados, la posibilidad de agotar selectivamente las células transferidas mediante un "conmutador de seguridad o de muerte" aumentaría significativamente la seguridad de la terapia celular.

El documento US2016/144026A1 se refiere a una inmunoterapia combinada de receptores que reconocen antígenos y células hematopoyéticas para el tratamiento de enfermedades.

El problema subyacente en la presente divulgación es proporcionar un sistema que sirva para marcar y rastrear células permanentemente y permita el agotamiento selectivo de las células marcadas o no marcadas *in vitro* o *in vivo*. Esos problemas se resuelven mediante el objeto de las reivindicaciones independientes.

Descripción

La invención se define en las reivindicaciones.

Un primer aspecto de la divulgación se refiere, pero no como parte de la invención reivindicada, a una célula de mamífero que expresa una primera isoforma de una proteína de superficie, en donde dicha primera isoforma de dicha proteína de superficie es funcionalmente indistinguible, pero inmunológicamente distinguible de una segunda isoforma de dicha proteína de superficie, para uso en un tratamiento médico de un paciente que tiene células que expresan dicha segunda forma de dicha proteína de superficie.

La expresión "inmunológicamente distinguible" se refiere a una primera y a una segunda isoforma de la proteína de superficie que pueden distinguirse por un ligando que se une específicamente a la primera o a la segunda isoforma.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "unión específica" se refiere a una unión con una constante de disociación $K_D \leq 10 E^{-7}$.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "ligando" se refiere a un anticuerpo o una molécula similar a un anticuerpo. El anticuerpo o molécula similar a anticuerpo puede estar acoplado a otra molécula (por ejemplo, en una inmunotoxina) o puede estar presente en la superficie de una célula, en particular una célula inmunitaria.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "anticuerpo" se utiliza con su significado conocido en la técnica de la biología celular y la inmunología; se refiere a anticuerpos completos que incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulina tipo G (IgG), tipo A (IgA), tipo D (IgD), tipo E (IgE) o tipo M (IgM), cualquier fragmento de unión a antígeno o cadenas simples de los mismos y estructuras artificiales relacionadas o derivadas. Un anticuerpo completo es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera (CL). La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluidas varias células del sistema inmunológico (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente del sistema del complemento clásico.

La expresión "molécula similar a un anticuerpo" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una molécula capaz de unirse específicamente a otra molécula o diana con alta afinidad / una $K_D \leq 10E^{-7}$ mol/l, en particular una $K_D \leq 10E^{-8}$ mol/l. Una molécula similar a un anticuerpo se une a su diana de manera similar a la unión específica de un anticuerpo. La expresión molécula similar a un anticuerpo, incluye una proteína repetida, tal como una proteína repetida de anquirina diseñada (Molecular Partners, Zúrich), un polipéptido obtenido a partir de proteínas repetidas de

armadillo, un polipéptido obtenido a partir de proteínas repetidas ricas en leucina, un afímero, una molécula obtenida a partir de un anticuerpo, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) y un polipéptido obtenido a partir de proteínas repetidas tetratricopeptídicas.

5 La expresión molécula similar a un anticuerpo incluye además un polipéptido obtenido a partir de dominios de la proteína A, un polipéptido obtenido a partir de un dominio de la fibronectina FN3, un polipéptido obtenido a partir de dominios de la fibronectina de consenso, un polipéptido obtenido a partir de lipocalinas, un polipéptido obtenido a partir de dedos de zinc, un polipéptido obtenido a partir de un dominio de homología 2 (SH2) de Src, un polipéptido obtenido a partir de un dominio de homología 3 (SH3) de Src, un polipéptido obtenido a partir de dominios PDZ, un polipéptido obtenido a partir de gamma-cristalina, un polipéptido obtenido a partir de ubicuitina, un polipéptido obtenido a partir de un polipéptido de nudo (knot) de cisteína y un polipéptido obtenido a partir de knottina.

10 Idealmente, la primera y la segunda isoformas de la proteína de superficie se pueden distinguir mediante dos ligandos, en donde un ligando es capaz de reconocer específicamente la primera isoforma y el otro ligando es capaz de reconocer específicamente la segunda isoforma. En otras palabras, cada ligando es capaz de unirse específicamente a una isoforma, pero no a la otra isoforma. En otras palabras, los ligandos son capaces de discriminar entre las dos isoformas uniéndose específicamente solo a una isoforma, pero no a la otra.

15 La expresión "funcionalmente indistinguible" se refiere a una primera y una segunda isoforma que son igualmente capaces de realizar la misma función dentro de una célula sin un deterioro significativo. En otras palabras, la primera y la segunda isoformas son en gran medida funcionalmente indistinguibles. En determinadas realizaciones, puede ser aceptable un ligero deterioro funcional.

20 En el contexto de la presente memoria descriptiva, las expresiones "primera y/o segunda isoformas de la proteína de la superficie celular" se refieren a un primer y a un segundo alelo de la proteína de la superficie celular.

En determinadas realizaciones, la célula de mamífero es una célula humana.

25 En determinadas realizaciones, la segunda isoforma de la proteína de superficie se refiere a la forma de tipo silvestre de la proteína (en otras palabras: la forma que normalmente se presenta en la naturaleza) y la primera isoforma se refiere a una isoforma obtenida mediante la introducción de una mutación en la secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda isoforma.

En determinadas realizaciones, la segunda isoforma de la proteína de superficie es la isoforma natural y la primera isoforma es una isoforma modificada genéticamente obtenida a partir de la isoforma natural.

30 En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "proteína natural" se refiere a una proteína que está codificada por una secuencia de ácido nucleico dentro del genoma de la célula, en donde esa secuencia de ácido nucleico no se ha insertado ni mutado mediante manipulación genética. En otras palabras, una proteína natural es una proteína que no es una proteína transgénica ni una proteína modificada genéticamente.

35 En determinadas realizaciones, la proteína de superficie comprende una secuencia polipeptídica extracelular y dicha primera isoforma comprende una inserción, delección y/o sustitución de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en comparación con dicha segunda isoforma.

En determinadas realizaciones, la proteína de superficie comprende una secuencia polipeptídica extracelular y dicha primera isoforma comprende una inserción, delección y/o sustitución de 1 a 5 aminoácidos, en comparación con dicha segunda isoforma.

40 En determinadas realizaciones, la proteína de superficie comprende una secuencia polipeptídica extracelular y dicha primera isoforma comprende una inserción, delección y/o sustitución de 1 aminoácido en comparación con dicha segunda isoforma.

En determinadas realizaciones, la inserción, delección y/o sustitución se sitúa en un sitio que no está conservado entre diferentes especies de mamíferos.

45 En determinadas realizaciones, la inserción, delección y/o sustitución no da como resultado un cambio de la estructura secundaria en la proteína de superficie.

En determinadas realizaciones, la inserción, delección y/o sustitución se localiza en un sitio que es accesible para la unión del ligando, según un análisis de la estructura cristalina o una predicción de la estructura asistida por ordenador.

50 En determinadas realizaciones, la inserción, delección y/o sustitución se localiza en un sitio que tiene una topología única en comparación con otras proteínas de mamífero, según un análisis de la estructura cristalina o una predicción de la estructura asistida por ordenador.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "topología única" se refiere a una topología que solo está presente en la proteína de superficie que se va a modificar mediante una inserción, delección y/o sustitución de 1-20 aminoácidos y no en otras proteínas de mamífero, en particular no en otras proteínas de la superficie humanas. La

presencia de una topología igual o muy similar en otras proteínas dificultaría la generación de un anticuerpo específico que reconozca un epítipo situado en dicho sitio.

En determinadas realizaciones, la inserción, delección y/o sustitución no se localiza en un sitio implicado en una interacción proteína-proteína de la proteína de superficie prevista, establecida experimentalmente o confirmada.

5 En determinadas realizaciones, la inserción, delección y/o sustitución no da como resultado la delección o introducción de una interacción intermolecular o intramolecular de un enlace disulfuro, o un apilamiento hidrófobo. En los casos en los que la inserción, delección y/o sustitución da como resultado la delección de una interacción intermolecular o intramolecular de un puente salino, se debe confirmar que esa delección de una interacción de un puente salino se compensa con nuevas interacciones dentro de la proteína. De lo contrario, se debe evitar la delección de una interacción de puente salino.

10 En determinadas realizaciones, la inserción, delección y/o sustitución no da como resultado la delección o introducción de un sitio de modificación postraduccional de la proteína, particularmente un sitio de glicosilación, que es importante para el plegamiento de proteínas.

15 En determinadas realizaciones, la inserción, delección y/o sustitución da como resultado la delección o introducción de un sitio de modificación postraduccional de la proteína, particularmente un sitio de glicosilación, que no es relevante para el plegamiento de proteínas, creando así un nuevo epítipo.

En determinadas realizaciones, la primera isoforma se puede distinguir de la segunda isoforma mediante la unión del anticuerpo.

20 En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la primera isoforma se puede distinguir de la segunda isoforma mediante la reacción de una célula efectora inmune que es portadora de un anticuerpo. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la primera isoforma se puede distinguir de la segunda isoforma mediante la reacción de una célula efectora inmune que es portadora de una molécula similar a un anticuerpo. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la primera isoforma se puede distinguir de la segunda isoforma mediante la reacción de una célula efectora inmune que es portadora un anticuerpo. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la primera isoforma se puede distinguir de la segunda isoforma mediante la reacción de una célula efectora inmune que es portadora de una molécula similar a un anticuerpo. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la primera isoforma se puede distinguir de la segunda isoforma mediante la reacción de un linfocito T, en particular un linfocito T activado, que es portador de un receptor de antígeno quimérico (CAR). En el contexto de la presente memoria descriptiva, un receptor de antígeno quimérico (CAR) se refiere a un receptor modificado genéticamente en el que se injerta una especificidad de unión, en particular la especificidad de un anticuerpo monoclonal, sobre un linfocito T. Una forma común de un CAR comprende un dominio extracelular obtenido a partir de un anticuerpo monoclonal que tiene la especificidad de unión deseada, un dominio transmembranal y un dominio intracelular (Gill y June, *Im Rev*, 2014). El dominio extracelular comprende un fragmento variable de cadena única que comprende las regiones variables de una cadena pesada y una cadena ligera de inmunoglobulina. La secuencia de nucleótidos que codifica el dominio extracelular de un CAR de ese tipo se puede obtener a partir de células de hibridoma que producen el anticuerpo con la especificidad de unión deseada (Gill y June, *Im Rev*, 2014; Fields, *Nat Prot*, 2013).

En determinadas realizaciones, la proteína de superficie se selecciona a partir de

40 CD1a, CD1b, CD1c, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15u, CD15s, CD15su, CD16, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85a, CD85d, CD85j, CD85k, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD99R, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158e, CD158i, CD158k, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD167b, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CD199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210b, CD212, CD213a1, CD213a2, CD215, CD217a, CD218a, CD218b, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240CE, CD240DCE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD252, CD253, CD254, CD256, CD266, CD267, CD268, CD269 (BCMA), CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278,

- 5 CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD286, CD289, CD290, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300a, CD300c, CD300e, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD308, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD350, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370, CD371, una cadena ligera de inmunoglobulina (λ o κ), una proteína de HLA y β 2-microglobulina.
- En el contexto de la presente memoria descriptiva, HLA se refiere a "antígeno leucocitario humano" e incluye HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR.
- 10 En determinadas realizaciones, la proteína de superficie se selecciona a partir de CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD20, CD22, CD23, CD33, CD34, CD90, CD45, CD123, CD269 (BCMA), una cadena ligera de inmunoglobulina (λ o κ), una proteína de HLA y β 2-microglobulina.
- En determinadas realizaciones, la proteína de superficie se selecciona a partir de CD45, CD3, CD4, CD8a, CD8b y CD279.
- 15 En determinadas realizaciones, la proteína de superficie se selecciona a partir de CD45, CD45RA y CD45RO.
- En determinadas realizaciones, la proteína de superficie se selecciona a partir de CD45, CD34, CD38, CD59, CD90 y CD117.
- En determinadas realizaciones, la proteína de superficie se selecciona a partir de CD45, CD19, CD20, CD22, CD23, CD38, CD138, CD268, CD269 (BCMA) y CD319.
- 20 En determinadas realizaciones, la proteína de superficie se selecciona a partir de CD5, CD19, CD20, CD33, CD123, CD38 y CD269.
- En determinadas realizaciones, la proteína de superficie se selecciona a partir de CD45, CD19, CD4 y CD8.
- En determinadas realizaciones, la proteína de superficie es CD45.
- En determinadas realizaciones, la proteína de superficie es Thy1 (CD90).
- 25 En determinadas realizaciones, la proteína de superficie es CD19.
- En el contexto de la presente memoria descriptiva, "Thy1" se refiere a "antígeno 1 de células del timo", theta; nombre alternativo: CD90; UniProt ID P04216 (humano).
- En el contexto de la presente memoria descriptiva, "CD45" se refiere a "proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, C (Ptpcr)"; UniProt ID P08575 (humana).
- 30 En los experimentos con animales de la sección de ejemplos, CD45 y CD90 se refieren a los homólogos murinos de los genes y proteínas humanos, respectivamente.
- En determinadas realizaciones, la proteína de superficie es CD4. En determinadas realizaciones, la proteína de superficie es CD2. En determinadas realizaciones, la proteína de superficie es CD8. En determinadas realizaciones, la proteína de superficie es una proteína de HLA.
- 35 En determinadas realizaciones, la primera isoforma de la proteína de superficie no se codifica en el ADN genómico natural del paciente.
- En determinadas realizaciones, la célula es una célula alogénica. Una célula alogénica se refiere a una célula obtenida a partir de un donante que es genéticamente similar a la persona que recibe la célula. El donante puede ser una persona relacionada o no.
- 40 En determinadas realizaciones, la célula es una célula autóloga. Una célula autóloga se refiere a una célula obtenida a partir de la misma persona que la recibe.
- En determinadas realizaciones, la primera isoforma se obtuvo cambiando una secuencia que codificaba dicha proteína de superficie en el ADN genómico natural del paciente, lo que daba como resultado la inducción de dicha inserción, delección y/o sustitución de aminoácidos.
- 45 En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la primera isoforma se obtuvo cambiando el ARNm que codificaba dicha proteína de superficie mediante técnicas de edición de ARN (Zhang, 2017). Ese método deja el ADN genómico sin cambios, pero da como resultado una inserción, delección y/o sustitución de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína de superficie.
- En determinadas realizaciones, la primera isoforma se obtuvo induciendo una inserción, delección y/o sustitución de 1,

2, 3, 4 o 5 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha segunda isoforma de dicha proteína de superficie.

En determinadas realizaciones, la primera isoforma se obtuvo induciendo una inserción, deleción y/o sustitución de 1 a 5 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha segunda isoforma de dicha proteína de superficie.

5 En determinadas realizaciones, la primera isoforma se obtuvo induciendo una inserción, deleción y/o sustitución de 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos de dicha segunda isoforma de dicha proteína de superficie.

La inserción, deleción y/o sustitución de aminoácidos se puede efectuar cambiando la secuencia que codifica dicha proteína de superficie en el ADN genómico natural del paciente (edición genética). Ambas formas de edición dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

En determinadas realizaciones, la inserción, deleción y/o sustitución se efectúa

10 a. comparando (alineando) una o varias secuencias homólogas de diferentes especies de mamíferos, particularmente homólogos de ratón, rata, primate y ser humano, y situando la inserción, deleción y/o sustitución en un sitio no conservado;

15 b. seleccionando la inserción, deleción y/o sustitución de manera que el análisis de la estructura cristalina o la predicción de la estructura asistida por ordenador no prevea un cambio de la estructura secundaria del tramo sometido a la inserción, deleción y/o sustitución;

c. seleccionando la inserción, deleción y/o sustitución de modo que esté localizada en un sitio que sea accesible para la unión del ligando según el análisis de la estructura cristalina o la predicción de la estructura asistida por ordenador;

20 d. seleccionando la inserción, deleción y/o sustitución en una secuencia no implicada en una interacción proteína-proteína prevista o establecida experimentalmente de la proteína de superficie;

e. seleccionando la inserción, deleción y/o sustitución sin deleccionar o introducir interacciones intermoleculares o intramoleculares de enlaces disulfuro, o apilamiento hidrofóbico; o

f. seleccionando la inserción, deleción y/o sustitución sin deleccionar o introducir un sitio de modificación postraduccional de proteínas, particularmente un sitio de glicosilación, importante para el plegamiento de proteínas.

25 En determinadas realizaciones, la inserción, deleción y/o sustitución se efectúa

a. comparando (alineando) una o varias secuencias homólogas de diferentes especies de mamíferos, particularmente homólogos de ratón, rata, primate y ser humano, y situando la inserción, deleción y/o sustitución en un sitio no conservado;

30 b. seleccionando la inserción, deleción y/o sustitución de manera que el análisis de la estructura cristalina o la predicción de la estructura asistida por ordenador no prevea un cambio de la estructura secundaria del tramo sometido a la inserción, deleción y/o sustitución;

c. seleccionando la inserción, deleción y/o sustitución de modo que esté localizada en un sitio que sea accesible para la unión del ligando según el análisis de la estructura cristalina o la predicción de la estructura asistida por ordenador;

35 d. seleccionando la inserción, deleción y/o sustitución en una secuencia no implicada en una interacción proteína-proteína prevista o establecida experimentalmente de la proteína de superficie;

e. seleccionando la inserción, deleción y/o sustitución sin deleccionar o introducir interacciones intermoleculares o intramoleculares de enlaces disulfuro, o apilamiento hidrofóbico; y

40 f. seleccionando la inserción, deleción y/o sustitución sin deleccionar o introducir un sitio de modificación de proteínas postraduccional, particularmente un sitio de glicosilación, importante para el plegamiento de proteínas.

En determinadas realizaciones, la inserción, deleción y/o sustitución se selecciona de modo que esté ubicada en un sitio que tenga una topología única en comparación con otras proteínas de mamífero, según un análisis de la estructura cristalina o la predicción de la estructura asistida por ordenador.

45 Un sitio no conservado en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un sitio que frecuentemente está sujeto a mutaciones a lo largo del tiempo evolutivo, según se estima a partir de alineamientos de secuencias múltiples (MSA, por sus siglas en inglés) de un gran número de secuencias homólogas. La conservación de un sitio específico es indicativa de la presencia de limitaciones funcionales o estructurales que actúan en sitios específicos, lo que permite evaluar su importancia en la preservación de la estructura o la función de una proteína. El estado de accesibilidad del disolvente en cada sitio, previsto u observado a partir de estructuras disponibles determinadas experimentalmente, se puede utilizar para distinguir entre sitios estructuralmente importantes, que a menudo están altamente conservados y

escondidos, de sitios funcionalmente importantes, involucrados en la unión de ligandos, unión de sustratos o interacciones de proteína-proteína, que están altamente conservados y expuestos. Por lo tanto, un sitio no conservado en el contexto de la presente memoria descriptiva se relaciona con un sitio que muestra una baja conservación evolutiva y una accesibilidad elevada para los disolventes.

5 Los métodos para buscar secuencias similares están bien establecidos y se utilizan de forma rutinaria para deducir una homología, y estos incluyen la herramienta BLAST ampliamente utilizada, así como métodos más sensibles basados en perfiles o modelos ocultos de Markov, como PSI-BLAST, HMMER, HHblits. Se pueden obtener múltiples alineamientos de secuencias homólogas mediante una combinación eficiente de una información de la alineación local y global, tal y como se implementa en T-COFFEE o, cuando es posible, incorporando una información estructural para guiar la construcción del MSA (MAFFT, PROMALS3D, 3D Coffee).

Los métodos para una estimación eficiente de la conservación específica de un sitio a partir de un MSA se basan en mediciones de la entropía de Shannon, matrices basadas en la similitud (es decir, BLOSUM) o modelos evolutivos probabilísticos como los paradigmas de máxima probabilidad y empíricos de Bayes (Rate4Site).

15 Los métodos eficientes para la predicción de la estructura de proteínas tridimensionales incluyen, pero no se limitan a, métodos comparativos, como SWISS-MODEL, MODELLER, RaptorX e IntFOLD.

Los métodos para predecir los epítomos de linfocitos B utilizan propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, es decir, hidrofobicidad, flexibilidad, polaridad y superficie expuesta para proporcionar una probabilidad basada en los residuos de que formen parte de un epítipo lineal o discontinuo. Esas herramientas incluyen, pero no se limitan a: Ellipro, SEPPA, BepiPred, ABCpred, DiscoTope, EpiSearch.

20 En determinadas realizaciones, la inserción, delección y/o sustitución se localiza en la porción extracelular de dicha primera proteína de superficie, particularmente en un bucle extracelular. Es menos probable que las mutaciones en los bucles extracelulares afecten a la función de las proteínas.

25 En los casos en los que ya existe un anticuerpo o una molécula similar a un anticuerpo que reacciona contra una proteína de superficie de interés, la información de qué epítipo de la proteína de superficie de interés es reconocido por ese anticuerpo, se puede utilizar para seleccionar el sitio de la inserción, delección y/o sustitución. La isoforma de la proteína de interés que comprende el epítipo al que se une el anticuerpo existente, correspondería entonces a la segunda isoforma, y la isoforma recientemente modificada genéticamente de la proteína de interés que comprende el epítipo modificado genéticamente correspondería entonces a la segunda isoforma.

El modelado de CDR se describe en Messih, Bioinformatics, 2014.

30 En determinadas realizaciones, la célula se administra antes, junto con o después de la eliminación específica de células que expresan dicha segunda isoforma de dicha proteína de superficie. En determinadas realizaciones, la eliminación de células que expresan dicha segunda isoforma de dicha proteína de superficie se realiza mediante la administración de un anticuerpo a dicho paciente.

35 En determinadas realizaciones, la célula expresa un anticuerpo o una molécula similar a un anticuerpo que reacciona contra la segunda isoforma de dicha proteína de superficie.

En determinadas realizaciones, la célula expresa un receptor de antígeno quimérico que reacciona contra la segunda isoforma de dicha proteína de superficie.

40 En determinadas realizaciones, la célula expresa un anticuerpo o una molécula similar a un anticuerpo, en particular un receptor de antígeno quimérico, que reacciona contra la segunda isoforma de la proteína de superficie, y la proteína de superficie se selecciona a partir de CD45, CD19, CD8 y CD4, en particular la proteína de superficie es CD45.

En determinadas realizaciones, la célula expresa

a. una primera isoforma de una primera proteína de superficie, en donde dicha primera isoforma de dicha primera proteína de superficie es funcionalmente indistinguible, pero inmunológicamente distinguible de una segunda isoforma de dicha primera proteína de superficie, y

45 b. una primera isoforma de una segunda proteína de superficie, en donde dicha primera isoforma de dicha segunda proteína de superficie es funcionalmente indistinguible, pero inmunológicamente distinguible de una segunda isoforma de dicha segunda proteína de superficie.

En determinadas realizaciones, la primera proteína de superficie es CD19 y la segunda proteína de superficie es CD45.

50 En determinadas realizaciones, la célula de mamífero se selecciona a partir del grupo que comprende una célula madre hematopoyética (hemocitoblasto), un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+, un linfocito T de memoria, un linfocito T regulador (T reg), un linfocito citolítico natural (NK), una célula linfoide innata (ILC), una célula dendrítica (DC), un linfocito B, un linfocito T invariante asociado a las mucosas (MAIT) y un linfocito T gamma delta ($\gamma\delta$ T).

En determinadas realizaciones, la célula de mamífero es una célula hematopoyética. En determinadas realizaciones, la célula de mamífero es una célula madre hematopoyética. En determinadas realizaciones, la célula de mamífero es una célula inmunitaria. En determinadas realizaciones, la célula de mamífero es un linfocito T. En determinadas realizaciones, la célula de mamífero es un linfocito B.

5 En determinadas realizaciones, la célula comprende una alteración genética que corrige o contrarresta un defecto génico relacionado con una enfermedad presente en dicho paciente. La expresión "alteración genética que corrige un defecto génico relacionado con una enfermedad" se entiende que incluye la inserción de un transgén, una corrección genética de una mutación relacionada con una enfermedad, la delección de un gen, en particular de un gen que es portador de una mutación relacionada con una enfermedad, un cambio en una modificación epigenética importante para la expresión de un gen, o una combinación de los mismos. La expresión "delección de un gen" se entiende que incluye una delección funcional de un gen, en otras palabras, que impide la expresión de un gen, p. ej., insertando un codón de parada prematuro o insertando una secuencia represora reguladora.

10 En determinadas realizaciones, la célula comprende un transgén. En determinadas realizaciones, el transgén es una secuencia de ácido nucleico que codifica una isoforma funcional de la proteína afectada por el defecto génico relacionado con la enfermedad. El transgén no es portador del defecto génico relacionado con la enfermedad.

15 En determinadas realizaciones, la célula comprende una corrección genética de una mutación relacionada con una enfermedad. En los casos en que la célula comprende una corrección genética de un defecto génico relacionado con una enfermedad, se corrige una mutación causante de la enfermedad en un gen natural mediante técnicas de edición de genes.

20 En el contexto de la presente memoria descriptiva, la edición de genes o la modificación genética se refieren a técnicas que efectúan la inserción, delección o sustitución de una secuencia de ácido nucleico en el genoma de un organismo vivo. La edición de genes implica roturas de la cadena doble específicas de un sitio o roturas de una sola cadena (muecas) específicas de un sitio en el ADN genómico. A modo de ejemplo no limitante, la edición de genes puede realizarse mediante HDR (reparación dirigida por homología, por sus siglas en inglés, de ADNbc después de roturas de la cadena doble específicas de un sitio mediadas por CRISPR/Cas o mediante el uso de editores de bases específicos de un sitio.

25 En determinadas realizaciones, el defecto génico relacionado con la enfermedad es una mutación en un gen seleccionado a partir del gen *Foxp3*, el gen *CD25*, el gen *Stat5b*, el gen *Stat1* y el gen *Itch*.

En determinadas realizaciones, el defecto génico relacionado con la enfermedad es una mutación en el gen *Foxp3*.

30 Ciertas realizaciones se refieren a casos en los que se desarrolla una enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) después de la administración de la célula de mamífero al paciente. En esos casos, la célula se elimina específicamente mediante la administración al paciente de un anticuerpo que se une específicamente a dicha primera isoforma (pero no a dicha segunda isoforma) de dicha proteína de la superficie celular.

En determinadas realizaciones, el tratamiento comprende el trasplante de células madre hematopoyéticas.

35 En determinadas realizaciones, el tratamiento comprende el trasplante de linfocitos T (en otras palabras: terapia con linfocitos T).

En determinadas realizaciones, el tratamiento comprende el trasplante de órganos.

En determinadas realizaciones, el tratamiento se refiere al tratamiento de una enfermedad hematopoyética genética. Un ejemplo no limitante de enfermedades hematopoyéticas genéticas son las talasemias.

40 En determinadas realizaciones, el tratamiento se refiere al tratamiento de una enfermedad mediada por linfocitos T, en particular una enfermedad genética mediada por linfocitos T, más particularmente un síndrome similar a IPEX, una desregulación inmune asociada a CTLA-4, un síndrome hemafagocítico, síndrome ALPS o un síndrome causado por mutaciones de la línea germinal de PTEN heterocigoto.

45 En determinadas realizaciones, la enfermedad mediada por linfocitos T es el síndrome ligado al cromosoma X de inmunodesregulación, poliendocrinopatía, enteropatía (IPEX; OMIM <http://www.omim.org/entry/304790>) o un síndrome similar a IPEX y dicha ubicación genómica es una mutación comprendida en un gen seleccionado a partir del gen *Foxp3*, el gen *CD25*, el gen *Stat5b*, el gen *Stat1* y el gen *Itch* (Verbsky y Chatila, Curr Opin Pediatr. 2013 diciembre; 25(6):708-14). Las mutaciones en dichos genes impiden la expresión o el funcionamiento normal del producto génico. La edición de esas ubicaciones genómicas para eliminar la mutación restaura la expresión génica y proteica. En determinadas realizaciones, el tratamiento se refiere al tratamiento de una inmunodeficiencia, en particular (síndrome de inmunodeficiencia combinada grave (SCID).

50 En determinadas realizaciones, el defecto génico relacionado con la enfermedad es una mutación en el gen *Foxp3* y dicha enfermedad es un síndrome ligado al cromosoma X de inmunodesregulación, poliendocrinopatía, enteropatía (IPEX). En determinadas realizaciones, el defecto génico relacionado con la enfermedad es una mutación en *Foxp3*,

particularmente la mutación *Foxp3*^{K276X}. Esa mutación impide el funcionamiento normal del producto génico. La edición de esa ubicación genómica revierte la mutación a la secuencia de ADN de tipo silvestre y, por lo tanto, restaura la expresión del gen *Foxp3* y de la proteína *Foxp3* (Fig. 20).

5 IPEX puede considerarse una enfermedad maligna comparable a un tumor/cáncer, ya que es muy agresiva aunque tiene un mecanismo diferente. La eliminación de las células hematopoyéticas/inmunitarias patógenas que son portadoras del defecto génico relacionado con la enfermedad está justificada, al menos de forma transitoria.

Dentro del contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "gen *Foxp3*" se refiere a la proteína FOX (forkhead box) P3 humana, NCBI GENE ID: 50943. En los experimentos con animales descritos en la sección de ejemplos, la mutación *Foxp3*^{K276X} murina se reparaba mediante edición de genes. Esa mutación recapitula una mutación de *Foxp3* humana clínicamente relevante (Ramsdell et al., Nature reviews. Immunology 14, 343-349 (2014); Lin et al., The Journal of Allergy and Clinical Immunology 116, 1106-1115 (2005)). Los inventores han mostrado que es posible corregir la mutación *Foxp3*^{K276X} en linfocitos T murinos usando la edición de genes (Fig. 20, 21, 22, 26). Los inventores han mostrado además que los linfocitos T reparados son funcionales y pueden suprimir otras células inmunitarias (Fig. 24, 25). Esos linfocitos T pueden repararse directamente o se pueden obtener a partir de HSCs reparadas o linfocitos T obtenidos a partir de iPS. Los inventores demostraron además que los linfocitos T transferidos de forma adoptiva se expanden en hospedadores carentes de *Foxp3*. Hasta la mitad de los linfocitos T se convierten en Treg y suprimen las enfermedades (Fig. 29). Esto demuestra la viabilidad de la terapia con linfocitos T para el síndrome de escurfi/IPEX. Los inventores han mostrado que el agotamiento de CD4 puede prevenir enfermedades (Fig. 30-32). Por tanto, las células CD4+ son las células patógenas. Por lo tanto, en principio, un enfoque terapéutico podría ser agotar los linfocitos T CD4+ y luego transferir linfocitos T CD4+ reparados por *Foxp3* para restablecer el equilibrio inmunológico. Sin embargo, dado que los linfocitos T reparados genéticamente y los linfocitos T patógenos carentes de *Foxp3* expresan CD4, un agotamiento continuo de los linfocitos T CD4+ no solo matará las células patógenas sino también las células reparadas genéticamente transferidas de forma adoptiva. Una solución sería corregir simultáneamente el gen *Foxp3* y, en paralelo, realizar una modificación genética del alelo. Los inventores demuestran la viabilidad de corregir el gen *Foxp3* y convertir CD45.2 en CD45.1 (Fig. 20). Por lo tanto, las células patógenas carentes de *Foxp3* podrían agotarse utilizando un anticuerpo dirigido contra el epítipo natural de CD45 (por ejemplo, CD45.2). Si las células reparadas con *Foxp3* se convierten en un alelo CD45 modificado genéticamente (por ejemplo, CD45.1), las células transferidas y reparadas con genes ya no se agotarán. Esto permite un agotamiento simultáneo de las células patógenas y la reposición de las células reparadas funcionales hasta que se restablece el equilibrio inmunológico. En ese punto se puede detener la eliminación selectiva de las células hospedadoras patógenas. Los inventores han mostrado que el agotamiento de CD45 amplía sustancialmente de forma eficaz la supervivencia de ratones carentes de *Foxp3*.

Además, las células con corrección del gen *Foxp3* no solo reexpresan la proteína *Foxp3* sino que también regulan positivamente CD25, el receptor de interleucina-2 (IL-2) de alta afinidad *in vitro* e *in vivo* (Fig. 20, 21, 22, 26). Fisiológicamente, *Foxp3* regula positivamente la expresión de CD25 en linfocitos T de tipo silvestre y el eje IL-2/CD25/Stat5 es necesario para la supervivencia de los linfocitos T reguladores. Por lo tanto, los inventores postularon que los linfocitos T que reexpresan *Foxp3* con el gen corregido podrían expandirse *in vivo* mediante la administración terapéutica de IL-2 (Fig. 23). Está bien establecido que los linfocitos T se pueden expandir *in vivo* utilizando los complejos IL-2/AcMo anti-IL-2, terapia con dosis bajas de IL-2, variantes de IL-2 (modificadas genéticamente) y otros protocolos de expansión de Treg. La Fig. 27 muestra que los linfocitos T reparados se pueden expandir *in vivo* usando los complejos IL-2/AcMo anti-IL-2.

En determinadas realizaciones, el defecto génico relacionado con la enfermedad es una mutación comprendida en el gen CTLA-4 y la enfermedad es el síndrome de desregulación inmunitaria humana asociado con mutaciones de CTLA-4 (Schubert et al., Science Translational Medicine 5, 215ra174-215ra174 (2013); Kuehn et al., Science (Nueva York, N.Y.) 345, 1623-1627 (2014)).

Un segundo aspecto de la divulgación proporciona, pero no como parte de la invención reivindicada, un agente seleccionado a partir de

- a. un compuesto que comprende, o consiste en, un anticuerpo o una molécula similar a un anticuerpo y
- b. una célula efectora inmune que es portadora de una molécula similar a un anticuerpo o una célula efectora inmune que es portadora de un receptor de antígeno quimérico,

para uso en el tratamiento de una afección médica. El agente es específicamente reactivo con una primera o una segunda isoforma de una proteína de superficie, en donde la primera isoforma de la proteína de superficie es funcionalmente indistinguible, pero inmunológicamente distinguible de la segunda isoforma de la proteína de superficie. El agente se administra para eliminar una célula que es portadora de la isoforma con la que reacciona el agente.

55 En determinadas realizaciones, la afección médica es un trastorno hematopoyético.

En determinadas realizaciones, la afección médica es una enfermedad hematopoyética maligna.

En determinadas realizaciones, la afección médica es una enfermedad hematopoyética maligna refractaria al

tratamiento con linfocitos T CAR anti-CD19 (= células CAR19).

En determinadas realizaciones, la afección médica es una enfermedad hematopoyética no maligna.

En determinadas realizaciones, la afección médica es una enfermedad autoinmune.

En determinadas realizaciones, la afección médica es la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH).

- 5 En el contexto de la presente memoria descriptiva, la enfermedad de injerto contra hospedador se refiere a una complicación médica que sigue a la recepción de tejido trasplantado desde una persona genéticamente diferente. Las células inmunes del tejido donado (el injerto) reconocen al receptor (el hospedador) como extraño.

En determinadas realizaciones, la afección médica es la enfermedad de injerto contra hospedador causada por un trasplante de células madre hematopoyéticas.

- 10 En determinadas realizaciones, la afección médica es la enfermedad de injerto contra hospedador causada por una transferencia adoptiva. En el contexto de la presente memoria descriptiva, una transferencia adoptiva o una terapia celular adoptiva se refiere a la transferencia de células humanas, normalmente células inmunitarias, a un paciente. Las células pueden ser autólogas o alogénicas. Las modificaciones específicas realizadas mediante técnicas de edición de genes permiten personalizar el producto celular transferido para reparar defectos genéticos, aumentar la eficiencia de las células transferidas o equipar las células con características adicionales deseadas, como moléculas guía o conmutadores de seguridad.

15 En determinadas realizaciones, la afección médica es la enfermedad de injerto contra hospedador causada por un trasplante de órgano.

- 20 En determinadas realizaciones, el anticuerpo o la molécula similar a un anticuerpo se acopla con una toxina, formando así una inmunotoxina. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o la molécula similar a un anticuerpo está acoplado con saporina.

En determinadas realizaciones, el agente es un anticuerpo biespecífico o una molécula similar a un anticuerpo biespecífico. En otras palabras, el agente es un anticuerpo o una molécula similar a un anticuerpo que puede unirse simultáneamente a dos tipos diferentes de antígeno.

- 25 En determinadas realizaciones de la presente divulgación, el agente es una célula efectora inmune que es portadora de un anticuerpo biespecífico o una molécula similar a un anticuerpo biespecífico.

En determinadas realizaciones, el agente es una célula efectora inmunitaria que es portadora de

- 30 a. un primer anticuerpo o molécula similar a un anticuerpo específicamente reactivo con una primera o una segunda isoforma de una primera proteína de superficie, en donde dicha primera y dicha segunda isoforma de dicha primera proteína de superficie son funcionalmente indistinguibles, pero inmunológicamente distinguibles, y

b. un segundo anticuerpo o molécula similar a un anticuerpo específicamente reactivo con una primera o una segunda isoforma de una segunda proteína de superficie, en donde dicha primera y dicha segunda isoforma de dicha segunda proteína de superficie son funcionalmente indistinguibles, pero inmunológicamente distinguibles.

En determinadas realizaciones, la primera proteína de superficie es CD19.

- 35 En determinadas realizaciones, la segunda proteína de superficie es CD45 o CD34.

En determinadas realizaciones, la primera proteína de superficie es CD19 y la segunda proteína de superficie es CD45.

- 40 En determinadas realizaciones de la presente divulgación, el agente es una célula efectora inmune que es portadora de un anticuerpo o una molécula similar a anticuerpo, o una célula efectora inmune, en particular un linfocito T, que es portador de un receptor de antígeno quimérico, para uso en un método de tratamiento de una enfermedad hematopoyética maligna.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, el agente es un linfocito T que es portador de un receptor de antígeno quimérico dirigido contra CD45 para uso en un método de tratamiento de una enfermedad hematopoyética, en particular una enfermedad hematopoyética maligna.

- 45 CD45 es una diana particularmente buena para el tratamiento de enfermedades hematopoyéticas, ya que se expresa sobre todas las células hematopoyéticas, incluidas las células malignas. CD45 es fundamental para la supervivencia celular, por lo que las células tendrán más dificultades para desarrollar resistencia.

Otro aspecto de la divulgación proporciona, pero no como parte de la invención reivindicada, un medicamento combinado que comprende

a. un primer agente según el segundo aspecto de la divulgación, en donde el agente reacciona con una primera

proteína de superficie, y

b. un segundo agente según el segundo aspecto de la divulgación, en donde el agente reacciona con una segunda proteína de superficie.

5 En determinadas realizaciones, el medicamento combinado se proporciona para el tratamiento de una enfermedad hematopoyética.

En determinadas realizaciones, el medicamento combinado se proporciona para el tratamiento de una enfermedad hematopoyética maligna.

En determinadas realizaciones, el medicamento combinado se proporciona para el tratamiento de una enfermedad hematopoyética no maligna.

10 En determinadas realizaciones de la presente divulgación, el primer y el segundo agente son linfocitos T que son portadores de un receptor de antígeno quimérico.

En determinadas realizaciones, la primera proteína de superficie es CD19 y la segunda proteína de superficie es CD45.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, el primer agente es un linfocito T CAR anti-CD19 y el segundo agente es un linfocito T CAR anti-CD45.

15 En determinadas realizaciones, la enfermedad hematopoyética maligna es refractaria al tratamiento con linfocitos T CAR anti-CD19 (= células CAR19) solos.

20 Otro aspecto de la divulgación proporciona, pero no como parte de la invención reivindicada, un método para el seguimiento *in vivo* de una célula que expresa una primera isoforma de una proteína de superficie, en donde dicha primera isoforma de dicha proteína de superficie es funcionalmente indistinguible, pero inmunológicamente distinguible de una segunda isoforma de dicha proteína de superficie, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente un ligando específicamente reactivo con dicha primera isoforma.

25 Una alternativa de este aspecto de la divulgación proporciona, pero no como parte de la invención reivindicada, un método para el seguimiento de una célula que expresa una primera isoforma de una proteína de superficie en un tejido obtenido a partir de un paciente, en donde dicha primera isoforma de dicha proteína de superficie es funcionalmente indistinguible, pero inmunológicamente distinguible de una segunda isoforma de dicha proteína de superficie, comprendiendo dicho método administrar a dicho tejido obtenido a partir de dicho paciente un ligando específicamente reactivo con dicha primera isoforma.

30 En determinadas realizaciones de este aspecto de la divulgación, el tejido obtenido a partir de un paciente se refiere a una muestra de sangre. Esa muestra de sangre se puede analizar utilizando FACS. En determinadas realizaciones de este aspecto de la divulgación, el tejido obtenido a partir de un paciente se refiere a una muestra de tejido de un órgano, p. ej., una biopsia, p. ej., una muestra de hígado. Una muestra de un tejido de ese tipo puede analizarse utilizando métodos histológicos.

Otro aspecto más de la divulgación proporciona, pero no como parte de la invención reivindicada, un método para agotar o enriquecer selectivamente una célula *in vivo*, que comprende las etapas de

35 a. proporcionar una célula, en donde dicha célula expresa una primera isoforma de una proteína de superficie, que es diferente de una segunda isoforma de dicha proteína de superficie con respecto a un marcador de aminoácidos, en donde dicha primera isoforma comprende el marcador de aminoácidos A codificado por la secuencia de ácido nucleico A y dicha segunda isoforma comprende el marcador de aminoácidos B codificado por la secuencia de ácido nucleico B;

40 b. inducir una mutación desde dicha secuencia de ácido nucleico A a dicha secuencia de ácido nucleico B en el ADN genómico de dicha célula;

c. enriquecer/agotar selectivamente dicha célula basándose en la expresión de dicha primera o segunda isoforma de dicha proteína de superficie.

45 En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "agotamiento selectivo de células" se refiere a reducir selectivamente el número total o la concentración de células que expresan un determinado marcador/alelo/isoforma.

50 La persona experta es consciente de que en los casos en los que un volumen definido comprende células que expresan una primera isoforma y células que expresan una segunda isoforma, el agotamiento selectivo de las células que expresan la primera isoforma corresponde al enriquecimiento de las células que expresan la segunda isoforma. A modo de ejemplo no limitante, el agotamiento selectivo se puede lograr mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). El agotamiento selectivo también puede efectuarse mediante la administración de un anticuerpo o una molécula similar a un anticuerpo que no esté acoplada a un compuesto efector tal como un fármaco o una toxina.

Los inventores han demostrado que el agotamiento selectivo *in vivo* es posible usando anticuerpos contra CD45.2 o CD45.1, respectivamente (Fig. 12). El uso de un anticuerpo dirigido contra un epítipo compartido por dos poblaciones de células (por ejemplo, linfocitos T CD45.2+ y CD45.1+) da como resultado un agotamiento no selectivo de ambas poblaciones de células (por ejemplo, agotamiento de anti-CD4). Por el contrario, el agotamiento con un anticuerpo que se une selectivamente a un alelo (por ejemplo, CD45.2) pero no al otro (por ejemplo, CD45.1) de una proteína de superficie comúnmente expresada (por ejemplo, CD45), solo agota las células que expresan el alelo unido a través del AcMo específico. En el ejemplo mostrado, el agotamiento de las células CD45.2+ ahorra células CD45.1+ y, por lo tanto, da como resultado un enriquecimiento relativo de las células CD45.1+. El agotamiento puede ser más eficaz si se acopla una toxina al AcMo.

Una ventaja de usar un anticuerpo o una molécula similar a un anticuerpo que no está acoplada a una toxina puede ser que el tratamiento que emplea una inmunotoxina conduce al agotamiento de las HSCs, mientras que el tratamiento con un anticuerpo o una molécula similar a un anticuerpo no acoplada a una toxina ahorra las HSCs. Esto puede ser deseable porque el sistema hematopoyético se conserva parcialmente.

Los inventores han demostrado que se puede modificar genéticamente la diferencia de un solo aminoácido en una célula y se puede discriminar mediante dos ligandos diferentes que se unen específicamente a las dos isoformas/alelos (natural frente a modificado). Una mutación artificial modificada genéticamente de forma específica o una mutación rara pero que ocurre naturalmente, como un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), se modifica en un gen endógeno expresado en la superficie para cambiar su antigenicidad. El experto es consciente de que esa mutación puede introducirse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo HDR y editores de bases. Ese epítipo alterado se explota posteriormente para agotar selectivamente las células editadas con éxito con un ligando que reconoce específica y selectivamente ese epítipo artificial. Alternativamente, las células editadas se vuelven resistentes al agotamiento mediante un ligando que reconoce el epítipo natural (y por lo tanto puede agotar las células hospedadoras) pero no reconoce el epítipo alterado y, por lo tanto, preserva las células transferidas.

En los casos en donde las "células editadas/modificadas" (células en donde la primera isoforma de la proteína de la superficie celular se ha cambiado a la segunda isoforma) se usan posteriormente para la transferencia, en particular transferencia adoptiva, se pueden usar las dos isoformas diferentes para discriminar entre las células transferidas y las células hospedadoras. Esto permite realizar un seguimiento de las células transferidas ya que están marcadas permanentemente. El seguimiento se puede lograr con ligandos marcados *in vivo* o *ex vivo*, p. ej., mediante citometría de flujo o histoquímica en células o tejidos. La aplicación *in vivo* de ligandos específicos para las células transferidas o las células hospedadoras permite agotar selectivamente las células transferidas o las células hospedadoras usando el anticuerpo que solo se une a las células modificadas genéticamente transferidas o a las células hospedadoras, respectivamente. El agotamiento celular selectivo también se puede lograr mediante células que son portadoras de un receptor de antígeno (CAR) natural o quimérico que reconoce las células transferidas o las células hospedadoras.

El agotamiento selectivo de las células modificadas genéticamente constituye una característica de seguridad importante al proporcionar un "conmutador de seguridad o de apagado". El concepto básico de conmutadores de seguridad y genes suicidas se describe en Jones et al., *Front Pharmacol.*; 5:254. doi: 10.3389. El enfoque de los inventores es más sencillo, más seguro y versátil. En principio, cualquier célula que se transfiere de forma adoptiva se puede modificar genéticamente para ser portadora del alelo/epítipo alterado como un conmutador combinado de selección, seguimiento, seguridad y/o eliminación selectiva *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos no exclusivos incluyen células que solo son portadoras del alelo modificado genéticamente pero que por lo demás no están genéticamente modificadas o células que son portadoras de características modificadas genéticamente de forma adicional, como las células CAR. Por ejemplo, las células alogénicas transferidas que se utilizan por su efecto injerto contra leucemia pueden causar la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH). Si el alelo modificado genéticamente se incorpora antes de la transferencia, el alelo modificado genéticamente puede eliminarlas para reducir/tratar la EICH (Fig. 2). De manera similar, los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) autólogos transferidos o los linfocitos específicos de patógenos se pueden modificar genéticamente para transportar el alelo alterado y eliminarlo si se producen efectos secundarios no deseados debido a efectos fuera del lugar o efectos demasiado intensos en la diana (Fig. 2). Los CARs pueden obtenerse a partir de un AcMo para combinar la especificidad de un AcMo conocido con las características de una célula, p. ej., un linfocito T citolítico. El principio de redirigir la actividad citotóxica (o supresora) de una determinada célula (T) hacia un antígeno diana específico mediante la introducción de un CAR es, en principio, aplicable a una amplia gama de enfermedades, incluidas neoplasias malignas, pero también enfermedades autoinmunes, trasplantes u otras enfermedades hematopoyéticas. El éxito de los linfocitos T CAR19 demuestra el potencial de las células CAR como agentes terapéuticos. Sin embargo, es importante destacar que, si bien los linfocitos T CAR19 son muy eficaces para curar algunos tumores CD19+, algunos linfocitos T CAR reactivos contra una variedad de moléculas diana diferentes, pueden tener efectos secundarios graves, a veces fatales, como el síndrome de liberación de citocinas y/o neurotoxicidad (demostrada por varias estructuras artificiales CAR dirigidas a CD19 pero también a otras dianas que incluyen, pero no se limitan a, CD123). Por lo tanto, la capacidad para controlar/eliminar los linfocitos T CAR después de una transferencia es importante (Fig. 2, 10, 19). En el caso de las células CAR, el alelo alterado puede servir como conmutador de seguridad. Además, las células transferidas y modificadas genéticamente también se pueden eliminar en caso de que se vuelvan malignas o causen algún tipo de daño no deseado en la diana o fuera de la diana (posiblemente años después). Alternativamente, las células hospedadoras que causan enfermedades pueden eliminarse selectivamente y al mismo tiempo conservar las células autólogas pero modificadas genéticamente. A diferencia del método de los inventores, la tecnología existente se limita a la eliminación de las células transferidas

pero no permite fácilmente una eliminación de las células hospedadoras. La isoforma alterada permite transferir, p. ej., células autólogas reparadas con genes o modificadas genéticamente de otro modo, durante la eliminación de las células hospedadoras. Sin el cambio de isoforma introducido por el método de la divulgación, la eliminación de la célula hospedadora se tiene que detener cuando se transfieren las células sanas. En ese caso, mientras las células reparadas recién transferidas se expanden, las células hospedadoras también se expandirán y ya no podrán eliminarse, con el riesgo de que las células hospedadoras que causan la enfermedad superen a las células reparadas. Por lo tanto, hacer que las células modificadas genéticamente sean resistentes al agotamiento mediante el método de la divulgación, es muy relevante como enfoque terapéutico. A modo de ejemplo, el epítipo CD19 reconocido por las células anti-CD19-CAR podría mutarse en células hematopoyéticas autólogas de modo que el agotamiento del AcMo anti-CD19 o las células anti-CD19-CAR ya no puedan unirse y destruir las células modificadas genéticamente, pero CD19 seguiría siendo funcional. Esto eliminaría una complicación importante de las células anti-CD19-CAR actuales eficaces. Si bien los anti-CD19-CAR tienen tasas de éxito muy altas en la eliminación de malignomas hematopoyéticos que expresan CD19, de forma concordante conducen a la eliminación de las células hospedadoras sanas que expresan CD19. Esto conduce a una hipogammaglobulinemia y, por lo tanto, a un mayor riesgo de infecciones. Un CD19 mutado permitiría la reconstitución del sistema inmunológico del hospedador con células madre hematopoyéticas (HSCs) autólogas sanas, que darán lugar a linfocitos B resistentes a las células anti-CD19-CAR. Por lo tanto, los linfocitos T CAR 19 podrían prevenir continuamente una recaída, mientras que las células resistentes editadas brindarán una protección natural contra las infecciones. Por lo tanto, los pacientes ya no dependerán de las infusiones de IVIG. El trasplante de HSCs podría lograrse potencialmente como un quimerismo parcial mediante un condicionamiento previo no genotóxico, p. ej., a través de anticuerpos (Nat Biotech, 2016). Alternativamente, podrían usarse células anti-CD45-CAR que reconozcan un epítipo encontrado en la población humana común (por ejemplo, análogas a CD45.2) para eliminar todas las células hospedadoras hematopoyéticas, incluidas las células hematopoyéticas malignas o que causan otras enfermedades. CD45 es una diana apropiada ya que se expresa en todas las células hematopoyéticas, incluidas la mayoría de las células malignas. Además, CD45 es fundamental para la supervivencia de los linfocitos, por lo tanto, si son atacados por linfocitos T CAR, es menos probable que las células puedan regular CD45 a la baja o mutar CD45 para escapar de la acción de los linfocitos T CAR. Esto reduciría el riesgo de recaída. El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCs) autólogas sanas u otras células hematopoyéticas que son portadoras de un epítipo CD45 modificado genéticamente (por ejemplo, CD45.1), como se ilustra en los experimentos de cambio de CD45.2 a CD45.1, permitiría reconstituir el hospedador con un sistema hematopoyético sano que ya no agotará las células anti-CD45-CAR. Una ventaja importante sería que todas las neoplasias malignas que expresan CD45 (incluidas, pero no restringidas a, las neoplasias malignas de linfocitos T y mieloides) pueden ser diana sin necesidad de antígenos específicos de un tipo de célula o un tumor, es decir, la divulgación proporcionará un sistema universalmente aplicable para tratar neoplasias malignas y otras enfermedades hematopoyéticas no malignas. Esto superaría un obstáculo importante de la terapia con CAR-T: identificar los antígenos diana apropiados (Klebanoff, Nat Med 2016). Por lo tanto, podría ampliar sustancialmente las indicaciones de enfermedades que son susceptibles a una terapia con CAR-T. Aunque la terapia con CAR-T tiene mucho éxito en el tratamiento de los tumores CD19+, otras neoplasias malignas hematopoyéticas plantean desafíos importantes. Por ejemplo, el tratamiento del mieloma múltiple sigue siendo un desafío importante, en parte debido a la falta de un antígeno diana adecuado (Mikkilineni, Blood, 2017; Sadelain, Nature 2017). Además, los tumores hematopoyéticos podrían tratarse sin la necesidad de células alogénicas, eliminando así la EICH como una complicación importante. Además, la reconstitución puede comenzar durante la fase de agotamiento, lo que acortará el tiempo de recuperación. Es importante destacar que la mutación utilizada para hacer que las células transferidas sean resistentes al agotamiento también se puede utilizar posteriormente para agotar esas células nuevamente, si fuera necesario. El agotamiento de las HSCs dependiente de las células CAR podría usarse potencialmente como una forma alternativa para lograr un condicionamiento previo leve, es decir, no genotóxico. Las células CAR45 también eliminarán las HSCs. La estrategia de "golpear y reemplazar" utilizada actualmente para el trasplante de "médula ósea" o de HSCs, podría lograrse utilizando CAR45. En lugar de utilizar una quimioterapia y radiación tóxicas, se podría lograr un condicionamiento previo del paciente con CAR45. Una ventaja de eliminar las HSCs y el sistema hematopoyético utilizando células CAR45 y reemplazarlas con HSCs resistentes modificadas genéticamente con alelos, sería que se podría eliminar el peligroso tiempo posterior al trasplante, ya que la reconstitución hematopoyética puede comenzar durante la eliminación de las células no deseadas. Por lo tanto, los pacientes siempre tendrán un sistema inmunológico funcional en lugar de pasar por una fase prolongada de agotamiento de la médula ósea e inmunosupresión. Por tanto, la estrategia de los inventores podría eliminar las infecciones como complicaciones importantes del actual trasplante de HSCs. Las células CAR dirigidas contra un antígeno o una combinación de antígenos para restringir las células diana específicamente las HSCs, podrían usarse para agotar las HSCs endógenas. Esto podría ser, por ejemplo, anti-CD45 o anti-CD34 más un segundo antígeno en un enfoque de biología sintética (por ejemplo, con una puerta AND) para dirigir específica y exclusivamente las células CAR contra las HSCs.

El tratamiento con CAR45 combinado con el reemplazo del sistema hematopoyético con HSCs modificadas genéticamente con alelos podría usarse como una alternativa a la terapia con CAR19 (ya que todas las células CD19+ también expresan CD45) o podría usarse como una terapia combinada de CAR19 más CAR45. La terapia con CAR45 también podría usarse para malignomas CD19 negativos o CD19 mutados en recidiva después de una terapia con CAR19.

Este aspecto de la divulgación representa una estrategia universal para reemplazar células. Las células pueden ser células hematopoyéticas, autólogas o alogénicas. Si las células de reemplazo son HSCs, el método descrito se puede

5 usar para tratar cualquier neoplasia maligna hematopoyética u otros trastornos hematopoyéticos. Otras ventajas del enfoque de los inventores en comparación con los enfoques de "conmutadores de seguridad" existentes incluyen las siguientes. El enfoque de los inventores utiliza una proteína endógena. No es necesario introducir ningún transgén ni
 10 marcador en la célula. Los dos epítomos son funcionalmente idénticos, pero pueden distinguirse por ligandos que se unen específicamente. El enfoque permite tanto el agotamiento de las células transferidas como el de las células hospedadoras, según el ligando que se utilice. Dado que la mutación diseñada se introduce en el genoma, la característica de seguridad sigue permanentemente en las células y no es silenciada, como puede suceder con los conmutadores de seguridad transgénicos introducidos viralmente. Además, el epítomo modificado genéticamente será
 15 menos antigénico que las estructuras artificiales grandes de conmutador de seguridad/gen suicida y, por lo tanto, será menos probable que sea rechazado por las células hospedadoras. Además, el uso de isoformas modificadas genéticamente se basa en mutaciones dirigidas y, por lo tanto, probablemente sea más seguro que otros conmutadores de seguridad/genes suicidas que se integran aleatoriamente en el genoma, generalmente mediante administración viral y, por lo tanto, pueden conducir a mutagénesis por inserción (Cornu, Nat Med, 2017).

15 El experto es consciente de que para cambiar la proteína de la superficie celular de la primera isoforma a la segunda isoforma, se pueden aplicar métodos alternativos en lugar de HDR. A modo de ejemplo no limitativo, el cambio de isoforma se puede efectuar utilizando editores de bases como se describe en la siguiente publicación: Komor et al., Nature 533, 420-424, doi:10.1038/nature17946. Este enfoque podría aumentar aún más la seguridad al permitir la edición del aminoácido deseado sin la necesidad de romper el ADNbc. Los editores de bases o tecnologías relacionadas se pueden entregar como plásmidos o minicírculos (ADNbc), ARNm o RNP.

20 En los casos en los que el cambio de una primera isoforma de una proteína de la superficie celular a una segunda isoforma se combina con la reparación de un gen que causa una enfermedad (por ejemplo, el gen Foxp3), es posible agotar las células no reparadas *in vivo* (es decir, después de la transferencia al hospedador) agotando las células que expresan la primera isoforma. Los inventores han demostrado que en los casos en que la HDR efectúa el cambio de
 25 isoforma y la reparación de defectos genéticos, la probabilidad de que un gen se repare con éxito aumenta en las células en donde se ha producido el cambio de isoforma (Fig. 20). La combinación de un cambio de isoforma en un primer gen con una modificación genética en un segundo gen, permite incluir una característica de seguridad en células modificadas genéticamente.

El conmutador de isoformas también se puede emplear como marcador para rastrear células transferidas y editadas en un hospedador.

30 Según un aspecto alternativo, se describe un método para agotar o enriquecer selectivamente una célula en una composición de células editadas y no editadas, pero no como parte de la invención reivindicada, en donde el método comprende las etapas de

35 a. proporcionar una célula, en donde la célula expresa una primera isoforma de una proteína de superficie, que es diferente de una segunda isoforma de la proteína de superficie con respecto a un marcador de aminoácidos, en donde la primera isoforma comprende el marcador de aminoácidos A codificado por la secuencia de ácido nucleico A y la segunda isoforma comprende el marcador de aminoácidos B codificado por la secuencia de ácido nucleico B;

40 b. inducir en dicha célula mediante manipulación genética específica del sitio el intercambio de la secuencia de ácido nucleico A por la secuencia de ácido nucleico B, cambiando así en dicha célula la expresión de la primera isoforma a la expresión de la segunda isoforma;

c. enriquecer/agotar selectivamente la célula basándose en la expresión de la primera o la segunda isoforma de la proteína de superficie.

45 En determinadas realizaciones, la manipulación genética que da como resultado dicha inserción, delección y/o sustitución de aminoácidos se efectúa mediante reparación dirigida por homología después de una rotura de la doble hebra inducida por una endonucleasa asociada a CRISPR (Cas9) y un ARN guía, en donde dicho ARN guía es capaz de aparearse con dicha primera ubicación genómica.

50 En el contexto de la presente memoria descriptiva, "endonucleasa asociada a CRISPR" se refiere a una endonucleasa Cas9 conocida en la técnica por facilitar la escisión de cadenas de ADN guiada por secuencias de tipo CRISPR. Ejemplos no limitantes de una endonucleasa asociada a CRISPR son las endonucleasas Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9), la endonucleasa Cpf1 de *Francisella* (FnCpf1), *Acidaminococcus* (AsCpf1) y la bacteria *Lachnospiraceae* (LbCpf1), hasta cualquier ortólogo de SpyCas9, FnCpf1, AsCpf1 o LbCpf1, o cualquier variante de proteínas modificadas genéticamente de SpyCas9, FnCpf1, AsCpf1 o LbCpf1 o sus ortólogos. El experto es consciente de que la divulgación también incluye variantes de CRISPR/Cas recientemente descubiertas o modificadas genéticamente.

55 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "ortólogo" se refiere a un gen y a su polipéptido correspondiente que se había originado por descendencia vertical a partir de un único gen ancestral. En otras palabras, los genes/polipéptidos ortólogos comparten un ancestro común y se dividieron cuando una especie divergió en dos especies distintas. Las copias de un solo gen en las dos especies resultantes se denominan ortólogos. Para determinar que dos genes son ortólogos, un experto en la técnica puede llevar a cabo un análisis filogenético del linaje genético,

comparando las secuencias de nucleótidos o aminoácidos alineadas de genes o polipéptidos.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "ARN guía" se refiere a un ARN sintético capaz de guiar una endonucleasa asociada a CRISPR a una ubicación genómica de interés (en donde la endonucleasa escindirá un enlace fosfodiéster dentro del ADN genómico). El experto es consciente de que si se utiliza una endonucleasa Cas9, la expresión "ARN guía" puede referirse a un único ARN guía (ARNsg) que comprende tanto una secuencia necesaria para la unión a Cas9 como una "secuencia de direccionamiento" definida por el usuario, o a una combinación de dos moléculas de ARN, en donde una comprende la secuencia necesaria para la unión a Cas9 (traARNcr) y la otra comprende la "secuencia de direccionamiento" definida por el usuario (ARNcr). Si se utiliza una endonucleasa Cpf1, la expresión "ARN guía" se refiere a una única molécula de ARN que comprende tanto la secuencia necesaria para la unión de Cpf1 como la "secuencia de direccionamiento" definida por el usuario o varios ARNs guía transcritos como una única matriz de ARNcr (Zetsche, Nat Biotech, 2016). La "secuencia de direccionamiento" es capaz de aparearse con la ubicación genómica de interés y, por lo tanto, define la diana genómica que se va a modificar y normalmente comprende aproximadamente 20 nucleótidos.

La escisión del ADN a través de Cas9 depende de la presencia de un motivo adyacente protoespaciador corto (PAM) en el ADN diana, lo que restringe la elección de las secuencias que pueden ser diana. CAS9 procedente de *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9) corresponde, por ejemplo, a la secuencia PAM 5'-NGG-3'. En determinadas realizaciones, la estructura artificial de reparación de ADN comprende una secuencia PAM mutada. La mutación hace que la secuencia PAM no sea funcional pero no afecta a la expresión, estabilidad o función de la proteína. El uso de una estructura artificial de reparación de ADN que comprende una secuencia PAM mutada, mejora la eficiencia de la HDR.

El experto sabe que, además del sistema CRISPR, existen medios alternativos para la edición de ADN específica de un sitio, a saber, el uso de endonucleasas con dedos de zinc, nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN), meganucleasas o sistemas basados en argonauta (Nat Biotechnol. 2016 julio; 34(7):768-73) o editores de bases (Komor et al., Nature 533, 420-424, doi:10.1038/nature17946). La divulgación también incluye el uso de esos medios alternativos para la edición de ADN específica de un sitio.

En determinadas realizaciones, la primera estructura artificial de reparación de ADN no es un sustrato para el sistema CRISPR empleado en la primera etapa del método (introducir una rotura en la cadena de ADN genómico), porque no comprende una secuencia PAM. De este modo, la secuencia insertada ya no se puede cortar después de la inserción mediante un segundo evento de endonucleasa.

En determinadas realizaciones, la manipulación genética que da como resultado dicha inserción, delección y/o sustitución de aminoácidos se efectúa proporcionando, en particular transfectando/electroporando dicha célula con, un editor de bases (como se describe en Komor et al., Nature 533, 420-424, doi:10.1038/nature17946 y/o Gaudelli, Nature 2017) capaz de cambiar la secuencia de ácido nucleico A, que codifica el marcador de aminoácidos A, a la secuencia de ácido nucleico B, que codifica el marcador de aminoácidos B, y un ARN guía capaz de dirigir dicho editor de bases a la secuencia de ácido nucleico A, que codifica el marcador de aminoácidos A. El diseño de un editor de bases capaz de cambiar CD45.1 murino a CD45.2 se ilustra en la sección de ejemplos (Figura 9). Esto ilustra la viabilidad de utilizar editores de bases para modificar genéticamente alelos como alternativa al enfoque probado de HDR. Sin embargo, debido a las limitaciones en cuanto a qué nucleótidos del genoma son susceptibles de edición de bases, los inventores no pudieron diseñar editores de bases para convertir CD90.2 en CD90.1 o CD90.1 en CD90.2. Además, según el diseño del editor de bases original que se basa en el PAM NGG (como se describe en Komor et al., Nature 2016), no era posible diseñar un editor de bases para convertir CD45.1 a CD45.2 o CD45.2 a CD45.1. Por el contrario, la generación de variantes de Cas9 modificadas genéticamente que reconocen la especificidad de un sitio PAM alterado ampliaba la cantidad de nucleótidos a los que pueden dirigirse los editores de bases (Kim, Nat Biotech 2017). Los inventores identificaron un sitio PAM para *Staphylococcus aureus* (SaKKH-BE3) en la proximidad de la G presente en la secuencia CD45.1 que cuando se mutaba a una A daba como resultado el alelo CD45.2. Diseñaron un ARNsg que situaba la G que se iba a convertir en A en la posición 5 en la ventana de edición porque SaKKH-BE3 edita de manera más efectiva una G en la posición 5 que en otras posiciones en la ventana de edición. A continuación, los inventores diseñaron parejas de ARN guía/editor de bases para convertir CD45.2 en CD45.1 (Figura 9b). Los editores de bases de adenina A/T (ABEs) modificados genéticamente de forma reciente pueden convertir G/C. Con este nuevo ABE, en principio, es posible convertir la A necesaria en el alelo CD45.2 en una G en el alelo CD45.1. Sin embargo, los ABEs disponibles actualmente requieren un PAM NGG cerca de la mutación deseada, pero no existe un PAM de ese tipo para posicionar correctamente el ABE. Por lo tanto, los inventores diseñaron un ABE hipotético basándose en las reglas aplicables a los editores de bases de citidina desaminasa. Dado que los editores de bases de citidina desaminasa conocidos y los nuevos ABEs se editan en una ventana de edición similar, es razonable suponer que esa estrategia funcionará. Los inventores identificaron 2 opciones, una basada en una hipotética fusión de Cas9 SaKKH-ABE y otra basada en una hipotética fusión de Cas9 VQR-ABE (Fig. 9b). No se puede excluir que las As flanqueantes también se conviertan, lo que podría cambiar el epítipo. Por lo tanto, convertir CD45.2 a CD45.1 con editores de bases requerirá editores de bases altamente específicos con una ventana de edición estrecha. Los editores de bases publicados recientemente tienen ventanas de edición de 1 a 2 nucleótidos y, por lo tanto, son adecuados (Kim, Nat Biotech, 2017). En conjunto, esos ejemplos ilustran que el principio de convertir una base para la edición de alelos es independiente de la plataforma y se puede lograr mediante enfoques mediados por HDR o alternativas como la edición de bases. Dependiendo del tipo de célula y del contexto genómico de una mutación deseada, se puede elegir una forma u otra.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, una "estructura artificial de reparación de ADN" se refiere a una estructura artificial de ADN que se usa como molde para reparar una lesión en una cadena de ADN, particularmente una rotura de la cadena doble (DSB), dentro del ADN genómico mediante HDR. Una estructura artificial de reparación de ADN comprende brazos de homología y una secuencia transgénica de interés. Los brazos de homología son homólogos a las secuencias de ADN genómico 5' y 3' de la DSB. La secuencia transgénica de interés se encuentra entre los brazos de homología. Durante la reparación del ADN genómico mediante HDR, la secuencia transgénica de interés se inserta en el ADN genómico. El experto sabe que la estructura artificial de reparación de ADN puede ser lineal (monocatenaria o bicatenaria) o circular (por ejemplo, plásmido, plásmido minicírculo).

El experto es consciente de que la expresión "el ARN guía es capaz de aparearse con la ubicación genómica de interés" se refiere al hecho de que parte del ARN guía (la "secuencia de direccionamiento" definida por el usuario es capaz de aparearse con la ubicación genómica de interés en condiciones altamente rigurosas. El ARN guía comprende otras partes que no son capaces de aparearse con la ubicación genómica de interés. Al aparearse (parcialmente) con la ubicación genómica de interés, el ARN guía dirige la endonucleasa asociada a CRISPR a la ubicación genómica de interés, efectuando así una DSB en la ubicación genómica de interés.

En determinadas realizaciones, durante el protocolo de edición de genes se utilizan reactivos potenciadores de la HDR, en particular vainillina o rucaparib. En el contexto de la presente memoria descriptiva, vainillina se refiere a 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, núm. de CAS 121-33-5. En el contexto de la presente memoria descriptiva, rucaparib se refiere a 8-fluoro-2-{4-[(metilamino)metil]fenil}-1,3,4,5-tetrahidro-6H-azepino[5,4,3-cd]indol-6-ona, núm. de CAS 283173-50-2.

Siempre que en el presente documento se presenten alternativas para características individuales separables, como "realizaciones", debe entenderse que esas alternativas pueden combinarse libremente para formar realizaciones discretas de la divulgación descrita en este documento.

La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras, de los cuales se pueden extraer realizaciones y ventajas adicionales. Estos ejemplos se entiende que ilustran la divulgación pero no limitan su alcance.

Breve descripción de las figuras.

La Fig. 1 ilustra el principio de modificación genética de variantes inmunológicamente discernibles de proteínas de la superficie celular. Las isoformas A y B son capaces de realizar la misma función (son funcionalmente comparables). En este ejemplo, la isoforma A representa una proteína de superficie natural que se modifica en la variante isoforma B.

La Fig. 2 ilustra cómo las variantes de la superficie celular inmunológicamente discernibles aumentan la seguridad de la terapia celular humana.

La Fig. 3 muestra que dos isoformas de una proteína de superficie se pueden distinguir con anticuerpos monoclonales (AcMos). Secuencias: fila superior: SEQ ID NO 020, fila inferior: SEQ ID NO 021.

La Fig. 4 muestra un experimento de prueba de concepto: conversión de CD90.2 (alelo A) a CD90.1 (alelo B) en células primarias. El panel de la citometría de flujo izquierda muestra una población inicial pura de linfocitos T primarios CD90.2+. Luego, las células se modifican genéticamente *in vitro* para convertir CD90.2 en CD90.1. Después de la edición se pueden discriminar 4 poblaciones distintas: células homocigotas CD90.2+ (población inicial sin editar, arriba a la izquierda), células heterocigotas CD90.1+/CD90.2+ (arriba a la derecha), células homocigotas CD90.1+ (abajo a la derecha) y células que perdieron CD90 (abajo a la izquierda). Las células modificadas genéticamente con alelos en el cuadrado inferior derecho ya no expresan el alelo endógeno inicial/original (CD90.2). Se puede utilizar una población pura de células CD90.1+CD90.2- para aislar células editadas correctamente *in vitro* antes de transferirlas a un paciente.

La Fig. 5 muestra un segundo experimento de prueba de concepto: conversión de CD45.2 (alelo A) a CD45.1 (alelo B) en células primarias. Secuencias: fila superior: SEQ ID NO 022, fila inferior: SEQ ID NO 023. Como se muestra para la conversión del alelo CD90.2 a CD90.1 (Fig. 4), las células modificadas genéticamente en los alelos en el cuadrado inferior derecho ya no expresan el alelo inicial/alelo endógeno original (CD45.2). Esto se puede utilizar para aislar una población pura de células editadas correctamente antes de transferirlas a un paciente.

La Fig. 6 muestra la edición de genes en células EL4 utilizando partículas de ribonucleoproteínas (RNPs) Cas9. Las células EL4 se transfectaron con el complejo ARNcr:traARNcr/Cas9 y molde +/- HDR de 2 kb de la misma manera que para el enfoque basado en plásmido, excepto por las condiciones de electroporación (descritas en la sección de métodos). Esto demuestra que la edición de alelos se puede lograr mediante diferentes enfoques, p. ej., basado en plásmidos o RNPs, es decir, es independiente de la plataforma.

La Fig. 7 muestra la edición de genes en linfocitos T primarios de ratón utilizando partículas de ribonucleoproteínas (RNPs) Cas9. Los linfocitos T primarios de ratón se transfectaron con complejo ARNcr:traARNcr/Cas9 y molde +/- HDR de 2 kb de la misma manera que para el enfoque basado en plásmidos. Al igual que en la Fig. 6, esto demuestra que la edición de alelos para convertir el alelo A en alelo B es

independiente de la plataforma.

La Fig. 8 muestra una selección *ex vivo* altamente pura de células con alelos modificados genéticamente. Panel izquierdo: después de transformar células CD45.2 en células CD45.1, surgen 4 poblaciones (comparable al de la Fig. 4). Luego se utilizó citometría de flujo para purificar las 4 poblaciones hasta alcanzar una pureza muy alta. El panel derecho muestra la pureza posterior a la clasificación para cada una de las 4 poblaciones. Conclusión: Las 4 poblaciones celulares posibles se pueden purificar *ex vivo* hasta lograr una pureza elevada, basándose en el alelo modificado genéticamente. Una edición de genes correcta se validó mediante una secuenciación del ADN de Sanger (no se muestra).

La Fig. 9 muestra el diseño de un editor de bases para convertir CD45.1 a CD45.2 (A) y CD45.2 a CD45.1 (B). Secuencias (A): fila superior: SEQ ID NO 024, fila inferior: SEQ ID NO 025 (B): fila superior (opción 1 y 2): SEQ ID NO 026, fila inferior (opción 1 y 2): SEQ ID NO 027. A) Se diseñó un ARN guía para usar con el editor de bases SaKKH-BE3 restringido con PAM NNNRRT. La secuencia PAM elegida está resaltada con una barra negra de puntos (ATTTGT). El ARN guía está resaltado con una barra gris, la ventana de edición de bases de los nucleótidos 4-7 del ARN guía está resaltada. La G en la posición 5 se convertirá en una A con ese editor de bases. Por tanto, el alelo CD45.1 se convertirá en el alelo CD45.2. B) Los editores de bases de adenina diseñados pueden convertir A en G. Para convertir CD45.2 en CD45.1 se identificaron dos opciones: Opción 1: se diseñó un ARNsg (barra gris) para usar con Cas9 SaKKH (PAM resaltado con una barra negra de puntos). Esto convertirá la A en la posición 5 de la ventana de edición base en una G. Opción 2: un ARNsg (barra gris) para usar con Cas9 VQR. PAM resaltado por una barra negra discontinua. Esto convertirá la A en la posición 6 de la ventana de edición bases en G. Las opciones 1 y 2 convertirán el alelo CD45.2 en el alelo CD45.1.

La Fig. 10 muestra el concepto subyacente a la eliminación opcional de las células transferidas. Las células se toman de un paciente y luego se editan (*ex vivo*) para convertir un alelo en otro. Las células editadas con éxito se seleccionan para infundir una población pura de células que es portadora del epítipo necesario para un agotamiento selectivo. Por lo tanto, la modificación genética alélica ha añadido la opción de realizar la eliminación de las células transferidas, si es necesario.

La Fig. 11 muestra aplicaciones para el agotamiento selectivo de células hospedadoras o transferidas *in vivo*.

La Fig. 12 muestra un experimento de prueba de concepto para la eliminación selectiva *in vivo*. Modelo para la eliminación *in vivo*: 1) Reconstitución de ratones inmunodeficientes que carecen de todos los linfocitos T (Rag KO) con una mezcla 1:1 de linfocitos T CD45.2+ y CD45.1+ purificados (células congénicas, células no editadas). 2) Agotamiento mediado por anticuerpos (no selectivos (anti-CD4) en comparación con selectivos (anti-CD45.2)). Anti-CD45.2 sin toxina o acoplado a toxina (Saporina). 3) Análisis 1 semana después.

La Fig. 13 muestra el agotamiento selectivo de células CD45.2+ *in vivo*: Cuantificación de linfocitos T en sangre.

La Fig. 14 muestra el agotamiento selectivo de células CD45.2+ *in vivo*: Cuantificación de cantidades relativas de linfocitos T en órganos linfoides. Misma configuración que en la Fig. 12 pero análisis de los ganglios linfáticos (LN) y los ganglios linfáticos mesentéricos (mesLN).

La Fig. 15 muestra el agotamiento selectivo de células CD45.2+ *in vivo*: Cuantificación de cantidades relativas de linfocitos T en órganos linfoides. Misma configuración que en la Fig. 12 pero análisis del bazo (SP).

La Fig. 16 muestra el agotamiento selectivo de células CD45.2+ *in vivo*: Cuantificación de cantidades absolutas de linfocitos T en órganos linfoides. Misma configuración que en la Fig. 12 pero análisis de los ganglios linfáticos (LN) y los ganglios linfáticos mesentéricos (mesLN).

La Fig. 17 muestra el agotamiento selectivo de células CD45.2+ *in vivo*: Cuantificación de cantidades absolutas de linfocitos T en órganos linfoides. Misma configuración que en la Fig. 12 pero análisis del bazo (SP).

La Fig. 18 muestra un segundo experimento de prueba de concepto para la eliminación selectiva *in vivo* de células con alelos editados. Configuración experimental: 1) Electroporación de linfocitos T CD45.2 *ex vivo* para diseñar CD45.1. 2) Transferencia adoptiva a ratones carentes de linfocitos T (Rag KO); (sin selección por pureza antes de la transferencia). 3) Semanas después, control de calidad para demostrar la edición de los alelos. 4) Agotamiento de las células CD45.2 mediado por anticuerpos, dejando solo las células editadas. Conclusión: PoC demuestra el agotamiento *in vivo* de las células hospedadoras CD45.2+ y las células no editadas mientras se preservan las células CD45.1+ con alelos modificados.

La Fig. 19 muestra una aplicación de la divulgación: la modificación genética de alelos aumenta la seguridad, p. ej., para terapia con células CAR-T. Las células modificadas genéticamente expresan una primera isoforma de una proteína de la superficie celular (por ejemplo, CD45) y un receptor de antígeno quimérico reactivo con una diana de interés, por ejemplo, CD19 (CAR-19). Mientras que CAR19 se modifica genéticamente en los linfocitos T, el segundo alelo CD45 se convierte en el primer alelo CD45 para permitir la discriminación de las células CAR T transferidas desde las células hospedadoras sin modificar genéticamente. En el caso de una toxicidad relacionada con el tratamiento, las células CAR-T patógenas se pueden eliminar selectivamente para detener la

toxicidad relacionada con CAR-T.

La Fig. 20 muestra la corrección génica de células escurfi y células portadoras de la mutación Foxp3K276X humana, así como el enriquecimiento de la frecuencia relativa de células con genes reparados cuando se activa un marcador de superficie sustituto con cambio de isoforma.

5 A) Alineación de secuencias de ADN genómico de *foxp3* de tipo silvestre (C57BL/6) (SEQ ID NO 028), el locus Foxp3 con una mutación dirigida Foxp3K276X (SEQ ID NO 029) que introduce un codón de parada prematuro y el locus Foxp3 de ratones escurfi (B6.Cg-Foxp3^{sf}/J) que son portadores de una inserción espontánea de 2 pb que conduce a un cambio de marco (SEQ ID NO 030). Sitios de unión de ARNsg (línea verde) y secuencias de PAM (línea negra). B) Protocolo para la edición de genes de linfocitos T CD4⁺ totales procedentes de ratones Foxp3K276X C57BL/6. Activación y electroporación *in vitro* (etapa 1) con plásmidos que codifican ARNsg dirigido a la mutación Foxp3K276X y un plásmido circular que contiene un molde de reparación de Foxp3 de tipo silvestre (wt) de 1 kb. Las células transfectadas con éxito se aíslan basándose en la expresión de GFP (etapa 2). Expansión celular *in vitro* para la edición génica en presencia de rhIL-2, TGF- β solos o en combinación con ácido retinoico (RA) y anticuerpos neutralizantes de citocinas (anti-IL-4 y anti-IFN γ) durante 7 días (etapa 3). C) Configuración experimental como en B con linfocitos T CD4⁺ totales procedentes de ratones de control (WT) o ratones Foxp3K276X. Citometría de flujo de la expresión de CD25 y Foxp3 (con selección de linfocitos T CD4⁺ vivos). Las células de tipo silvestre electroporadas con plásmido px458 vacío se diferencian en linfocitos T CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ (panel izquierdo), ausencia de diferenciación de Foxp3 en células Foxp3K276X electroporadas con ARNsg Foxp3K276X solo (panel central) y restauración de la expresión de la proteína Foxp3 en células Foxp3K276X electroporadas con ARNsg Foxp3K276X y molde de reparación de ADNbc de Foxp3 de 1 kb (panel derecho). Fila superior: inducción de Foxp3 con TGF- β solo, fila inferior: inducción de Foxp3 con TGF- β combinado con RA. En comparación con TGF- β solo, la combinación de TGF- β y RA conduce a una mayor frecuencia de células que expresan Foxp3 en aquellas células que tienen un locus Foxp3 intacto (es decir, células de tipo silvestre y reparadas). Datos representativos de 2 experimentos con células Foxp3^{K276X} y un experimento con células Foxp3^{sf}/J. D) Enriquecimiento de células que expresan Foxp3 con genes reparados utilizando el cambio de la isoforma CD45 multiplexada como marcador sustituto. Configuración experimental como en B pero electroporación simultánea de plásmidos que codifican 2 ARNsgs (ARNsg Foxp3K276X y ARNsg CD45.2_R1) y dos moldes de ADNbc de 1 kb (Foxp3 de tipo silvestre y CD45.1). Siete días después, citometría de flujo de CD45.2, CD45.1, CD25 y Foxp3 (con selección de células CD4⁺ vivas). Panel superior: selección previa de células CD45.1- (línea verde) y células CD45.1+ (línea roja). Panel inferior: Enriquecimiento de células CD25⁺Foxp3⁺ en células CD45.1+ con cambio de isoforma. Datos representativos de 2 experimentos con células Foxp3^{K276X} y un experimento con células Foxp3^{sf}/J.

La Fig. 21 muestra la reparación del gen Foxp3 usando el enfoque basado en plásmidos y el enfoque basado en RNP. A: Se transfectaron linfocitos T CD4 procedentes de ratones Foxp3 KO con plásmido de ARNsg solo o junto con un molde de HDR de tipo silvestre de Foxp3. Las células GFP⁺ y GFP⁻ se clasificaron 24 h después de la transfección (transfección del plásmido) e inmediatamente después de la clasificación celular se expandieron hasta el final del experimento en presencia del cóctel de diferenciación de Foxp3. B: Se transfectaron linfocitos T CD4 procedentes de ratones Foxp3 KO con complejo de RNP ARNcr:traARNcr/Cas9 solo o moldes de HDR +/- (ADNmc de 180 pb o plásmido de 2 kb). El conjunto total de células transfectadas con RNP se expandió hasta el final del experimento en presencia del cóctel de diferenciación de Foxp3.

La Fig. 22 muestra la reparación exitosa del gen Foxp3 en linfocitos T *in vitro*. Fila superior: Alineación de secuencias de ADN genómico de Foxp3 wt (C57BL/6) SEQ ID NO 031 y el locus Foxp3 con una mutación dirigida Foxp3K276X SEQ ID NO 032 que introduce un codón de parada prematuro. Sitios de unión de ARNsg (línea verde) y secuencias de PAM (línea negra). Se transfectaron linfocitos T CD4⁺ totales procedentes de ratones wt de control o Foxp3K276X. Citometría de flujo de la expresión de CD25 y Foxp3 (selección de linfocitos T CD4⁺ vivos). Diferenciación de células wt electroporadas con plásmido px458 vacío en linfocitos T CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ (panel superior), ausencia de diferenciación de Foxp3 en células Foxp3K276X electroporadas con ARNsgFoxp3K276X solo (panel central) y restauración de la expresión de la proteína Foxp3 en células Foxp3K276X electroporadas con ARNsgFoxp3K276X y molde de reparación de ADNbc de Foxp3 de 1 kb (panel inferior). Inducción de Foxp3 con TGFbeta combinado con RA.

La Fig. 23 muestra un protocolo para la edición de genes de linfocitos T CD4⁺ totales procedentes de ratones C57BL/6 Foxp3K276X. Activación y electroporación *in vitro* con plásmidos que codifican ARNsg dirigido a la mutación Foxp3K276X y un plásmido circular que contiene un molde de reparación de Foxp3 wt de 1 kb. Las células transfectadas con éxito se aíslan basándose en la expresión de GFP. Las células se transfieren *in vivo* para la diferenciación de Foxp3 seguida de un régimen de IL-2.

La Fig. 24 muestra el fenotipo clínico de los ratones 14 semanas después de la AT de las células. Los ratones WT y los reparados no padecen enfermedades, la transferencia de células KO produce inflamación de la piel y alopecia. Configuración experimental como en la Fig. 23.

La Fig. 25 muestra que el fenotipo clínico (infiltración de linfocitos T) en ratones que recibieron células KO se correlaciona con la infiltración de linfocitos T CD4/CD3⁺ en la piel de la oreja y la cola. No se encuentran linfocitos

T CD4/CD3+ o se encuentran cantidades muy bajas en la piel de la oreja y la cola de los ratones que recibieron linfocitos T WT o reparados. Los datos se representan como % y cantidades absolutas.

5 La Fig. 26 muestra la presencia de linfocitos Treg CD25/Foxp3+ en ratones que recibieron células WT y reparadas. No se encontraron linfocitos T CD25/Foxp3+ en ratones que recibieron células KO. Los datos se muestran como % y MFI de Foxp3. Configuración experimental como en la Fig. 23.

La Fig. 27 muestra que los Treg reparados responden a IL-2. El tratamiento adicional con IL-2 durante la última semana del experimento da como resultado una mayor presencia de linfocitos Treg CD25/Foxp3+ en los ratones que recibieron células WT y reparadas. No se encontraron linfocitos T CD25/Foxp3+ en los ratones que recibieron células KO. Estos datos demuestran que las células WT y Treg reparadas responden a la IL-2 en un grado similar.

10 La Fig. 28 muestra que los linfocitos WT y Treg CD25/Foxp3 reparados expresan niveles similares de diferentes marcadores de la superficie celular (GITR, ICOS, TIGIT, PD1 y KLRG1). La combinación de CD25 y marcadores adicionales (por ejemplo, GITR) se puede utilizar para enriquecer esas poblaciones. Los linfocitos T carentes de Foxp3 son fenotípicamente diferentes, p. ej., carecen de la expresión GITR y KLRG1.

15 La Fig. 29 muestra que AT de células CD45.1+ WT rescata a los ratones carentes de Foxp3 y amplía su esperanza de vida hasta 8 semanas (último momento examinado, sin indicios de enfermedad). La alta proporción de linfocitos Treg WT (50%) encontrados en ratones Foxp3 KO suprime la activación de los linfocitos T del hospedador (menor porcentaje de células CD44 altas). Esto demuestra que los linfocitos T WT tienen la capacidad de restaurar completamente la regulación inmune y controlar la enfermedad de escurfi. Además, el microambiente carente de Foxp3 estimula la expansión masiva de los linfocitos T con suficiente Foxp3.

20 La Fig. 30 muestra un experimento de agotamiento de CD4 en ratones Foxp3 KO (nódulo linfático, LN). Reparación génica combinada en linfocitos T con agotamiento selectivo de anticuerpos: agotar las células patógenas y luego transferir linfocitos T con genes corregidos. El agotamiento de CD4 previene en gran medida la enfermedad de escurfi y prolonga significativamente la esperanza de vida. La observación está respaldada por datos de FACS que muestran linfocitos T CD4 bajos o inexistentes (KO agotado en comparación con ratones KO o WT sin tratamiento).

25 La Fig. 31 muestra un experimento de agotamiento de CD4 en ratones Foxp3 KO (bazo, SP). Reparación génica combinada en linfocitos T con agotamiento selectivo de anticuerpos: agotar las células patógenas y luego transferir linfocitos T con genes corregidos. El agotamiento de CD4 previene en gran medida la enfermedad de escurfi y prolonga significativamente la esperanza de vida. La observación está respaldada por datos de FACS que muestran linfocitos T CD4 bajos o inexistentes (KO agotado en comparación con ratones KO o WT sin tratamiento).

30 La Fig. 32A muestra que el agotamiento de CD4 previene el desarrollo de la enfermedad de escurfi en ratones carentes de Foxp3.

La Fig. 32B muestra que el agotamiento de CD4 previene en gran medida el desarrollo de dermatitis en la piel de la cola de ratones carentes de Foxp3.

35 Ejemplos

Consideraciones generales para el diseño de mutaciones modificadas genéticamente (modificación genética de alelos):

La modificación genética de un alelo de un gen mediante la introducción de una pequeña mutación específica, posiblemente una mutación de un solo nucleótido o de un solo aminoácido, con el fin de cambiar la unión específica de un ligando y permitir la unión de un segundo ligando específico, puede ser útil como principio general para uso terapéutico. La mutación está diseñada de manera que preserve la función de la proteína modificada genéticamente tanto como sea posible. Es necesario cambiar la inmunogenicidad para poder generar ligandos de unión específicos, como anticuerpos monoclonales (AcMos) o moléculas similares a anticuerpos, como afímeros, DARPINS, nanocuerpos, etc. Es necesario analizar esos ligandos para determinar su unión específica y la naturaleza del inmunógeno requiere un diseño cuidadoso. Al mismo tiempo, la mutación constituye un cambio antigénico menor y, por lo tanto, es poco probable que cause una reacción inmunológica fuerte *in vivo*. Los marcadores congénicos en ratones cumplen exactamente esos criterios. La diferencia entre CD90.1 y CD90.2, así como entre CD45.1 y CD45.2, es un único nucleótido que conduce a una sola diferencia de aminoácido. En ambos casos, esa diferencia puede detectarse mediante AcMos específicos, lo que da como resultado una pareja de AcMos para cada gen. Aunque los AcMos podrían generarse contra esas diferencias cuando las células congénicas se transfieren a ratones hospedadores congénicos compatibles, es decir, células CD90.1+ a ratones hospedadores CD90.2+ o viceversa y células CD45.1+ a hospedadores CD45.2+ y viceversa las células no son rechazadas inmunológicamente. Esto significa que esa diferencia antigénica menor es tolerada por el sistema inmunológico *in vivo*. En conjunto, esas propiedades han convertido a las células marcadas congénicamente en una herramienta muy útil para la investigación inmunológica la cual se ha utilizado durante décadas. Inmunológicamente, esas células se utilizan como células sustitutas para transferencias autólogas (ya que las células son genéticamente idénticas excepto por esa mutación), pero la diferencia congénica menor permite discriminar las células transferidas de las células hospedadoras.

Elección de una proteína que se va a modificar genéticamente:

Para diseñar un sistema similar para uso terapéutico en humanos, es necesario tener en cuenta varias consideraciones. En principio, la mutación puede introducirse en cualquier gen que codifique una proteína. El patrón de expresión de la proteína de interés será relevante, es decir, expresión ubicua o específica en células o tejidos, si se desea. Las proteínas expresadas en la superficie pueden ser el objetivo más directo y, por lo tanto, en la mayoría de los casos serán las proteínas elegidas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, las proteínas caracterizadas por el grupo del sistema de diferenciación CD1 a CD371) (Engel, J Immunol 15 de noviembre de 2015, 195 (10) 4555-4563 y <http://www.hcdm.org/>). Otras proteínas de interés pueden ser proteínas expresadas de forma ubicua, como la beta-2-microglobulina o partes constantes del HLA de clase I que se expresan en todas las células, incluidas las células no inmunes. Alternativamente, pueden ser de interés las proteínas expresadas en tipos celulares específicos, p. ej., CD45 humano para células hematopoyéticas, CD3 humano para linfocitos T, regiones constantes de componentes de receptores de linfocitos T humanos, regiones constantes de inmunoglobulinas de linfocitos B tales como las cadenas ligeras kappa y lambda o regiones constantes de las cadenas pesadas, correceptores de CD4 o CD8 humanos o marcadores de linfocitos B como CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, moléculas coestimuladoras como CD28 o CD40, CD34 en células madre hematopoyéticas o incluso isoformas específicas expresadas en subconjuntos de células como CD45RA o CD45RO. En este último caso, la mutación se diseñaría en la región variable (exones cortados y empalmados alternativamente) que difiere entre CD45RA y CD45RO. Diseñar una mutación en una molécula expresada de forma ubicua, como la beta-2-microglobulina o HLA-I, podría servir como un sistema único que puede usarse en prácticamente cualquier célula de mamífero, más específicamente en cualquier célula humana. Esto se podría usar para rastrear y eliminar las células modificadas y, al mismo tiempo, preservar las células hospedadoras no modificadas. Una característica de este tipo podría ser útil, p. ej., como conmutador de muerte para la terapia celular, incluidos varios tipos de células madre (por ejemplo, células madre musculares), células hepáticas o células obtenidas a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPS). Diseñar una mutación en una proteína específica de un tipo de célula, como CD45, podría ser útil para atacar a todas las células de ese tejido específico. En el caso del sistema hematopoyético, la modificación de CD45 humana podría servir para marcar células madre hematopoyéticas (HSCs) que se utilizan para reemplazar el sistema hematopoyético endógeno. Toda la progenie de esas HSCs albergará la misma mutación diseñada en el genoma de las HSCs originales. Si el sistema hematopoyético del hospedador previo se elimina por cualquier medio (por ejemplo, radiación, quimioterapia, ligandos que agotan como AcMo o moléculas similares a anticuerpos, AcMo acoplado con toxinas, eliminación mediada por células, por ejemplo, eliminación mediada por células CAR-T, etc.), entonces el reemplazo del sistema hematopoyético, incluso si es autólogo, podría discriminarse a través de la mutación diseñada.

Alternativamente, permitiría la eliminación de las células hospedadoras sin afectar a las células diseñadas.

Consideraciones del diseño:

- Patrón de expresión de la proteína (ubicua frente a específica de células o tejidos)
- Proteínas extracelulares: en la mayoría de los casos, las mutaciones se diseñarán en las partes extracelulares de las proteínas de interés que son accesibles a ligandos específicos. Las mutaciones se pueden diseñar en exones expresados de forma constante o en exones cortados y empalmados de forma alternativa si se desea una expresión específica de un subconjunto.
- Conservación entre especies: es más probable que los aminoácidos (aa) o las estructuras conservadas sean funcionalmente relevantes y, por lo tanto, deberían permanecer intactos. Más bien, las mutaciones deberían incorporarse en regiones menos conservadas.
- Propiedades químicas de los aminoácidos, p. ej., polaridad, carga eléctrica, hidrofobicidad
- Similitud de los aminoácidos: para preservar la función, la mutación debe convertir un aa determinado en un aa relacionado, pero los cambios aún deben ser detectables por ligandos específicos.
- Variaciones que ocurren naturalmente: las mutaciones que corresponden a variaciones de aminoácidos observadas en una posición determinada en una secuencia múltiple alineada de miembros de una familia de proteínas (secuencias homólogas de diferentes organismos) probablemente no afecten a la función y la estructura de la proteína, y pueden seleccionarse para diseñar mutaciones.
- Consideraciones estructurales: los datos estructurales pueden ayudar en el diseño racional de posibles mutaciones. El aminoácido que se va a diseñar debe ser accesible para la unión del ligando. Las mutaciones en bucles se toleran funcionalmente relativamente bien y, por tanto, son de interés.
- Evitar mutaciones conocidas que causen enfermedades.
- Considerar las variaciones genéticas humanas conocidas: los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) funcionalmente tolerados son buenos candidatos para mutaciones.

- Los sitios importantes para modificaciones secundarias como las glicosilaciones no deben mutarse.
- Los sitios importantes para los enlaces disulfuro no deben mutarse.
- Los sitios importantes para las interacciones indicadas (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, puentes salinos, interacciones de apilamiento hidrofóbico) no deben mutarse, tanto internamente como en las interacciones proteína-proteína para complejos multiproteicos o interacciones receptor-ligando.
- Considerar sistemas exitosos anteriores como el CD90.1/CD90.2 murino (Q a R)
- Considerar los sitios de unión de ligandos de unión conocidos, como AcMos conocidos, y la elaboración de modelos informáticos de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs).
- Excluir los "sitios activos" conocidos, p. ej., sitios catalíticos de enzimas
- Evitar dominios estructuralmente muy similares presentes en otras proteínas humanas, ya que es probable que aumenten el riesgo de ligandos con especificidad cruzada.
- Considerar la inmunogenicidad: elegir un sitio que probablemente dé como resultado un inmunógeno peptídico adecuado.

Modificación genética de alelos como principio de aplicación general e independiente de la plataforma:

- 15 Los inventores demuestran y caracterizan cómo se puede utilizar la plataforma CRISPR/Cas para diseñar una mutación puntual específica para la modificación genética de alelos seguida de eliminación selectiva. Los inventores diseñaron dos mutaciones puntuales distintas en dos genes diferentes y demostraron que la mutación diseñada puede usarse para rastrear y/o eliminar selectivamente células diseñadas *in vivo*.

20 Los inventores se basaron en el sistema CRISPR/Cas9 y un molde de ADNbc para lograr la reparación dirigida por homología (HDR). Sin embargo, el ejemplo utilizado es solo una forma de introducir la mutación. Las alternativas incluyen diferentes tipos de nucleasas, como proteínas con dedos de zinc, TALEN u otros sistemas CRISPR/Cas de origen natural o modificados genéticamente como Cas9, Cpf-1, nucleasas de alta fidelidad o nucleasas con dependencias de PAM modificadas genéticamente (Komor, Cell, 2017). Además, el principio descrito es independiente de la forma de administración de las nucleasas. Pueden administrarse como plásmido, ARNm, proteína recombinante, proteína recombinante en complejo con un ARN guía (es decir, complejo ribonuclear, RNP), recombinasa dividida o como un virus integrante o no integrante, p. ej., retrovirus, lentivirus, baculovirus u otra plataforma de administración de virus. La modalidad de administración puede incluir electroporación u otras formas como lipofección, administración de nanopartículas, compresión celular o perforación física. Además, el molde de HDR puede ser un ADNmc o un ADNbc en forma de ADNmc corto, ADNmc largo o un ADN de minicírculo circular o lineal, ADN plasmídico o un molde de ADN viral, p. ej., virus adenoasociado (VAA). Dependiendo de la célula diana, se utilizan serotipos de VAA específicos para entregar la carga a las células. Para los linfocitos T humanos y las células madre hematopoyéticas humanas, los moldes de HDR a menudo se proporcionan como VAA6, pero también se pueden utilizar con éxito la endonucleasa de RNP junto con moldes de HDR de ADNmc corto.

Por tanto, el modo en que se introduce la mutación puede ser flexible.

- 35 Modificación genética de alelos que emplea enfoques alternativos, p. ej., convertidores de bases o editores de bases

Los inventores demostraron cómo se puede aprovechar un corte específico del ADNbc seguido de HDR para introducir mutaciones pequeñas, específicas, es decir, precisas, para la modificación genética alélica. Además, existen enfoques alternativos sobre cómo se podrían introducir mutaciones puntuales diseñadas en el genoma de una célula viva. Por ejemplo, las proteínas de fusión quiméricas recientemente diseñadas permiten la conversión directa de una base de un ADN diana en otra (Komor, Nature 2016; Nishida, Science 2016; Yang, Nat Comm, 2016; Ma, Nat Meth 2016). Se pueden fusionar enzimas como las desaminasas a módulos de unión al ADN como (pero no limitadas a) proteínas con dedos de zinc, sistemas TALENS o CRISPR/Cas. Las citidina desaminasas naturales (APOBEC1, APOBEC3F, APOBEC3G) y la desaminasa inducida por activación (AID) o el ortólogo de AID PmCDA1 (de la lamprea marina) pueden convertir citidinas (C) en uracilos (U) en el ADN. La maquinaria de replicación del ADN tratará la U como una T si la replicación del ADN ocurre antes de la reparación de la U. Esto conduce a una conversión de una pareja de bases C:G a una T:A (Yang, Nat Comm, 2016; Komor, Nature 2016). Por lo tanto, varios grupos han desarrollado proteínas quiméricas diseñadas con desaminasas fusionadas a módulos de unión a ADN que se utilizan para llevar la desaminasa a un locus genómico específico. Por ejemplo, el sistema CRISPR/Cas se puede utilizar como sistema de administración cuando se utiliza una versión modificada genéticamente, catalíticamente muerta (dCas9) de la nucleasa Cas9. Ese enfoque se ha utilizado con éxito para dirigir moléculas efectoras fusionadas a loci genómicos específicos. Las aplicaciones incluyen dirigir proteínas fluorescentes a loci específicos o llevar transactivadores o represores transcripcionales a loci genómicos específicos para controlar una expresión génica específica (Wang, Ann Rev Biochem, 2016). La fusión de una citidina desaminasa o AID con una nickasa Cas9 y la modificación genética adicional para mejorar la eficiencia de la edición de bases, permite una conversión de bases dirigida directa (Komor, Nature 2016; Nishida, Science 2016). En determinadas circunstancias, esto podría tener ventajas sobre el enfoque de HDR,

ya que la edición de bases no induce una rotura del ADNbc ni requiere la entrega de un molde de ADN para HDR. Por lo tanto, este enfoque alternativo podría conducir a menos indeles y, por lo tanto, podría ser una alternativa segura o incluso más segura a la modificación genética genómica basada en HDR. Además, la entrega del editor de bases como ARNm o RNP podría ser suficiente y menos tóxica para ciertos tipos de células. Para los linfocitos T humanos, las RNPs Cas9 ofrecen un enfoque exitoso de edición del genoma (Schumann, PNAS, 2015), por lo tanto, se puede anticipar que los convertidores de bases en forma de RNPs podrían ser particularmente adecuados para células hematopoyéticas, incluidas las células madre hematopoyéticas (HSCs) y los linfocitos T, pero en principio la conversión de bases podría ser un enfoque adecuado para la modificación genética de alelos aplicable a cualquier célula, incluidas las células de mamífero. La mutación puntual diseñada introducida se puede utilizar para aplicaciones posteriores, como marcador celular, seguimiento celular y eliminación selectiva. Los editores de bases entregados como RNPs editaban con éxito nucleótidos diana en células de mamífero, embriones de ratón y pez cebra y el oído interno de ratones vivos (Rees, Nat Comm, 2017; Kim, Nat Biotech, 2017 doi:10.1038/nbt.3816). Por lo tanto, esos estudios demuestran la viabilidad de la edición de bases específica sin ADN. Sin embargo, el número de nucleótidos en el genoma (humano) que son susceptibles de conversión de bases es más restringido que el enfoque de HDR, ya que no solo depende de la secuencia de PAM (para convertidores de bases basados en CRISPR/Cas) sino que subyace a restricciones adicionales. Aunque los editores de bases de citidina desaminasa solo pueden convertir C en T (o G en A), los editores de bases de adenina recientemente diseñados pueden convertir A en G (o T en C (Gaudelli, Nature 2017)). Sin embargo, además del requisito de PAM, la conversión de bases solo ocurre dentro de una ventana determinada, especificada por el diseño y/o la modificación genética específicos de la proteína de fusión. Por lo tanto, en comparación con la introducción de una mutación puntual mediada por HDR, el número de nucleótidos editables es mucho más restringido si se utilizan editores de bases (Komor, Nature 2016). Además, la ventana de conversión de bases incluye varios nucleótidos. Por ejemplo, para el llamado editor de bases 3 (BE3) que utiliza *S. pyogenes* Cas9 (SpBE3, véase, Komor et al., Nature 2016) esa ventana incluye aproximadamente 5 nucleótidos. Por lo tanto, no será posible editar una sola C a T dentro de un tramo de múltiples nucleótidos C adyacentes y conducirá a mutaciones adicionales no deseadas que pueden cambiar el aminoácido de la proteína resultante. Se aplican ventanas de edición similares a los editores de bases de adenina. Además, un BE3 diferente basado en *S. aureus* Cas9, SaBE3, puede dar como resultado una edición de bases detectable en las Cs diana fuera de la ventana de edición canónica de BE3. Para abordar esas limitaciones, se modificaron genéticamente versiones más nuevas del convertidor de bases para tener ventanas de edición más estrechas y diferentes especificidades de PAM aparte de NGG (por ejemplo, NGA, NGAG, NGCG, NNGRRT y NNNRRT), pero el diseño de un editor de bases específico para la conversión de un solo nucleótido dado sigue siendo un desafío (Kim, Nat Biotech 2017, doi:10.1038/nbt.3803). Aunque los nuevos convertidores de bases amplían la gama de nucleótidos seleccionables en el genoma de los mamíferos, no todos los nucleótidos pueden editarse a voluntad. Sin embargo, para aprovechar algunos de los beneficios de los convertidores de bases, los inventores intentaron diseñar un editor de bases para la modificación genética de alelos de CD90.1 a CD90.2, CD90.2 a CD90.1, CD45.1 a CD45.2. o CD45.2 a CD45.1. Sin embargo, con los editores de bases restringidos a NGG originales, ninguna de esas conversiones se pudo lograr con los editores de bases disponibles. Esto a pesar del hecho de que para ambos genes, CD90 y CD45, la diferencia alélica está codificada por una sustitución de G por A que, en principio, debería ser susceptible para una conversión con desaminasa. La única solución fue utilizar una versión de BE3 basada en SaCas9 que contenía 3 mutaciones que relajaban el requisito de PAM de esa variante Cas9 a NNNRRT (Kleinstiver, Nature 2015; Kim, Nat Biotech, 2016 (doi:10.1038/nbt.3803)). La elección de ese editor de bases hizo posible diseñar un editor de bases con un ARNsg adecuado que convertirá el alelo CD45.1 en el alelo CD45.2 (Fig. 9A). Sin embargo, ese editor de bases solo funcionará para convertir CD45.1 a CD45.2, pero no para la conversión de CD45.2 a CD45.1. Diseñamos editores de bases de adenina hipotéticos (fusiones del editor de bases de adenina con Cas9 SaKKH o Cas9 VQR (Fig. 9B)). Por el contrario, ninguna de las conversiones de alelos CD90 es posible, incluso con la versión del editor de bases actualmente existente.

Métodos

Aislamiento de linfocitos T humanos y anticuerpos

Se aislaron linfocitos T primarios humanos a partir de capas leucocitarias (Blutspendezentrum, Basilea) de donantes sanos utilizando gradiente de densidad Lymphoprep™ (Stemcell Technologies). Los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados se enriquecieron previamente con un kit de enriquecimiento de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados de Easysep Human (Stemcell Technologies) según el protocolo del fabricante. Alternativamente, se usó sangre del cordón umbilical como fuente de PBMCs, sin utilizar la etapa de aislamiento de linfocitos T indiferenciados, dadas las altas frecuencias de los linfocitos T indiferenciados. Las muestras de enriquecimiento de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados pre y post se tiñeron con los siguientes anticuerpos para evaluar la pureza: αCD4-FITC (OKT-4), αCD25-APC (BC96), αCD45RA-BV711 (HI100), αCD45RO-BV450 (UCHL1), αCD62L-BV605 (DREG-56), αCD3-PerCP (HIT3a) y colorante de viabilidad Zombie-UV, todos obtenidos en Biolegend.

En resumen, para 1 capa leucocitaria de 50 ml: preparar 2 tubos Falcon de 50 ml con filtro y añadir 16 ml de Lymphoprep a cada tubo, centrifugar a 300 g durante 1 min. Distribuir la sangre por igual en ambos tubos de filtro de 50 ml y rellenar con PBS hasta 50 ml. Centrifugar a 2000 rpm (aceleración 4, desaceleración 1) durante 15 min. Retirar un poco de suero y desecharlo. Colocar con cuidado las capas leucocitarias blancas en un tubo Falcon nuevo de 50 ml. Añadir PBS estéril a la fracción de PBMCs enriquecida hasta aproximadamente 50 ml y centrifugar a 300 g durante 5 minutos. Desechar el material sobrenadante y resuspender el sedimento con 10 ml de PBS y completar hasta 50 ml y centrifugar a 300 g durante 5 min. Lisar los glóbulos rojos, si es necesario, con tampón de lisis de glóbulos rojos,

antes de la etapa de purificación.

Protocolo de transfección de linfocitos T humanos

Se utilizaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados o PBMCs totales de sangre o sangre de cordón umbilical para la transfección. Para la activación de linfocitos T, se sembraron 2x10⁶ células en una placa de 24 pocillos (Corning) recubierta con anticuerpos monoclonales (AcMos) α-CD3 (clon de hibridoma OKT3, 5 (*alto*), 2,5 (*medio*), 1 (*bajo*) μg/ml) y α-CD28 (clon de hibridoma CD28, 2,5 (*alto*), 1 (*medio*), 0,5 (*bajo*) μg/ml, ambos de Biolegend) durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂ en presencia de 50 UI/ml de interleucina-2 humana recombinante (rhIL-2) (RD systems). Después de 24 h, se recogieron los linfocitos T y se lavaron con PBS. Se sometieron a electroporación 2x10⁶ linfocitos T activados con el sistema de transfección Amaxa, programa T-020 (para plásmidos) o usando el sistema de transfección Neon[®] (ThermoFisher) con las siguientes condiciones: voltaje (1600 V), ancho (10 ms), pulsos (3), punta de 100 μl, tampón R (para RNPs). Las células se transfectaron con 65 μg de plásmido vacío px458 (número de plásmido Addgene: 48138) o de complejo ARNcr:tracerARN-Atto 550 (IDT) y Cas9 (Berkeley). Después de la electroporación, las células se sembraron en placas de 24 pocillos en 650 μl de medio completo con 50 UI de rhIL-2/ml en presencia de AcMos unidos a la placa con la mitad de las concentraciones utilizadas para la activación inicial, es decir, anti-CD3 (2,5, 1,25, 0,5 μg /ml) y anti-CD28 (1,25, 0,5, 0,25 μg/ml). La expresión de las células GFP⁺ o Atto550⁺ se evaluó 24 h después utilizando el analizador Fortessa (BD Biosciences).

Experimento de agotamiento de CD45.2

Se aislaron linfocitos T CD4⁺ de ratones C57BL6 (CD45.2) y ratones congénicos C57BL6 (CD45.1) utilizando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ de ratón de EasySep (Stem cell Technologies). Se reconstituyeron los ratones RAG KO con una relación 1:1 de 10x10⁶ linfocitos T CD4⁺ CD45.2 y CD45.1 del donante. El mismo día de la transferencia de linfocitos T, los ratones también recibieron inyecciones intraperitoneales de PBS (grupo no tratado) o un Ac α-CD4 para agotar (clon GK1.5, 250 μg) durante 3 días consecutivos. Las inmunotoxinas CD45.2-ZAP se prepararon combinando el anticuerpo biotinilado de CD45.2 (160 kDa de PM, Biolegend) con un conjugado de estreptavidina-SAP (2,8 moléculas de saporina por cada estreptavidina, 135 kDa de PM, Advanced Targeting Systems) en una relación molar de 1:1 y posteriormente diluido en PBS inmediatamente antes del uso, igual que como se describe en la publicación inicial: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5179034/>). La administración *in vivo* de inmunotoxina o el control con anticuerpo de CD45.2 no conjugado se realizó mediante inyecciones intravenosas. Una semana después, se recogió sangre, ganglios linfáticos periféricos (LN), ganglios linfáticos mesentéricos (mesLN) y bazo (SP) y las células se tiñeron con los siguientes AcMos conjugados con fluorocromo: anti-CD45.2 (104), anti-CD45.1 (A20), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD3 (145-2C11), todos de Biolegend. Las muestras se adquirieron en BD Fortessa (BD Biosciences) y se analizaron con el programa informático FlowJo (Tree Star).

REIVINDICACIONES

1. Una célula hematopoyética humana, que expresa una primera isoforma de una proteína de superficie, en donde dicha primera isoforma de dicha proteína de superficie es funcionalmente indistinguible, pero inmunológicamente distinguible de una segunda isoforma de dicha proteína de superficie, para uso en un tratamiento médico de un paciente humano que tiene células que expresan dicha segunda isoforma de dicha proteína de superficie, en donde dicha célula se administra antes, de forma concomitante o después de una eliminación específica de las células que expresan dicha segunda isoforma de dicha proteína de superficie, en donde dicha eliminación de las células que expresan dicha segunda isoforma de dicha proteína de superficie se realiza mediante la administración a dicho paciente de un anticuerpo, en donde dicho anticuerpo es específicamente reactivo con dicha segunda isoforma pero no con dicha primera isoforma de dicha proteína de la superficie celular y en donde dicho tratamiento comprende cambiar una secuencia que codifica dicho gen de la proteína de superficie en el ADN genómico natural del paciente mediante edición génica de modo que se obtiene una primera isoforma que tiene una inserción, delección y/o sustitución de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos en comparación con dicha segunda isoforma de dicha proteína de superficie.
2. La célula humana para uso en un tratamiento médico según la reivindicación 1, en donde dicha proteína de superficie se selecciona a partir de
- CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15u, CD15s, CD15su, CD16, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RC, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85a, CD85d, CD85j, CD85k, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD99R, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158e, CD158i, CD158k, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD167b, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CD199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210b, CD212, CD213a1, CD213a2, CD215, CD217a, CD218a, CD218b, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240CE, CD240DCE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD252, CD253, CD254, CD256, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD286, CD289, CD290, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300a, CD300c, CD300e, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD308, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD350, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370, CD371, BCMA, una cadena ligera de inmunoglobulina (lambda o kappa), una proteína de HLA y β 2-microglobulina,
- en particular en donde dicha proteína de superficie se selecciona a partir de CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD20, CD22, CD23, CD33, CD34, CD90, CD45, CD123, BCMA, una cadena ligera de inmunoglobulina (lambda o kappa), una proteína de HLA y β 2-microglobulina.
3. La célula humana para uso en un tratamiento médico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha primera isoforma no está codificada por el ADN genómico natural del paciente.
4. La célula humana para uso en un tratamiento médico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha célula humana se selecciona a partir del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+, un linfocito T de memoria, un linfocito T regulador (T reg), un linfocito citolítico natural (NK), una célula linfoide innata (ILC), una célula dendrítica (DC), un linfocito B, un linfocito T invariante asociado a las mucosas (MAIT) y un linfocito T gamma delta ($\gamma\delta$ T), en particular una célula madre hematopoyética o un linfocito T.
5. La célula humana para uso en un tratamiento médico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho tratamiento médico comprende un trasplante de células madre hematopoyéticas.

Fig. 1

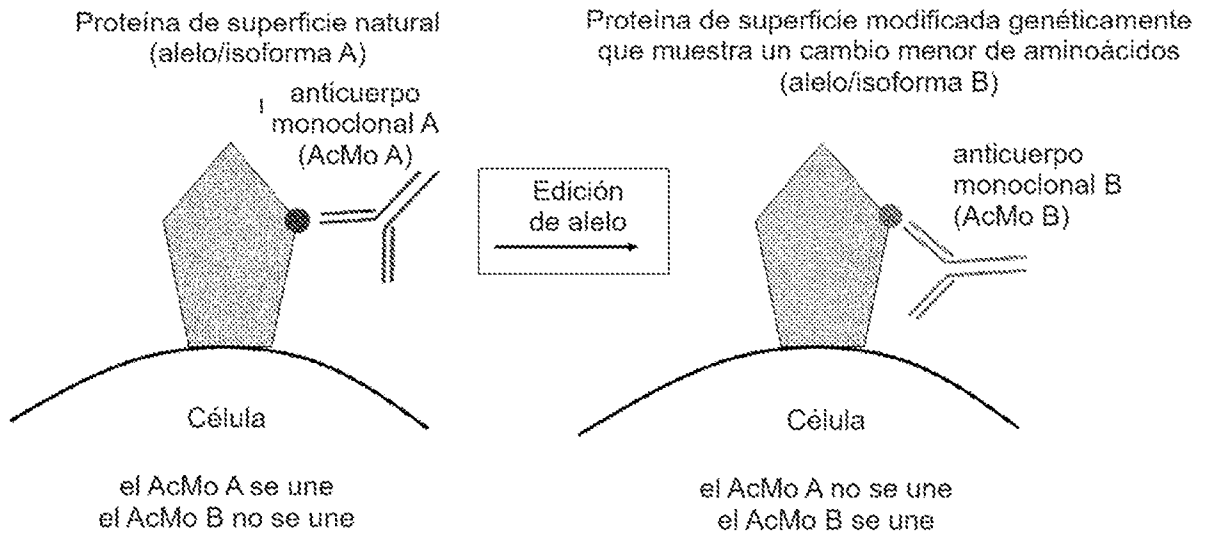


Fig. 2

Problema: Los productos celulares sin característica de seguridad no se pueden controlar después de la transferencia

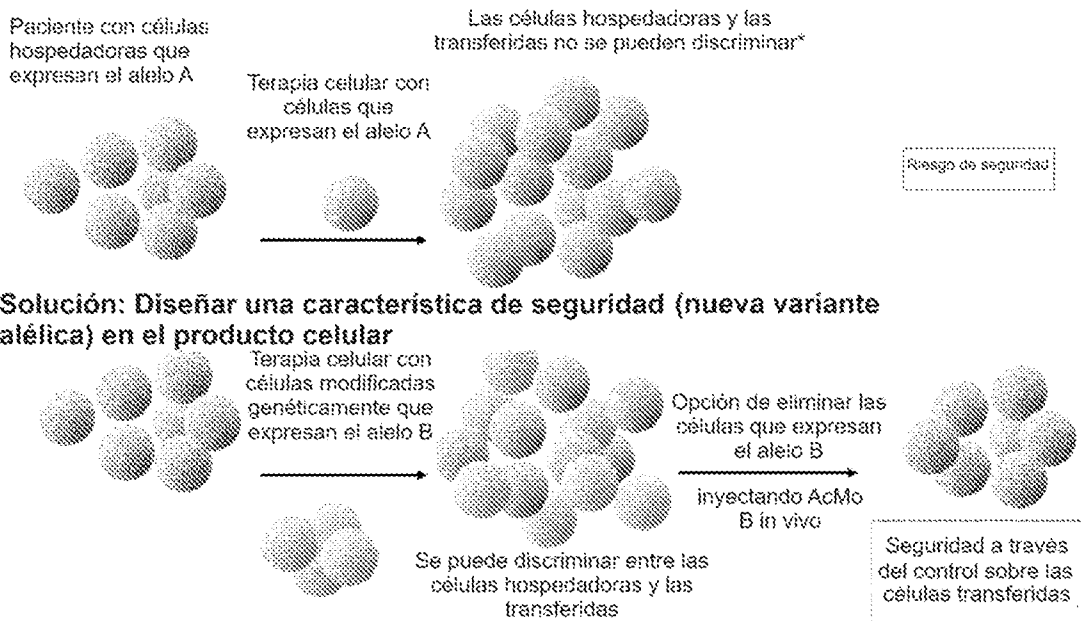


Fig. 3

A) Dos isoformas de CD90 difieren en 1 nucleótido

Diferencia genómica: 1 nt

```

CD90.1 TTTTGTGAGCTTCTGCTCCGGTCGCCGAATCCCATGAGCTCCCAATAAAAGTATCAGT
CD90.2 TTTTGTGAGCTTCTGCTCCGGTCGCCGAATCCCATGAGCTCCCAATAAAAGTATCAGT
    
```

B) Las isoformas CD90.1 y CD90.2 se pueden discriminar con dos AcMos específicos

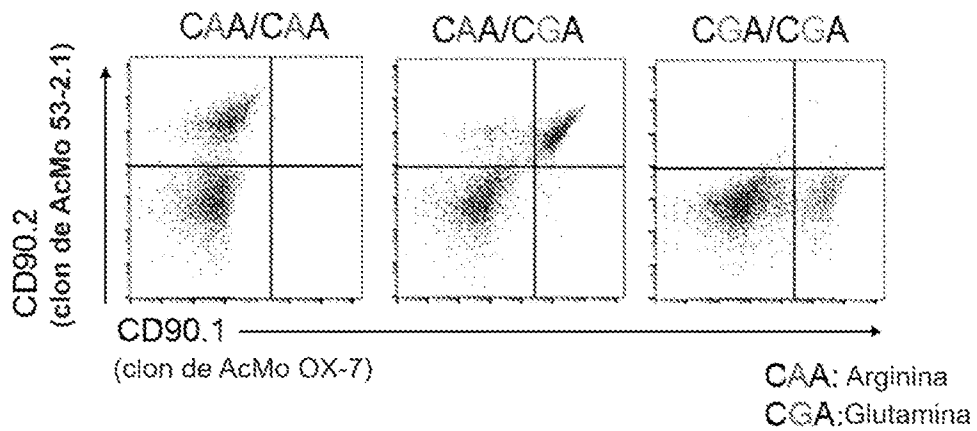


Fig. 4

Edición de alelos en linfocitos T primarios

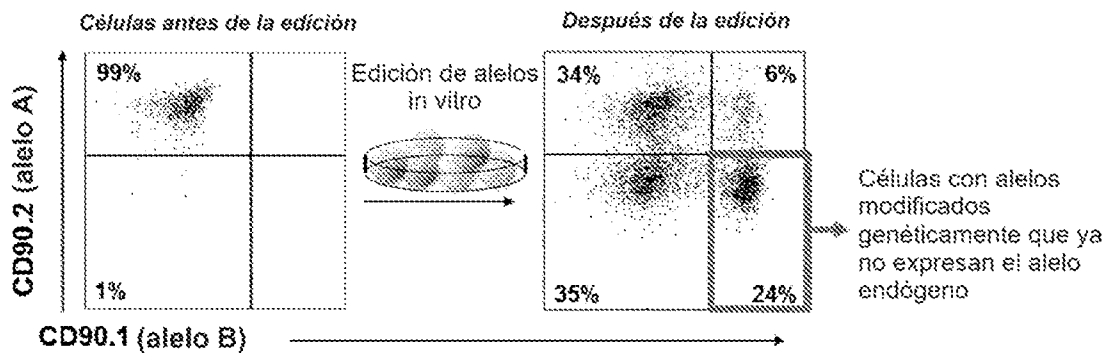


Fig. 5

A) Dos isoformas de CD45 difieren en 1 nucleótido

CD45.2 AAAAGGCTAATACTTCAATTTGTTTGGAGTGGAAAACA^AAAAACCTTGATTTTCAGAAAATGCA
CD45.1 AAAAGGCTAATACTTCAATTTGTTTGGAGTGGAAAADAG^AAAAACCTTGATTTTCAGAAAATGCA

B) Conversión de CD45.2 en CD45.1 (edición de alelos en linfocitos T primarios)

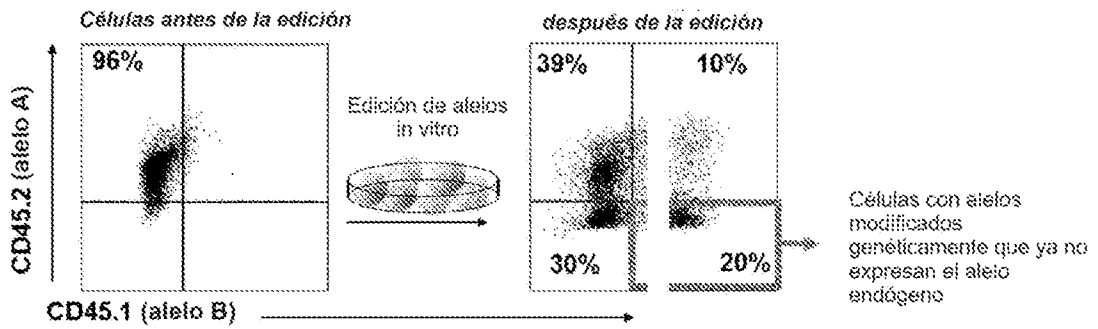


Fig. 6

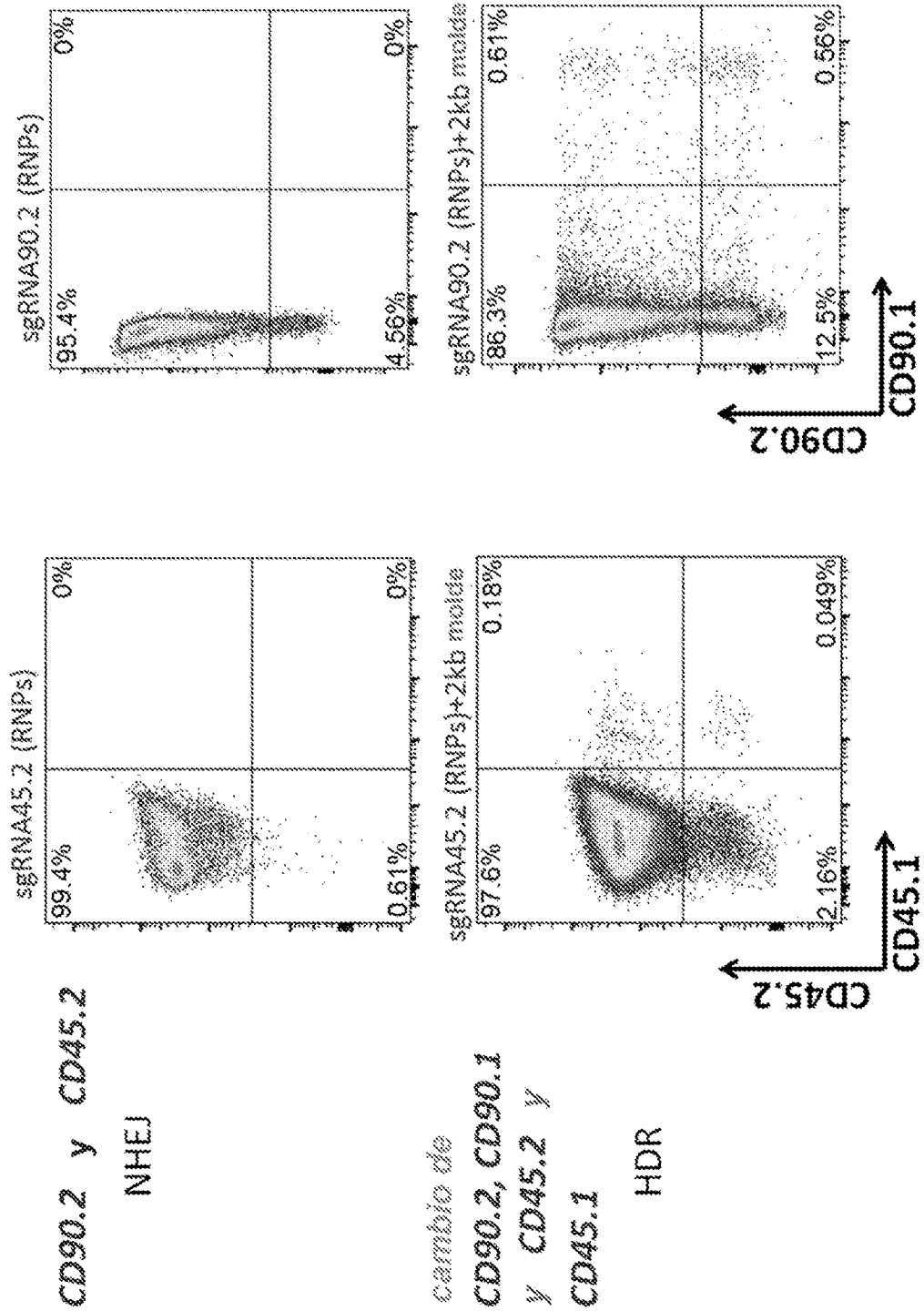


Fig. 7

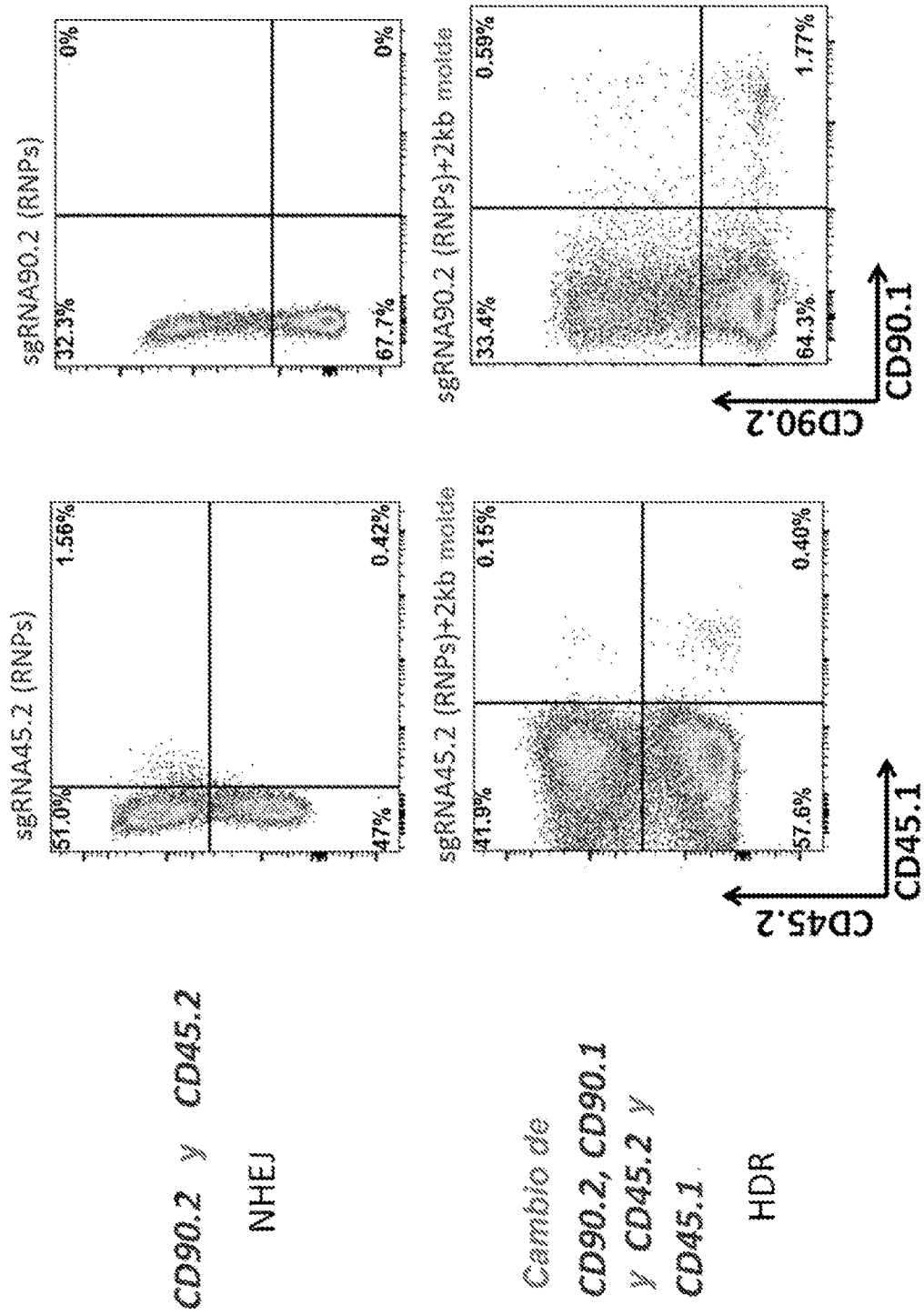


Fig. 8

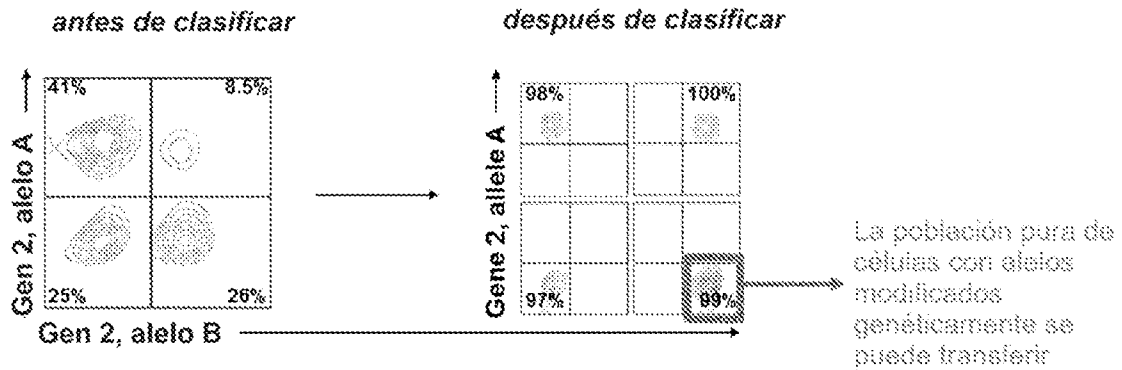
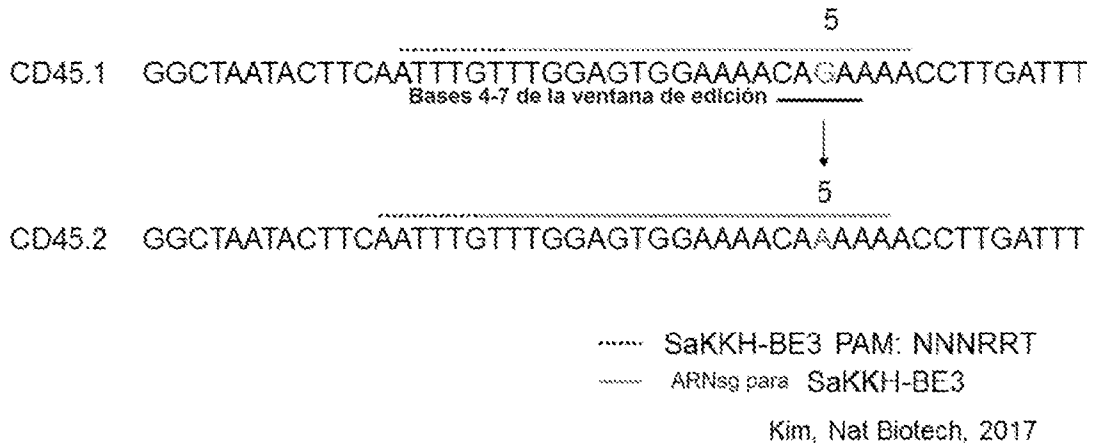


Fig. 9

A) Conversión de CD45.1 a CD45.2



B) Conversión de CD45.2 a CD45.1

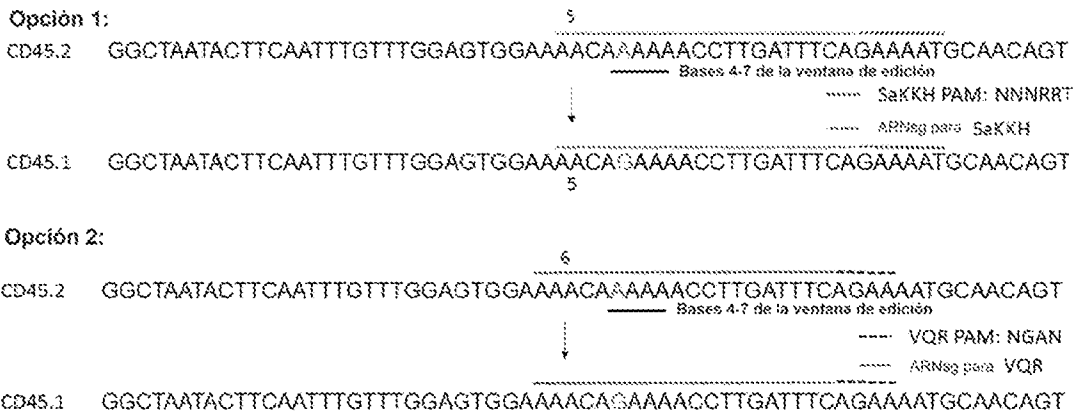


Fig. 10

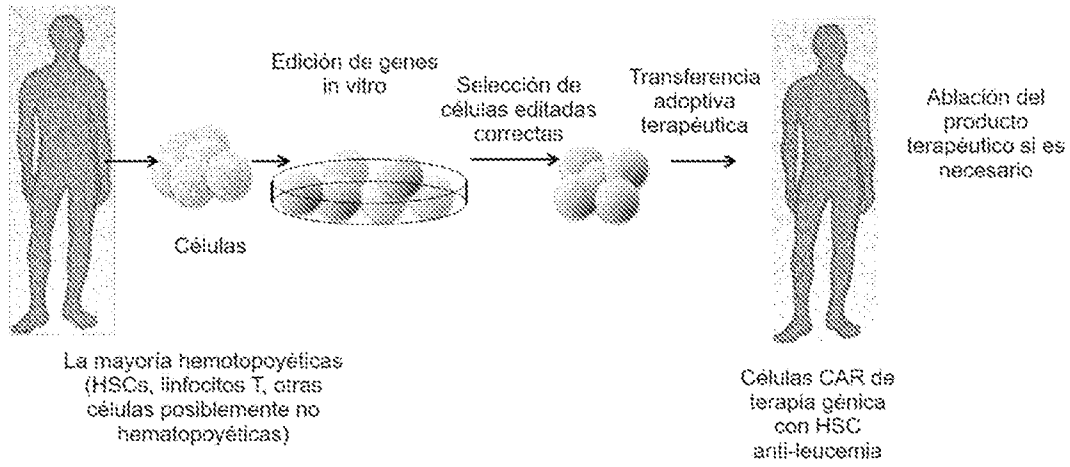
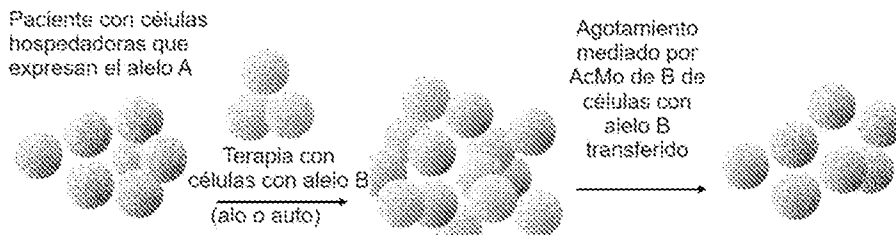


Fig. 11

A) Característica de seguridad (p. ej., células con genes corregidos, células con receptor de antígeno quimérico (CAR)):



B) Ablación de células hospedadoras patógenas que ahorran el producto terapéutico (células)



Fig. 12

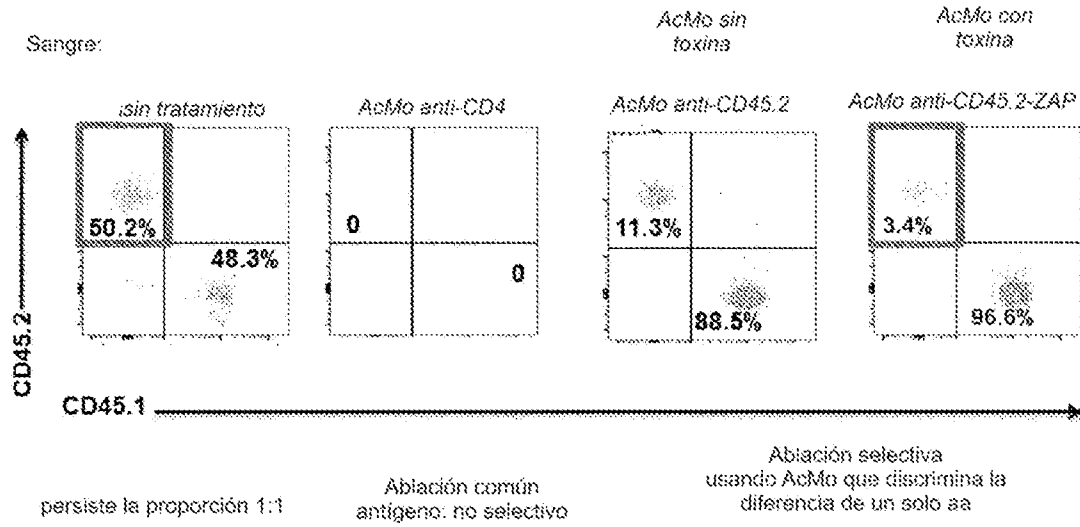


Fig. 13

Sangre:

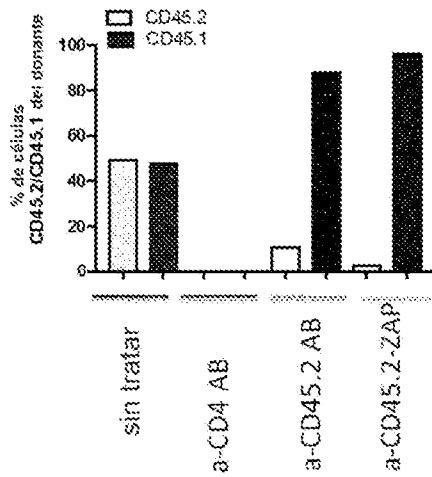


Fig. 14

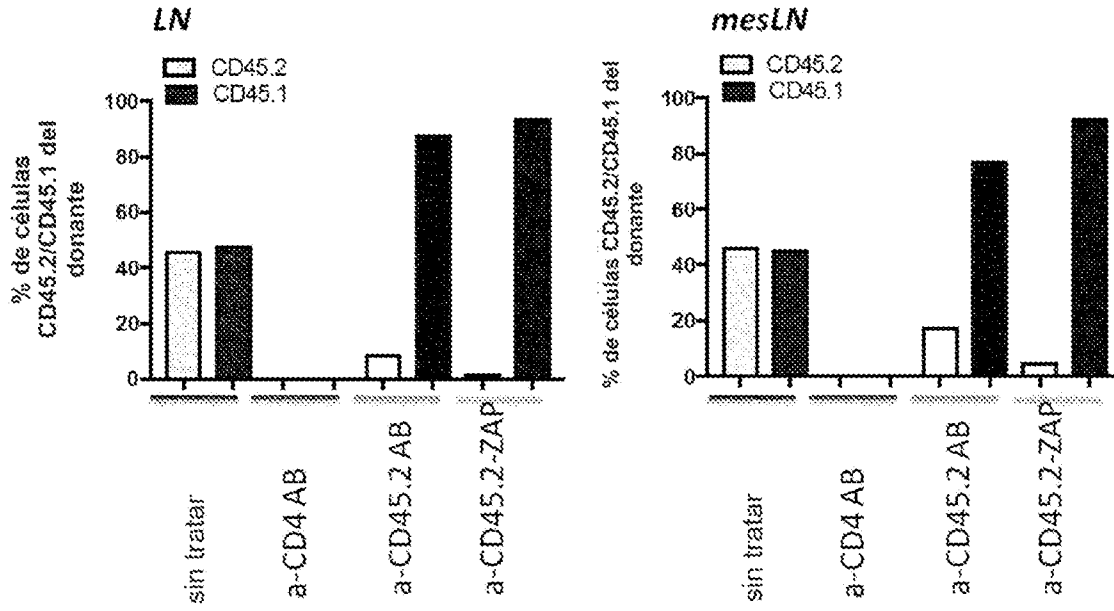


Fig. 15

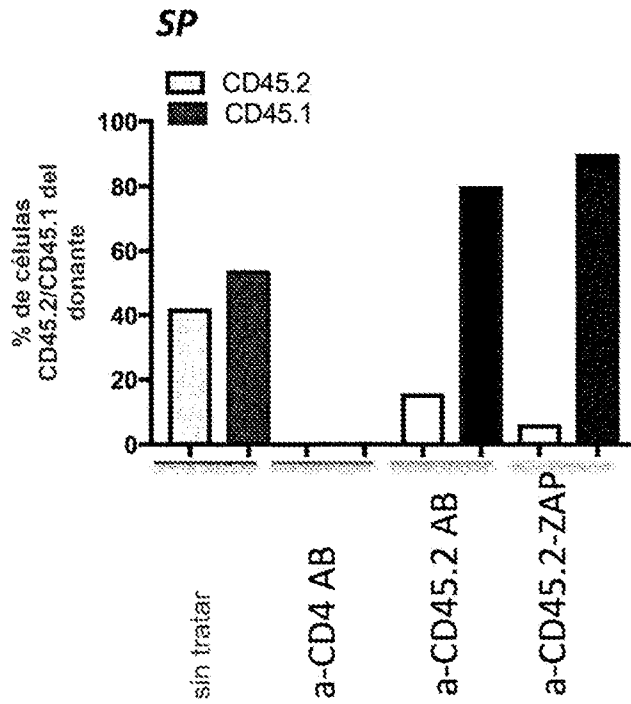


Fig. 16

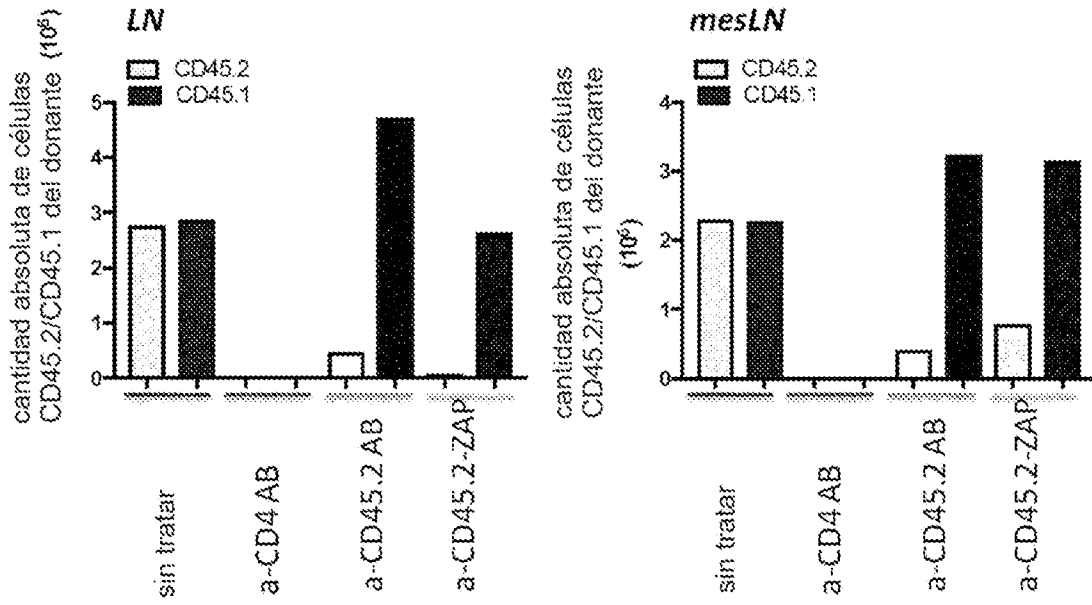


Fig. 17

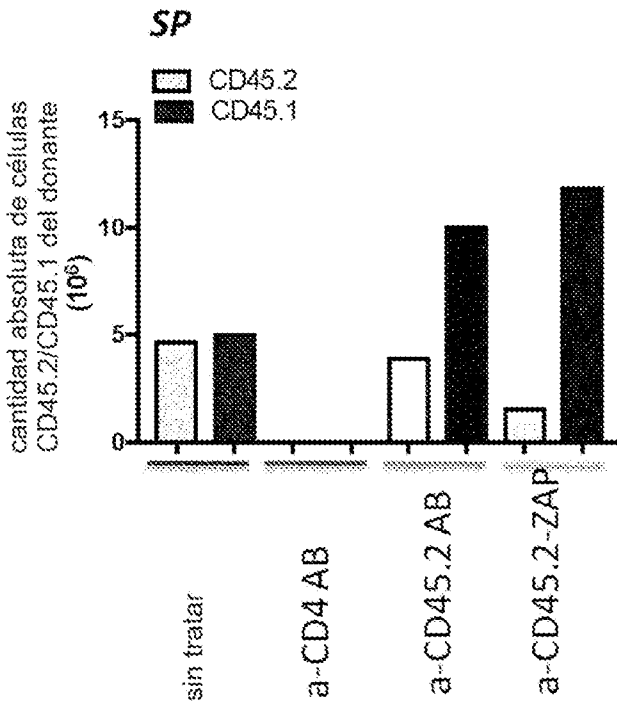


Fig. 18

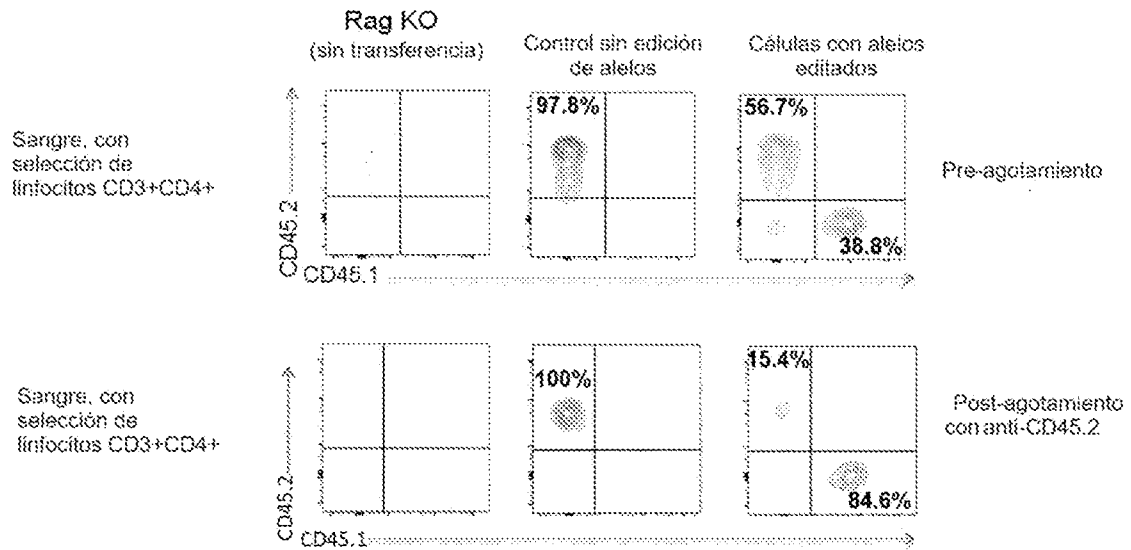


Fig. 19

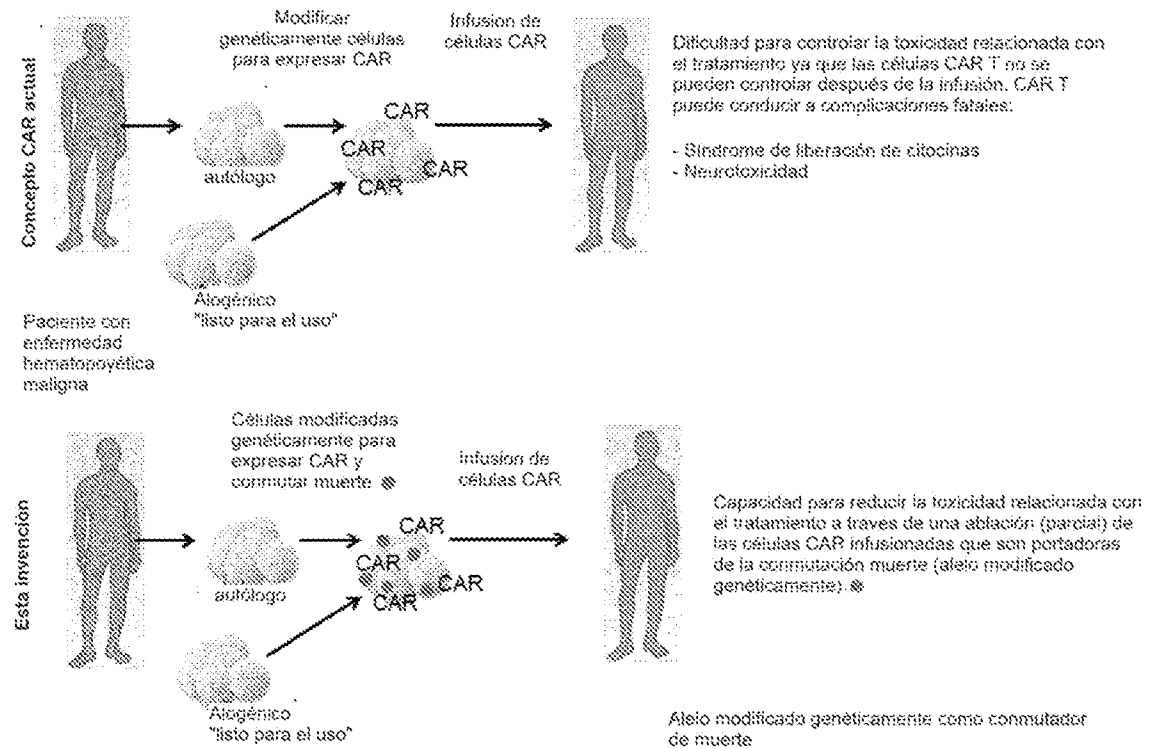


Fig. 20

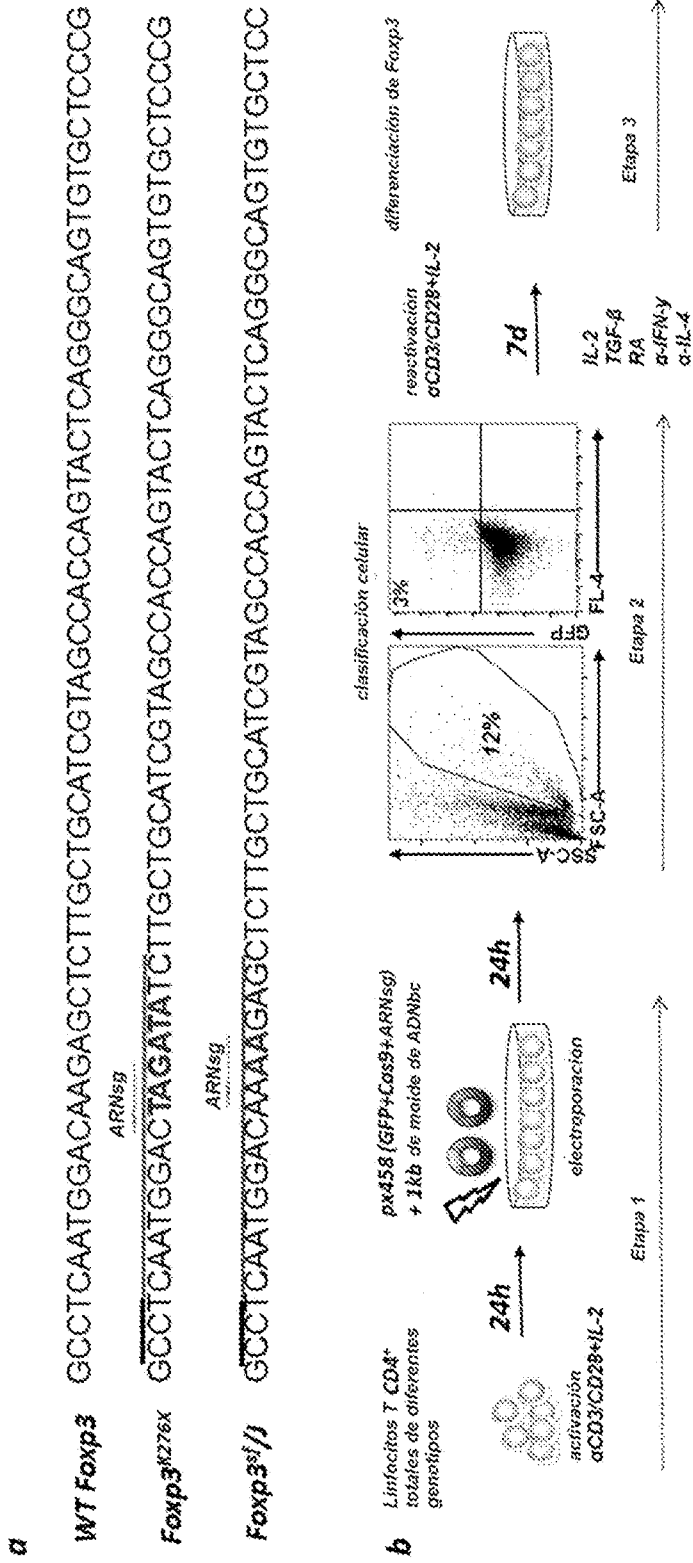


Fig. 20 (continuación)

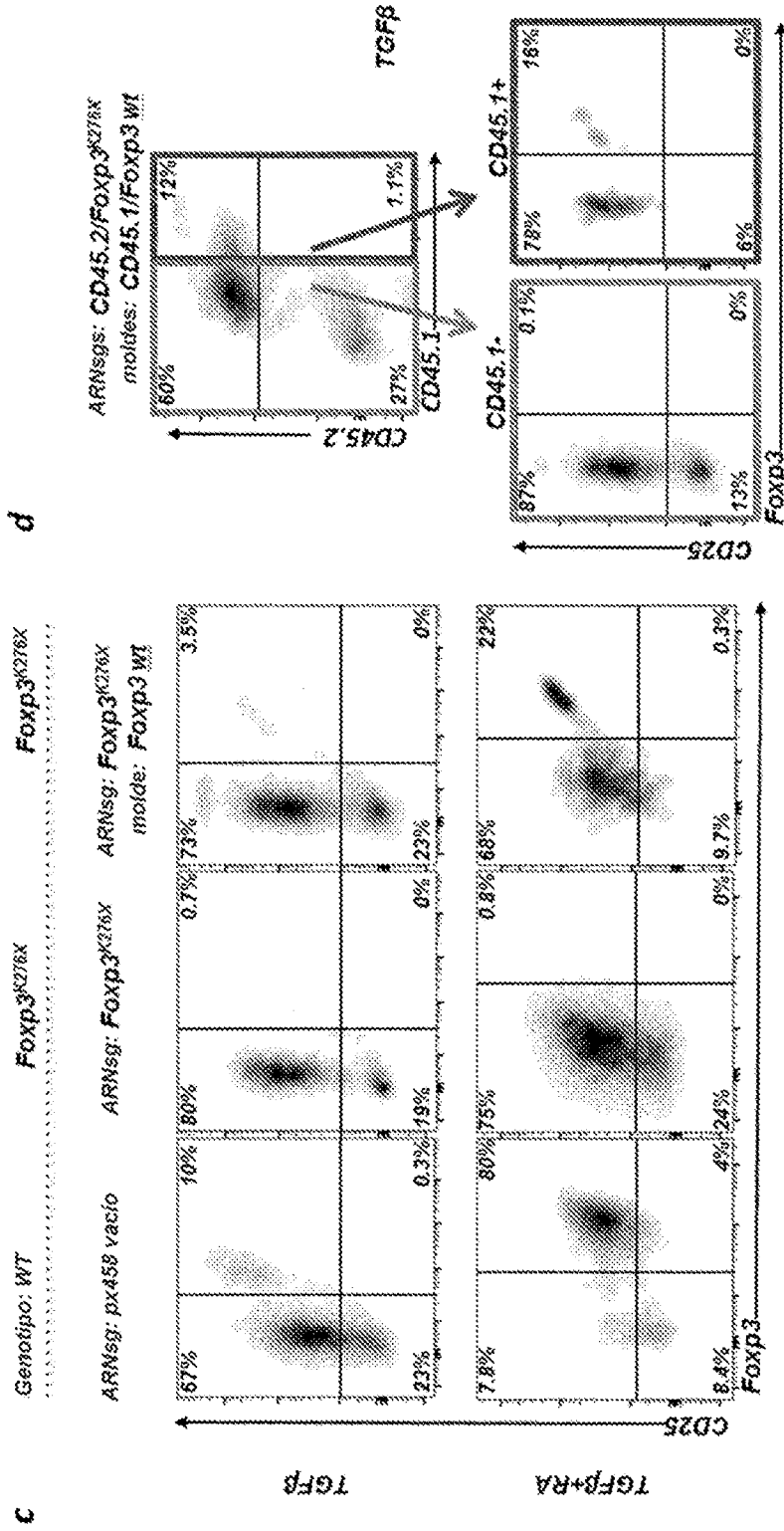


Fig. 21

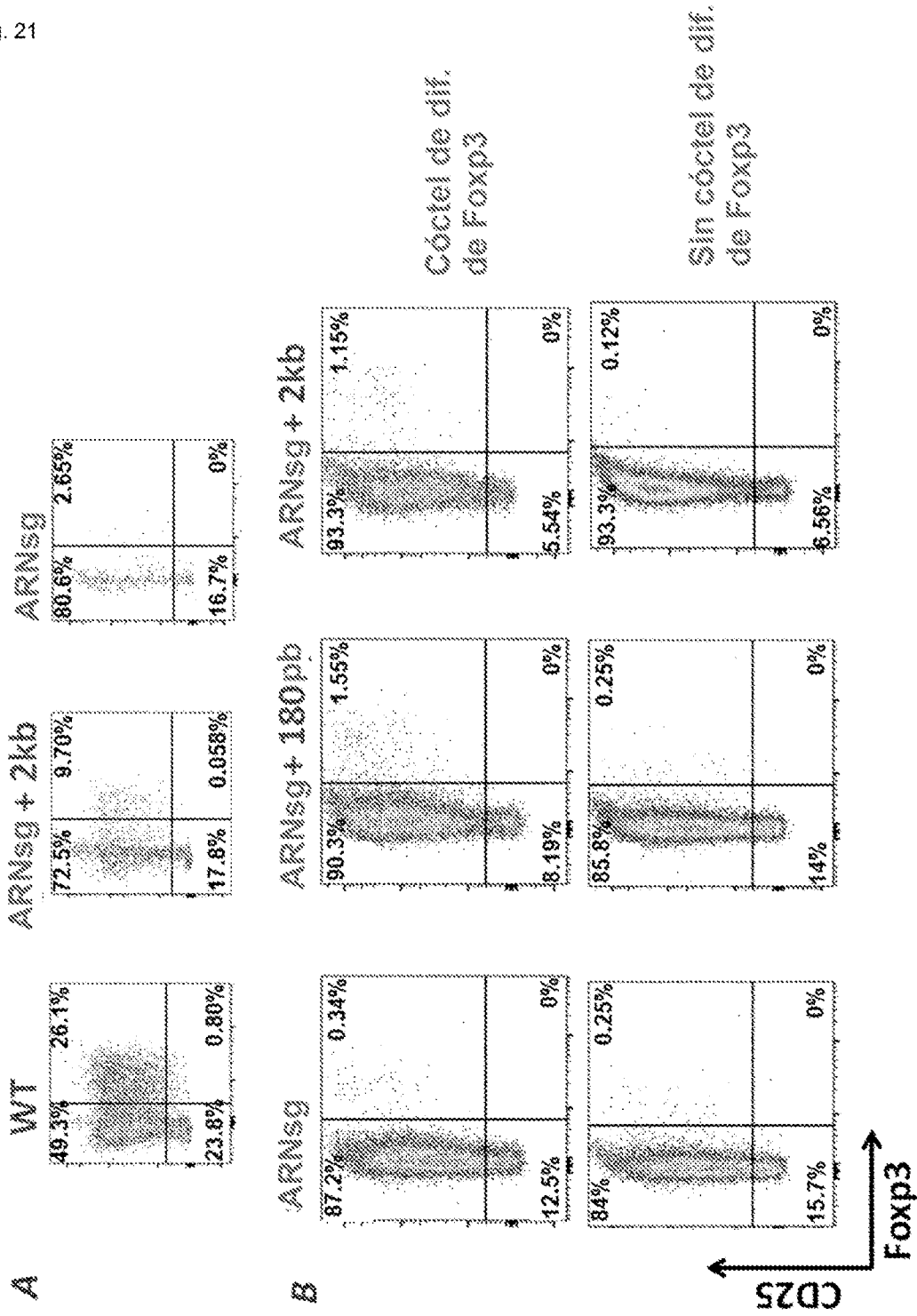


Fig. 22

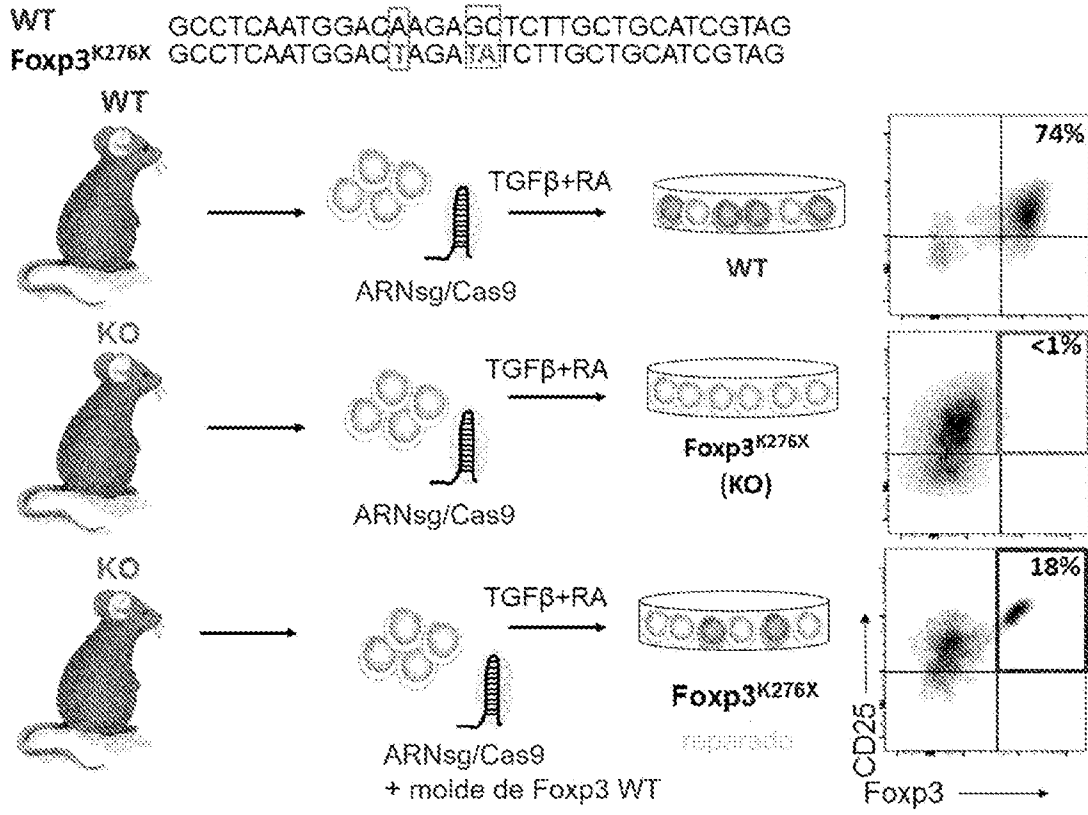
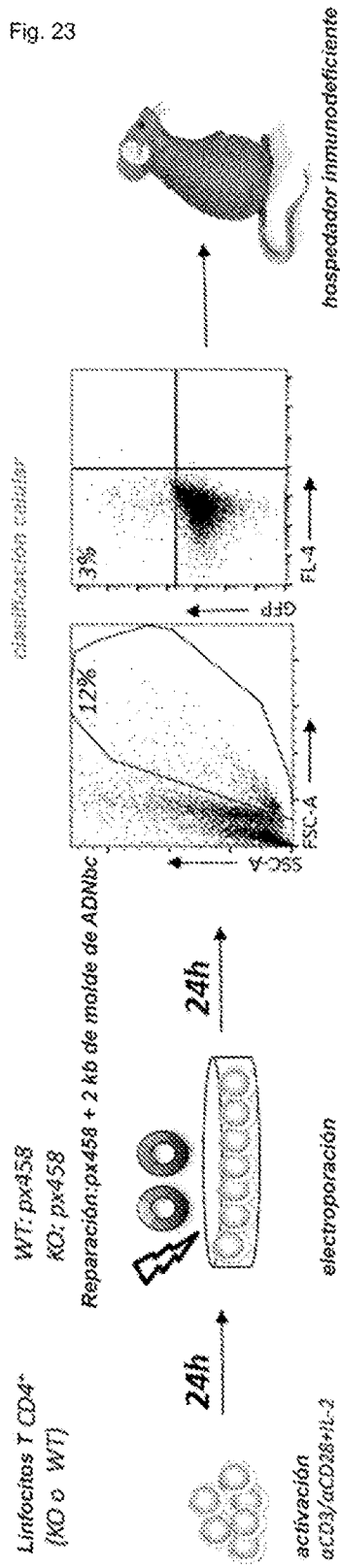


Fig. 23



✓ Terapia con IL-2

1ª FASE:

3 inyecciones posteriores



FASE DE MANTENIMIENTO:

2x inyecciones por semana



✓ Mediciones del peso cada 2 semanas

Fig. 24

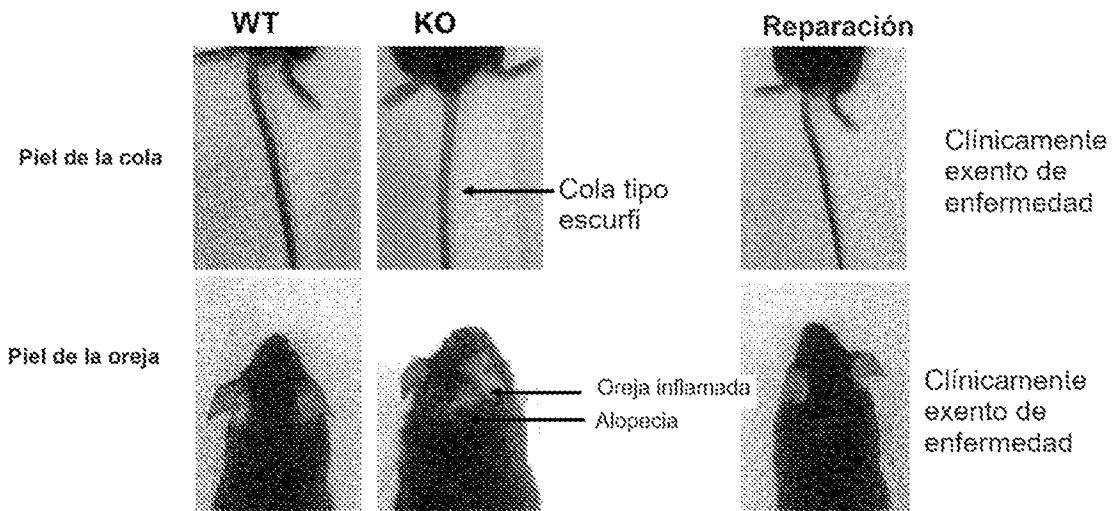
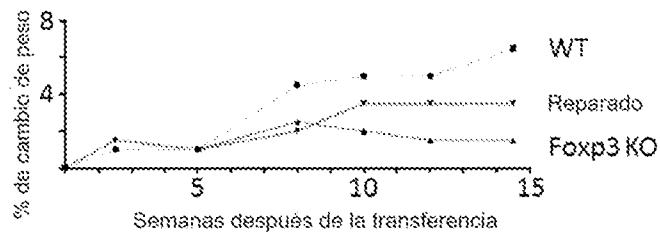


Fig. 25

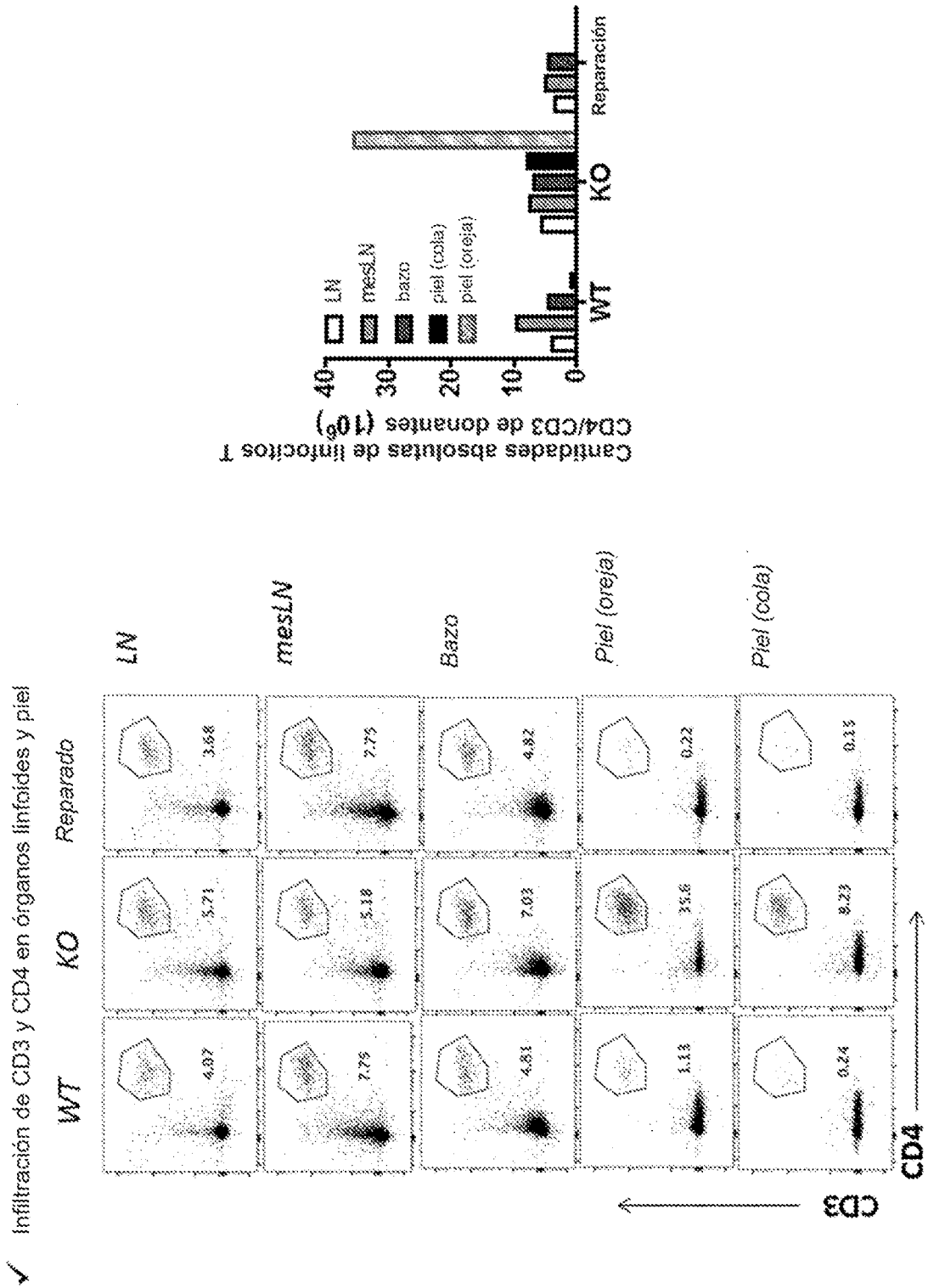


Fig. 26

✓ Presencia de linfocitos T_{reg} CD25/Foxp3⁺

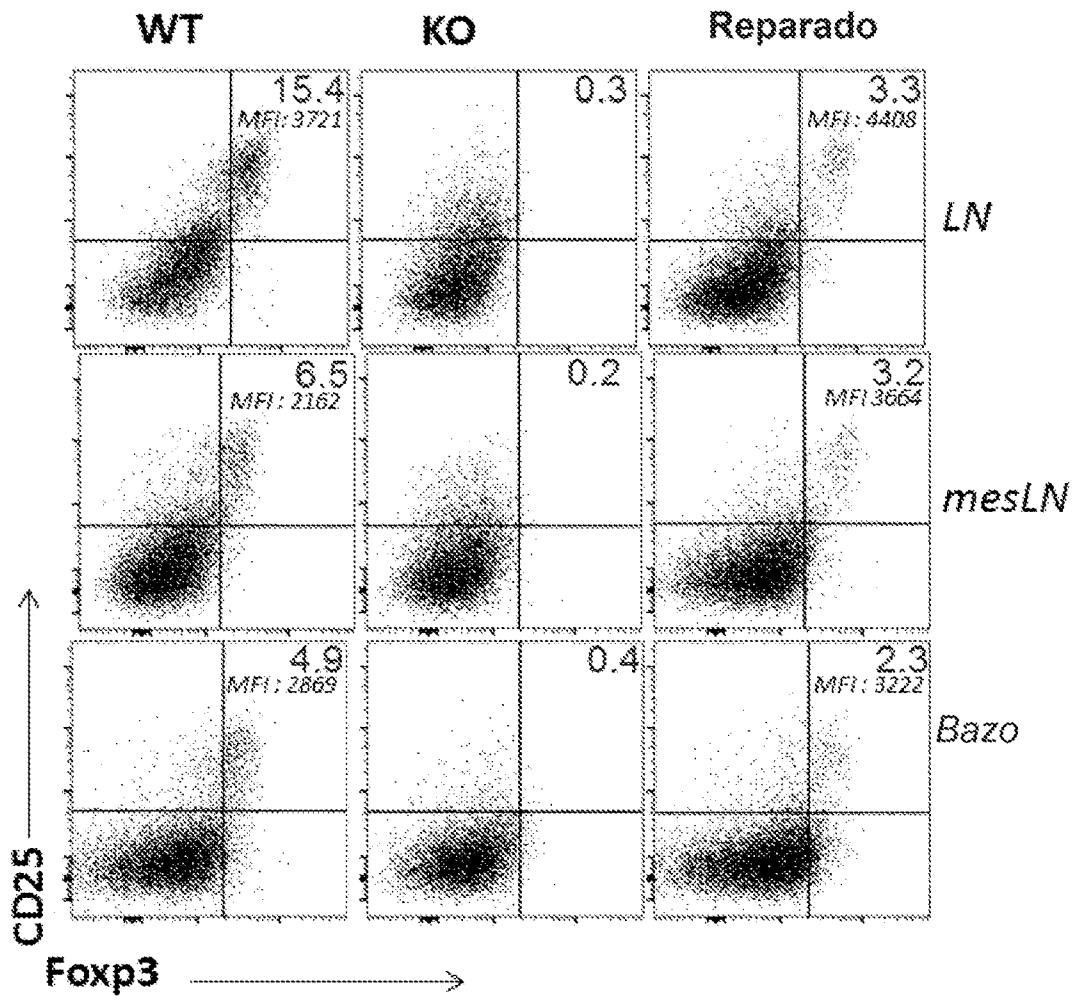


Fig. 27

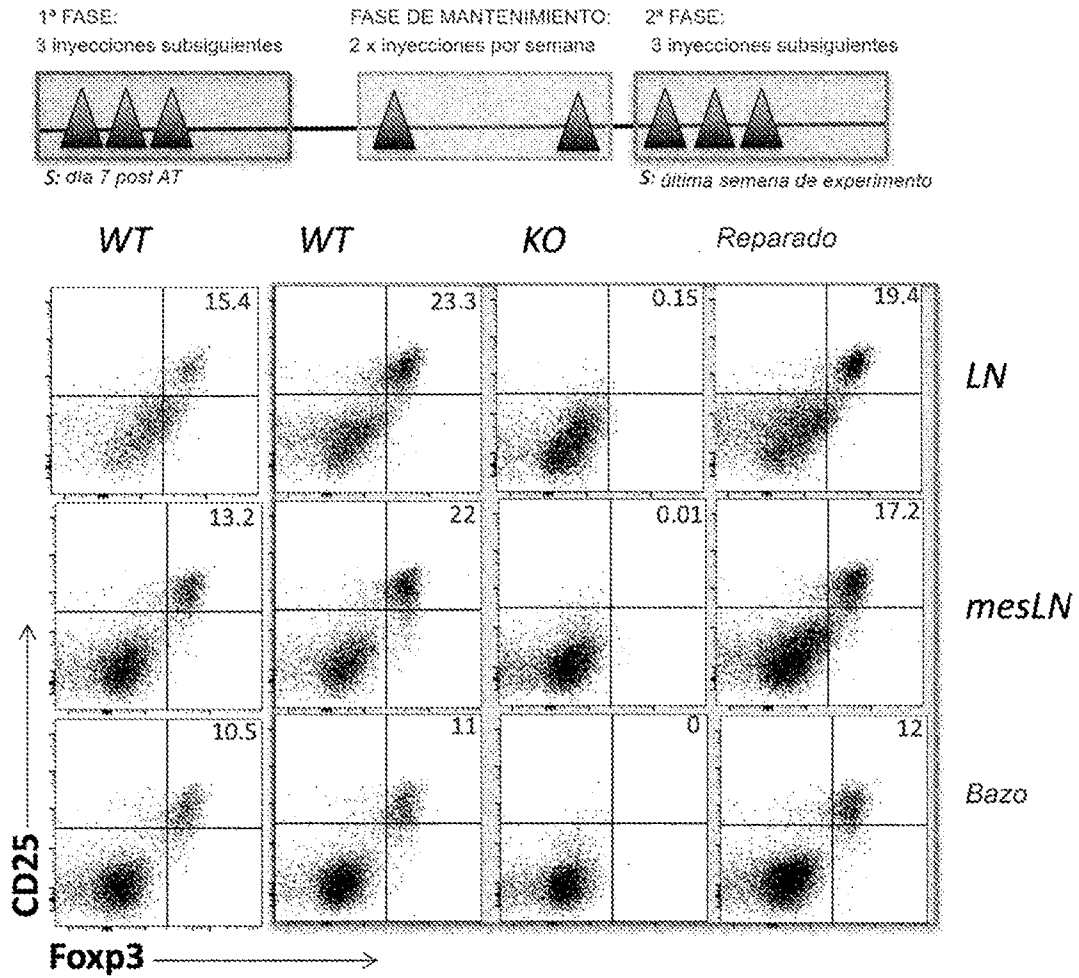


Fig. 28

✓ Linfocitos Treg reparados expresan niveles similares a los de linfocitos Treg asociados a las moléculas de superficie

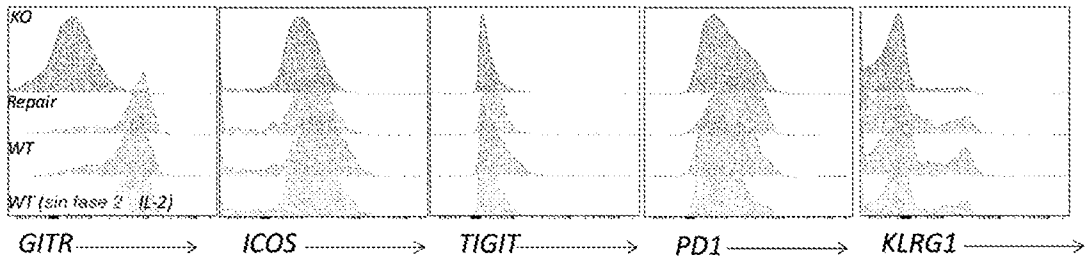


Fig. 29

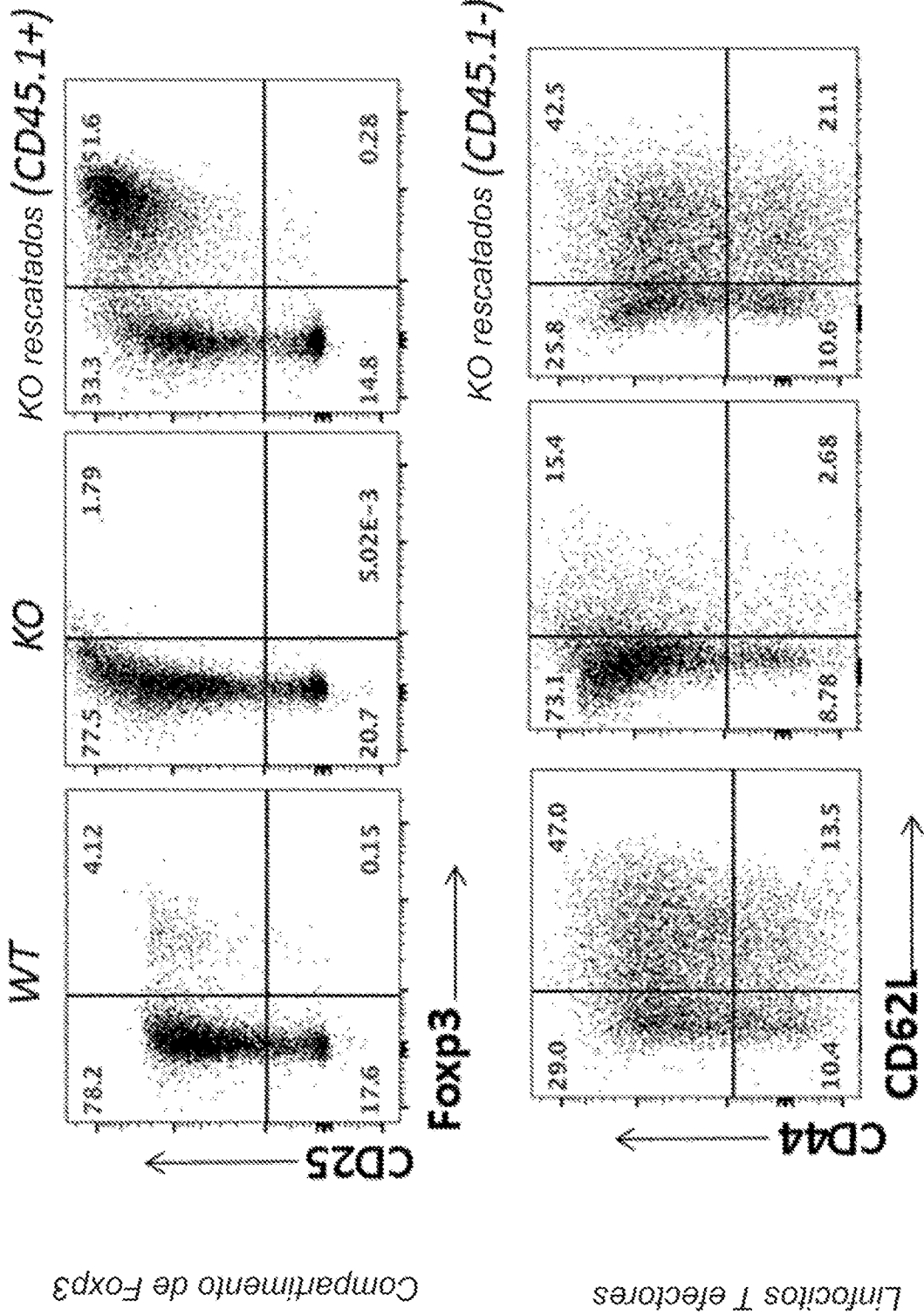


Fig. 30

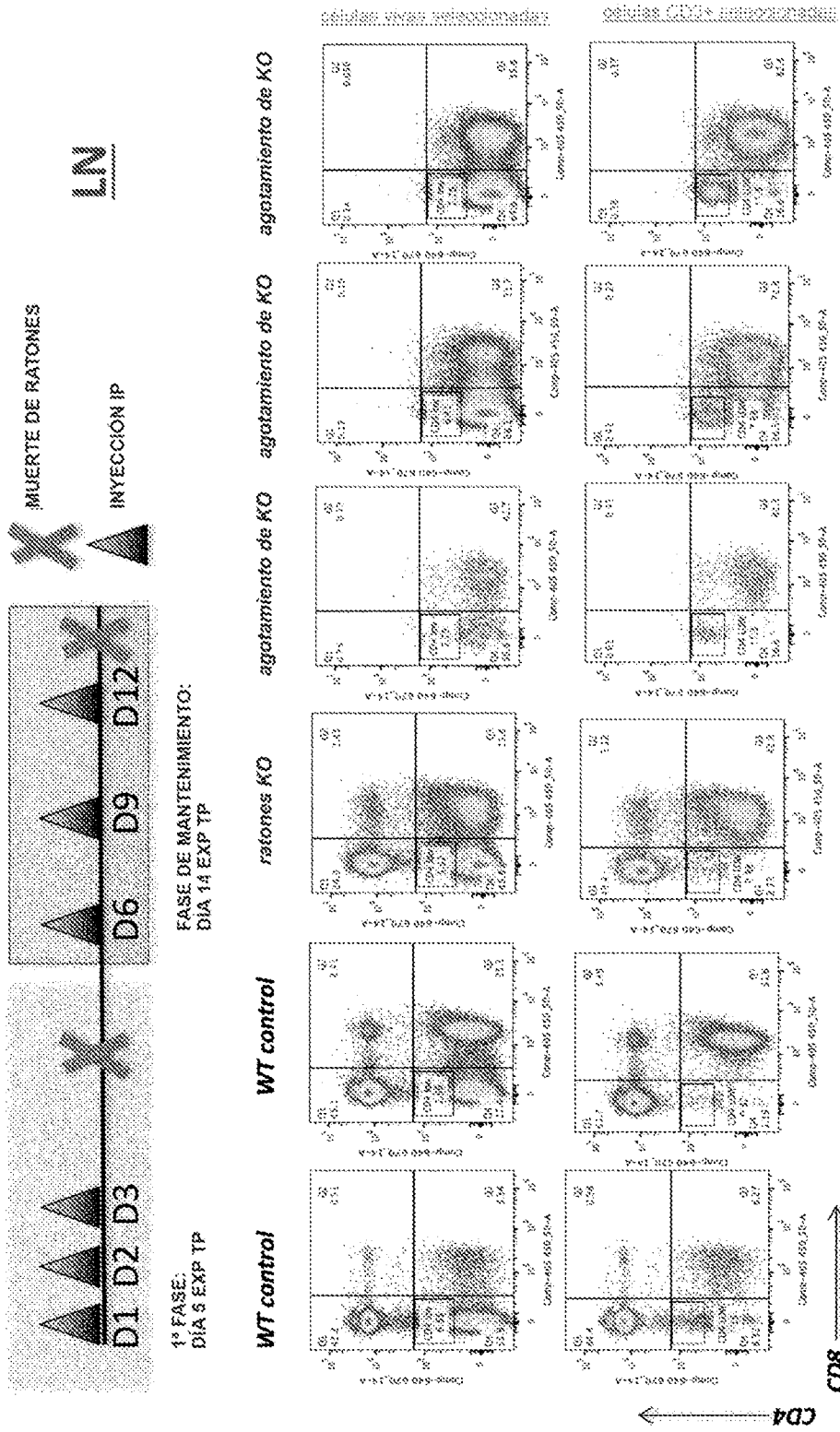


Fig. 31

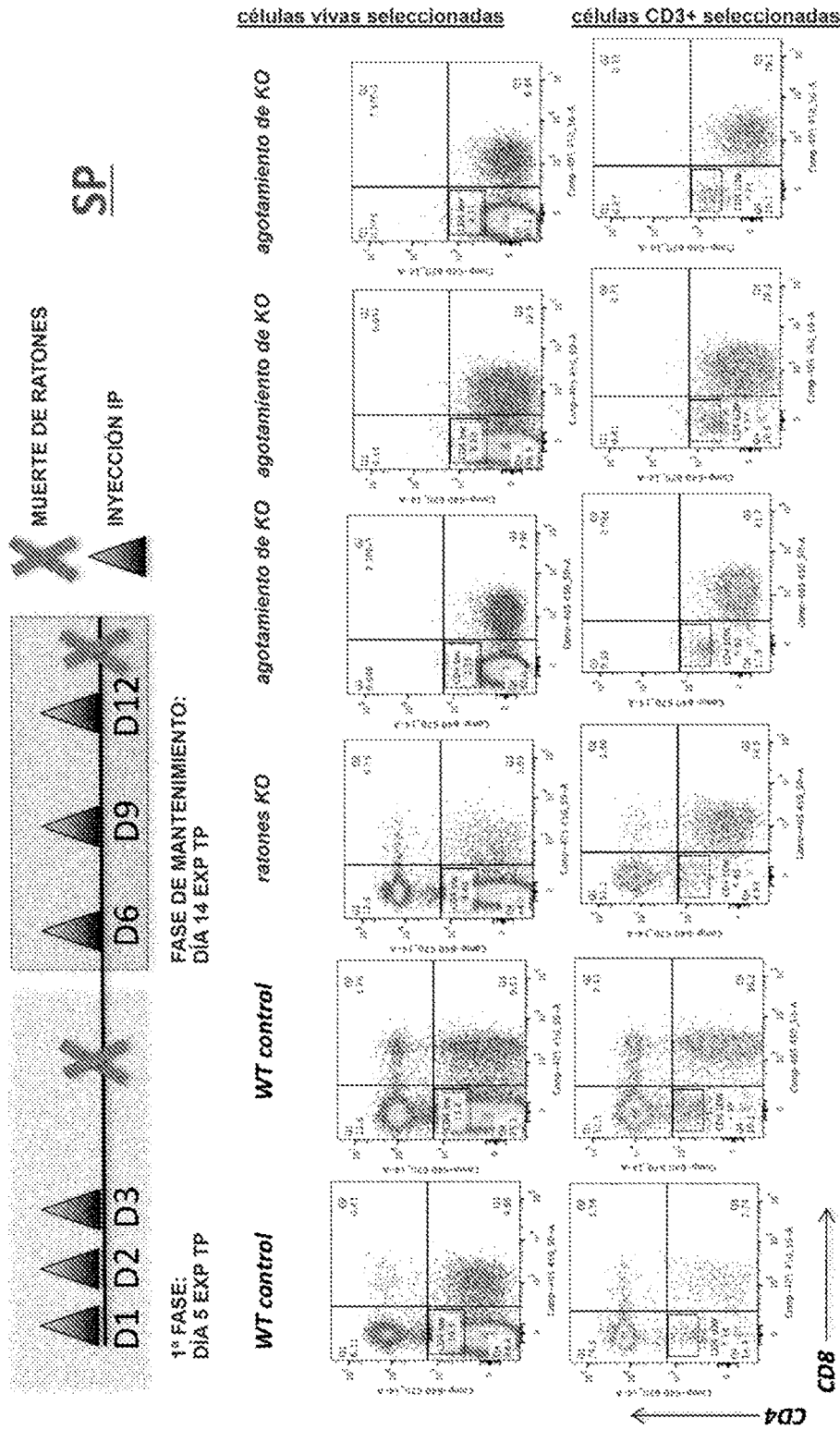


Fig. 32

