

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 268**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2021** **PCT/IB2021/058704**
87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2022** **WO22064428**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2021** **E 21787042 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2024** **EP 4176048**

54 Título: **Las células T genéticamente manipuladas con interrupción de regnasa-1 y/o TGFBR11 tienen funcionalidad y persistencia mejoradas**

30 Prioridad:

23.09.2020 US 202063082357 P
11.12.2020 US 202063124429 P
26.07.2021 US 202163225673 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2024

73 Titular/es:

CRISPR THERAPEUTICS AG (100.00%)
Baarerstrasse 14
6300 Zug, CH

72 Inventor/es:

DEQUEANT, MARY-LEE;
KALAITZIDIS, DEMETRIOS y
GHONIME, MOHAMMED

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 993 268 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

Las células T genéticamente manipuladas con interrupción de *regnasa-1* y/o *TGFBR11* tienen funcionalidad y persistencia mejoradas

Antecedentes de la invención

La terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) usa células T genéticamente modificadas para dirigirse a y destruir células cancerosas de forma más específica y eficaz. Después de haber recogido células T de la sangre, las células se manipulan para incluir CAR en su superficie. Los CAR se pueden introducir en las células T usando tecnología de edición génica CRISPR/Cas9. Cuando estas células CAR T alogénicas se inyectan en un paciente, los receptores permiten que las células T destruyan células cancerosas.

Las células T que tienen persistencia mejorada en cultivo son deseadas en terapia de CAR T. Tales células T viven más tanto *in vitro* como *in vivo*, confiriendo de esta manera beneficios en la fabricación y aplicaciones clínicas de células CAR T. Sin embargo, permanece desafiante mejorar la persistencia de células T en cultivo.

Wei et al. 2019 ("Targeting REGNASE-1 programs long-lived effector T cells for cancer therapy." *Nature* 576.7787 (2019): 471-476) divulga que células T CD8⁺ con *Reg1* interrumpido mostraron efectos antitumorales más fuertes que las células de tipo salvaje, indicado por análisis de supervivencia de ratones y carga tumoral; véanse la figura 2e y 2f, página 247 de Wei et al. 2019.

El documento WO 2019/089884 divulga el uso del sistema de edición génica CRISPR/Cas para dirigirse al gen *TGFBR11* en células T, por ejemplo, atenuando o inactivando la expresión de *TGFBR11*; véanse los párrafos [0005], [0009] y [0013] del documento WO 2019/089884.

Compendio de la invención

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el desarrollo de células T genéticamente editadas que portan un gen *Regnasa 1* (*Reg1*) interrumpido (por ejemplo, "células T con *Reg1* inactivado"), y un gen *TGFBR11* interrumpido (por ejemplo, "células T con *TGFBR11* inactivado"), por ejemplo, células T genéticamente editadas que portan tanto un gen *Reg1* interrumpido como un gen *TGFBR11* interrumpido.

Tales células T genéticamente manipuladas muestran al menos una de las siguientes características ventajosas: (a) actividad de crecimiento celular mejorada; (b) persistencia aumentada; (c) agotamiento de células T reducido; (d) resistente a efectos inhibidores inducidos por TGF- β ; (e) capacidad de destruir células aumentada; y (f) resistente a los efectos inhibidores por fibroblastos y/o factores inhibidores secretados por ellos.

Las células T con doble interrupción *Reg1/TGFBR11* divulgadas en el presente documento están además genéticamente manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral, y pueden además estar genéticamente manipuladas para comprender uno o más genes interrumpidos adicionales, por ejemplo, *TRAC*, *β 2M*, *CD70*, o una combinación de los mismos. Las células T con *Reg1/TGFBR11* interrumpidos que expresan CAR resultantes muestran actividad citotóxica aumentada contra células diana y actividad antitumoral en comparación con células CAR-T que tienen un gen *Reg1/TGFBR11* de tipo salvaje.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere al desarrollo de células CAR T genéticamente manipuladas que comprenden un gen *Reg1/TGFBR11* interrumpido, en donde las células T se manipulan además para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral. Las células CAR T genéticamente manipuladas, en ciertos aspectos, están además genéticamente manipuladas para comprender un gen de grupo de diferenciación 70 (CD70) interrumpido. En algunos aspectos, las células CAR T descritas en el presente documento pueden expresar CAR anti-CD70, CAR anti-grupo de diferenciación 19 (CD19) o CAR anti-antígeno de maduración de células B (anti-BCMA).

Las células T genéticamente editadas divulgadas en el presente documento mostraron expansión celular aumentada, longevidad y capacidad de proliferación en cultivo, potencia aumentada (por ejemplo, citotoxicidad aumentada), y eficacia CAR-T aumentada en modelos animales (a través, por ejemplo, de persistencia más larga). Además, las células T genéticamente editadas mostraron crecimiento dependiente de citoquinas, que indica seguridad. Además, interrumpir los genes tanto *Reg1* como *TGFBR11* mostró efectos sinérgicos en actividad antitumoral y expansión y persistencia de células CAR-T como se observa en modelos animales.

Según esto, la presente divulgación proporciona, en algunos aspectos, una población de células T genéticamente manipuladas, que comprende: (i) un gen *Regnasa 1* (*Reg1*) interrumpido; y (ii) un gen del receptor del factor de crecimiento transformante beta II (*TGFBR11*) interrumpido, en donde las células T además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno

extracelular específico para un antígeno tumoral. Las células T genéticamente manipuladas además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR).

La población de células T genéticamente manipuladas divulgada en el presente documento, en comparación con homólogos de células T no manipuladas, tiene una o más de las siguientes características: (a) actividad de crecimiento celular mejorada; (b) persistencia aumentada; (c) agotamiento de células T reducido; (d) resistente a efectos inhibidores inducidos por TGF- β ; (e) capacidad de destruir células aumentada; y (f) resistente a los efectos inhibidores por fibroblastos y/o factores inhibidores secretados por ellos.

En algunas formas de realización, el gen *Reg1* interrumpido está genéticamente editado en el exón 1, exón 2, exón 3, o exón 4. En algunos ejemplos, el gen *Reg1* interrumpido está genéticamente editado en el exón 2 y/o exón 4. Alternativamente o además, el gen *TGFBR1* interrumpido está genéticamente editado en el exón 1, exón 2, exón 3, exón 4, o exón 5. En algunos ejemplos, el gen *TGFBR1* interrumpido está genéticamente editado en el exón 4. En otros ejemplos, el gen *TGFBR1* interrumpido está genéticamente editado en el exón 5. Tanto el gen *Reg1* interrumpido como el gen *TGFBR1* interrumpido se pueden editar genéticamente por un sistema de edición génica mediado por CRISPR/Cas.

En algunos casos, el sistema de edición génica mediado por CRISPR/Cas comprende un ARN guía (ARNg) que se dirige a un sitio en el gen *Reg1* que comprende una secuencia de nucleótidos enumerada en la tabla 22 (con o sin PAM) (por ejemplo, SEQ ID NO: 320, 322, 323, o 327, o las correspondientes con PAM). Por ejemplo, el ARNg que se dirige al gen *Reg1* comprende un espaciador que comprende la secuencia de nucleótidos enumeradas en la tabla 22 (por ejemplo, SEQ ID NO: 24, 32, 36, o 52). En algunos ejemplos, el gen *Reg1* interrumpido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de las enumeradas en las tablas 29-38 (por ejemplo, tabla 31, 33, 34, o 38).

En algunos casos, el sistema de edición génica mediado por CRISPR/Cas comprende un ARN guía (ARNg) que se dirige a un sitio en el gen *TGFBR1* que comprende una secuencia de nucleótidos enumerada en la tabla 39 (con o sin PAM). Por ejemplo, el ARNg que se dirige al gen *TGFBR1* comprende un espaciador enumerado en la tabla 39, por ejemplo, que tiene una secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEQ ID NO: 270, 302, 308, y 312. En algunos ejemplos, el gen *TGFBR1* interrumpido puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada de las enumeradas en las tablas 40-48 (por ejemplo, tabla 43).

Cualquiera de los ARNg divulgados en el presente documento puede además comprender una secuencia andamiaje. Por ejemplo, el ARNg que se dirige al gen *Reg1* comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos enumeradas en la tabla 22. Los ejemplos incluyen SEQ ID NO: 22, 23, 30, 31, 34, 35, 50, y 51. Alternativamente, o además, el ARNg que se dirige al gen *TGFBR1* puede comprender cualquiera de las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la tabla 39. Los ejemplos incluyen SEQ ID NO: 270, 271, 300, 301, 306, 307, 312, y 313.

Cualquiera de las poblaciones de células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento puede además comprender: (iii) un gen de la región constante de la cadena alfa de receptor de células T (*TRAC*) interrumpido, (iv) un gen de beta-2-microglobulina (*β 2M*) interrumpido, (v) un gen *CD70* interrumpido, o (vi) una combinación de cualquiera de (iii)-(v). En algunas formas de realización, las células T comprenden un gen de la región constante de la cadena alfa de receptor de células T (*TRAC*) interrumpido. Alternativamente o además, las células T comprenden un gen de beta-2-microglobulina (*β 2M*) interrumpido. Cualquiera de las células T divulgadas en el presente documento también puede comprender un gen *CD70* interrumpido. En algunos ejemplos, el gen *TRAC* interrumpido, el gen *β 2M* interrumpido, y/o el gen *CD70* interrumpido está genéticamente editado por uno o más sistemas de edición mediados por CRISPR/Cas.

En algunas formas de realización, las células T genéticamente manipuladas pueden comprender un ácido nucleico que codifica el CAR, y en donde el ácido nucleico se inserta en el genoma de las células T. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el CAR se inserta en el gen *Reg1* interrumpido, el gen *TGFBR1* interrumpido, el gen *β 2M* interrumpido, o el gen *CD70* interrumpido. En algunos ejemplos, el ácido nucleico que codifica el CAR se inserta en el gen *TRAC* interrumpido. En ejemplos específicos, el ácido nucleico que codifica el CAR puede sustituir al fragmento deleciónado que comprende SEQ ID NO: 69 en el gen *TRAC*. En algunos ejemplos, el gen *Reg1* interrumpido puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada de las enumeradas en las tablas 29-38 (por ejemplo, tabla 31, 33, 34, o 38). En algunos ejemplos, el gen *TGFBR1* interrumpido puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada de las enumeradas en las tablas 40-48 (por ejemplo, tabla 43). En algunos ejemplos, el gen *TRAC* interrumpido puede comprender una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 75-82 (véase la tabla 24). En algunos ejemplos, el gen *β 2M* interrumpido puede comprender una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 83-88 (véase la tabla 25). En algunos ejemplos, el gen *CD70* interrumpido puede comprender una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 89-94 (véase la tabla 26).

Cualquiera de las construcciones CAR divulgadas en el presente documento puede comprender un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral, un dominio de señalización coestimulador de 4-1BB o CD28, y un dominio de señalización citoplásmico de CD3 ζ . En algunos ejemplos, el antígeno tumoral es CD19. En algunos ejemplos, el antígeno tumoral es BCMA. En algunos ejemplos, el antígeno tumoral es CD70. En algunos ejemplos, el antígeno tumoral es CD33. En algunos ejemplos, el antígeno tumoral es PTK7.

En algunas formas de realización, el CAR se une a CD19 (CAR anti-CD19). El dominio de unión a antígeno extracelular del CAR anti-CD19 puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a CD19 (scFv anti-CD19). En algunos casos el scFv anti-CD19 puede comprender (i) una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada que esas en SEQ ID NO: 124; y (ii) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende las mismas CDR de cadena ligera que esas en SEQ ID NO: 125. En algunos ejemplos, la V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 y la V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125. En un ejemplo, el scFv anti-CD19 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120. En un ejemplo específico, el CAR anti-CD19 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118 (con un péptido señal N-terminal) o SEQ ID NO: 353 (sin péptido señal N-terminal).

En algunas formas de realización, el CAR se une a CD70 (CAR anti-CD70). El dominio de unión a antígeno extracelular del CAR anti-CD70 puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a CD70 (scFv anti-CD70). En algunos casos el scFv anti-CD70 puede comprender (i) una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada que esas en SEQ ID NO: 143; y (ii) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende las mismas CDR de cadena ligera que esas en SEQ ID NO: 144. En algunos ejemplos, la V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143 y la V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144. En un ejemplo, el scFv anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 o 142. En un ejemplo específico, el CAR anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 (con un péptido señal N-terminal) o SEQ ID NO: 354 (sin péptido señal N-terminal).

En algunas formas de realización, el CAR se une a BCMA (CAR anti-BCMA). El dominio de unión a antígeno extracelular del CAR anti-BCMA puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a BCMA (CAR anti-BCMA). En algunos casos el scFv anti-BCMA comprende (i) una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada que esas en SEQ ID NO: 149; y (ii) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende las mismas CDR de cadena ligera que esas en SEQ ID NO: 150. En algunos ejemplos, la V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149 y la V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150. En un ejemplo, el scFv anti-BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148. En un ejemplo específico, el CAR anti-BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146 (con un péptido señal N-terminal) o SEQ ID NO: 355 (sin péptido señal N-terminal).

Las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento pueden derivar de células T primarias de uno o más donantes humanos. En algunos casos, las células T genéticamente manipuladas muestran crecimiento dependiente de citoquinas.

Cualquiera de los ARNg divulgados en el presente documento puede además comprender una secuencia andamiaje. Por ejemplo, el ARNg que se dirige al gen *Reg1* puede comprender cualquiera de las secuencias de nucleótidos enumeradas en la tabla 22. Los ejemplos incluyen SEQ ID NO: 22, 23, 30, 31, 34, 35, 50, y 51. Alternativamente, o además, el ARNg que se dirige al gen *TGFBR1* puede comprender cualquiera de las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la tabla 39. Los ejemplos incluyen SEQ ID NO: 270, 271, 300, 301, 306, 307, 312, y 313.

El ácido nucleico que codifica el CAR puede estar en un vector AAV. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el CAR comprende un brazo de homología izquierdo y un brazo de homología derecho flanqueando la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR. El brazo de homología izquierdo y el brazo de homología derecho son homólogos a un locus genómico en las células T, lo que permite la inserción del ácido nucleico en el locus genómico. En algunos ejemplos, el locus genómico está en el gen *Reg1*. En algunos ejemplos, el locus genómico está en el gen *TGFBR1*. En algunos ejemplos, el locus genómico está en el gen *TRAC*. En algunos ejemplos, el locus genómico está en el gen *$\beta 2M$* . En algunos ejemplos, el locus genómico está en el gen *CD70*.

En algunas formas de realización, el ARNg comprende un espaciador enumerado en la tabla 22 (por ejemplo, SEQ ID NO: 24, 32, 36, o 52). Tal ARNg puede además comprender una secuencia andamiaje. Alternativamente o además, el ARNg comprende uno o más nucleótidos modificados. Por ejemplo, el ARNg comprende uno o más residuos de 2'-O-metilfosforotioato en el extremo 5' y/o 3' del ARNg. Los ejemplos de ARNg que se dirigen a *Reg1* incluyen cualquiera de los enumerados en la tabla 22 (por ejemplo, SEQ ID NO: 22, 23, 30, 31, 34, 35, 50, o 51; véase también la divulgación en el presente documento).

En algunas formas de realización, el ARNg comprende una secuencia de nucleótidos específica al exón 4 del gen *TGFBR1*. En otros ejemplos, el ARNg comprende una secuencia de nucleótidos específica al exón 5 del gen *TGFBR1*. En algunos casos, el ARNg comprende un espaciador que tiene la secuencia de nucleótidos enumerada en la tabla 39 (por ejemplo, SEQ ID NO: 272, 302, 308, y 314). Tal ARNg puede además comprender una secuencia andamiaje. Alternativamente o además, el ARNg comprende uno o más nucleótidos modificados. Por ejemplo, el ARNg comprende uno o más residuos de 2'-O-metilfosforotioato en el extremo 5' y/o 3' del ARNg. Los ejemplos de los ARNg que se dirigen al gen *TGFBR1* incluyen cualquiera de los enumerados en la tabla 39 (por ejemplo, SEQ ID NO: 270, 271, 300, 301, 306, 307, 312, y 313).

También se proporciona en el presente documento una población de células T genéticamente manipuladas que comprende:

- (i) un gen de *Regnasa-1* (*Reg1*) interrumpido; y
- (ii) un gen del receptor del factor de crecimiento transformante beta II (*TGFBR/II*) interrumpido;

en donde las células T además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral para uso como un medicamento.

También se proporciona en el presente documento una población de células T genéticamente manipuladas que comprende:

- (i) un gen de *Regnasa-1* (*Reg1*) interrumpido; y
- (ii) un gen del receptor del factor de crecimiento transformante beta II (*TGFBR/II*) interrumpido;

en donde las células T además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral para uso en tratar cáncer.

También se proporciona en el presente documento una población de células T genéticamente manipuladas que comprende:

- (i) un gen de *Regnasa-1* (*Reg1*) interrumpido; y
- (ii) un gen del receptor del factor de crecimiento transformante beta II (*TGFBR/II*) interrumpido;

en donde las células T además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral para uso en tratar cáncer, en donde el cáncer es un cáncer hematopoyético o un tumor sólido, opcionalmente en donde el cáncer es CD19⁺, BCMA⁺, CD70⁺, CD33⁺, o PTK7⁺.

También se proporciona en el presente documento una población de células T genéticamente manipuladas que comprende:

- (i) un gen de *Regnasa-1* (*Reg1*) interrumpido; y
- (ii) un gen del receptor del factor de crecimiento transformante beta II (*TGFBR/II*) interrumpido;

en donde las células T además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral para uso en tratar una enfermedad diana como se divulga en el presente documento (por ejemplo, cáncer tal como los divulgados en el presente documento).

Los detalles de una o más formas de realización de la invención se explican en la descripción siguiente. Otras características o ventajas de la presente invención serán aparentes de los siguientes dibujos y descripción detallada de varias formas de realización, y también de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Las **figuras 1A y 1B** incluyen diagramas que muestran que células CAR T ejemplares (células CAR T anti-CD70) con Reg1 KO muestran expansión superior *in vitro*. **Fig. 1A:** Proliferación de células CAR T anti-CD70 (CAR T) con Reg1 KO usando una de 10 guías (Z01-Z10) que se dirigen a Reg1 como se indica. CAR T indica células CAR T anti-CD70 con un gen *Reg1* sin editar (de tipo salvaje). **Fig. 1B:** Proliferación de células CAR T anti-CD70 (CAR T) con Reg1 KO usando la guía REG1-Z10 (Z10) hasta 52 días tras HDR. También se muestran células CAR T anti-CD70 con un gen *Reg1* sin editar (CAR T). (A) y (B) se refieren a ensayos duplicados.

Las **figuras 2A-2E** incluyen diagramas que muestran que células CAR T ejemplares (células CAR T anti-CD70) con Reg1 KO (+reg1 KO) muestran potencia superior *in vitro* contra líneas celulares tumorales relativas a células CAR T con un gen *Reg1* sin editar (CAR T). **Fig. 2A:** Lisis celular de células ACHN por células CAR T anti-CD70 con Reg1 KO, usando guías de regnasa Z03 o Z10, relativo a células CAR T con un gen *Reg1* sin editar (de tipo salvaje) (CAR T). **Fig. 2B:** Lisis celular de células ACHN por células CAR T anti-CD70 con Regnasa 1 KO, usando guías de regnasa Z05 o Z06, relativo a células CAR T con un gen *Reg1* sin editar. La lisis celular se midió después de 24 h de cocultivo el día 12 tras HDR. **Fig. 2C:** Lisis celular de células ACHN por células CAR T anti-CD70 con Regnasa 1 KO, usando guías de regnasa Z03, Z05, Z06 o Z10, relativo a células CAR T con un gen *Reg1* sin editar. La lisis celular se midió después de 24 h de cocultivo el día 27 tras HDR. **Fig. 2D:** Lisis celular de células caki-1 por células CAR T anti-CD70 con Regnasa 1 KO, usando guías de regnasa Z03, Z05, Z06 o Z10, relativo a células CAR T con un gen *Reg1* sin editar. La lisis celular se midió después de 24 h de cocultivo el día 27 tras HDR. **Fig. 2E:** Lisis celular de células 769P

por células CAR T anti-CD70 con Regnasa 1 KO, usando guías de regnasa Z03, Z05, Z06 o Z10, relativo a células CAR T con un gen *Reg1* sin editar. La lisis celular se midió después de 24 h de cocultivo el día 27 tras HDR.

Las **figuras 3A-3D** incluyen diagramas que muestran que células CAR T ejemplares (células CAR T anti-CD70) con Reg1 KO (CAR T + Reg1 KO, usando guía Z10 como un ejemplo) expresan niveles menores de marcadores de agotamiento de células T *in vitro* relativo a homólogos de tipo salvaje de Reg1 (CAR T). **Fig. 3A:** Expresión de PD1 el día 13 tras HDR en células CAR T anti-CD70 CD4+ y CD8+ con REG1 KO (+REG1 KO) relativo a homólogos de tipo salvaje. **Fig. 3B:** Expresión de PD1 el día 26 tras HDR en células CAR T anti-CD70 CD4+ y CD8+ con REG1 KO (+REG1 KO) relativo a homólogos de tipo salvaje. **Fig. 3C:** Expresión de Tim3 el día 13 tras HDR en células CAR T anti-CD70 CD4+ y CD8+ con REG1 KO (+REG1 KO) relativo a homólogos de tipo salvaje. **Fig. 3D:** Expresión de Tim3 el día 26 tras HDR en células CAR T anti-CD70 CD4+ y CD8+ con REG1 KO (+REG1 KO) relativo a homólogos de tipo salvaje.

La **figura 4** es un diagrama que muestra que células CAR T ejemplares (células CAR T anti-CD19) con Reg1 KO mostraron expansión aumentada en presencia de citoquinas *in vitro* y siguen dependiendo de citoquinas para la expansión *in vitro*. Se cultivaron células CAR T anti-CD19 con Reg1 KO (CAR T anti-CD19/Reg KO) y células CAR T anti-CD19 con un gen *Reg1* de tipo salvaje (CAR T anti-CD19) en presencia y ausencia (sin citoquinas) de citoquinas durante 40 días.

Las **figuras 5A-5D** incluyen diagramas que muestran que células CAR T ejemplares (células CAR T anti-CD19) con Reg1 KO (CAR T anti-CD19/Reg KO) proporcionan supervivencia superior *in vitro* y carga tumoral disminuida relativo a homólogos de tipo salvaje de Reg1 (CAR T anti-CD19) en modelo de ratón de xenoinjerto de tumor de leucemia linfoblástica aguda humana Nalm-6 diseminada. **Fig. 5A:** Probabilidad de supervivencia de ratones sin tratar, ratones dosificados con 4e6 células CAR T anti-CD19, y 4e6 células CAR T anti-CD19/Reg KO. **Fig. 5B:** Probabilidad de supervivencia de ratones sin tratar, ratones dosificados con 8e6 células CAR T anti-CD19, y 8e6 células CAR T anti-CD19/Reg KO. **Fig. 5C:** Señal de bioluminiscencia de células de leucemia modelo bioluminiscentes en ratones tratados con 4e6 células CAR T anti-CD19, o 4e6 células CAR T anti-CD19/Reg KO. **Fig. 5D:** Señal de bioluminiscencia de células de leucemia modelo bioluminiscentes en ratones tratados con 8e6 células CAR T anti-CD19, o 8e6 células CAR T anti-CD19/Reg KO.

Las **figuras 6A-6B** incluyen diagramas que muestran que células CAR T ejemplares (células CAR T anti-CD70) con Reg1 KO (CAR T + Reg KO) muestran potencia superior *in vitro* contra líneas celulares tumorales relativo a homólogos de tipo salvaje de Reg1 (CAR T). **Fig. 6A:** Lisis celular de células ACHN por células CAR T anti-CD70 con Reg1 KO, usando la guía REG1-Z10 (CAR T + Reg KO) relativo a homólogos de tipo salvaje de Reg1 (CAR T). La lisis celular se midió después de 24 h de cocultivo el día 19 y 26 tras HDR. **Fig. 6B:** Lisis celular de células caki-1 por células CAR T anti-CD70 con Reg1 KO, usando la guía REG1-Z10 (CAR T + Reg KO) relativo a homólogos de tipo salvaje de Reg1 (CAR T). La lisis celular se midió después de 24 h de cocultivo el día 13, 19 y 26 tras HDR.

Las **figuras 7A y 7B** incluyen diagramas que muestran la inactivación de *TGFBR1* usando varios ARN guía como se indica. **Fig. 7A:** Tasa de indel del gen *TGFBR1* editado por ocho ARNg que se dirigen a varios exones del gen *TGFBR1* como se indica. De izquierda a derecha, EX1_T1, EX1_T3, EX2_T1, EX3_T1, EX3_T2, EX4_T1, EX4_T2 y EX5_T1, la secuencia de nucleótidos de cada uno de ellos se proporciona en la tabla 32. **Fig. 7B:** Inmunotransferencia de la expresión de *TGFBR1* en células T con edición génica. Se usó GAPDH como control de carga. La muestra control es células T sin editar con *TGFBR1* de tipo salvaje.

Las **figuras 8A-8K** incluyen diagramas que muestran el efecto de TGF- β en la expansión de células CAR T. Se expusieron células CAR T anti-CD70 a diferentes concentraciones de TGF- β humano recombinante (10, 20, 50, 100 ng/ml) y el número de células se registró a diferentes puntos de tiempo (**Fig. 8A**). Se incubaron células T con o sin *TGFBR1* inactivado, generadas usando diferentes ARNg de *TGFBR1* como se indica, con 0 o 50 ng/ml de TGF- β y la expansión celular se registró a lo largo del tiempo (**Fig. 8B-8K**).

La **figura 9** es un diagrama que muestra el efecto de *TGFBR1* KO en la capacidad de destrucción de células CAR T contra células A498 a varias proporciones E:T como se indica. *TGFBR1* KO mejora la citotoxicidad de células CAR-T.

Las **figuras 10A-10E** incluyen diagramas que muestran el efecto de *TGFBR1* KO en la capacidad de destrucción de células CAR T contra múltiples líneas celulares tumorales. La capacidad de destruir células de células CAR T anti-CD70 se comparó con células CAR T anti-CD70 con *TGFBR1* KO. La actividad de destrucción de células de las células CAR T se evaluó contra CAKI-1 (**Fig. 10A**), H1975 (**Fig. 10B**), Hs-766T (**Fig. 10C**), 786-O (**Fig. 10D**) y SK-OV3 (**Fig. 10E**). *TGFBR1* KO mejora la citotoxicidad de células CAR-T.

La **figura 11** es un gráfico que muestra el efecto de *TGFBR1* KO en el fenotipo de células CAR T. Se expusieron células CAR T anti-CD70 con o sin *TGFBR1* KO a TGF- β humano recombinante 50 ng/ml y se evaluó la expresión de CD25 por citometría de flujo. *TGFBR1* KO protege CAR T del efecto inhibitor de TGF- β en el fenotipo celular.

La **figura 12** es un gráfico que muestra que *TGFBR1* KO protege células CAR T del efecto inhibitor de TGF- β en citotoxicidad. Se cocultivaron células CAR T anti-CD70 con células tumorales diana (A498) en presencia o ausencia

de TGF- β (0, 1, 10, 50 ng/ml). La capacidad de células CAR T anti-CD70 con *TGFBR1* sin editar para destruir células diana se comparó con células CAR T anti-CD70 con *TGFBR1* KO usando un ARN guía ejemplar como se indica.

- Las **figuras 13A-13C** incluyen diagramas que muestran que células CAR T anti-CD70 *TGFBR1* KO son resistentes a los efectos inhibidores de TGF- β sobre la función efectora. Se cocultivaron células CAR T anti-CD70 con células tumorales diana (A498) con TGF- β (50 ng/ml) o sin TGF- β y se compararon a CAR T anti-CD70 con *TGFBR1* KO (por ejemplo: CAR anti-CD70 + *TGFBR1*_EX4_T1) en su capacidad para destruir células diana. La proliferación de células T (**Fig. 13A**) y la secreción de citoquinas efectoras se evaluó por Luminx (**Fig. 13B y 13C**).
- La **figura 14** es un gráfico que muestra que los fibroblastos reducen la actividad citolítica de células CAR-T. Se cocultivó CAR T anti-CD70 con células diana (A498) con o sin fibroblastos (CCL-190) colocados en una placa transwell a 0,25:1, fibroblastos:CAR T anti-CD70.
- Las **figuras 15A-15C** incluyen gráficos que muestran que *TGFBR1* KO protege células CAR-T contra el efecto inhibidor de los fibroblastos. Se cocultivó CAR T anti-CD70 con células diana (A498) a 0,1:1 (E:T) en presencia de diferentes volúmenes de medio condicionado de CCL-190 (2,5, 5, 10 μ l) y la capacidad de destrucción de células se evaluó y comparó a células con *TGFBR1* KO. La capacidad de células CAR T anti-CD70 (con o sin *TGFBR1* KO) para destruir células diana se muestra en células de tumor pancreático Hs-766T (**Fig. 15A**), células de tumor de riñón A498 (**Fig. 15B**), y células de tumor pulmonar H1975 (**Fig. 15C**).
- Las **figuras 16A-16B** incluyen diagramas que muestran los efectos sinérgicos de interrupciones dobles de *TGFBR1* y regnasa con reexposición *in vitro* de células CAR T con ACHN. **Fig. 16A**: potencia mejorada. **Fig. 16B**: expansión de CAR mejorada.
- Las **figuras 17A-17B** incluyen diagramas que muestran los efectos sinérgicos de interrumpir los genes tanto *TGFBR1* como regnasa en modelos de xenoinjerto de cáncer. **Fig. 17A**: modelo de xenoinjerto de carcinoma de células renales CAKI-1 con células CAR T anti-CD70. **Fig. 17B**: modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón H1975 con células CAR T anti-CD70.
- Las **figuras 18A-18B** incluyen diagramas que muestran los efectos sinérgicos de interrumpir los genes tanto *TGFBR1* como regnasa en un modelo de xenoinjerto de reexposición de RCC. **Fig. 18A**: reducción en el tamaño tumoral de RCC (A498). **Fig. 18B**: inhibición de crecimiento de células tumorales RCC después de reexposición con células ACHN.
- Las **figuras 19A-19B** incluyen diagramas que muestran el impacto de interrupción de *Reg1* y/o *TGFBR1* en la diferenciación y expansión *in vitro* de células CAR-T. **Fig. 19A**: diferenciación de células CAR-T. **Fig. 19B**: expansión de células CAR-T.
- Las **figuras 20A-20B** incluyen diagramas que muestran los efectos sinérgicos de la doble inactivación de *TGFBR1* y regnasa en un modelo de ratón de leucemia Nalm-6 (B-LLA). **Fig. 20A**: reducción en el tamaño tumoral. **Fig. 20B**: Tasas de supervivencia.
- La **figura 21** es un diagrama que muestra la ventaja de supervivencia que surge de dobles interrupciones de *TGFBR1* y regnasa en un modelo en ratón de xenoinjerto de tumor de linfoma de células del manto (MCL) NOG.
- Las **figuras 22A-22B** incluyen diagramas que muestran la expansión *in vivo* aumentada de células CAR-T que tienen inactivados *TGFBR1* y/o regnasa. La **figura 22A** muestra la expansión de células CAR T en el modelo de xenoinjerto Jeko-1. La **figura 22B** muestra la expansión de células CAR T en el modelo de xenoinjerto nalm-6.
- Las **figuras 23A-23D** incluyen diagramas que muestran tasas consistentes de edición CRISPR/Cas en células CAR-T anti-BCMA con interrupción de *Reg-1* y/o *TGFBR1* determinado por citometría de flujo. **Fig. 23A**: niveles de células TCR⁺. **Fig. 23B**: niveles de células β 2M⁺. **Fig. 23C**: niveles de células CAR⁺. **Fig. 23D**: proporción de células CD4⁺/CD8⁺.
- Las **figuras 24A-24B** incluyen diagramas que muestran tasas consistentes de edición CRISPR/Cas en células CAR-T anti-BCMA con interrupciones de *Reg-1* y/o *TGFBR1*. **Fig. 24A**: eficacia de interrupción de *TGFBR1*. **Fig. 24B**: eficacia de interrupción de *Reg-1*.
- Las **figuras 25A-25D** incluyen diagramas que muestran la superior citotoxicidad celular de células T TRAC-/ β 2M-/Reg-1- *TGFBR1*- CAR anti-BCMA⁺. **Fig. 25A-25B**: citotoxicidad contra células MM1s (línea celular mieloma múltiple) (**25A**) relativo a células K562 (**25B**). **Fig. 25C-25D**: citotoxicidad contra células JeKo-1 (línea celular de linfoma de células del manto) (**25C**) relativo a células K562 (**25D**).
- Las **figuras 26A-26C** incluyen diagramas que muestran que la interrupción combinada de Regnasa-1 y *TGFBR1* mejoró la actividad CAR-T anti-BCMA contra mieloma múltiple murino en un modelo animal. **Fig. 26A**: reducción del volumen tumoral. **Fig. 26B**: Tasa de supervivencia. **Fig. 26C**: expansión de células CAR-T en sangre periférica.

Las **figuras 27A-27F** incluyen diagramas que muestran que la interrupción combinada de *Regnasa* y *TGFBR11* mejora la actividad CAR-T anti-BCMA contra linfoma de células del manto murino en un modelo animal. **Fig. 27A:** reducción del volumen tumoral. **Fig. 27B:** Tasa de supervivencia. **Fig. 27C:** expansión de células CAR-T en sangre periférica. **Fig. 27D:** niveles de PD-1 y LAG-3 en células CAR T. **Fig. 27E:** niveles de células T circulantes a las tres semanas tras la inyección de CAR-T. **Fig. 27F:** niveles de marcadores de agotamiento (LAG-3 y PD-1) en células T circulantes a las tres semanas tras la inyección de CAR-T.

La **figura 28** es un diagrama que muestra que la interrupción de los genes *TGFBR11* y *Reg-1* aumenta la proliferación de células CAR T anti-PTK7.

Las **figuras 29A-29D** incluyen diagramas que muestran el impacto de la interrupción de *TGFBR11*, opcionalmente en combinación con la interrupción de *Reg-1*, en ensayos de reexposición *in vitro* a largo plazo. **Fig. 29A:** la interrupción de *TGFBR11* solo mejora la potencia de células CAR T anti-PTK7 en un ensayo de reexposición *in vitro* a largo plazo. **Fig. 29B:** la interrupción de *TGFBR11* mejora la persistencia y expansión de células CAR T anti-PTK7 en un ensayo de reexposición *in vitro* a largo plazo medido por células humCD45+. **Fig. 29C:** la interrupción de *TGFBR11* aumenta la citotoxicidad de células T CD8+ que expresan el CAR anti-PTK7. **Fig. 29D:** células T CD4+ que expresan el CAR anti-PTK7 permanecen consistentes independientemente de la interrupción de *TGFBR11*.

Las **figuras 30A-30B** incluyen diagramas que muestran la actividad antitumoral de células CAR T anti-PTK7 con o sin interrupción de *TGFBR11*. **Fig. 30A:** efecto del tratamiento en el volumen tumoral. **Fig. 30B:** efecto del tratamiento en el peso corporal. ● Grupo 1: sin tratamiento. ○ Grupo 2: células CAR T anti-PTK7, 5×10^6 células/ratón (iv) Día 1. □ Grupo 3: células T CAR anti-PTK7/*TGFBR11* KO, 5×10^6 células/ratón (iv) Día 1. Se administró pienso UTA 9 días antes del tratamiento de células CAR-T a los grupos aplicables.

Las **figuras 31A-31B** incluyen diagramas que muestran las fracciones de células T en un modelo animal de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células pancreáticas (Hs766T) tratado con células CAR T anti-PTK7 con o sin interrupción de *TGFBR11*. **Fig. 31A:** número de células humCD45+/ul en sangre murina el día 47 tras la dosis. **Fig. 31B:** diferenciación de células CAR-T el día 47 tras la dosis.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se dirige a establecer células T genéticamente manipuladas que tienen actividad de crecimiento mejorada, persistencia, agotamiento de células T reducido, y potencia aumentada, una necesidad largamente sentida en la terapia de CAR-T. Tal célula T puede usar de buena fe células T como el material de partida, por ejemplo, células T no transformadas, células T terminalmente diferenciadas, células T que tienen genoma estable y/o células T que dependen de citoquinas y factores de crecimiento para la proliferación y expansión. Alternativamente, tal célula T puede usar células T generadas de células precursoras tal como células madre hematopoyéticas (por ejemplo, iPSC), por ejemplo, cultivo *in vitro*. Las células T divulgadas en el presente documento pueden conferir uno o más beneficios tanto en la producción de células CAR-T como en aplicaciones clínicas.

Las células CAR T alogénicas convencionales se producen en donde un leukopak de donante único se edita en la mayoría de los casos de modo que las células pueden evitar componentes del sistema inmunitario del paciente y por tanto no producen EICH. El proceso de expandir estas células CAR T puede producir de decenas a centenas de productos farmacéuticos envasados. Los pacientes pueden recibir una única dosis o dosis múltiples. Durante el proceso de fabricación, estas células CAR T pierden potencial debido a varios mecanismos, por ejemplo, apoptosis, agotamiento, senescencia replicativa, y otros procesos donde las células se vuelven menos adecuadas.

Las células T genéticamente manipuladas que tienen un gen *TGFBR11* interrumpido y un gen *Reg1* interrumpido, y opcionalmente una o más ediciones genéticas adicionales, por ejemplo, un gen *TRAC* interrumpido, un gen *$\beta 2M$* interrumpido, un gen *CD70* interrumpido, y un ácido nucleico insertado que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico a un antígeno tumoral.

Inesperadamente, la presente divulgación describe que inactivar *Reg1* en células T produjo varias características ventajosas en terapia celular mediada por células T tal como terapia CAR-T. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a: crecimiento en cultivo celular y expansión *in vitro* mejorados incluyendo expansión más rápida, viabilidad más larga, proliferación más rápida y/o resistencia aumentada a apoptosis, que son beneficiosos para fabricar y producir productos basados en células T terapéuticas tal como células CAR-T; las ventajas de potencia de células T relacionadas con mantener la potencia y actividad (destrucción de células diana) de células T terapéuticas (por ejemplo, células CAR-T) *in vitro* e *in vivo* para productos terapéuticos basados en células T más eficaces y persistentes; producción y/o retención de más células de memoria central; menor expresión de marcadores de agotamiento de células T (tal como, PD-1, Tim-3); eficacia mejorada de agentes terapéuticos de células T *in vivo*, relacionado con carga tumoral descendiente y supervivencia creciente de sujetos tratados con CAR T.

Además, inesperadamente, las células T que tienen un gen *TGFBR11* interrumpido mostraron características ventajosas, incluyendo crecimiento y expansión celulares mejorados, actividad de citotoxicidad mejorada, resistente

al efecto inhibidor mediado por TGF β , y/o mediado por fibroblastos. Dadas tales características ventajosas, las células T genéticamente manipuladas (por ejemplo, células CAR-T) divulgadas en el presente documento, que tienen un gen *TGFBR1* interrumpido y opcionalmente otras ediciones genéticas como se divulga en el presente documento, se espera que mostraran efectos terapéuticos superiores, por ejemplo, efectos antitumorales superiores, por ejemplo, en el TME de un tumor sólido.

Además, las células CAR-T que tienen tanto un gen *Reg1* interrumpido como un gen *TGFBR1* interrumpido mostraron actividades antitumorales mucho mayores, así como expansión de células CAR-T en modelos animales en relación a células CAR-T que tienen un gen *Reg1* interrumpido o un gen *TGFBR1* interrumpido.

Otras características ventajosas ilimitadas de las células T proporcionadas en el presente documento incluyen:

- (a) Calidad y consistencia mejoradas de agentes terapéuticos basados en células CAR-T.
- (b) Mayor potencia y potencia más larga de células CAR-T producidas a partir de células T en pacientes humanos.
- (c) Requisito de dosis reducido. Puesto que las células T divulgadas en el presente documento tienen capacidades de proliferación y expansión aumentadas, pueden vivir más *in vivo*. Como tal, se puede usar una dosis menor relativa a la terapia CAR-T estándar para lograr efectos terapéuticos sustancialmente similares relativos a una alta dosis de terapia de células CAR-T convencional.
- (d) Eficacia aumentada resultante de proliferación y expansión mejoradas de las células CAR-T divulgadas en el presente documento, citotoxicidad aumentada, y persistencia prolongada *in vivo*. Además, las células T proporcionarían el beneficio de dosificación titulable en pacientes para optimizar la seguridad y eficacia como se ha indicado anteriormente.
- (e) Efectos terapéuticos extendidos debido al agotamiento y/o senescencia replicativa reducidos y persistencia prolongada de las células T tanto *in vitro* como *in vivo*.
- (f) Actividad antitumoral mejorada, por ejemplo, reducción del tamaño tumoral y/o tasas de supervivencia alargadas.

Según esto, en el presente documento se proporcionan células T manipuladas, que comprenden:

- (i) un gen *Regnasa-1* (*Reg1*) interrumpido; y
- (ii) un gen del receptor del factor de crecimiento transformante beta II (*TGFBR1*) interrumpido;

en donde las células T están además manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral que tienen persistencia mejorada en cultivo, y usos médicos de tales células T. Los componentes y procesos (por ejemplo, el enfoque CRISPR para edición génica y componentes usados en el mismo) para hacer las células T divulgadas en el presente documento también están dentro del ámbito de la presente divulgación.

I. Células T genéticamente manipuladas que tienen características mejoradas

Las células T divulgadas en el presente documento comprenden células T genéticamente manipuladas que tienen persistencia aumentada en cultivo. Tales células T genéticamente manipuladas pueden tener edición genética tanto del gen *Reg1* como del gen *TGFBR1*.

Las células T genéticamente manipuladas pueden tener edición genética en uno o más genes adicionales implicados en agotamiento de células T, tal como CD70. Como se muestra por los estudios divulgados en el presente documento, tales células T genéticamente manipuladas muestran una o más de las siguientes características superiores en relación a las células T homólogas que tienen un gen *Regnasa-1* de tipo salvaje: capacidad de expansión mejorada en cultivo (por ejemplo, expansible en cultivo durante al menos 4 semanas, por ejemplo, al menos 6 semanas; y/o al menos 10 veces expansibles, por ejemplo, al menos 15 veces expansibles, relativo al homólogo no editado), longevidad mejorada, capacidad de proliferación mejorada, mayor activación de células T, potencia mejorada, expresión mejorada de marcadores de células T de memoria central, y expresión reducida de marcadores de agotamiento de células T.

Las células T genéticamente manipuladas pueden derivar de células T parentales (por ejemplo, células T de tipo salvaje no editadas) obtenidas de una fuente adecuada, por ejemplo, uno o más donantes mamíferos. En algunos ejemplos, las células T parentales son células T primarias (por ejemplo, células T no transformadas y terminalmente diferenciadas) obtenidas de uno o más donantes humanos. Alternativamente, las células T parentales pueden estar diferenciadas de células T precursoras obtenidas de uno o más donantes adecuados o células madre tal como células madre hematopoyéticas o células madre pluripotentes inducibles (iPSC), que se pueden cultivar *in vitro*.

En algunas formas de realización, las células T genéticamente manipuladas portan un gen *Reg1* interrumpido y un gen *TGFBR1* interrumpido, y opcionalmente, uno o más genes interrumpidos implicados en agotamiento celular (por ejemplo, *CD70*). Tales células T genéticamente manipuladas pueden además comprender uno o más genes interrumpidos, por ejemplo, *TRAC* o *β 2M*. Tales células T genéticamente manipuladas pueden además expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno asociado a tumor (por ejemplo, CD19, BCMA, CD70, CD33, o PTK7).

En algunas formas de realización, las células T genéticamente manipuladas portan un gen *TGFBRII* interrumpido y un gen *Reg1* interrumpido, y opcionalmente, uno o más genes interrumpidos implicados en agotamiento celular (por ejemplo, *CD70*). Tales células T genéticamente manipuladas pueden además comprender uno o más genes interrumpidos, por ejemplo, *TRAC* o *$\beta 2M$* . Tales células T genéticamente manipuladas pueden además expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno asociado a tumor (por ejemplo, CD19, BCMA, CD70, CD33, o PTK7). En algunos ejemplos, las células T genéticamente manipuladas pueden expresar un CAR anti-PTK7 tal como los divulgados en el presente documento.

En algunas formas de realización, las células T genéticamente manipuladas portan un gen *Reg1* interrumpido y un gen *TGFBRII* interrumpido, y opcionalmente, uno o más genes interrumpidos implicados en agotamiento celular (por ejemplo, *CD70*). Tales células T genéticamente manipuladas pueden además comprender uno o más genes interrumpidos, por ejemplo, *TRAC* o *$\beta 2M$* . Tales células T genéticamente manipuladas pueden además expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno asociado a tumor (por ejemplo, CD19, BCMA, CD70, CD33, o PTK7).

Cualquiera de las células T genéticamente manipuladas se puede generar a través de edición génica (incluyendo edición genómica), un tipo de manipulación genética en el que nucleótido(s)/ácido(s) nucleico(s) se inserta(n), deleciona(n) y/o sustituye(n) en una secuencia de ADN, tal como en el genoma de una célula diana. La edición génica dirigida permite la inserción, deleción, y/o sustitución en sitios preseleccionados en el genoma de una célula diana (por ejemplo, en un gen diana o una secuencia de ADN diana). Cuando se edita una secuencia de un gen endógeno, por ejemplo, por deleción, inserción o sustitución de nucleótido(s)/ácido(s) nucleico(s), el gen endógeno que comprende la secuencia afectada se puede inactivar debido a la alteración de la secuencia. Por tanto, la edición dirigida se puede usar para interrumpir la expresión génica endógena. La "integración dirigida" se refiere a un proceso que implica la inserción de una o más secuencias exógenas, con o sin deleción de una secuencia endógena en el sitio de inserción. La integración dirigida puede resultar de la edición génica dirigida cuando un molde donante que contiene una secuencia exógena está presente.

(a) Genes genéticamente editados

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona células T genéticamente manipuladas que pueden comprender tanto un gen *Reg1* interrumpido como un gen *TGFBRII* interrumpido, en donde las células T están además manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral. En algunos casos, las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento pueden además comprender un gen *CD70* interrumpido, un gen *$\beta 2M$* interrumpido, un gen *TRAC* interrumpido, o una combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, un "gen interrumpido" se refiere a un gen que comprende una inserción, deleción o sustitución relativo a un gen endógeno de modo que la expresión de una proteína funcional del gen endógeno se reduce o inhibe. Como se usa en el presente documento, "interrumpir un gen" se refiere a un método de insertar, deleccionar o sustituir al menos un nucleótido/ácido nucleico en un gen endógeno de modo que la expresión de una proteína funcional del gen endógeno se reduce o inhibe. Los métodos de interrumpir un gen los conocen los expertos en la materia y se describen en el presente documento.

Una célula que comprende un gen interrumpido puede no expresar (por ejemplo, en la superficie celular) un nivel detectable (por ejemplo, en un inmunoensayo usando un anticuerpo que se une a la proteína codificada o por citometría de flujo) de la proteína codificada por el gen. Una célula que no expresa un nivel detectable de la proteína se puede denominar una célula inactivada.

Edición del gen *Reg1*

En algunas formas de realización, las células T genéticamente manipuladas pueden comprender un gen *Reg1* interrumpido implicado en la descomposición del ARNm y un gen *TGFBRII* interrumpido, en donde las células T están además manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral. *Reg1* contiene un motivo de dedo de cinc, se une a ARN y muestra actividad ribonucleasa. *Reg1* desempeña papeles tanto en células inmunitarias como no inmunitarias y su expresión se puede inducir rápidamente en diversas condiciones incluyendo infecciones microbianas, tratamiento con citoquinas inflamatorias y estimulación química o mecánica. El gen *Reg1* humano está localizado en el cromosoma 1p34.3. Se puede encontrar información adicional en GenBank bajo Gene ID: 80149.

En algunos ejemplos, las células T genéticamente manipuladas pueden comprender un gen *Reg1* interrumpido de modo que la expresión de *Reg1* en las células T esté sustancialmente reducida o eliminada por completo, en donde las células además comprenden un gen *TGFBRII* interrumpido, en donde las células T están además manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral. El gen *Reg1* interrumpido puede comprender una o más ediciones

genéticas en uno o más sitios diana adecuados (por ejemplo, en regiones codificantes o en regiones reguladoras no codificantes tal como regiones promotoras) que interrumpen la expresión del gen *Reg1*. Tales sitios diana se pueden identificar basado en el enfoque de edición génica para uso en hacer las células T genéticamente manipuladas. Los sitios diana ejemplares para las ediciones genéticas pueden incluir el exón 1, exón 2, exón 3, exón 4, exón 5, exón 6, o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, una o más ediciones genéticas se pueden producir en el exón 2 o el exón 4. Tal edición genética puede estar inducida por la tecnología CRISPR/Cas usando un ARN guía adecuado, por ejemplo, los enumerados en la tabla 22. El gen *Reg1* editado resultante usando un ARNg enumerado en la tabla 22 puede comprender una o más secuencias editadas proporcionadas en las tablas 29-38 posteriormente.

Edición del gen *TGFBRII*

En algunas formas de realización, las células T genéticamente manipuladas pueden comprender un gen *TGFBRII* interrumpido, que codifica el receptor del factor de crecimiento transformante de tipo II (TGFBRII) en donde las células además comprenden un gen *REG1* interrumpido, en donde las células T están además manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral. Los receptores TGFBRII son una familia de receptores serina/treonina quinasa implicados en la ruta de señalización TGF β . Estos receptores se unen al factor de crecimiento y proteínas de señalización de citoquinas en la familia TGF β , por ejemplo, TGF β (TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3), proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores de diferenciación de crecimiento (GDF), activina e inhibina, miostatina, hormona antimülleriana (AMH), y NODAL.

En algunos ejemplos, las células T genéticamente manipuladas pueden comprender un gen *TGFBRII* interrumpido de modo que la expresión de TGFBRII en las T esté sustancialmente reducida o eliminada por completo, en donde las células además comprenden un gen *Reg1* interrumpido, en donde las células T están además manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral. El gen *TGFBRII* interrumpido puede comprender una o más ediciones genéticas en uno o más sitios diana adecuados (por ejemplo, en regiones codificantes o en regiones reguladoras no codificantes tal como regiones promotoras) que interrumpen la expresión del gen *TGFBRII*. Tales sitios diana se pueden identificar basado en el enfoque de edición génica para uso en hacer las células T genéticamente manipuladas. Los sitios diana ejemplares para las ediciones genéticas pueden incluir el exón 1, exón 2, exón 3, exón 4, exón 5, o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, una o más ediciones genéticas se pueden producir en el exón 4 y/o el exón 5. Tal edición genética puede estar inducida por una tecnología de edición génica (por ejemplo, la tecnología CRISPR/Cas) usando un ARN guía adecuado, por ejemplo, los enumerados en la tabla 39. El gen *TGFBRII* interrumpido resultante usando un ARNg enumerado en la tabla 39 puede comprender una o más secuencias editadas proporcionadas en las tablas 40-48 posteriormente.

Edición del gen *CD70*

El agotamiento de células T es un proceso de pérdida escalonada y progresiva de funciones de células T, que puede estar inducido por estimulación de antígeno prolongada u otros factores. Los genes implicados en el agotamiento de células T se refieren a los que o bien regulan de forma positiva o regulan de forma negativa este proceso biológico. Las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento pueden comprender edición genética de un gen que regula positivamente el agotamiento de células T para interrumpir su expresión. Alternativamente o además, las células T genéticamente manipuladas pueden comprender edición de genética de un gen que regula negativamente el agotamiento de células T para aumentar su expresión y/o actividad biológica del producto génico.

Las células T genéticamente manipuladas pueden comprender un gen editado implicado en el agotamiento de células T, por ejemplo, interrupción de un gen que regula positivamente el agotamiento de células T. Tal gen puede ser el gen del grupo de diferenciación 70 (*CD70*). *CD70* es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral y su expresión está restringida a linfocitos T y B activados y células dendríticas maduras. *CD70* está implicado en supervivencia de células tumorales y células T reguladoras mediante interacción con su ligando *CD27*. *CD70* y su receptor *CD27* tienen múltiples papeles en la función inmunitaria en múltiples tipos celulares incluyendo células T (células activadas y T_{reg}), y células B.

También se encontró que interrumpir el gen *CD70* en células inmunitarias manipuladas para expresar una fracción que se dirige a antígeno aumentó la eficacia antitumoral contra tumores grandes e inducía una respuesta de memoria anticáncer durable. Específicamente, la respuesta de memoria anticáncer prevenía el crecimiento tumoral tras la reexposición. Además, se ha demostrado que interrumpir el gen *CD70* produce citotoxicidad mejorada de células inmunitarias manipuladas para expresar una fracción de direccionamiento a antígeno a menores proporciones de células inmunitarias manipuladas respecto a células diana, indicando la eficacia potencial de bajas dosis de células inmunitarias manipuladas. Véase, por ejemplo, el documento WO2019/215500.

Las estructuras de los genes *CD70* se conocen en la técnica. Por ejemplo, el gen *CD70* humano está localizado en el cromosoma 19p13.3. El gen contiene cuatro exones que codifican proteína. Se puede encontrar información adicional en GenBank bajo Gene ID: 970.

En algunos ejemplos, las células T genéticamente manipuladas pueden comprender un gen *CD70* interrumpido de modo que la expresión de *CD70* en las células T esté sustancialmente reducida o eliminada por completo. El gen *CD70* interrumpido puede comprender una o más ediciones genéticas en uno o más sitios diana adecuados (por ejemplo, en regiones codificantes o en regiones reguladoras no codificantes tal como regiones promotoras) que interrumpen la expresión del gen *CD70*. Tales sitios diana se pueden identificar basado en el enfoque de edición génica para uso en hacer las células T genéticamente manipuladas. Los sitios diana ejemplares para las ediciones genéticas pueden incluir el exón 1, exón 2, exón 3, exón 4, o una combinación de los mismos. Véase también el documento WO2019/215500.

El ARNg que se dirige a *CD70* enumerado en la tabla 23 (*CD70-7*) se puede usar para interrumpir el gen *CD70* a través de edición génica con CRISPR/Cas9. En algunos ejemplos, un gen *CD70* editado puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada de las siguientes secuencias en la tabla 26.

Edición del gen $\beta 2M$

En algunas formas de realización, las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento pueden además comprender un gen $\beta 2M$ interrumpido. $\beta 2M$ es un componente común (invariable) de los complejos de MHC I. Interrumpir su expresión por edición génica prevendrá respuestas del huésped contra células T alogénicas terapéuticas produciendo persistencia de células T alogénicas aumentada. En algunas formas de realización, la expresión del gen $\beta 2M$ endógeno se elimina para prevenir una respuesta del huésped contra el injerto.

En algunas formas de realización, un gen $\beta 2M$ editado puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada de las siguientes secuencias en la tabla 25. Los expertos en la materia saben que diferentes secuencias de nucleótidos en un gen editado, tal como un gen $\beta 2M$ editado (por ejemplo, esas en la tabla 25) se pueden generar mediante un único ARNg tal como el enumerado en la tabla 23 ($\beta 2M-1$). Véase también el documento WO2019097305.

Las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento pueden además comprender una o más ediciones génicas adicionales (por ejemplo, introducción o inactivación génica) para mejorar la función de células T. Los ejemplos incluyen genes introducidos o inactivados para mejorar la lisis de células diana, genes introducidos o inactivados para mejorar el rendimiento de células T terapéuticas tal como células CAR-T preparadas de las células T genéticamente manipuladas.

Edición del gen *TRAC*

En algunas formas de realización, las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento pueden además comprender un gen *TRAC* interrumpido. Esta interrupción produce pérdida de función del TCR y hace las células T manipuladas no alorreactivas y adecuadas para trasplante alogénico, minimizando el riesgo de enfermedad del injerto contra el huésped. En algunas formas de realización, la expresión del gen *TRAC* endógeno se elimina para prevenir una respuesta del injerto contra el huésped. Véase también el documento WO2019097305.

En algunas formas de realización, un gen *TRAC* editado puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada de las siguientes secuencias en la tabla 24. Los expertos en la materia saben que diferentes secuencias de nucleótidos en un gen editado, tal como un gen *TRAC* editado (por ejemplo, esas en la tabla 24) se pueden generar mediante un único ARNg tal como el enumerado en la tabla 23 (*TA-1*).

Se debe entender que se puede usar más de un sitio diana/ARNg para cada gen diana divulgado en el presente documento, por ejemplo, los conocidos en la técnica o divulgados en el presente documento. Se pueden encontrar ejemplos adicionales en, por ejemplo, el documento WO2019097305.

(b) Características mejoradas ejemplares de células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento

Cualquiera de las células T genéticamente manipuladas que tienen un gen *Reg1* interrumpido y un gen *TGFBR1* interrumpido, en donde las células T además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral, y opcionalmente una o más ediciones genéticas adicionales, por ejemplo, un gen *CD70* interrumpido, un gen *TRAC* interrumpido, un gen $\beta 2M$ interrumpido o una combinación de los mismos, puede ser expansible en cultivo durante más de 4 semanas, por ejemplo, más de 5 semanas, más de 6 semanas, más de 8 semanas, y más de 10 semanas. En algunos ejemplos, las células T genéticamente manipuladas comprenden un gen *Reg1* interrumpido y un gen *TGFBR1* interrumpido, en donde las células T además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específica para un antígeno tumoral (opcionalmente, interrupciones en *CD70*) son expansibles después de 6 semanas (por ejemplo, después de 7 semanas, después de 8 semanas, después de 9 semanas o después de 10 semanas) en cultivo. Tales células T genéticamente manipuladas pueden mantener la capacidad de activarse después de 6 semanas (por ejemplo, después de 7 semanas, después de 8 semanas, después de 9 semanas o después de 10 semanas) en cultivo. Además, tales células T genéticamente manipuladas tienen una capacidad de expansión aumentada, que

puede ser al menos 10 veces (por ejemplo, al menos 15 veces) mayor que los homólogos no manipulados, es decir, células T que tienen los mismos antecedentes genéticos que las células T manipuladas divulgadas en el presente documento excepto que las células T homólogas tienen un gen *Reg1* de tipo salvaje.

5 Además, las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento muestran persistencia de célula T mejorada. "Persistencia de células T" como se usa en el presente documento se refiere a la tendencia de las células T a seguir creciendo, proliferando, autorrenovándose, expandiéndose y manteniendo actividad saludable en cultivo. En algunos casos, la persistencia de células T puede estar representada por la longevidad que las células T
10 pueden crecer y expandirse *in vitro*, que se puede medir por métodos y/o ensayos convencionales descritos en el presente documento. En otros casos, la persistencia de células T puede estar representada por la reducción de muerte celular (por ejemplo, apoptosis) o reducción en estados celulares caracterizados por agotamiento o senescencia replicativa. En aun otros casos, la persistencia de células T puede estar presentada por el mantenimiento de la capacidad de activación de células T en cultivo.

15 Alternativamente o además, las células T genéticamente manipuladas divulgadas pueden crecer más rápido y más tiempo que las células T no manipuladas, por ejemplo, como se observa en cultivo celular *in vitro*. En algunos casos, las células T genéticamente manipuladas crecen al menos el 50% (por ejemplo, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 5 veces, o más) que las células T no manipuladas en un cultivo de células T *in vitro* convencional (por ejemplo, como se describe en los ejemplos posteriores). En otros casos, las células T genéticamente manipuladas pueden
20 mantener una alta velocidad de crecimiento (por ejemplo, tienen sustancialmente la misma velocidad de crecimiento o con solo una ligera reducción) *in vitro* durante al menos 20 días (por ejemplo, al menos 25 días, al menos 30 días, al menos 35 días, al menos 40 días, al menos 45 días, al menos 50 días, o más tiempo).

Además, las células T genéticamente manipuladas pueden mostrar un nivel reducido de agotamiento celular relativo a la célula T homóloga no manipulada. En algunos casos, un nivel reducido de agotamiento celular se refleja por un mayor nivel de células T de memoria central en la población de células T entera. La población de células T genéticamente manipuladas divulgada puede comprender un mayor número de células T de memoria central en comparación con células T homólogas no manipuladas. Por ejemplo, en algunos casos la población de células T genéticamente manipuladas incluye un mayor número de células T de memoria central que se caracterizan por
25 expresión aumentada de CD27 y/o CD45RO en comparación con células T homólogas no manipuladas. En algunos casos, la población de células T genéticamente manipuladas divulgada muestra agotamiento de células T reducido, que se caracteriza, por ejemplo, por expresión reducida de PD-1 y/o TIM3 en comparación con células T homólogas no manipuladas.

35 Cualquiera de las células T genéticamente manipuladas que tienen un gen *TGFBR1* interrumpido y un gen *Reg1* interrumpido, en donde las células T además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específica para un antígeno tumoral, y opcionalmente una o más ediciones genéticas adicionales, por ejemplo, un gen *CD70* interrumpido, un gen *TRAC* interrumpido, un gen *$\beta 2M$* interrumpido o una combinación de los mismos, puede tener actividades de crecimiento y expansión mejoradas, tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con la homóloga no manipulada, que se refiere a células T que tienen los mismos antecedentes genéticos excepto por un gen *TGFBR1* no interrumpido. Además, tales células T genéticamente manipuladas (por ejemplo, células CAR-T) pueden mostrar actividad de citotoxicidad mejorada, por ejemplo, contra células indeseadas (por ejemplo, células tumorales) que expresan un antígeno al que se dirige el CAR expresado en las células CAR-T, en comparación con la homóloga no manipulada. Tales células T genéticamente manipuladas (por ejemplo, células CAR-T) también pueden ser resistentes a los efectos inhibidores mediados por la señalización de TGF β y/o fibroblastos (por ejemplo, en TME). Por ejemplo, las células T genéticamente manipuladas con un gen *TGFBR1* interrumpido y un gen *Reg1* interrumpido, en donde las células T además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específica para un gen de antígeno tumoral pueden ser resistentes a factores
40 inhibidores secretados por fibroblastos.

Las células T genéticamente manipuladas pueden además comprender uno o más genes interrumpidos (por ejemplo, *CD70*, *Reg1*, o una combinación de los mismos) para mejorar la persistencia de células T. "Persistencia de células T" como se usa en el presente documento se refiere a la tendencia de las células T a seguir creciendo, proliferando, autorrenovándose, expandiéndose y manteniendo actividad saludable en cultivo. En algunos casos, la persistencia de células T puede estar representada por la longevidad que las células T pueden crecer y expandirse *in vitro*, que se puede medir por métodos y/o ensayos convencionales descritos en el presente documento. En otros casos, la persistencia de células T puede estar representada por la reducción de la muerte celular (por ejemplo, apoptosis) o reducción en estados celulares caracterizados por agotamiento o senescencia replicativa. En aun otros casos, la persistencia de células T puede estar presentada por el mantenimiento de la capacidad de activación de células T en cultivo.
55

Por ejemplo, tales células T genéticamente manipuladas puede ser expansible en cultivo durante más de 4 semanas, por ejemplo, más de 5 semanas, más de 6 semanas, más de 8 semanas, y más de 10 semanas. En algunos ejemplos, las células T genéticamente manipuladas comprenden un gen *TGFBR1* interrumpido, y un gen *CD70* interrumpido y un gen *Reg1* interrumpido, pueden ser expansibles después de 6 semanas (por ejemplo, después de 7 semanas,
60

después de 8 semanas, después de 9 semanas o después de 10 semanas) en cultivo. Tales células T genéticamente manipuladas pueden mantener la capacidad de activarse después de 6 semanas (por ejemplo, después de 7 semanas, después de 8 semanas, después de 9 semanas o después de 10 semanas) en cultivo. Tales células T genéticamente manipuladas pueden mostrar capacidad de crecimiento y expansión más mejorada relativa a las células T que tienen los mismos antecedentes genéticos excepto por un gen *TGFBRII* no interrumpido, *CD70* y un gen no interrumpido y un gen *Reg1* no interrumpido.

Además, cualquiera de las células T genéticamente manipuladas que tienen un gen *TGFBRII* interrumpido y un gen *Reg1* interrumpido, en donde las células T además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específica para un antígeno tumoral, y opcionalmente una o más ediciones genéticas adicionales, por ejemplo, un gen *CD70* interrumpido, un gen *TRAC* interrumpido, un gen $\beta 2M$ interrumpido o una combinación de los mismos, puede tener ventaja de expansión (por ejemplo, *in vivo*) sobre células T homólogas, es decir, que tienen el gen *TGFBRII* interrumpido o el gen *Reg1* interrumpido (pero no ambos), así como las otras ediciones genéticas adicionales. Se encontró que las células CAR-T que tienen interrupciones tanto en el gen *TGFBRII* como el gen *Reg1* eran más potentes en tratamiento contra el cáncer que las células T homólogas como se observa en modelos de ratón de xenoinjertos. Según esto, se esperaría que células CAR-T que tienen interrupciones tanto en el gen *TGFBRII* como el gen *Reg1* mostraran eficacia superior en tratamiento contra el cáncer.

(c) Métodos de hacer células T genéticamente manipuladas

Las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento se pueden preparar por edición genética de células T parentales o células precursoras de las mismas a través de un método de edición génica convencional o los descritos en el presente documento.

(a) Células T

Las células T pueden derivar de uno o más mamíferos adecuados, por ejemplo, uno o más donantes humanos. Las células T se pueden obtener de un número de fuentes, incluyendo, pero no limitado a, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, efusión pleural, tejido de bazo, y tumores. Las células T se pueden obtener de una unidad de sangre recogida de un sujeto usando cualquier número de técnicas que conoce el experto en la materia, tal como sedimentación, por ejemplo, separación con FICOLL™.

En algunos ejemplos, las células T se pueden aislar de una mezcla de células inmunitarias (por ejemplo, las descritas en el presente documento) para producir una población de células T aislada. Por ejemplo, después del aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), se pueden separar tanto linfocitos T citotóxicos como auxiliares en subpoblaciones de células T indiferenciadas, memoria, y efectoras ya sea antes o después de la activación, expansión y/o modificación genética.

Una subpoblación específica de células T, que expresan uno o más de los siguientes marcadores de superficie celular: TCRab, CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD122, CD95, CD197, CCR7, KLRG1, proteínas de MHC-I y/o proteínas de MHC-II, se puede aislar adicionalmente por técnicas de selección positiva o negativa. Una subpoblación específica de células T, que expresan uno o más de los marcadores seleccionados de TCRab, CD4 y/o CD8, se puede aislar adicionalmente por técnicas de selección positiva o negativa. Se pueden aislar subpoblaciones de células T por técnicas de selección positiva o negativa antes de la manipulación genética y/o tras la manipulación genética.

Una población aislada de células T puede expresar uno o más de los marcadores de células T incluyendo, pero no limitado a CD3+, CD4+, CD8+, o una combinación de los mismos. Las células T se pueden aislar de un donante, o sujeto, y primero activar y estimular para proliferar *in vitro* antes de someterse a edición génica.

En algunos casos, la población de células T comprende células T primarias aisladas de uno o más donantes humanos. Tales células T son terminalmente diferenciadas, no transformadas, dependen de citoquinas y/o factores de crecimiento para el crecimiento, y/o tienen genomas estables.

Alternativamente, las células T pueden derivar de células madre (por ejemplo, HSC o iPSC) a través de diferenciación *in vitro*.

Las células T de una fuente adecuada se pueden someter a una o más rondas de estimulación, activación y/o expansión. Las células T se pueden activar y expandir en general usando métodos como se describen, por ejemplo, en las patentes en EE UU No. 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; y 6.867.041. Las células T se pueden activar y expandir durante de aproximadamente 1 día a aproximadamente 4 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 2 días, de aproximadamente 2 días a aproximadamente 3 días, de aproximadamente 2 días a aproximadamente 4 días, de aproximadamente 3 días a

aproximadamente 4 días, o aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, o aproximadamente 4 días antes de la introducción de las composiciones de edición genómica en las células T.

Las células T se pueden activar y expandir durante aproximadamente 4 horas. Aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, o aproximadamente 72 horas antes de la introducción de las composiciones de edición génica en las células T. Las células T se pueden activar al mismo tiempo que se introducen las composiciones de edición génicas en las células T. En algunos casos, la población de células T se puede expandir y/o activar después de la edición genética como se divulga en el presente documento. Las poblaciones de células T o las células T aisladas generadas por cualquiera de lo método de edición génica descritos en el presente documento también están dentro del ámbito de la presente divulgación.

(b) Métodos de edición génica

Cualquiera de las células T genéticamente manipuladas se puede preparar usando métodos de edición génica convencionales o los descritos en el presente documento para editar uno o más de los genes diana divulgados en el presente documento (edición dirigida). La edición dirigida se puede lograr o bien mediante un enfoque independiente de nucleasa, o mediante un enfoque dependiente de nucleasa. En el enfoque de edición dirigida independiente de nucleasa, la recombinación homóloga está guiada por secuencias homólogas que flanquean un polinucleótido exógeno que se va a introducir en una secuencia endógena mediante la maquinaria enzimática de la célula huésped. El polinucleótido exógeno puede introducir delecciones, inserciones o sustituciones de nucleótidos en la secuencia endógena.

Alternativamente, el enfoque dependiente de nucleasa puede lograr la edición dirigida con mayor frecuencia mediante la introducción específica de roturas bicatenarias (DSB) por nucleasas de corte infrecuente específicas (por ejemplo, endonucleasas). Tal edición dirigida dependiente de nucleasas también utiliza mecanismos de reparación de ADN, por ejemplo, unión de extremos no homólogos (NHEJ), que se produce en respuesta a las DSB. La reparación de ADN por NHEJ con frecuencia produce inserciones o delecciones (indels) aleatorias de un pequeño número de nucleótidos endógenos. En contraste con la reparación mediada por NHEJ, la reparación también se puede producir por una reparación dirigida por homología (HDR). Cuando un molde donante que contiene material genético exógeno flanqueado por un par de brazos de homología está presente, el material genético exógeno se puede introducir en el genoma por HDR, que produce la integración dirigida del material genético exógeno.

Una interrupción génica se puede producir por delección de una secuencia genómica usando dos ARN guías. Los métodos de usar la tecnología de edición genómica CRISPR-Cas para crear una delección genómica en una célula (por ejemplo, para inactivar un gen en una célula) son conocidos (Bauer DE et al. Vis. Exp. 2015; 95:e52118).

Las endonucleasas disponibles capaces de introducir DSB específicas y dirigidas incluyen, pero no están limitadas a, nucleasas de dedo de cinc (ZFN), nucleasa efectoras similares a activador de transcripción (TALEN), y nucleasa CRISPR-Cas9 guiada por ARN (CRISPR/Cas9; asociada a 9 a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas regularmente). Además, el sistema DICE (intercambio de casete de integrasa dual) que utiliza las integrasas phiC31 y Bxb1 también se puede usar para la integración dirigida. Algunos enfoques ejemplares se divulgan en detalle a continuación.

Sistema de edición génica CRISPR-Cas9

El sistema CRISPR-Cas9 es un mecanismo de defensa natural en procariotas que se ha reconvertido como una plataforma de direccionamiento a ADN guiada por ARN usado para edición génica. Se basa en la ADN nucleasa Cas9, y dos ARN no codificantes, crisprARN (crARN) y un ARN transactivador (tracrARN), para dirigir el corte de ADN. CRISPR es una abreviatura para repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas, una familia de secuencias de ADN encontradas en los genomas de bacterias y arqueas que contienen fragmentos de ADN (ADN espaciador) con similitud a ADN exógeno previamente expuesto a la célula, por ejemplo, por virus que han infectado o atacado el procariota. Estos fragmentos de ADN son usados por el procariota para detectar y destruir ADN exógeno similar tras la reintroducción, por ejemplo, de virus similares durante ataques posteriores. La transcripción del locus CRISPR produce la formación de una molécula de ARN que comprende la secuencia espaciadora, que se asocia con y dirige proteínas Cas (asociadas a CRISPR) capaces de reconocer y cortar el ADN exógeno, extraño. Se han descrito numerosos tipos y clases de sistemas CRISPR/Cas (véase, por ejemplo, Koonin et al., (2017) Curr Opin Microbiol 37:67-78).

El crARN dirige el reconocimiento de secuencia y especificidad del complejo CRISPR-Cas9 a través de emparejamiento de bases de Watson-Crick típicamente con una secuencia de 20 nucleótidos (nt) en el ADN diana. Cambiar la secuencia de los 20 nt 5' en el crARN permite que el complejo CRISPR-Cas9 se dirija a loci específicos. El complejo CRISPR-Cas9 solo se une a secuencias de ADN que contienen una coincidencia de secuencia a los primeros 20 nt del crARN, si la secuencia diana está seguida por un motivo de ADN corto específico (con la secuencia NGG) denominada un motivo adyacente protoespaciador (PAM).

El tracrARN hibrida con el extremo 3' de crARN para formar una estructura dúplex de ARN que se une a la endonucleasa Cas9 para formar el complejo CRISPR-Cas9 catalíticamente activo, que entonces puede cortar el ADN diana.

- 5 Una vez el complejo CRISPR-Cas9 está unido al ADN en un sitio diana, dos dominios nucleasa independientes en la enzima Cas9 cada uno corta una de las hebras de ADN antes del sitio PAM, dejando una rotura bicatenaria (DSB) donde ambas hebras del ADN terminan en un par de bases (un extremo romo).

- 10 Después de la unión del complejo CRISPR-Cas9 al ADN en un sitio diana específico y la formación de la DSB específica de sitio, la siguiente etapa clave es la reparación de la DSB. Las células usan dos rutas principales de reparación de ADN para reparar la DSB: unión de extremos no homólogos (NHEJ) y reparación dirigida por homología (HDR).

- 15 NHEJ es un mecanismo de reparación robusto que parece muy activo en la mayoría de los tipos celulares, incluyendo células que no se dividen. NHEJ es propenso a errores y con frecuencia puede producir la eliminación o adición de entre uno y varios cientos de nucleótidos en el sitio de la DSB, aunque tales modificaciones son típicamente < 20 nt. Las inserciones y deleciones (indels) resultantes pueden interrumpir regiones codificantes o no codificantes de genes. Alternativamente, HDR usa un tramo largo de ADN donante homólogo, proporcionado endógena o exógenamente, para reparar la DSB con alta fidelidad. La HDR es activa solo en células individuales, y se produce a una frecuencia relativamente baja en la mayoría de los tipos celulares.

Endonucleasa para uso en CRISPR

- 25 Los componentes del sistema CRISPR/Cas pueden derivar de un sistema de tipo I, tipo II o tipo III. Los esquemas de clasificación actualizados para loci CRISPR/Cas definen sistemas CRISPR/Cas de clase 1 y clase 2, que tienen los tipos I a V o VI (Makarova et al., (2015) Nat Rev Microbiol, 13(11):722-36; Shmakov et al., (2015) Mol Cell, 60:385-397). Los sistemas CRISPR/Cas de clase 2 tienen proteínas efectoras individuales. Las proteínas Cas de tipos II, V, y VI son endonucleasas guiadas por ARN de proteína individual, llamadas en el presente documento "nucleasas Cas de clase 2". Las nucleasas Cas de clase 2 incluyen, por ejemplo, las proteínas Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, y C2c3. La nucleasa Cpf1 (Zetsche et al., (2015) Cell 163:1-13) es homóloga a Cas9, y contiene un dominio nucleasa de tipo RuvC.

- 35 La nucleasa Cas puede ser de un sistema CRISPR/Cas de tipo II (por ejemplo, una proteína Cas9 de un sistema CRISPR/Cas). La nucleasa Cas puede ser de un sistema CRISPR/Cas de clase 2 (una nucleasa Cas de proteína única tal como una proteína Cas9 o una proteína Cpf1). La familia de proteínas de Cas9 y Cpf1 son enzimas con actividad ADN endonucleasa, y se pueden dirigir para cortar una diana de ácido nucleico deseada diseñando un ARN guía apropiado, como se describe adicionalmente en el presente documento.

- 40 Una nucleasa Cas puede comprender más de un dominio nucleasa. Por ejemplo, la nucleasa Cas9 puede comprender al menos un dominio nucleasa de tipo RuvC (por ejemplo, Cpf1) y al menos un dominio nucleasa de tipo HNH (por ejemplo, Cas9). La nucleasa Cas9 puede introducir una DSB en la secuencia diana. La nucleasa Cas9 se puede modificar para contener solo un dominio nucleasa funcional. Por ejemplo, la nucleasa Cas9 se modifica de modo que uno de los dominios nucleasa se muta o delecta total o parcialmente para reducir su actividad de corte de ácido nucleico. La nucleasa Cas9 se puede modificar para que no contenga un dominio nucleasa de tipo RuvC funcional. La nucleasa Cas9 se puede modificar para que no contenga un dominio nucleasa de tipo HNH funcional. Cuando solo uno de los dominios nucleasa es funcional, la nucleasa Cas9 puede ser una nickasa que es capaz de introducir un corte monocatenario (una "mella" ("nick", en inglés)) en la secuencia diana. Un aminoácido conservado en un dominio nucleasa de Cas9 se puede sustituir para reducir o alterar una actividad nucleasa. La nickasa nucleasa Cas9 puede comprender una sustitución de aminoácido en el dominio nucleasa de tipo RuvC. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares en el dominio nucleasa de tipo RuvC incluyen D10A (basado en la nucleasa Cas9 de *S. pyogenes*). La nickasa puede comprender una sustitución de aminoácidos en el dominio nucleasa de tipo HNH. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares en el dominio nucleasa de tipo HNH incluyen E762A, H840A, N863A, H983A, y D986A (basado en la nucleasa Cas9 de *S. pyogenes*).

- 55 Secuencia de aminoácidos de la nucleasa Cas9 (SEQ ID NO: 1):

MDRKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
 RRYTRRNRIICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERNPTFGNIVDEVAYHEKYPTTYHL
 RKKLVDSTDKADLRLLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEEENPINASGVD
 AKAILSARLSKSRRLNLTIAQLPGEKKNGLFENLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDDLD
 NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
 KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPTLEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
 HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEVVVD
 KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL
 PKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRENASLGTYHDLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVL
 TLTLEFEDREMIEERLNTYAHLPDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDNQSGKTIILDFLKSIGFAN
 RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI
 VIEMARENQTTQKQKNSRERMKRIEKGIELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQEL
 DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIINKVLFRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNALKITQRKF
 DNLPKAERGGLSELDKAGFIKQQLVETPQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSILVSDF
 RKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEGEIGKATAK
 YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIIVKTEVQTGG
 FSKESILPKRNSDKLIARKKNDWDPNKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS
 FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHY
 EKLGSPEDNEQKQLFEVQHKHYLDEIEEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHROKPIREQAENI
 LFTLTNLGAPAAFKYEDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD

5 La nucleasa Cas puede ser de un sistema CRISPR/Cas de tipo I. La nucleasa Cas es un componente del complejo de cascada de un sistema CRISPR/Cas de tipo I. Por ejemplo, la nucleasa Cas es una nucleasa Cas3. La nucleasa Cas puede derivar de sistema CRISPR/Cas de tipo III. La nucleasa Cas puede derivar de sistema CRISPR/Cas de tipo IV. La nucleasa Cas puede derivar de sistema CRISPR/Cas de tipo V. La nucleasa Cas puede derivar de sistema CRISPR/Cas de tipo VI.

10 *ARN guías (ARNg)*

La tecnología CRISPR implica el uso de un ácido nucleico dirigido al genoma que puede dirigir la endonucleasa a una secuencia diana específica en un gen diana para edición génica en la secuencia diana específica. El ácido nucleico dirigido al genoma puede ser un ARN. Un ARN dirigido al genoma se denomina un "ARN guía" o "ARNg" en el presente documento. Un ARN guía comprende al menos una secuencia espaciadora que hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana en un gen diana para edición, y un secuencia de repetición CRISPR.

En sistema de tipo II, el ARNg también comprende un segundo ARN llamado la secuencia tracrARN. En el ARNg de tipo II, la secuencia de repetición CRISPR y la secuencia tracrARN hibridan entre sí para formar un dúplex. En el ARNg de tipo V, el crARN forma un dúplex. En ambos sistemas, el dúplex se une a un polipéptido dirigido a sitio, de modo que el ARN guía y el polipéptido dirigido al sitio forman un complejo. El ácido nucleico dirigido al genoma proporciona especificidad de diana al complejo en virtud de su asociación con el polipéptido dirigido a sitio. El ácido nucleico dirigido al genoma, por tanto, dirige la actividad del polipéptido dirigido a sitio.

25 Como entiende el experto en la materia, cada ARN guía se diseña para incluir una secuencia espaciadora complementaria a su secuencia diana genómica. Véase, Jinek et al., Science, 337, 816-821 (2012) y Deltcheva et al., Nature, 471, 602-607 (2011).

30 El ácido nucleico dirigido al genoma (por ejemplo, ARNg) puede ser un ARN guía de molécula doble. El ácido nucleico dirigido al genoma (por ejemplo, ARNg) puede ser un ARN guía de molécula única.

Un ARN guía de molécula doble comprende dos hebras de moléculas de ARN. La primera hebra comprende en la dirección 5' a 3', una secuencia de extensión del espaciador opcional, una secuencia espaciadora y una secuencia de repetición CRISPR mínima. La segunda hebra comprende una secuencia tracrARN mínima (complementaria a la secuencia de repetición CRISPR mínima), una secuencia tracrARN 3' y una secuencia de extensión de tracrARN opcional.

Un ARN guía de molécula única (denominado un "ARNsg") es un sistema de tipo II comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de extensión del espaciador opcional, una secuencia espaciadora, una secuencia de repetición CRISPR mínima, un enlazador guía de molécula única, una secuencia tracrARN mínima, una secuencia tracrARN 3' y una secuencia de extensión de tracrARN opcional. La extensión tracrARN opcional puede comprender elementos que contribuyen funcionalidad adicional (por ejemplo, estabilidad) al ARN guía. El enlazador guía de molécula única enlaza la repetición CRISPR mínima y la secuencia tracrARN mínima para formar una estructura de horquilla. La extensión de tracrARN opcional comprende una o más horquillas. Un ARN guía de molécula única en un sistema de tipo V comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de repetición CRISPR mínima y una secuencia espaciadora.

Una secuencia espaciadora en un ARNg es una secuencia (por ejemplo, una secuencia de 20 nucleótidos) que define la secuencia diana (por ejemplo, una secuencia diana de ADN, tal como una secuencia diana genómica) de un gen diana de interés. La secuencia espaciadora puede variar desde 15 a 30 nucleótidos. Por ejemplo, la secuencia espaciadora puede contener 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos. Una secuencia espaciadora puede contener 20 nucleótidos.

La "secuencia diana" está en un gen diana que está adyacente a una secuencia PAM y es la secuencia que se va a modificar por una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, Cas9). La "secuencia diana" está en la llamada hebra PAM en un "ácido nucleico diana", que es una molécula bicatenaria que contiene la hebra PAM y una hebra no PAM complementaria. Un experto en la materia reconoce que la secuencia espaciadora del ARNg hibrida con la secuencia complementaria localizada en la hebra no PAM del ácido nucleico diana de interés. Por tanto, la secuencia espaciadora del ARNg es el equivalente de ARN de la secuencia diana. Por ejemplo, si la secuencia diana es 5'-AGAGCAACAGTGTGTGGCC**-3' (SEQ ID NO: 69), entonces la secuencia espaciadora del ARNg es 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC**-3' (SEQ ID NO: 61). El espaciador de un ARNg interacciona con un ácido nucleico diana de interés de una manera específica de secuencia mediante hibridación (es decir, emparejamiento de bases). La secuencia de nucleótidos del espaciador por tanto varía dependiendo de la secuencia diana del ácido nucleico diana de interés.

En un sistema CRISPR/Cas en el presente documento, la secuencia espaciadora se diseña para hibridar con una región del ácido nucleico diana que está localizada 5' de un PAM reconocible por una enzima Cas9 usada en el sistema. El espaciador puede perfectamente coincidir con la secuencia diana o puede tener malos emparejamientos. Cada enzima Cas9 tiene una secuencia PAM particular que reconoce en un ADN diana. Por ejemplo, *S. pyogenes* reconoce en un ácido nucleico diana un PAM que comprende la secuencia 5'-NRG-3', donde R comprende o bien A o G, donde N es cualquier nucleótido y N está inmediatamente 3' de la secuencia de ácido nucleico diana a la que se dirige la secuencia espaciadora.

La secuencia de ácido nucleico diana puede tener 20 nucleótidos de longitud. El ácido nucleico diana puede tener menos de 20 nucleótidos de longitud. El ácido nucleico diana puede tener más de 20 nucleótidos de longitud. El ácido nucleico diana puede tener al menos: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 o más nucleótidos de longitud. La secuencia de ácido nucleico diana puede tener 20 bases inmediatamente 5' del primer nucleótido del PAM. Por ejemplo, en una secuencia que comprende 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3', el ácido nucleico diana puede ser la secuencia que corresponde a las N, en donde N puede ser cualquier nucleótido, y la secuencia NRG subrayada es el PAM de *S. pyogenes*.

El ARN guía divulgado en el presente documento se puede dirigir a cualquier secuencia de interés a través de la secuencia espaciadora en el crARN. El grado de complementariedad entre la secuencia espaciadora del ARN guía y la secuencia diana en el gen diana puede ser aproximadamente el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100%. La secuencia espaciadora del ARN guía y la secuencia diana en el gen diana pueden ser complementarias al 100%. La secuencia espaciadora del ARN guía y la secuencia diana en el gen diana pueden contener hasta 10 malos emparejamientos, por ejemplo, hasta 9, hasta 8, hasta 7, hasta 6, hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2, o hasta 1 mal emparejamiento.

Para cualquiera de las secuencias de ARNg proporcionadas en el presente documento, las que no indican explícitamente modificaciones se pretende que abarquen tanto las secuencias sin modificar como secuencias que tienen cualquier modificación adecuada.

La longitud de la secuencia espaciadora en cualquiera de los ARNg divulgados en el presente documento puede depender del sistema CRISPR/Cas9 y los componentes usados para editar cualquiera de los genes diana también divulgados en el presente documento. Por ejemplo, diferentes proteínas Cas9 de diferentes especies bacterianas tienen longitudes de secuencias espaciadoras óptimas variables. Según esto, la secuencia espaciadora puede tener 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, o más de 50 nucleótidos de longitud. La secuencia espaciadora puede tener 18-24 nucleótidos de longitud. La secuencia de direccionamiento puede tener 19-21 de longitud. La secuencia espaciadora puede comprender 20 nucleótidos de longitud.

El ARNg puede ser un ARNsg, que puede comprender una secuencia espaciadora de 20 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia ARNsg. El ARNsg puede comprender una secuencia espaciadora de menos de 20 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia ARNsg. El ARNsg puede comprender una secuencia espaciadora de más de 20 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia ARNsg. El ARNsg puede comprender una secuencia espaciadora de longitud variable con 17-30 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia ARNsg. Se proporcionan ejemplos en la tabla 23 posterior. En estas secuencias ejemplares, el fragmento de "n" se refiere a la secuencia espaciadora en el extremo 5'.

El ARNsg puede no comprender uracilo en el extremo 3' de la secuencia ARNsg. El ARNsg puede comprender uno o más uracilo en el extremo 3' de la secuencia ARNsg. Por ejemplo, el ARNsg puede comprender 1-8 residuos de uracilo,

en el extremo 3' de la secuencia ARNsg, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 residuos de uracilo, en el extremo 3' de la secuencia ARNsg.

Cualquiera de los ARNg divulgados en el presente documento, incluyendo cualquiera de los ARNsg, puede estar sin modificar. Alternativamente, puede contener uno o más nucleótidos modificados y/o esqueletos modificados. Por ejemplo, un ARNg modificado tal como un ARNsg puede comprender uno o más nucleótidos 2'-O-metilfosforotioato, que pueden estar localizados o bien en el extremo 5', el extremo 3', o ambos.

Se puede usar más de un ARN guía con un sistema de nucleasa CRISPR/Cas. Cada ARN guía puede contener una secuencia de direccionamiento diferente, de modo que el sistema CRISPR/Cas corta más de un ácido nucleico diana. Uno o más ARN guía pueden tener propiedades iguales o diferentes tal como actividad o estabilidad en el complejo Cas9 RNP. Cuando se usa más de un ARN guía, cada ARN guía puede estar codificado en el mismo o diferentes vectores. Los promotores usados para dirigir la expresión del más de un ARN guía es el mismo o diferente.

Los ARNg divulgados en el presente documento pueden dirigirse al gen *Reg1*, por ejemplo, dirigirse a un sitio en el exón 1, exón 2, exón 3, exón 4, exón 5, o exón 6 del gen *Reg1*. Tal ARNg puede comprender una secuencia espaciadora complementaria (completa o parcialmente) a las secuencias dianas en el exón 2 o exón 4 de un gen *Reg1*, o un fragmento del mismo. Las secuencias diana ejemplares de *Reg1* y las secuencias de ARNg ejemplares se proporcionan en la tabla 22 posterior.

Los ARNg divulgados en el presente documento pueden dirigirse al gen *TGFBR1*, por ejemplo, dirigirse a un sitio en el exón 1, exón 2, exón 3, exón 4, exón 5, o exón 6 del gen *TGFBR1*. Tal ARNg puede comprender una secuencia espaciadora complementaria (completa o parcialmente) a las secuencias dianas en el exón 4 o exón 5 de un gen *TGFBR1*, o un fragmento del mismo. Las secuencias diana ejemplares de *TGFBR1* y las secuencias de ARNg ejemplares se proporcionan en la tabla 39 posterior.

Los ARNg divulgados en el presente documento pueden dirigirse al gen *CD70*, por ejemplo, dirigirse a un sitio en el exón 1 o el exón 3 de un *CD70*. Tal ARNg puede comprender una secuencia espaciadora complementaria (completa o parcialmente) a las secuencias dianas en el exón 1 o exón 3 de un gen *CD70*, o un fragmento del mismo. Las secuencias diana ejemplares de un gen *CD70* y las secuencias de ARNg ejemplares específicas para el gen *CD70* se proporcionan en la tabla 23 posterior.

Los ARNg divulgados en el presente documento pueden dirigirse al gen $\beta 2M$, por ejemplo, dirigirse a un sitio adecuado en un gen $\beta 2M$. Véase también el documento WO2019097305. Otras secuencias de ARNg se pueden diseñar usando la secuencia del gen $\beta 2M$ localizada en el cromosoma 15 (coordenadas GRCh38: cromosoma 15: 44.711.477-44.718.877; Ensembl: ENSG00000166710). Los ARNg que se dirigen a la región genómica de $\beta 2M$ y la nucleasa guiada por ARN pueden crear roturas en la región genómica de $\beta 2M$ que producen indels en el gen $\beta 2M$ interrumpiendo la expresión del ARNm o proteína.

Los ARNg divulgados en el presente documento pueden dirigirse al gen *TRAC*. Véase también el documento WO2019097305. Otras secuencias de ARNg se pueden diseñar usando la secuencia del gen *TRAC* localizada en el cromosoma 14 (GRCh38: cromosoma 14: 22.547.506-22.552.154; Ensembl: ENSG00000277734). Los ARNg que se dirigen a la región genómica de *TRAC* y la nucleasa guiada por ARN pueden crear roturas en la región genómica de *TRAC* que producen indels en el gen *TRAC* interrumpiendo la expresión del ARNm o proteína.

Se proporcionan secuencias espaciadoras ejemplares y ARNg que se dirigen al gen $\beta 2M$ o el al gen *TRAC* en la tabla 23 posterior.

A modo de ilustración, los ARN guías usados en el sistema CRISPR/Cas/Cpf1, u otros ARN más pequeños se puede sintetizar fácilmente por medios químicos, como se ilustra posteriormente y se describe en la técnica. Mientras los procedimientos de síntesis química se expanden continuamente, las purificaciones de tales ARN por procedimientos tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, que evita el uso de geles tal como PAGE) tiende a volverse más desafiante según las longitudes de los polinucleótidos aumentan significativamente más allá de cien nucleótidos o así. Un enfoque usado para generar ARN de mayor longitud es producir dos o más moléculas que se ligan juntas. Los ARN mucho más largos, tal como los que codifican una endonucleasa Cas9 o Cpf1, se generan más fácilmente de forma enzimática. Se pueden introducir varios tipos de modificaciones de ARN durante o después de la síntesis química y/o generación enzimática de los ARN, por ejemplo, modificaciones que aumentan la estabilidad, reducen la probabilidad o grado de respuesta inmunitaria innata, y/o aumentan otros atributos, como se describe en la técnica.

En algunos ejemplos, los ARNg de la presente divulgación se pueden producir por transcripción *in vitro* (IVT), métodos de síntesis sintéticos y/o químicos, o una combinación de los mismos. Se utilizan métodos enzimáticos (IVT), de fase sólida, fase líquida, sintéticos combinados, síntesis de región pequeña, y métodos de ligación. Los ARNg se pueden hacer usando métodos de síntesis enzimáticos de IVT. Los métodos de hacer polinucleótidos por IVT se conocen en la técnica y se describen en el documento WO2013/151666. Según esto, la presente divulgación también incluye polinucleótidos, por ejemplo, se usan ADN, construcciones y vectores para transcribir *in vitro* un ARNg descrito en el presente documento.

Se pueden introducir varios tipos de modificaciones de ARN durante o después de la síntesis química y/o generación enzimática de los ARN, por ejemplo, modificaciones que aumentan la estabilidad, reducen la probabilidad o grado de respuesta inmunitaria innata, y/o aumentan otros atributos, como se describe en la técnica. Se pueden introducir nucleobases modificadas no naturales en cualquiera de los ARNg divulgados en el presente documento durante la síntesis o post-síntesis. Las modificaciones pueden ser en los enlaces internucleotídicos, bases de purina o pirimidina, o azúcar. Se puede introducir una mutación en el terminal de un ARNg con síntesis química o con una enzima polimerasa. Los ejemplos de ácido nucleicos modificados y sus síntesis se divulgan en el documento WO2013/052523. La síntesis de polinucleótidos modificados también se describe en Verma y Eckstein, Annual Review of Biochemistry, vol. 76, 99-134 (1998).

Se pueden usar métodos de ligación enzimática o química para conjugar polinucleótidos o sus regiones con diferentes fracciones funcionales, tal como agentes de direccionamiento o administración, marcadores fluorescentes, líquidos, nanopartículas, etc. Los conjugados de polinucleótidos y polinucleótidos modificados se revisan en Goodchild, Bioconjugate Chemistry, vol. 1(3), 165-187 (1990).

Un sistema de nucleasa CRISPR/Cas para uso en editar genéticamente cualquiera de los genes diana divulgados en el presente documento puede incluir un ARN guía. En algunos ejemplos, el sistema de nucleasa CRISPR/Cas puede contener múltiples ARNg, por ejemplo, 2, 3, o 4 ARNg. Tales múltiples ARNg se pueden dirigir a diferentes sitios en un mismo gen diana. Alternativamente, los múltiples ARNg se pueden dirigir a diferentes genes. El/los ARN guía(s) y la proteína Cas pueden formar una ribonucleoproteína (RNP), por ejemplo, un complejo CRISPR/Cas. El/los ARN guía(s) puede(n) guiar la proteína Cas a una secuencia(s) diana en uno o más genes diana como los divulgados en el presente documento, en donde la proteína Cas corta el gen diana en el sitio diana. El complejo CRISPR/Cas puede ser un complejo Cpf1/ARN guía. El complejo CRISPR puede ser un complejo CRISPR/Cas9 de tipo II. La proteína Cas puede ser una proteína Cas9. El complejo CRISPR/Cas9 puede ser un complejo Cas9/ARN guía.

La frecuencia de indel (frecuencia de edición) de un sistema de nucleasa CRISPR/Cas particular, que comprende uno o más ARN guías específicos, se puede determinar usando un análisis TIDE, que se puede usar para identificar moléculas de ARNg muy eficaces para editar un gen diana. Un ARNg muy eficaz puede dar una frecuencia de edición génica de más de 80%. Por ejemplo, se considera que un ARNg es muy eficaz si da una frecuencia de edición génica de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o el 100%.

Administración de ARN guías y nucleasas a células T

El sistema de nucleasa CRISPR/Cas divulgado en el presente documento, que comprende uno o más ARNg y al menos una nucleasa guiada por ARN, opcionalmente un molde donante como se divulga posteriormente, se puede administrar a una célula diana (por ejemplo, una célula T) para edición genética de un gen diana, a través de un método convencional. Los componentes de un sistema de nucleasa CRISPR/Cas como se divulga en el presente documento se pueden administrar a una célula diana por separado, ya sea simultáneamente o secuencialmente. Los componentes del sistema de nucleasa CRISPR/Cas se pueden administrar a una diana juntos, por ejemplo, como un complejo. En algunos casos, el ARNg y una nucleasa guiada por ARN se pueden pre-acomplejar juntos para formar una ribonucleoproteína (RNP), que se puede administrar a una célula diana.

Las RNP son útiles para edición génica, al menos porque minimizan el riesgo de interacciones promiscuas en un entorno celular rico en ácidos nucleicos y protegen el ARN de degradación. Los métodos para formar RNP se conocen en la técnica. Una RNP que contiene una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas9) y uno o más ARNg que se dirigen a una o más genes de interés se pueden administrar a una célula (por ejemplo, una célula T). Una RNP se puede administrar a una célula T por electroporación.

Una nucleasa guiada por ARN se puede administrar a una célula en un vector de ADN que expresa la nucleasa guiada por ARN en la célula. En otros ejemplos, una nucleasa guiada por ARN se puede administrar a una célula en un ARN que codifica la nucleasa guiada por ARN y expresa la nucleasa en la célula. Alternativamente o además, un ARNg que se dirige a un gen se puede administrar a una célula como un ARN, o un vector de ADN que expresa en ARNg en la célula.

La administración de una nucleasa guiada por ARN, ARNg y/o una RNP puede ser mediante inyección directa o transfección celular usando métodos conocidos, por ejemplo, electroporación o transfección química. Se pueden usar otros métodos de transfección celular.

Otros métodos de edición génica

Además del método CRISPR divulgado en el presente documento, también se pueden usar métodos de edición génica adicionales conocidos en la técnica para hacer las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen enfoques de edición génica que implican nucleasa de dedo de cinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN), endonucleasas de restricción, endonucleasas de migración dirigida de meganucleasas, y similares.

Las ZFN son nucleasas dirigidas que comprenden una nucleasa fusionada a un dominio de unión a ADN de dedo de cinc (ZFP), que es un dominio polipeptídico que se une a ADN de una manera específica de secuencia mediante uno o más dedos de cinc. Un dedo de cinc es un dominio de aproximadamente 30 aminoácidos en el dominio de unión de dedo de cinc cuya estructura se estabiliza mediante coordinación de un ion cinc. Los ejemplos de dedos de cinc incluyen, pero no están limitados a, dedos de cinc C2H2, dedos de cinc C3H, y dedos de cinc C4. Un dominio de dedo de cinc diseñado es un dominio que no se produce en la naturaleza cuyo diseño/composición resulta principalmente de criterios racionales, por ejemplo, aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computarizados para procesar información en una base de datos que almacena información de diseños de ZFP existentes y datos de unión. Véase, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 6.140.081; 6.453.242; y 6.534.261; véanse también los documentos WO 98/53058, WO 98/53059, WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496. Un dominio de dedo de cinc seleccionado es un dominio no encontrado en la naturaleza cuya producción resulta principalmente de procesos empíricos tal como presentación en fagos, trampa de interacción o selección híbrida. Las ZFN se describen en mayor detalle en la patente en EE UU No. 7.888.121 y la patente en EE UU No. 7.972.854. El ejemplo más reconocido de una ZFN es una fusión de la nucleasa FokI con un dominio de unión a ADN de dedo de cinc.

Una TALEN es una nucleasa dirigida que comprende una nucleasa fusionada a un dominio de unión a ADN efector TAL. Un "dominio de unión a ADN efector de tipo activador de transcripción", "dominio de unión a ADN efector TAL" o "dominio de unión a ADN TALE" es un dominio polipeptídico de proteínas efectoras TAL que es responsable de la unión de la proteína efectora TAL a ADN. Las proteínas efectoras TAL se secretan por patógenos vegetales del género *Xanthomonas* durante la infección. Estas proteínas entran en el núcleo de la célula vegetal, se unen a secuencias de ADN específicas de efector a través de su dominio de unión a ADN, y activan la transcripción génica en estas secuencias a través de sus dominios de transactivación. La especificidad del dominio de unión a ADN de efector TAL depende de un número variable de efectores de repeticiones imperfectas de 34 aminoácidos, que comprenden polimorfismos en posiciones de la repetición seleccionadas llamadas dirresiduos variables de repetición (RVD). Las TALEN se describen en más detalle en la solicitud de patente en EE UU No. 2011/0145940. El ejemplo más reconocido de una TALEN en el técnica es un polipéptido de fusión de la nucleasa FokI y un dominio de unión a ADN de efector TAL.

Los ejemplos adicionales de nucleasas dirigidas adecuadas para uso como se proporcionan en el presente documento incluyen, pero no están limitadas a, Bxb1, phiC31, R4, PhiBT1 y Wβ/SPBc/TP901-1, ya se usen individualmente o en combinación.

Cualquiera de las nucleasas divulgadas en el presente documento se puede administrar usando un sistema de vectores incluyendo, pero no limitado a, vectores plásmidos, minicírculos de ADN, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, vectores adenovíricos, vectores poxvíricos, vectores de herpesvirus y vectores de virus adenoasociados, y combinaciones de los mismos.

Se pueden usar métodos de transferencia génica víricos y no víricos convencionales para introducir ácidos nucleicos que codifican nucleasas y moldes donantes en células (por ejemplo, células T). Los sistemas de administración de vectores no víricos incluyen plásmidos de ADN, minicírculos de ADN, ácido nucleico desnudo, y ácido nucleico en complejo con un vehículo de administración tal como un liposoma o poloxámero. Los sistemas de administración de vectores víricos incluyen virus de ADN y ARN, que tienen o bien genomas episomales o integrados después de la administración a la célula.

Los métodos de administración no víricos de ácidos nucleicos incluyen electroporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, conjugados de poliacrilato o lípido:ácido nucleico, ADN desnudo, ARN desnudo, ARN con caperuza, viriones artificiales, y absorción de ADN aumentada por agente. También se puede usar sonoporación usando, por ejemplo, el sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) para la administración de ácidos nucleicos. Algunos ejemplos específicos se proporcionan posteriormente.

II. Expresión en células T genéticamente manipuladas de un receptor de antígeno quimérico (CAR)

Las células T genéticamente manipuladas que tienen tanto, un gen *Reg1* interrumpido como un gen *TGFBRII* interrumpido expresan además un receptor de antígeno quimérico (CAR) en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral. Opcionalmente, tales células T genéticamente manipuladas pueden comprender uno o más genes interrumpidos adicionales, por ejemplo, *β2M*, *TRAC*, *CD70*, o una combinación de los mismos como se divulga en el presente documento.

(a) Receptor de antígeno quimérico (CAR)

Un receptor de antígeno quimérico (CAR) se refiere a un receptor de célula inmunitaria artificial que está manipulado para reconocer y unirse a un antígeno expresado por células indeseadas, por ejemplo, células enfermas tal como células cancerosas. Una célula T que expresa un polipéptido CAR se denomina una célula CAR T. Los CAR tienen la capacidad de redirigir la especificidad y reactividad de células T hacia una diana seleccionada de una manera no restringida por MHC. El reconocimiento de antígeno no restringido por MHC da a las células CAR-T la capacidad de

reconocer un antígeno independiente de procesamiento de antígeno, por tanto evitando un mecanismo principal de escape tumoral. Además, cuando se expresan en células T, los CAR ventajosamente no dimerizan con las cadenas alfa y beta del receptor de células T (TCR) endógeno.

Hay varias generaciones de CAR, cada uno de los cuales contiene diferentes componentes. Los CAR de primera generación unen un scFv derivado de anticuerpo al dominio de señalización intracelular de CD3zeta (ζ o z) del receptor de células T mediante dominios bisagra y transmembrana. Los CAR de segunda generación incorporan un dominio coestimulador adicional, por ejemplo, CD28, 4-1BB (41BB), o ICOS, para suministrar una señal coestimuladora. Los CAR de tercera generación contienen dos dominios coestimuladores (por ejemplo, una combinación de CD27, CD28, 4-1BB, ICOS u OX40) fusionados con la cadena CD3 ζ del TCR. Maude et al., *Blood*. 2015; 125(26):4017-4023; Kakarla y Gottschalk, *Cancer J.* 2014; 20(2):151-155). Cualquiera de las varias generaciones de construcciones CAR está dentro del ámbito de la presente divulgación.

En general, un CAR es un polipéptido de fusión que comprende un dominio extracelular que reconoce un antígeno diana (por ejemplo, un fragmento monocatenario (scFv) de un anticuerpo u otro fragmento de anticuerpo) y un dominio intracelular que comprende un dominio de señalización del complejo del receptor de células T (TCR) (por ejemplo, CD3 ζ) y, en la mayoría de los casos, un dominio coestimulador (Enblad et al., *Human Gene Therapy*. 2015; 26(8):498-505). Una construcción CAR puede además comprender un dominio bisagra y transmembrana entre el dominio extracelular y el dominio intracelular, así como un péptido señal en el extremo N para expresión de superficie. Los ejemplos de péptidos señal incluyen SEQ ID NO: 95 y SEQ ID NO: 96 proporcionados en la tabla 27 posterior. Se pueden usar otros péptidos señal.

(i) Dominio extracelular de unión a antígeno

El dominio extracelular de unión a antígeno es la región de un polipéptido CAR que está expuesta al fluido extracelular cuando el CAR se expresa en la superficie celular. En algunos casos, un péptido señal puede estar localizado en el extremo N para facilitar la expresión en la superficie celular. En algunas formas de realización, el dominio de unión a antígeno puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv, que puede incluir una región variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) y una región variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L) (en cualquier orientación). En algunos casos, el fragmento V_H y V_L pueden estar unidos a través de un enlazador peptídico. El enlazador, puede incluir residuos hidrofílicos con tramos de glicina y serina para flexibilidad así como tramos de glutamato y lisina para solubilidad añadida. El fragmento scFv retiene la especificidad de unión a antígeno del anticuerpo parental, del que deriva el fragmento scFv. El scFv puede comprender dominios V_H y/o V_L humanizados. Los dominios V_H y/o V_L del scFv pueden completamente humanos.

El dominio extracelular de unión a antígeno puede ser específico para un antígeno diana de interés, por ejemplo, un antígeno patológico tal como un antígeno tumoral. Un antígeno tumoral es un "antígeno asociado a tumor", refiriéndose a una molécula inmunogénica, tal como una proteína, que en general se expresa a un mayor nivel en células tumorales que en células no tumorales, en las que puede no expresarse en absoluto, o solo a bajos niveles. Las estructuras asociadas a tumor, que son reconocidas por el sistema inmunitario del huésped que porta el tumor, se pueden denominar antígenos asociados a tumor. Un antígeno asociado a tumor puede ser un antígeno tumoral universal, si se expresa ampliamente por la mayoría de los tipos tumorales. Los antígenos asociados a tumor pueden ser antígenos de diferenciación, antígenos mutacionales, antígenos celulares sobreexpresados o antígenos víricos. Un antígeno tumoral puede ser un "antígeno específico de tumor" o "TSA", refiriéndose a una molécula inmunogénica, tal como una proteína, que es única a una célula tumoral. Los antígenos específicos de tumor se expresan exclusivamente en células tumorales, por ejemplo, en un tipo específico de células tumorales.

En algunas formas de realización, el dominio extracelular de unión a antígeno puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a un antígeno tumoral como se divulga en el presente documento. El scFv puede comprender una región variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) y una región variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L), que opcionalmente pueden estar conectadas a través de un enlazador peptídico flexible. En algunos casos, el scFv puede tener la orientación V_H a V_L (del extremo N al extremo C). Alternativamente, el scFv puede tener la orientación V_L a V_H (del extremo N al extremo C).

Los antígenos tumorales ejemplares incluyen, pero no están limitados a, CD19, BCMA, CD70, CD33, y PTK7. Cualquier anticuerpo conocido específico para tales antígenos tumorales, por ejemplo, los aprobados para comercializar y esos en ensayos clínicos, se pueden usar para hacer las construcciones CAR divulgadas en el presente documento. Se proporcionan ejemplos no limitantes de construcciones CAR en los documentos WO2019097305 y WO2019215500, WO2020/095107, y la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/IB2021/053849.

En algunos ejemplos, el dominio extracelular de unión a antígeno puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a CD19 humano. En algunos casos el scFv anti-CD19 puede comprender (i) una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada que esas en SEQ ID NO: 124; y (ii) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende las mismas CDR de cadena ligera que esas en SEQ ID NO: 125. En algunos ejemplos específicos, el anticuerpo anti-CD19 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, y CDR3 de

cadena pesada mostradas como SEQ ID NO: 108-110, respectivamente determinadas por el método de Kabat. Alternativamente o además, el anticuerpo anti-CD19 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, y CDR3 de cadena ligera mostradas como SEQ ID NO: 105-107, respectivamente determinadas por el método de Kabat. Alternativamente, el anticuerpo anti-CD19 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, y CDR3 de cadena pesada mostradas como SEQ ID NO: 114-116, respectivamente determinadas por el método de Chothia. Alternativamente o además, el anticuerpo anti-CD19 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, y CDR3 de cadena ligera mostradas como SEQ ID NO: 111-113, respectivamente determinadas por el método de Chothia. En un ejemplo específico, el scFv anti-CD19 puede comprender una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125. Véase la tabla de secuencias 27 posterior.

En algunos ejemplos, el dominio extracelular de unión a antígeno puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a CD70 humano. En algunos casos el scFv anti-CD70 puede comprender (i) una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada que esas en SEQ ID NO: 143; y (ii) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende las mismas CDR de cadena ligera que esas en SEQ ID NO: 144. En algunos ejemplos específicos, el anticuerpo anti-CD70 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, y CDR3 de cadena pesada mostradas como SEQ ID NO: 132, 134, y 136, respectivamente determinadas por el método de Kabat. Alternativamente o además, el anticuerpo anti-CD70 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, y CDR3 de cadena ligera mostradas como SEQ ID NO: 127, 129 y 130, respectivamente determinadas por el método de Kabat. Alternativamente, el anticuerpo anti-CD70 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, y CDR3 de cadena pesada mostradas como SEQ ID NO: 133, 135, y 137, respectivamente determinadas por el método de Chothia. Alternativamente o además, el anticuerpo anti-CD70 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, y CDR3 de cadena ligera mostradas como SEQ ID NO: 128, 129, y 131, respectivamente determinadas por el método de Chothia. En un ejemplo específico, el scFv anti-CD70 puede comprender una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144. Véase la tabla de secuencias 27 posterior.

En algunos ejemplos, el dominio extracelular de unión a antígeno puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a BCMA humano. En algunos casos el scFv anti-BCMA puede comprender (i) una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada que esas en SEQ ID NO: 149; y (ii) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende las mismas CDR de cadena ligera que esas en SEQ ID NO: 150. En algunos ejemplos específicos, el anticuerpo anti-BCMA divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, y CDR3 de cadena pesada mostradas como SEQ ID NO: 155, 157, y 159, respectivamente determinadas por el método de Kabat. Alternativamente o además, el anticuerpo anti-BCMA divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, y CDR3 de cadena ligera mostradas como SEQ ID NO: 151, 152 y 153, respectivamente determinadas por el método de Kabat. Alternativamente, el anticuerpo anti-BCMA divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, y CDR3 de cadena pesada mostradas como SEQ ID NO: 156, 158, y 160, respectivamente determinadas por el método de Chothia. Alternativamente o además, el anticuerpo anti-BCMA divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, y CDR3 de cadena ligera mostradas como SEQ ID NO: 151, 152, y 154, respectivamente determinadas por el método de Chothia. En un ejemplo específico, el scFv anti-BCMA puede comprender una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150. Véase la tabla de secuencias 27 posterior.

En algunos ejemplos, el dominio extracelular de unión a antígeno puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a CD33 humano. Se pueden encontrar scFv anti-CD33 ejemplares y construcciones CAR anti-CD33, por ejemplo, en la tabla de secuencias 27 posterior y en el documento WO2020/095107.

En algunos ejemplos, el dominio extracelular de unión a antígeno puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a CD33 humano. En algunos casos el scFv anti-CD33 puede comprender (i) una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada que esas en SEQ ID NO: 334; y (ii) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende las mismas CDR de cadena ligera que esas en SEQ ID NO: 335. En algunos ejemplos específicos, el anticuerpo anti-CD33 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, y CDR3 de cadena pesada mostradas como SEQ ID NO: 328-330, respectivamente determinadas por el método de Kabat. Alternativamente o además, el anticuerpo anti-CD33 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, y CDR3 de cadena ligera mostradas como SEQ ID NO: 331-333, respectivamente determinadas por el método de Kabat. En un ejemplo específico, el scFv anti-BCMA puede comprender una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150. Véase la tabla de secuencias 27 posterior.

En algunos ejemplos, el dominio extracelular de unión a antígeno puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a PTK7 humano. En algunos casos el scFv anti-PTK7 puede comprender (i) una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada que esas en SEQ ID NO: 346; y (ii) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende las mismas CDR de cadena ligera que esas en SEQ ID NO: 347. En algunos ejemplos específicos, el anticuerpo anti-PTK7 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, y CDR3 de cadena pesada mostradas como SEQ ID NO: 340-342, respectivamente determinadas por el método de Kabat. Alternativamente o además, el anticuerpo anti-PTK7 divulgado en el presente documento puede comprender la CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, y CDR3 de cadena ligera mostradas como SEQ ID NO: 343-345, respectivamente determinadas por el método de Kabat. En un ejemplo específico, el scFv anti-BCMA puede comprender una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 346 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 347. Véase la tabla de secuencias 27 posterior.

Dos anticuerpos que tienen las mismas CDR de V_H y/o V_L significa que sus CDR son idénticas cuando se determinan por el mismo enfoque (por ejemplo, el enfoque de Kabat, el enfoque de Chothia, el enfoque de AbM, el enfoque de contacto, o el enfoque de IMGT como se sabe en la técnica. Véase, por ejemplo, bioinf.org.uk/abs/ o abysis.org/abysis/sequence_input).

(ii) Dominio transmembrana

El polipéptido CAR divulgado en el presente documento puede contener un dominio transmembrana que puede ser una hélice alfa hidrofóbica que cruza la membrana. Como se usa en el presente documento, un "dominio transmembrana" se refiere a cualquier estructura de proteína que es termodinámicamente estable en una membrana celular, preferiblemente una membrana celular eucariota. El dominio transmembrana puede proporcionar estabilidad del CAR que contiene tal.

El dominio transmembrana de un CAR como se proporciona en el presente documento puede ser un dominio transmembrana de CD8. El dominio transmembrana puede ser un dominio transmembrana de CD28. El dominio transmembrana puede ser una quimera del dominio transmembrana de CD8 y CD28. Se pueden usar otros dominios transmembrana como se proporciona en el presente documento. El dominio transmembrana puede ser un dominio transmembrana CD8a que contiene la secuencia de SEQ ID NO: 97 como se proporciona posteriormente en la tabla 27. Se pueden usar otros dominios transmembrana.

(iii) Dominio bisagra

Un dominio bisagra puede estar localizado entre un dominio extracelular (que comprende el dominio de unión a antígeno) y un dominio transmembrana de un CAR, o entre un dominio citoplásmico y un dominio transmembrana del CAR. Un dominio bisagra puede ser cualquier oligopéptido o polipéptido que funcione para enlazar el dominio transmembrana al dominio extracelular y/o el dominio citoplásmico en la cadena polipeptídica. Un dominio bisagra puede funcionar para proporcionar flexibilidad al CAR, o dominios del mismo, o para prevenir impedimento estérico del CAR, o dominios del mismo.

Un dominio bisagra puede comprender hasta 300 aminoácidos (por ejemplo, de 10 a 100 aminoácidos, o de 5 a 20 aminoácidos). Se puede(n) incluir uno o más dominio(s) bisagra en otras regiones de un CAR. El dominio bisagra puede ser un dominio bisagra de CD8. Se pueden usar otros dominios bisagra.

(iv) Dominios de señalización intracelular

Cualquiera de las construcciones CAR contiene uno o más dominios de señalización intracelular (por ejemplo, CD3 ζ , y opcionalmente uno o más dominios coestimuladores), que son el extremo funcional del receptor. Después del reconocimiento del antígeno, los receptores se agrupan y una señal se transmite a la célula.

CD3 ζ es el dominio de señalización citoplásmico del complejo de receptor de células T. CD3 ζ contiene tres (3) motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptores (ITAM), que transmiten una señal de activación a la célula T después de que la célula T se involucre con un antígeno afín. En muchos casos, CD3 ζ proporciona una señal de activación de células T primaria, pero no una señal de activación completamente competente, que requiere una señalización coestimuladora.

Los polipéptidos CAR divulgados en el presente documento pueden además comprender uno o más dominios de señalización coestimuladores. Por ejemplo, los dominios coestimuladores de CD28 y/o 4-1BB se pueden usar para transmitir un señal proliferativa/de supervivencia completa, junto con la señalización primaria mediada por CD3 ζ . En algunos ejemplos, el CAR divulgado en el presente documento comprende una molécula coestimuladora CD28. En otros ejemplos, el CAR divulgado en el presente documento comprende una molécula coestimuladora 4-1BB. En algunas formas de realización, un CAR incluye un dominio de señalización de CD3 ζ y un dominio coestimulador de CD28. En otras formas de realización, un CAR incluye un dominio de señalización de CD3 ζ y un dominio coestimulador

de 4-1BB. Un CAR puede incluir un dominio de señalización de CD3 ζ , un dominio coestimulador de CD28 y un dominio coestimulador de 4-1BB.

La tabla 27 proporciona ejemplos de dominios de señalización derivados de 4-1BB, CD28 y CD3-zeta que se pueden usar en el presente documento.

En ejemplos específicos, el CAR anti-CD19 divulgado en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 117. Alternativamente, el CAR anti-CD19 puede ser una forma madura sin el péptido señal N-terminal, por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 353.

En otros ejemplos, el CAR anti-BCMA divulgado en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146, que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 145. Alternativamente, el CAR anti-CDBCMA puede ser una forma madura sin el péptido señal N-terminal, por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 355.

En otros ejemplos, el CAR anti-CD70 divulgado en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138, que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 141. Alternativamente, el CAR anti-CD70 puede ser una forma madura sin el péptido señal N-terminal, por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 354.

En algunos ejemplos, el CAR anti-CD33 divulgado en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 338 o 339. Alternativamente, el CAR anti-CD33 puede ser una forma madura sin el péptido señal N-terminal, por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 356 o 357.

En algunos ejemplos, el CAR anti-PTK7 divulgado en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 349 o 350. Alternativamente, el CAR anti-PTK7 puede ser una forma madura sin el péptido señal N-terminal, por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358 o 359.

Véase la tabla de secuencias 27 proporcionada posteriormente.

(b) Administración de construcciones CAR a células T

Un ácido nucleico que codifica un CAR se puede introducir en cualquiera de las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento por métodos que conocen los expertos en la materia. Por ejemplo, una secuencia codificante del CAR se puede clonar en un vector, que se puede introducir en las células T genéticamente manipuladas para expresión del CAR. Se puede usar una variedad de diferentes métodos conocidos en la técnica para introducir cualquiera de los ácidos nucleicos o vectores de expresión divulgados en el presente documento en una célula efectora inmunitaria. Los ejemplos no limitantes de métodos para introducir ácido nucleico en una célula incluyen: lipofección, transfección (por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, transfección usando compuestos orgánicos muy ramificados, transfección usando polímeros catiónicos, transfección basada en dendrímeros, transfección óptica, transfección basada en partículas (por ejemplo transfección con nanopartículas), o transfección usando liposomas (por ejemplo, liposomas catiónicos)), microinyección, electroporación, presión de células, sonoporación, fusión de protoplastos, impalefacción, administración hidrodinámica, bombardeo génico, magnetofección, transfección vírica, y nucleofección.

En ejemplos específicos, un ácido nucleico que codifica una construcción CAR se puede administrar a una célula usando un virus adenoasociado (AAV). Los AAV son virus pequeños que se integran de forma específica de sitio en el genoma del huésped y pueden, por tanto, administrar un transgén, tal como un CAR. Repeticiones terminales invertidas (ITR) están presentes flanqueando el genoma del AAV y/o el transgén de interés y sirven como orígenes de replicación. También están presentes en el genoma de AAV proteínas rep y cap que, cuando se transcriben, forman cápsides que encapsulan el genoma de AAV para administración en células diana. Los receptores de superficie en estas cápsides que confieren el serotipo de AAV, que determina a qué órganos diana se unirán principalmente las cápsides y por tanto qué células infectará el AAV de forma más eficaz. Hay doce serotipos de AAV humanos actualmente conocidos. Los AAV para uso en administrar el ácido nucleico que codifica CAR pueden ser AAV de serotipo 6 (AAV6).

Los virus adenoasociados están entre los virus usados con mayor frecuencia para terapia génica por varias razones. Primero, los AAV no provocan una respuesta inmunitaria tras la administración a mamíferos, incluyendo seres humanos. Segundo, los AAV se administran de forma eficaz a células diana, en particular cuando se considera seleccionar un serotipo de AAV apropiado. Por último, los AAV tienen la capacidad de infectar células tanto en división como que no se dividen porque el genoma puede persistir en la célula huésped sin integración. Este rasgo los hace un candidato ideal para terapia génica.

Un ácido nucleico que codifica un CAR se puede diseñar para que se inserte en un sitio genómico de interés en las células T huéspedes. El sitio genómico diana puede estar en un locus de puerto seguro.

En algunas formas de realización, se puede diseñar un ácido nucleico que codifica un CAR (por ejemplo, a través de un molde donante, que se puede ser llevado por un vector vírico tal como un vector de virus adenoasociado (AAV)) de modo que se pueda insertar en una localización en un gen *TRAC* para interrumpir el gen *TRAC* en las células T genéticamente manipuladas y expresar el polipéptido CAR. La interrupción de *TRAC* produce pérdida de función del TCR endógeno. Por ejemplo, se puede crear una interrupción en el gen *TRAC* con una endonucleasa tal como los descritos en el presente documento y uno o más ARNg que se dirigen a una o más regiones genómicas de *TRAC*. Cualquiera de los ARNg específicos para un gen *TRAC* y las regiones diana divulgadas en el presente documento se pueden usar para este fin.

En algunos ejemplos, se puede crear una delección genómica en el gen *TRAC* y la sustitución por un segmento codificante de CAR por reparación dirigida por homología o HDR (por ejemplo, usando un molde donante, que puede ser parte de un vector vírico tal como un vector de virus adenoasociado (AAV)). Se puede crear una interrupción en el gen *TRAC* con una endonucleasa tal como las descritas en el presente documento y uno o más ARNg que se dirigen a una o más regiones genómicas de *TRAC*, e insertar un segmento codificante de CAR en un gen *TRAC*.

En algunas formas de realización, puede diseñar un ácido nucleico que codifica un CAR (por ejemplo, a través de un molde donante, que se puede ser llevado por un vector vírico tal como un vector de virus adenoasociado (AAV)) de modo que se pueda insertar en una localización en un gen $\beta 2M$ para interrumpir el gen $\beta 2M$ en las células T genéticamente manipuladas y expresar el polipéptido CAR. La interrupción de $\beta 2M$ produce pérdida de función de los complejos de MHC de clase I endógenos. Por ejemplo, se puede crear una interrupción en el gen $\beta 2M$ con una endonucleasa tal como las descritas en el presente documento y uno o más ARNg que se dirigen a una o más regiones genómicas de $\beta 2M$. Cualquiera de los ARNg específicos para un gen $\beta 2M$ y las regiones diana divulgadas en el presente documento se pueden usar para este fin.

En algunos ejemplos, se puede crear una delección genómica en el gen $\beta 2M$ y la sustitución por un segmento codificante de CAR por reparación dirigida por homología o HDR (por ejemplo, usando un molde donante, que puede ser parte de un vector vírico tal como un vector de virus adenoasociado (AAV)). Se puede crear una interrupción en el gen $\beta 2M$ con una endonucleasa tal como las descritas en el presente documento y uno o más ARNg que se dirigen a una o más regiones genómicas de $\beta 2M$, e insertar un segmento codificante de CAR en un gen $\beta 2M$.

En algunas formas de realización, se puede diseñar un ácido nucleico que codifica un CAR (por ejemplo, a través de un molde donante, que se puede ser llevado por un vector vírico tal como un vector de virus adenoasociado (AAV)) de modo que se pueda insertar en una localización en un gen *CD70* para interrumpir el gen *CD70* en las células T genéticamente manipuladas y expresar el polipéptido CAR. La interrupción de *CD70* produce pérdida de función de la proteína *CD70* endógena. Por ejemplo, se puede crear una interrupción en el gen *CD70* con una endonucleasa tal como los descritos en el presente documento y uno o más ARNg que se dirigen a una o más regiones genómicas de *CD70*. Cualquiera de los ARNg específicos para un gen *CD70* y las regiones diana divulgadas en el presente documento se pueden usar para este fin.

En algunos ejemplos, se puede crear una delección genómica en el gen *CD70* y la sustitución por un segmento codificante de CAR por reparación dirigida por homología o HDR (por ejemplo, usando un molde donante, que puede ser parte de un vector vírico tal como un vector de virus adenoasociado (AAV)). Se puede crear una interrupción en el gen *CD70* con una endonucleasa tal como las descritas en el presente documento y uno o más ARNg que se dirigen a una o más regiones genómicas de *CD70*, e insertar un segmento codificante de CAR en un gen *CD70*.

En algunas formas de realización, se puede diseñar un ácido nucleico que codifica un CAR (por ejemplo, a través de un molde donante, que se puede ser llevado por un vector vírico tal como un vector de virus adenoasociado (AAV)) de modo que se pueda insertar en una localización en un gen *Reg1* para interrumpir el gen *Reg1* en las células T genéticamente manipuladas y expresar el polipéptido CAR. La interrupción de *Reg1* produce pérdida de función de la proteína *Reg1* endógena. Por ejemplo, se puede crear una interrupción en el gen *Reg1* con una endonucleasa tal como las descritas en el presente documento y uno o más ARNg que se dirigen a una o más regiones genómicas de *Reg1*. Cualquiera de los ARNg específicos para un gen *Reg1* y las regiones diana divulgadas en el presente documento se pueden usar para este fin.

En algunos ejemplos, se puede crear una delección genómica en el gen *Reg1* y la sustitución por un segmento codificante de CAR por reparación dirigida por homología o HDR (por ejemplo, usando un molde donante, que puede ser parte de un vector vírico tal como un vector de virus adenoasociado (AAV)). En algunas formas de realización se puede crear una interrupción en el gen *Reg1* con una endonucleasa tal como las descritas en el presente documento y uno o más ARNg que se dirigen a una o más regiones genómicas de *Reg1*, e insertar un segmento codificante de CAR en un gen *Reg1*.

En algunas formas de realización, se puede diseñar un ácido nucleico que codifica un CAR (por ejemplo, a través de un molde donante, que se puede ser llevado por un vector vírico tal como un vector de virus adenoasociado (AAV)) de modo que se pueda insertar en una localización en un gen *TGFBR1* para interrumpir el gen *TGFBR1* en las células T genéticamente manipuladas y expresar el polipéptido CAR. La interrupción de *Reg1* produce pérdida de función del

receptor *TGFBR1* endógeno. Por ejemplo, se puede crear una interrupción en el gen *TGFBR1* con una endonucleasa tal como las descritas en el presente documento y uno o más ARNg que se dirigen a una o más regiones genómicas de *TGFBR1*. Cualquiera de los ARNg específicos para un gen *TGFBR1* y las regiones diana divulgadas en el presente documento se pueden usar para este fin.

En algunos ejemplos, se puede crear una delección genómica en el gen *TGFBR1* y la sustitución por un segmento codificante de CAR por reparación dirigida por homología o HDR (por ejemplo, usando un molde donante, que puede ser parte de un vector vírico tal como un vector de virus adenoasociado (AAV)). En algunas formas de realización, se puede crear una interrupción en el gen *TGFBR1* con una endonucleasa tal como las descritas en el presente documento y uno o más ARNg que se dirigen a una o más regiones genómicas de *TGFBR1*, e insertar un segmento codificante de CAR en un gen *TGFBR1*.

Un molde donante como se divulga en el presente documento puede contener una secuencia codificante para un CAR. En algunos ejemplos, la secuencia codificante de CAR puede estar flanqueada por dos regiones de homología para permitir HDR eficaz en una localización genómica de interés, por ejemplo en un gen *TRAC* usando un método de edición génica conocido en la técnica. En algunos ejemplos, se puede usar un método basado en CRISPR. En este caso, ambas hebras del ADN en el locus diana se pueden cortar por una enzima CRISPR Cas9 guiada por ARNg específicos para el locus diana. HDR se produce después para reparar la rotura bicatenaria (DSB) e insertar el ADN donante que codifica el CAR. Para que esto ocurra correctamente, la secuencia donante se diseña con residuos flanqueantes que son complementarios a la secuencia que rodea el sitio de DSB en el gen diana (de aquí en adelante "brazos de homología"), tal como el gen *TRAC*. Estos brazos de homología sirven como el molde para la reparación de la DSB y permiten que HDR sea un mecanismo esencialmente sin errores. La tasa de reparación dirigida por homología (HDR) es una función de la distancia entre la mutación y el sitio de corte así que elegir sitios diana solapantes o cercanos es importante. Los moldes pueden incluir secuencias extra flanqueadas por las regiones homólogas o pueden contener una secuencia que se diferencia de la secuencia genómica, permitiendo de esta manera la edición de secuencia.

Alternativamente, un molde donante puede no tener regiones de homología respecto a la localización diana en el ADN y se puede integrar por unión de extremos dependiente de NHEJ después del corte en el sitio diana.

Un molde donante puede ser ADN o ARN, monocatenario y/o bicatenario, y se puede introducir en una célula en forma lineal o circular. Si se introduce en forma lineal, los extremos de la secuencia donante pueden estar protegidos (por ejemplo, de degradación exonucleolítica) por métodos que conocen los expertos en la materia. Por ejemplo, se añaden uno o más residuos de didesoxinucleótidos al extremo 3' de una molécula lineal y/u oligonucleótidos autocomplementarios se ligan a uno o ambos extremos. Véase, por ejemplo, Chang et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al., (1996) Science 272:886-889. Los métodos adicionales para proteger polinucleótidos exógenos de la degradación incluyen, pero no están limitados a, adición de grupo(s) amino terminal(es) y el uso de enlaces internucleotídicos modificados tal como, por ejemplo, fosforotioatos, fosforoamidatos, y residuos de O-metil ribosa o desoxirribosa.

Un molde donante se puede introducir en una célula como parte de una molécula vector que tiene secuencias adicionales tal como, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores y genes que codifican resistencia a antibióticos. Además, un molde donante se puede introducir en una célula como ácido nucleico desnudo, como ácido nucleico en complejo con un agente tal como un liposoma o poloxámero, o puede ser administrado por virus (por ejemplo, adenovirus, AAV, herpesvirus, retrovirus, lentivirus y lentivirus deficientes en integrasa (IDLV)).

Un molde donante se puede insertar en un sitio cercano a un promotor endógeno (por ejemplo, antes o después) de modo que su expresión puede estar dirigida por el promotor endógeno. El molde donante puede comprender un promotor y/o potenciador exógeno, por ejemplo, un promotor constitutivo, un promotor inducible, o promotor específico de tejido para controlar la expresión del gen CAR. El promotor endógeno puede ser un promotor de EF1 α , véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 167 proporcionada en la tabla 28 posterior. Se pueden usar otros promotores.

Además, las secuencias exógenas también pueden incluir secuencias reguladoras de transcripción o traducción, por ejemplo, promotores, potenciadores, aislantes, sitios de entrada internos al ribosoma, secuencias que codifican péptidos 2A y/o señales de poliadenilación.

Cuando sea necesario, se puede introducir edición génica adicional (por ejemplo, introducción o inactivación de genes) en células T terapéuticas como se divulga en el presente documento para mejorar la función y eficacia terapéutica de células T. Por ejemplo, si la interrupción de $\beta 2M$ se puede realizar para reducir el riesgo de o prevenir una respuesta del huésped contra el injerto. Otros ejemplos incluyen genes introducidos o inactivados para mejorar la lisis de células diana, genes introducidos o inactivados para aumentar el rendimiento de células T terapéuticas tal como células CAR-T.

Un molde donante para administrar un CAR anti-CD19 puede ser un vector AAV con un fragmento de ácido nucleico insertado que comprende la secuencia codificante del CAR anti-CD19, y opcionalmente secuencias reguladoras para la expresión del CAR anti-CD19 (por ejemplo, un promotor tal como el promotor de EF1a proporcionado en la tabla de

secuencias), que puede estar flanqueado por brazos homólogos para insertar la secuencia codificante y las secuencias reguladoras en un locus genómico de interés. En algunos ejemplos, el fragmento de ácido nucleico se inserta en el locus del gen *TRAC* endógeno, interrumpiendo de esta manera la expresión del gen *TRAC*. En ejemplos específicos, el ácido nucleico puede sustituir un fragmento en el gen *TRAC*, por ejemplo, un fragmento que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 69. En algunos ejemplos específicos, el molde donante para administrar el CAR anti-CD19 puede comprender una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 117, que se puede insertar en un gen *TRAC* interrumpido, por ejemplo, sustituyendo el fragmento de SEQ ID NO: 69.

Un molde donante para administrar un CAR anti-BCMA puede ser un vector AAV con un fragmento de ácido nucleico insertado que comprende la secuencia codificante del CAR anti-BCMA, y opcionalmente secuencias reguladoras para la expresión del CAR anti-BCMA (por ejemplo, un promotor tal como el promotor de EF1a proporcionado en la tabla de secuencias), que puede estar flanqueado por brazos homólogos para insertar la secuencia codificante y las secuencias reguladoras en un locus genómico de interés. En algunos ejemplos, el fragmento de ácido nucleico se inserta en el locus del gen *TRAC* endógeno, interrumpiendo de esta manera la expresión del gen *TRAC*. En ejemplos específicos, el ácido nucleico puede sustituir un fragmento en el gen *TRAC*, por ejemplo, un fragmento que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 69. En algunos ejemplos específicos, el molde donante para administrar el CAR anti-BCMA puede comprender una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 145, que se puede insertar en un gen *TRAC* interrumpido, por ejemplo, sustituyendo el fragmento de SEQ ID NO: 69.

Un molde donante para administrar un CAR anti-CD70 puede ser un vector AAV con un fragmento de ácido nucleico insertado que comprende la secuencia codificante del CAR anti-CD70, y opcionalmente secuencias reguladoras para la expresión del CAR anti-CD70 (por ejemplo, un promotor tal como el promotor de EF1a proporcionado en la tabla de secuencias), que puede estar flanqueado por brazos homólogos para insertar la secuencia codificante y las secuencias reguladoras en un locus genómico de interés. En algunos ejemplos, el fragmento de ácido nucleico se inserta en el locus del gen *TRAC* endógeno, interrumpiendo de esta manera la expresión del gen *TRAC*. En ejemplos específicos, el ácido nucleico puede sustituir un fragmento en el gen *TRAC*, por ejemplo, un fragmento que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 69. En algunos ejemplos específicos, el molde donante para administrar el CAR anti-CD70 puede comprender una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 139, que se puede insertar en un gen *TRAC* interrumpido, por ejemplo, sustituyendo el fragmento de SEQ ID NO: 69.

Las células T genéticamente manipuladas que tienen un gen *Reg1* interrumpido y un gen *TGFBR1* interrumpido, genes interrumpidos adicionales, por ejemplo, *β 2M*, *TRAC*, *CD70*, y además expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral, se pueden producir dirigiéndose secuencialmente a los genes de interés. Por ejemplo, el gen *Reg1* se puede interrumpir primero, seguido por las interrupciones de los genes *TRAC* y *β 2M* y la inserción del CAR. Los genes *TRAC* y *β 2M* se pueden interrumpir primero, seguido por la inserción del CAR e interrupción del gen *Reg1*. Según esto, las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento se pueden producir por sucesos de electroporación múltiples, secuenciales con múltiples RNP dirigiéndose a los genes de interés, por ejemplo, *Reg1*, *β 2M*, *TRAC*, *CD70*, etc.

Las células CAR T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento se pueden producir por un único suceso de electroporación con un complejo RNP que comprende una nucleasa guiada por ARN y múltiples ARNg que se dirigen a los genes de interés, por ejemplo, *Reg1*, *β 2M*, *TRAC*, *CD70*, etc.

(c) Expresión en células T genéticamente manipuladas ejemplares de un receptor de antígeno quimérico

Se debe entender que la interrupción génica abarca modificación génica mediante edición génica (por ejemplo, usando edición génica CRISPR/Cas para insertar o delecionar uno o más nucleótidos). Un gen interrumpido puede contener una o más mutaciones (por ejemplo, inserción, delección, o sustitución de nucleótidos, etc.) relativo al homólogo de tipo salvaje de modo que se reduzca sustancialmente o elimine por completo la actividad del producto génico codificado. La una o más mutaciones pueden estar localizadas en una región no codificante, por ejemplo, una región promotora, una región reguladora que regula la transcripción o traducción, o una región de intrón. Alternativamente, la una o más mutaciones pueden estar localizadas en una región codificante (por ejemplo, en un exón). En algunos casos, el gen interrumpido no expresa o expresa un nivel sustancialmente reducido de la proteína codificada. En otros casos, el gen interrumpido expresa la proteína codificada en una forma mutada, que o bien no es funcional o tiene actividad sustancialmente reducida. Un gen interrumpido puede ser un gen que no codifica una proteína funcional. Una célula que comprende un gen interrumpido puede no expresar (por ejemplo, en la superficie celular) un nivel detectable (por ejemplo, por anticuerpo, por ejemplo, por citometría de flujo) de la proteína codificada por el gen. Una célula que no expresa un nivel detectable de la proteína se puede denominar una célula inactivada. Por ejemplo, una célula que tiene una edición del gen *β 2M* se puede considerar una célula inactivada para *β 2M* si la proteína *β 2M* no se puede detectar en la superficie celular usando un anticuerpo que específicamente se une a la proteína *β 2M*.

En algunas formas de realización, una población de células T genéticamente manipuladas divulgada en el presente documento expresa un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral (por ejemplo, CAR anti-CD19, anti-BCMA o anti-CD70), un gen *Reg1* interrumpido, un gen *TGFBR1* interrumpido, un gen *TRAC* interrumpido, y opcionalmente un gen *β 2M* interrumpido, y opcionalmente un

gen *CD70* interrumpido. La secuencia de nucleótidos que codifica el CAR se puede insertar en el gen *TRAC* interrumpido (por ejemplo, sustituyendo el sitio al que se dirige un ARNsg tal como TA-1). En algunos ejemplos, tal población de células genéticamente manipuladas puede comprender aproximadamente el 70-99% de células *Reg1*⁺, por ejemplo, aproximadamente el 90-97% de células *Reg1*⁺, aproximadamente el 70-99% de células *TGFBR1*⁺, por ejemplo, aproximadamente el 80-89% de células *TGFBR1*⁺, aproximadamente el 70-99% de células *TCR*⁺, por ejemplo, aproximadamente el 90-99% de células *TCR*⁺, y/u opcionalmente aproximadamente el 60-99% de células $\beta 2M$ ⁺, por ejemplo, aproximadamente el 60-82% de células $\beta 2M$ ⁺, y/u opcionalmente aproximadamente el 70-99% de células *CD70*⁺, por ejemplo, aproximadamente el 90-99% de células *CD70*⁺. La población celular también puede contener al menos aproximadamente el 30%-50% (por ejemplo, al menos el 60%) de células que expresan en CAR.

i. Células CAR T anti-CD19 que tienen interrupción de genes *Reg1* y *TGFBR1*

También se proporcionan en el presente documento una población de células inmunitarias genéticamente manipuladas (por ejemplo, células T tal como células T humanas) que comprenden un gen *Reg1* interrumpido, y un gen *TGFBR1* interrumpido, y expresan un CAR anti-CD19, por ejemplo, las divulgadas en el presente documento. En algunos casos, la población de células inmunitarias genéticamente manipuladas (por ejemplo, células T tal como células T humanas) comprenden tanto un gen *Reg1* interrumpido como un gen *TGFBR1* interrumpido, y expresan un CAR anti-CD19, por ejemplo, las divulgadas en el presente documento. En algunos ejemplos las células CAR-T anti-CD19 divulgadas en el presente documento, que expresan cualquiera de los CAR anti-CD19 divulgados en el presente documento (por ejemplo, el CAR anti-CD19 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106), también puede comprender un gen *TRAC* interrumpido y/o un gen $\beta 2M$ interrumpido como también se divulga en el presente documento.

En algunos ejemplos, la población de células T genéticamente manipuladas son células CAR anti-CD19 que además comprenden un gen *regnasa-1* interrumpido y un gen del receptor del factor de crecimiento transformante beta II interrumpido. En algunos ejemplos, las células CAR anti-CD19 son células T dirigidas a CD19 que tienen un gen *TRAC* y un gen $\beta 2M$ interrumpido y que tienen un gen *regnasa-1* interrumpido y un gen del receptor del factor de crecimiento transformante beta II interrumpido. El ácido nucleico que codifica el CAR anti-CD19 se puede insertar en el gen *TRAC* interrumpido en el sitio de SEQ ID NO: 69, que se sustituye por el ácido nucleico que codifica el CAR anti-CD19, interrumpiendo de esta manera la expresión del gen *TRAC*. El gen *TRAC* interrumpido en las células CAR anti-CD19 pueden comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 119.

Las células CAR T anti-CD19 que comprenden tanto un gen *TGFBR1* interrumpido como un gen *Reg1* interrumpido se pueden producir a través de modificación genética *ex vivo* usando la tecnología CRISPR/Cas9 (proteína 9 asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas regularmente/CRISPR) para interrumpir genes dirigidos (*TGFBR1* y *Reg1*, opcionalmente genes *TRAC* y/o $\beta 2M$), y transducción de virus adenoasociados (AAV) para administrar la construcción CAR anti-CD19. La edición génica mediada por CRISPR-Cas9 implica al menos un ARNsg que se dirige a *TGFBR1* (por ejemplo, los enumerados en la tabla 39) y un ARNsg que se dirige a *Reg1* (por ejemplo, los enumerados en la tabla 22), opcionalmente ARNsg TA-1 (SEQ ID NO: 59), que se dirige al locus *TRAC*, y ARNsg $\beta 2M$ -1 (SEQ ID NO: 63), que se dirige al locus $\beta 2M$.

Las células CAR T anti-CD19 están compuestas de un fragmento de anticuerpo monocatenario anti-CD19 (scFv, que puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120), seguido por un dominio bisagra y transmembrana de CD8 (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97) que está fusionada a un dominio de coseñalización intracelular de CD28 (por ejemplo, SEQ ID NO: 101) y un dominio de señalización de CD3 ζ (por ejemplo, SEQ ID NO: 103). En ejemplos específicos, las células CAR T anti-CD19 comprenden la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 118.

Al menos el 30% de una población de células CAR T anti-CD19 puede expresar un nivel detectable del CAR anti-CD19. Por ejemplo, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de las células CAR T anti-CD19 expresa un nivel detectable del CAR anti-CD19.

Al menos el 50% de una población de células CAR T anti-CD19 puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$. Por ejemplo, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de las células CAR T anti-CD19 puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$. El 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T genéticamente manipuladas de una población puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$.

Alternativamente o además, al 50% de una población de células CAR T anti-CD19 puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie *TRAC*. Por ejemplo, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de las células CAR T anti-CD19 puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie *TRAC*. El 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T genéticamente manipuladas de una población puede no expresar un nivel

detectable de proteína de superficie TRAC. En ejemplos específicos, más del 90% (por ejemplo, más del 99,5%) de las células CAR T anti-CD19 no expresan una proteína de superficie TRAC detectable.

Un porcentaje sustancial de la población de células CAR T anti-CD19 puede comprender más de una edición génica, que produce un cierto porcentaje de células que no expresan más de un gen y/o proteína.

Por ejemplo, al menos el 50% de una población de células CAR T anti-CD19 puede no expresar un nivel detectable de dos proteínas de superficie, por ejemplo, un nivel detectable de proteínas $\beta 2M$ y TRAC. El 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células CAR T anti-CD19 puede no expresar un nivel detectable de las proteínas de superficie TRAC y $\beta 2M$. En otro ejemplo, al menos el 50% de una población de células CAR T anti-CD19 no expresa un nivel detectable de las proteínas de superficie TRAC y $\beta 2M$.

La población de células CAR T anti-CD19 puede comprender más de una edición génica (por ejemplo, en más de un gen), que puede ser una edición descrita en el presente documento. Por ejemplo, la población de células CAR T anti-CD19 pueden comprender un gen *TRAC* interrumpido a través de tecnología CRISPR/Cas usando el ARNg de *TRAC* TA-1. En algunos ejemplos, las células CAR T anti-CD19 pueden comprender una delección en el gen *TRAC* relativo a células T sin modificar. Por ejemplo, las células CAR T anti-CD19 pueden comprender una delección del fragmento AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (SEQ ID NO: 69) en el gen *TRAC*. Este fragmento se puede sustituir por el ácido nucleico que codifica el CAR anti-CD19 (SEQ ID NO: 117). Alternativamente o además, la población de células CAR T anti-CD19 puede comprender un gen $\beta 2M$ interrumpido a través de tecnología CRISPR/Cas usando el ARNg de $\beta 2M$ -1. Tales células CAR T anti-CD19 pueden comprender indels en el gen $\beta 2M$, que comprenden una o más de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 83-88. En ejemplos específicos, las células CAR T anti-CD19 comprenden $\geq 30\%$ de células T CAR⁺, $\leq 50\%$ de células $\beta 2M$ ⁺, y $\leq 30\%$ de células TCR $\alpha\beta$ ⁺. En ejemplos específicos adicionales, las células CAR T anti-CD19 comprenden $\geq 30\%$ de células T CAR⁺, $\leq 30\%$ de células $\beta 2M$ ⁺, y $\leq 0,5\%$ de células TCR $\alpha\beta$ ⁺.

Véase también los documentos WO 2019/097305A2 y WO2019215500.

En ejemplos específicos, la población de células T genéticamente manipuladas puede ser las células CAR T anti-CD19 divulgadas en el presente documento que comprenden un gen *TGFBRII* interrumpido y un gen *Reg1* interrumpido. El gen *Reg1* interrumpido puede comprender cualquiera de las secuencias proporcionadas en las tablas 29-38 posteriormente. Alternativamente o además, el gen *TGFBRII* interrumpido puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada de las enumeradas en las tablas 40-48 posteriormente. En algunos ejemplos, las células CAR T anti-CD19 pueden comprender al menos el 80% de células TGFBRII⁻, por ejemplo, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o más de células TGFBRII⁻. Alternativamente o además, las células CAR T anti-CD19 pueden comprender al menos el 80% de células Reg1⁻, por ejemplo, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o más de células Reg1⁻. En algunos ejemplos, las células CAR T anti-CD19 pueden comprender al menos el 60% de células Reg1⁻/TGFBRII⁻, por ejemplo, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o más de células Reg1⁻/TGFBRII⁻.

En algunos ejemplos, tal población de células T genéticamente manipuladas puede comprender aproximadamente el 90-97% de células Reg1⁻, aproximadamente el 80-89% de células TGFBRII⁻, aproximadamente el 90-99% de células TCR⁻, y/o aproximadamente el 60-82% de células $\beta 2M$ ⁻. La población celular también puede contener al menos el 50% (por ejemplo, al menos el 60%) de células que expresan el CAR anti-CD19.

ii. Células CAR T anti-BCMA que tienen interrupción de genes *Reg1* y *TGFBRII*

También se proporciona en el presente documento una población de células inmunitarias genéticamente manipuladas (por ejemplo, células T tal como células T humanas) que comprenden un gen *Reg1* interrumpido, y un gen *TGFBRII* interrumpido, y expresan un CAR anti-BCMA, por ejemplo, las divulgadas en el presente documento. En algunos ejemplos, las células CAR-T anti-BCMA divulgadas en el presente documento, que expresan cualquiera de los CAR anti-BCMA divulgados en el presente documento (por ejemplo, el CAR anti-BCMA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146), también puede comprender un gen *TRAC* interrumpido y/o un gen $\beta 2M$ interrumpido como también se divulga en el presente documento.

La población de células T genéticamente manipuladas son células CAR T anti-BCMA que comprenden un gen *Reg1* interrumpido y un gen *TGFBRII* interrumpido. En algunos casos, la población de células inmunitarias genéticamente manipuladas (por ejemplo, células T tal como células T humanas) comprenden tanto un gen *Reg1* interrumpido como un gen *TGFBRII* interrumpido, y expresan un CAR anti-BCMA, por ejemplo, las divulgadas en el presente documento. En algunos ejemplos, las células CAR T anti-BCMA son células CAR T anti-BCMA que tienen un gen *TRAC* y un gen $\beta 2M$ interrumpidos. El ácido nucleico que codifica el CAR anti-BCMA se puede insertar en el gen *TRAC* interrumpido en el sitio de SEQ ID NO: 69, que se sustituye por el ácido nucleico que codifica el CAR anti-BCMA, interrumpiendo de esta manera la expresión del gen *TRAC*. El gen *TRAC* interrumpido en las células CAR T anti-BCMA pueden comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 145.

Las células CAR T anti-BCMA que comprenden un gen *Reg1* interrumpido y un gen *TGFBR1* interrumpido se pueden producir a través de modificación genética *ex vivo* usando la tecnología CRISPR/Cas9 (proteína 9 asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas regularmente/CRISPR) para interrumpir genes dirigidos (*TGFBR1* y *Reg1*, opcionalmente genes *TRAC* y/o $\beta 2M$), y transducción de virus adenoasociados (AAV) para administrar la construcción CAR anti-BCMA. La edición génica mediada por CRISPR-Cas9 implica al menos tres ARN guías (ARNsg), como se describe anteriormente para células CAR T anti-BCMA.

Las células CAR T anti-BCMA están compuestas de un fragmento de anticuerpo monocatenario anti-BCMA (scFv, que puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148), seguido por un dominio bisagra y transmembrana de CD8 (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97) que está fusionada a un dominio de coseñalización intracelular de CD28 (por ejemplo, SEQ ID NO: 101) y un dominio de señalización de CD3 ζ (por ejemplo, SEQ ID NO: 103). En ejemplos específicos, las células CAR T anti-BCMA comprenden la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 146.

Al menos el 30% de una población de células CAR T anti-BCMA puede expresar un nivel detectable del CAR anti-BCMA. Por ejemplo, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de las células CAR T anti-BCMA expresa un nivel detectable del CAR anti-BCMA.

Al menos el 50% de una población de células CAR T anti-BCMA puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$. Por ejemplo, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de las células CAR T anti-BCMA puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$. El 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T genéticamente manipuladas de una población puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$.

Alternativamente o además, al menos el 50% de una población de células CAR T anti-BCMA puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie TRAC. Por ejemplo, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de las células CAR T anti-BCMA puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie TRAC. El 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T genéticamente manipuladas de una población puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie TRAC. En ejemplos específicos, más del 90% (por ejemplo, más del 99,5%) de las células CAR T anti-BCMA no expresan una proteína de superficie TRAC detectable.

Un porcentaje sustancial de la población de células CAR T anti-BCMA puede comprender más de una edición génica, que produce un cierto porcentaje de células que no expresan más de un gen y/o proteína.

Por ejemplo, al menos el 50% de una población de células CAR T anti-BCMA puede no expresar un nivel detectable de dos proteínas de superficie, por ejemplo, un nivel detectable de proteínas $\beta 2M$ y TRAC. El 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células CAR T anti-BCMA puede no expresar un nivel detectable de las proteínas de superficie TRAC y $\beta 2M$. En otro ejemplo, al menos el 50% de una población de células CAR T anti-BCMA no expresa un nivel detectable de las proteínas de superficie TRAC y $\beta 2M$.

La población de células CAR T anti-BCMA puede comprender más de una edición génica (por ejemplo, en más de un gen), que puede ser una edición descrita en el presente documento. Por ejemplo, la población de células CAR T anti-BCMA puede comprender un gen *TRAC* interrumpido a través de tecnología CRISPR/Cas usando el ARNg de *TRAC* TA-1. En algunos ejemplos, las células CAR T anti-BCMA puede comprender una delección en el gen *TRAC* relativo a células T sin modificar. Por ejemplo, las células CAR T anti-CD19 puede comprender una delección el fragmento AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (SEQ ID NO: 69) en el gen *TRAC*. Este fragmento se puede sustituir por el ácido nucleico que codifica el CAR anti-BCMA (SEQ ID NO: 145). Alternativamente o además, la población de células CAR T anti-BCMA puede comprender un gen $\beta 2M$ interrumpido a través de tecnología CRISPR/Cas usando el ARNg de $\beta 2M$ -1. Tales células CAR T anti-BCMA puede comprender indels en el gen $\beta 2M$, que comprenden una o más de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 83-88. En ejemplos específicos, las células CAR T anti-BCMA comprenden $\geq 30\%$ de células T CAR⁺, $\leq 50\%$ de células $\beta 2M$ ⁺, y $\leq 30\%$ de células TCR $\alpha\beta$ ⁺. En ejemplos específicos adicionales, las células CAR T anti-BCMA comprenden $\geq 30\%$ de células T CAR⁺, $\leq 30\%$ de células $\beta 2M$ ⁺, y $\leq 0,5\%$ de células TCR $\alpha\beta$ ⁺.

Véase también los documentos WO 2019/097305A2 y WO2019215500.

En ejemplos específicos, la población de células T genéticamente manipuladas puede ser las células CAR T anti-BCMA divulgadas en el presente documento que comprenden un gen *TGFBR1* interrumpido y un gen *Reg1* interrumpido. El gen *Reg1* interrumpido puede comprender cualquiera de las secuencias proporcionadas en las tablas 29-38 posteriormente. Alternativamente o además, el gen *TGFBR1* interrumpido puede comprender una secuencia de

nucleótidos seleccionada de las enumeradas en las tablas 40-48 posteriormente. En algunos ejemplos, las células CAR T anti-BCMA pueden comprender al menos el 80% de células TGFBR11, por ejemplo, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o más de células TGFBR11. Alternativamente o además, las células CAR T anti-BCMA pueden comprender al menos el 80% de células Reg1, por ejemplo, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o más de células Reg1. En algunos ejemplos, las células CAR T anti-BCMA pueden comprender al menos el 60% de células Reg1/TGFBR11, por ejemplo, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o más de células Reg1/TGFBR11.

iii. Células CAR T anti-CD70 que tienen interrupción de genes *Reg1* y *TGFBR11*

También se proporciona en el presente documento una población de células inmunitarias genéticamente manipuladas (por ejemplo, células T tal como células T humanas) que comprenden un gen *Reg1* interrumpido, y un gen *TGFBR11* interrumpido, y expresan un CAR anti-CD70, por ejemplo, las divulgadas en el presente documento. En algunos casos, la población de células inmunitarias genéticamente manipuladas (por ejemplo, células T tal como células T humanas) comprende tanto un gen *Reg1* interrumpido como un gen *TGFBR11* interrumpido, y expresan un CAR anti-CD70, por ejemplo, las divulgadas en el presente documento. En algunos ejemplos las células CAR T anti-CD70 divulgadas en el presente documento, que expresan cualquiera de los CAR anti-CD70 divulgados en el presente documento (por ejemplo, el CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138), también puede comprender un gen *TRAC* interrumpido y/o un gen $\beta 2M$ interrumpido como también se divulga en el presente documento.

En algunos ejemplos, las células CAR T anti-CD70 son células CAR T anti-CD70 que tienen un gen *TRAC* interrumpido, un gen $\beta 2M$ interrumpido, y un gen *CD70* interrumpido. El ácido nucleico que codifica el CAR anti-CD70 se puede insertar en el gen *TRAC* interrumpido en el sitio de SEQ ID NO: 69, que se sustituye por el ácido nucleico que codifica el CAR anti-CD70, interrumpiendo de esta manera la expresión del gen *TRAC*. El gen *TRAC* interrumpido en las células CAR anti-CD70 pueden comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 139.

Las células CAR T anti-CD70 que comprenden un gen *TGFBR11* interrumpido y un gen *Reg1* interrumpido se pueden producir a través de modificación genética *ex vivo* usando la tecnología CRISPR/Cas9 (proteína 9 asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas regularmente/CRISPR) para interrumpir genes dirigidos (*TGFBR11* y *Reg1*, opcionalmente genes *TRAC*, $\beta 2M$ y/o *CD70*), y transducción de virus adenoasociados (AAV) para administrar la construcción CAR anti-CD70. La edición génica mediada por CRISPR-Cas9 implica al menos un ARNsg que se dirige al gen *TGFBR11* como los divulgados en el presente documento (véase, por ejemplo, la tabla 39) y un ARNsg que se dirige al gen *Reg1* como los divulgados en el presente documento (véase, por ejemplo, la tabla 22), y opcionalmente un ARNsg (SEQ ID NO: 55) que se dirige al locus *CD70*, ARNsg TA-1 (SEQ ID NO: 59), que se dirige al locus *TRAC*, y ARNsg $\beta 2M$ -1 (SEQ ID NO: 63), que se dirige al locus $\beta 2M$.

Las células CAR T anti-CD70 están compuestas de un fragmento de anticuerpo monocatenario anti-CD70 (scFv, que puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138), seguido por un dominio bisagra y transmembrana de CD8 (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97) que está fusionada a un dominio de coseñalización intracelular de CD28 (por ejemplo, SEQ ID NO: 101) y un dominio de señalización de CD3 ζ (por ejemplo, SEQ ID NO: 103). En ejemplos específicos, las células CAR T anti-CD70 comprenden la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 138.

Al menos el 30% de una población de células CAR T anti-CD70 puede expresar un nivel detectable del CAR anti-CD70. Por ejemplo, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de las células CAR T anti-CD70 expresa un nivel detectable del CAR anti-CD70.

Al menos el 50% de una población de células CAR T anti-CD70 puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$. Por ejemplo, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de las células CAR T anti-CD70 puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$. El 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T genéticamente manipuladas de una población puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$.

Alternativamente o además, al menos el 50% de una población de células CAR T anti-CD70 puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie *TRAC*. Por ejemplo, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de las células CAR T anti-CD70 puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie *TRAC*. El 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T genéticamente manipuladas de una población puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie *TRAC*. En ejemplos específicos, más del 90% (por ejemplo, más del 99,5%) de las células CAR T anti-CD70 no expresan una proteína de superficie *TRAC* detectable.

Al menos el 50% de una población de células CAR T anti-CD70 puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie CD70. Por ejemplo, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de las células T manipuladas de una población puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie CD70. El 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T genéticamente manipuladas de una población puede no expresar un nivel detectable de proteína de superficie CD70.

Un porcentaje sustancial de la población de células CAR T anti-CD70 puede comprender más de una edición génica, que produce un cierto porcentaje de células que no expresan más de un gen y/o proteína.

Por ejemplo, al menos el 50% de una población de células CAR T anti-CD70 puede no expresar un nivel detectable de dos proteínas de superficie, por ejemplo, no expresa un nivel detectable de proteínas $\beta 2M$ y TRAC, proteínas $\beta 2M$ y CD70, o proteínas TRAC y CD70. El 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T manipuladas de una población puede no expresar un nivel detectable de dos proteínas de superficie. En otro ejemplo, al menos el 50% de una población de células CTX130 puede no expresar un nivel detectable de las tres proteínas de superficie $\beta 2M$, TRAC y CD70. El 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T manipuladas de una población puede no expresar un nivel detectable de las proteínas de superficie $\beta 2M$, TRAC y CD70.

La población de células CAR T anti-CD70 puede comprender más de una edición génica (por ejemplo, en más de un gen), que puede ser una edición descrita en el presente documento. Por ejemplo, la población de células CAR T anti-CD70 puede comprender un gen *TRAC* interrumpido a través de tecnología CRISPR/Cas usando el ARNg de *TRAC* TA-1. En algunos ejemplos, las células CAR T anti-CD70 pueden comprender una delección en el gen *TRAC* relativo a células T sin modificar. Por ejemplo, las células CAR T anti-CD70 pueden comprender una delección el fragmento AGAGCAACAGTGTGTGGCC (SEQ ID NO: 69) en el gen *TRAC*. Este fragmento se puede sustituir por el ácido nucleico que codifica el CAR anti-CD70 (SEQ ID NO: 139). Alternativamente o además, la población de células CAR T anti-CD70 puede comprender un gen $\beta 2M$ interrumpido a través de tecnología CRISPR/Cas usando el ARNg de $\beta 2M$ -1. Tales células CAR T anti-CD70 pueden comprender indels en el gen $\beta 2M$, que comprenden una o más de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 83-88. En ejemplos específicos, las células CAR T anti-CD70 comprenden $\geq 30\%$ de células T CAR⁺, $\leq 50\%$ de células $\beta 2M$ ⁺, y $\leq 30\%$ de células TCR $\alpha\beta$ ⁺. En ejemplos específicos adicionales, las células CAR T anti-CD70 comprenden $\geq 30\%$ de células T CAR⁺, $\leq 30\%$ de células $\beta 2M$ ⁺, y $\leq 0,5\%$ de células TCR $\alpha\beta$ ⁺.

Véase también los documentos WO 2019/097305A2 y WO2019215500.

En ejemplos específicos, la población de células T genéticamente manipuladas puede ser las células CAR T anti-CD70 divulgadas en el presente documento que además comprenden un gen *TGFBR1* interrumpido y un gen *Reg1* interrumpido. El gen *Regnasa 1* interrumpido puede comprender cualquiera de las secuencias proporcionadas en las tablas 29-38 posteriormente. Alternativamente o además, el gen *TGFBR1* interrumpido puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada de las enumeradas en las tablas 40-48 posteriormente. Tales células T genéticamente manipuladas pueden tener $\geq 30\%$ de células T CAR⁺, $\leq 0,45\%$ de células T TCR⁺, $\leq 30\%$ de células T $\beta 2M$ ⁺, y $\leq 2\%$ de células T CD70⁺. En algunos ejemplos, las células CAR T anti-CD70 pueden comprender al menos el 80% de células TGFBR1⁺, por ejemplo, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o más de células TGFBR1⁺. En algunos ejemplos, las células CAR T anti-CD70 pueden comprender al menos el 60% de células Reg1/TGFBR1⁺, por ejemplo, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o más de células Reg1/TGFBR1⁺.

III. Aplicaciones terapéuticas

Se esperaría que las células T terapéuticas generadas usando las células T genéticamente manipuladas divulgadas en el presente documento mantuvieran la salud de células T permitida por la interrupción del gen *Reg1* y la interrupción del gen *TGFBR1*, y opcionalmente la interrupción de *CD70*. Por ejemplo, mantener la salud de las células T puede extender la expansión durante la producción, aumentando de esta manera el rendimiento y consistencia. En otro ejemplo, mantener la salud de las células T puede rescatar células T agotadas/poco sanas, permitiendo de esta manera dosis potencialmente menores en pacientes y respuestas más robustas. Además, la interrupción del gen *Reg1* y del gen *TGFBR1* mostraron efectos sinérgicos en aumentar la potencia de las células CAR-T y expansión *in vivo*.

Las células T terapéuticas divulgadas en el presente documento para uso como un medicamento, se deben administrar a un sujeto para fines terapéuticos, por ejemplo, tratamiento de un tumor sólido al que se dirige la construcción CAR expresada por las células T terapéuticas.

La etapa de administrar puede incluir la colocación (por ejemplo, trasplante) de las células T terapéuticas en un sujeto por un método o ruta que produce al menos localización parcial de las células T terapéuticas en un sitio deseado, tal como un sitio tumoral, de modo que se pueda producir un efecto(s) deseado(s). Las células T terapéuticas se pueden

administrar por cualquier ruta adecuada que produzca administración a una localización deseada en el sujeto donde al menos una porción de las células implantadas o componentes de las células permanecen viables. El periodo de viabilidad de las células después de la administración a un sujeto puede ser tan corto como unas pocas horas, por ejemplo, veinticuatro horas, a unos pocos días, a tanto como varios años, o incluso la vida del sujeto, es decir, injerto a largo plazo. Por ejemplo, en algunos aspectos descritos en el presente documento, una cantidad eficaz de células T terapéuticas se puede administrar a través de una ruta sistémica de administración, tal como una ruta intraperitoneal o intravenosa.

En algunas formas de realización, las células T terapéuticas para uso se deben administrar por vía sistémica, que se refiere a la administración de una población de células diferente que directamente en un sitio, tejido, u órgano diana, de modo que entra, en su lugar, en el sistema circulatorio del sujeto y, por tanto, se somete a metabolismo y otros procesos similares. Los modos adecuados de administración incluyen inyección, infusión, instilación o ingestión. La inyección incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, inatraespinal, intracerebroespinal, e intracisternal e infusión. La ruta puede ser intravenosa.

Un sujeto puede ser cualquier sujeto para el que se desea diagnóstico, tratamiento, o terapia. El sujeto puede ser un mamífero. El sujeto puede ser un ser humano.

En algunos casos, las células T terapéuticas pueden ser autólogas ("propias") al sujeto, es decir, las células son del mismo sujeto. Alternativamente, las células T terapéuticas pueden ser no autólogas ("no propias", por ejemplo, alogénicas, singénicas o xenogénicas) al sujeto. "Alogénico" significa que las células T terapéuticas no derivan del sujeto que recibe el tratamiento, sino de individuos diferentes (donantes) de la misma especie que el sujeto. Un donante es un individuo que no es sujeto que se trata. Un donante es un individuo que no es el paciente. Un donante puede ser un individuo que no tiene o no se sospecha que tenga el cáncer que se trata. Se pueden usar múltiples donantes, por ejemplo, dos o más donantes.

En algunas formas de realización, una población de células T manipuladas que se va a administrar según los usos médicos descritos en el presente documento comprende células T alogénicas obtenidas de uno o más donantes. Alogénica se refiere a una célula, población celular o muestras biológicas que comprenden células, obtenidas de uno o más donantes diferentes de la misma especie, donde los genes en uno o más loci no son idénticos al receptor (por ejemplo, sujeto). Por ejemplo, una población de células T manipuladas, que se administra a un sujeto puede derivar de uno o más donantes no relacionados, o de uno o más hermanos no idénticos. Se pueden usar poblaciones celulares singénicas, tal como las obtenidas de donantes genéticamente idénticos (por ejemplo, gemelos idénticos). Las células pueden ser células autólogas; es decir, las células T manipuladas se obtienen o aíslan de un sujeto y se administran al mismo sujeto, es decir, el donante y el receptor son el mismo.

Una cantidad eficaz se refiere a la cantidad de una población de células T manipuladas necesaria para prevenir o aliviar al menos uno o más signos o síntomas de una afección médica (por ejemplo, cáncer), y se refiere a una cantidad suficiente de una composición para proporcionar el efecto deseado, por ejemplo, para tratar un sujeto que tiene una afección médica. Una cantidad eficaz también incluye una cantidad suficiente para prevenir o retrasar el desarrollo de un síntoma de la enfermedad, alterar el curso de un síntoma de la enfermedad (por ejemplo, pero no limitado a, ralentizar la evolución de un síntoma de la enfermedad), o revertir un síntoma de la enfermedad. Se entiende que para cualquier caso determinado, una cantidad eficaz apropiada la puede determinar un experto en la materia usando experimentación rutinaria.

Debido a la persistencia y eficacia aumentadas de las células T terapéuticas divulgadas en el presente documento, la dosis de las células T terapéuticas para uso proporcionadas en el presente documento sería menor que la dosis estándar de células CAR-T preparadas por enfoques convencionales (por ejemplo, usar células T que no tiene uno o más de los sucesos de edición genética divulgados en el presente documento, incluyendo un gen *Reg1* interrumpido y un gen *CD70* interrumpido). La cantidad eficaz de las células T terapéuticas divulgadas en el presente documento puede ser al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al menos 10 veces menor, al menos 20 veces menor, al menos 50 veces menor, o al menos 100 veces menor que una dosis estándar de una terapia CAR-T. En algunos ejemplos, una cantidad eficaz de las células T terapéuticas divulgadas en el presente documento puede ser menor de 10^6 células, por ejemplo, 10^5 células, 5×10^4 células, 10^4 células, 5×10^3 células, o 10^3 células. En algunos ejemplos descritos en el presente documento, las células se expanden en cultivo antes de la administración a un sujeto en necesidad de ello.

La eficacia de un tratamiento usando las células T terapéuticas divulgadas en el presente documento la puede determinar el experto en la materia. Un tratamiento se considera "eficaz". Si uno cualquiera o todos los signos o síntomas de, como pero un ejemplo, niveles de diana funcional se alteran de una manera beneficiosa (por ejemplo, aumentado en al menos el 10%), u otros síntomas clínicamente aceptados o marcadores de enfermedad (por ejemplo, cáncer) mejoran o se alivian. La eficacia también se puede medir por fallo de un sujeto de empeorar evaluado por hospitalización o necesidad de intervenciones médicas (por ejemplo, la evolución de la enfermedad se para o al menos ralentiza). Los métodos de medir estos indicadores los conocen los expertos en la materia y/o se describen en el

presente documento. Tratamiento incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en un sujeto e incluye: (1) inhibir la enfermedad, por ejemplo, parar, o ralentizar la evolución de síntomas; o (2) aliviar la enfermedad, por ejemplo, producir regresión de síntomas; o (3) prevenir o reducir la probabilidad del desarrollo de síntomas.

- 5 Las terapias de combinación también están abarcadas por la presente divulgación. Por ejemplo, las células T terapéuticas divulgadas en el presente documento se pueden coultizar con otros agentes terapéuticos, para tratar la misma indicación, o para aumentar la eficacia de las células T terapéuticas y/o reducir los efectos secundarios de las células T terapéuticas.

10 **Técnicas generales**

La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro de las capacidades de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., eds. 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practice approach* (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); *DNA Cloning: A practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985»; *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984»; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986»; *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986»; y B. Perbal, *A practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.).

35 Sin más elaboración, se cree que un experto en la materia puede, basado en la descripción anterior, utilizar la presente invención a su nivel más completo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cribado de sitio de direccionamiento de Reg1 por edición génica mediada por CRISPR/Cas

40 (A) *Interrupción eficaz de Reg1 por RNP Cas9:ARNsg en células T*

El gen *Reg1* se editó de forma eficaz en células T humanas primarias *ex vivo* usando edición génica de CRISPR/Cas9. Se usaron segmentos genómicos del gen *Reg1* que contenían los seis (6) exones codificantes de proteína como entrada en el software de diseño de ARNg. Los ARNg deseados eran esos que producirían inserciones o deleciones en la secuencia codificante, interrumpiendo la secuencia de aminoácidos de *Reg1*, produciendo alelo(s) fuera de marco de lectura/de pérdida de función (denominados alelos "inactivados (KO) de *Reg1*" o "alelos interrumpidos de *Reg1*"). Las diez (10) secuencias espaciadoras de ARNg identificadas *in silico* que se dirigen al gen *Reg1* se sintetizaron, y los ARNg se modificaron específicamente, como se indica en la tabla 1. Mientras los ARNg usados en este ejemplo se modificaron con modificaciones 2'-O-metilfosforotioato, se pueden usar ARNg sin modificar, o ARNg con otras modificaciones. Las secuencias diana y las secuencias de ARNg de las guías de *Reg1* Z01-Z10 se proporcionan en la tabla 22 posteriormente.

Tabla 1. Tasa de indel del gen *Reg1* por diez ARNg

Nombre de la guía	Eficacia de indel (TIDE)
REG1-Z01	98,3%
REG1-Z02	97,2%
REG1-Z03	96,8%
REG1-Z04	92,7%
REG1-Z05	98,5%
REG1-Z06	95%
REG1-Z07	94,8%
REG1-Z08	71%
REG1-Z09	88,2%
REG1-Z10	94,9%

Se transfectaron (electroporaron) células T primarias humanas con una partícula de ribonucleoproteína (RNP) que contenía nucleasa Cas9 y un ARNg modificado sintético que se dirigía al gen *Reg1* (secuencias en la tabla 22) o controles (sin Cas9, sin ARNg). Cuatro (4) días tras la transfección, las células se sometieron a un análisis TIDE para evaluar la frecuencia de indels.

Diez (10) ARNg dieron datos medibles por el análisis TIDE como se indica en la tabla 1. Ocho (8) secuencias de ARNg dieron porcentajes de indels (frecuencias de edición) por encima del 90% indicando edición génica muy eficaz.

Cuatro ARNg que se dirigían o bien al exón 2 o 4 se seleccionaron para estudios posteriores (REG1-Z03, REG1-Z05, REG1-Z06 y REG1-Z10, que mostraron tasas de edición del 96,8%, 98,5%, 95% y 94,9% de *Reg1*, respectivamente como se muestra en la (tabla 1).

(B) Edición específica e inespecífica de los ARN guía de REG1

Se examinaron las eficacias de edición específica e inespecífica de varios ARNg que se dirigen a REG1 indicados anteriormente según los métodos divulgados en la sección anterior. Brevemente, se transfectaron (electroporaron) células T activadas con una partícula de ribonucleoproteína (RNP) que contenía nucleasa Cas9 y un ARNg modificado sintético que se dirigía al gen *Reg1* (secuencias en la tabla 22 posteriormente) o controles (sin Cas9, sin ARNg).

Para la evaluación genómica específica e inespecífica, estos métodos de electroporación se usaron para generar dos poblaciones celulares de células editadas de dos células T donantes diferentes (denominadas 1 y 2). Las células se sometieron a edición génica con cada una de las diez guías indicadas anteriormente, y después se recogieron diez (10) días tras la transfección. Estas muestras se analizaron con captura híbrida, un método dependiente de homología para enriquecer sitios específicos e inespecíficos, combinado con secuenciación de nueva generación. Brevemente, los sitios específicos e inespecíficos con homología a cada sitio diana de ARNg se identificaron por ordenador, se usaron sondas de ARN monocatenario para enriquecer estos sitios del ADN genómico en masa, estos sitios enriquecidos se secuenciaron con secuenciación de nueva generación, y los datos se analizaron para inserciones y deleciones (indel) que indican reparación después de edición CRISPR.

(i) Análisis de perfiles de indel específicos en células T

Los datos usados para cuantificar ediciones inespecíficas también se usaron para cuantificar y resumir los indel específicos más frecuentes para todas las guías de *Reg1* enumeradas en la tabla 22. Estos datos se generaron de captura híbrida de locus *Reg1* combinado con secuenciación de nueva generación en dos donantes (denominados donante 1 y donante 2).

Después de la edición génica, el análisis de captura híbrida del locus *Reg1* en una población de células T después de edición génica con CRISPR/Cas9 para producir células T *Reg1* KO produjo frecuencias de indel específicas y secuencias génicas editadas en el locus *Reg1* (tablas 29-38; deleciones como guiones e inserciones en negrita).

Para los fines de cuantificación de secuencia individual de los datos de captura híbrida, se seleccionaron lecturas de secuencias alineadas a través del sitio específico de regnasa 1, 20 pb antes y después del sitio de corte, y se consideraron para cuantificación de secuencia de indel. De las lecturas seleccionadas, la secuencia a 10 pb antes y después de cada sitio de corte putativo (~3 bp antes del PAM (Jinek, et al., Science 2012) se cuantificó como una región representativa de edición de unión de extremos no homólogos (NHEJ) específica.

La tabla 2 siguiente muestra los resultados de edición específicos e inespecíficos (de dos donantes) de los ARNg de *Reg1* ejemplares obtenidos por el ensayo de captura híbrida divulgado en el presente documento.

Tabla 2. Resultados específicos e inespecíficos por captura híbrida

Guía	Número de sitios inespecíficos predichos ensayados	Edición media específica captura híbrida	Inespecíficos detectados
REG1-Z01	35	97,0%	1 0,75% inespecífico 1 0,25% inespecífico
REG1-Z02	27	97,7%	Edición inespecífica no detectada
REG1-Z03	52	99,0%	1 5,0% inespecífico 1 0,6% inespecífico 1 0,4% inespecífico 1 0,3% inespecífico 1 0,2% inespecífico
REG1-Z04	6	97,0%	Edición inespecífica no detectada
REG1-Z05	14	98,6%	Edición inespecífica no detectada
REG1-Z06	1	94,2%	Edición inespecífica no detectada

REG1-Z07	16	94,2%	1 0,2% inespecífico
REG1-Z08	6	53,8%	Edición inespecífica no detectada
REG1-Z09	6	86,2%	Edición inespecífica no detectada
REG1-Z10	14	98,2%	Edición inespecífica no detectada

Se presentan secuencias con edición génica específica por los ARNg de Reg1 ejemplares en las tablas 29-38 posteriormente, las frecuencias de estas secuencias representan el porcentaje de todas las secuencias que abarcan el sitio específico en 20 pb antes y después de cada sitio de corte. Los indels para cada guía se muestran en relación a una secuencia de referencia específica en las tablas 29-38. La secuencia de referencia se centra en el sitio de corte con 10 pb en cada dirección, acabando 4 pb 3' del PAM.

Ejemplo 2: La interrupción de *regnasa 1* mejora la expansión de células CAR-T

Usando células T que expresan un CAR anti-CD70 divulgado en el presente documento como un ejemplo, este estudio demostró que inactivar Reg1 en las células CAR-T produjo expansión de cultivo de células CAR-T *in vitro* aumentada.

Se produjeron células T humanas alogénicas que carecen de expresión del gen *TRAC*, gen $\beta 2M$, gen *CD70*, y gen *regnasa-1*, y expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a CD70. Brevemente, células T humanas activadas se aislaron primero y después se administraron RNP Cas9:ARNsg (Cas9 1 μM , ARNg 5 μM) a las células T humanas activadas por electroporación, seguido por incubación con vectores adenovíricos adenoasociados recombinantes (AAV), serotipo 6 (AAV6) (MOI 50.000). La mezcla de nucleofección contenía la solución Nucleofector™, 5 x 10⁶ células, Cas9 1 μM , y ARNg 5 μM (como se describe en Hendel *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2015; 33(9):985-989, PMID: 26121415). El complejo RNP comprendía Cas9 y ARNsg dirigido a los genes *TRAC*, *B2M*, y *CD70* (mostrado en la tabla 23) y opcionalmente *regnasa-1* (usando los ARNsg REG1-Z01 y REG1-Z10 mostrados en la tabla 22). El vector rAAV incluía la secuencia de nucleótidos que codifica un CAR anti-CD70 (el molde donante en SEQ ID NO: 169, que codifica una secuencia de aminoácidos de CAR anti-CD70 de SEQ ID NO: 138).

Para evaluar la capacidad de células CAR T anti-CD70 para expandirse en medio que contiene citoquinas (IL-2 + IL-7), se utilizaron células CAR T anti-CD70. Específicamente, se generaron de 2,5 a 3,8 x 10⁶ células CAR T anti-CD70 totales que comprendían una cuádruple interrupción (*TRAC*-/ $\beta 2M$ -/*CD70*-/*Reg1*-) y se compararon con células CAR T anti-CD70 con Reg1 sin editar (*TRAC*-/ $\beta 2M$ -/*CD70*-).

Las células se sembraron y dejaron crecer en botellas con medio que contenía citoquinas. Cada 3-4 días el número total de células se contó y resembraron según se necesitó. Este proceso se repitió cada semana durante un total de 21 días. Las células CAR T anti-CD70 alogénicas que contenían una interrupción en el gen *Reg1* muestran un aumento en la expansión celular después de 21 días (Fig. 1A). Las guías de Reg1 REG1-Z01, REG1-Z03, REG1-Z07, REG1-Z09 y REG1-Z10 parecen tener un mayor efecto en la expansión celular que las células hechas usando las guías de Reg1 REG1-Z02 o REG1-Z08.

En un segundo experimento, la guía de Reg1 REG1-Z10 se usó en células CAR T hechas de un donante de células T diferente en replicados por dos operadores (llamados A y B). El efecto de expansión de cultivo celular aumentado se demostró otra vez. El aumento en la expansión celular se puede ver tan pronto como el día 13 y sigue a lo largo de todo el experimento hasta el día 52 (Fig. 1B). Además, las células CAR-T anti-CD70 que contienen una interrupción de Reg1 se mantienen durante un tiempo más largo en cultivo (al menos hasta el día 52) en comparación con células CAR-T anti-CD70 con un gen *regnasa 1* sin editar, una de las cuales ya no era viable el día 26. En conjunto, estos datos muestran que la interrupción del gen *Reg1* produce mayores rendimientos de cultivo celular y mantenimiento de células en cultivo más largo en comparación con células CAR T con un gen *Reg1* sin editar.

Ejemplo 3: Función de destrucción celular de células CAR T anti-CD70 con interrupción de *Reg1*

Se produjeron células T humanas alogénicas que carecen de expresión del gen *TRAC*, gen $\beta 2M$, y gen *CD70*, y expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a CD70. Las células CAR T editadas además comprendían inactivación del gen *Reg1*. Como en los ejemplos anteriores, se electroporaron células T humanas activadas con RNP Cas9:ARNsg (Cas9 1 μM , ARNg 5 μM), seguido por incubación con vectores adenovíricos adenoasociados recombinantes, serotipo 6 (AAV6) (MOI 50.000).

El AAV recombinante comprendía la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 169 (que codifica el CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138). Se usaron los siguientes ARNsg: *TRAC* (SEQ ID NO: 58), $\beta 2M$ (SEQ ID NO: 62), *CD70* (SEQ ID NO: 54), y opcionalmente *Reg1* (por ejemplo, REG1-Z03, Z05, Z06 y Z10; véase la tabla 22 y las figuras 2A a 2E).

En puntos de tiempo de una semana y un mes tras la electroporación, se comprobó la expresión de CAR de las células T por citometría de flujo. Tanto las células CAR T anti-CD70 como las células CAR T anti-CD70 que carecían de *Reg1* (usando cuatro ARNsg REG1-Z03, Z05, Z06 y Z10) expresaban cantidades casi equivalentes de CAR en su superficie el día 7 (85,6% y 81,8%, 80%, 84,4%, 85,6%) y el día 32 (97,6% y 90,7%, 91,5%, 92,6%, 93,2%) tras HDR.

Función de destrucción celular de células CAR T anti-CD70 con interrupción de regnasa-1 (Reg1)

Se usó un ensayo de destrucción celular para evaluar la capacidad de las células TRAC- β 2M-/CD70-/Reg1-/CAR anti-CD70+ de destruir líneas celulares derivadas de carcinoma de células renales (RCC) adherentes CD70+ (líneas celulares ACHN, Caki-1, y/o 769P). Las células adherentes se sembraron en placas de 96 pocillos a 50.000 células por pocillo y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente se añadieron células CAR T anti-CD70 editadas (cultivadas hasta el día 12 tras HDR o el día 27 tras HDR) a los pocillos que contenían células diana en proporciones celulares CAR T:diana de 1:1, 2:1 o 1,5:1. Después de 24 horas de cocultivo, las células CAR T se eliminaron del cultivo por aspiración y se añadieron 100 μ l de Cell titer-Glo (Promega) a cada pocillo de la placa para evaluar el número de células diana viables restantes. La cantidad de luz emitida por pocillo se cuantificó después usando un lector de placas.

Las células con interrupción de *Reg1* mostraron una destrucción celular más potente de células derivadas de RCC después de coincubación de 24 horas. Las células CAR T anti-CD70 el día 12 tras HDR (Fig. 2A y 2B) demostraron potencia ligeramente mayor cuando *Reg1* estaba inactivado, y potencia mucho mayor el día 27 tras HDR (Fig. 2C, 2D y 2E). Esto sugiere que inactivar el gen *Reg1* da una potencia de destrucción celular mayor persistente/mantenida a las células T CAR anti-CD70+ durante el tiempo tras HDR. Este hallazgo era consistente a través de tres líneas tumorales de líneas tumorales de carcinoma de células renales. Las células T CAR anti-CD70+ con interrupción de *Reg1* usando los ARNg REG1-Z03, REG1-Z05, REG1-Z10 dieron una mayor potencia persistente que cuando se usa el ARNg REG1-Z06. Las células CAR-T con interrupción de *Reg1* demostraron un aumento visible en potencia después de cocultivo de 24 horas con caki-1 (Fig. 2A, 2B y 2C) y ACHN (Fig. 2D), y después de cocultivo de 6 horas con 769P (diferencia ya no visible después de 24 h) (Fig. 2E).

Mientras las células CAR-T con o sin regnasa KO mostraron eficacia similar el día 13 tras HDR, la eficacia parece disminuir en células más viejas (día 19 y día 26) sin la inactivación de regnasa. Sorprendentemente, las células TRAC- β 2M-/CD70-/Reg1-/CAR anti-CD70+ aún retienen la capacidad de destruir con actividad similar células ACHN y Caki-1 en cultivo (Fig. 6A y 6B).

Esto sugiere que interrumpir el gen *Reg1* da una actividad persistente y mayor potencia de destrucción celular a células T CAR+ durante un periodo de tiempo más largo tras edición HDR.

Ejemplo 4: Efecto de la interrupción de Regnasa-1 (Reg1) sobre expresión de marcadores de agotamiento

Se evaluaron los niveles de marcadores de agotamiento de células T en células TRAC- β 2M-/CD70-/CAR anti-CD70+ y células TRAC- β 2M-/CD70-/Reg1-/CAR anti-CD70+. Se evaluaron células T CD4+ y CD8+ para expresión de PD-1 (Fig. 3A y 3B) y expresión de TIM3 (Fig. 3C y 3D) por citometría de flujo el día 13 (Fig. 3A y 3C) y día 26 (Fig. 3B y 3D) tras HDR.

Los datos demuestran que *Reg1* KO (usando guía Z10 como un ejemplo) reduce la expresión de marcadores de agotamiento en células CAR T en todos los puntos de tiempo medidos. Los datos demuestran que inactivar *Reg1* podría reducir el potencial agotamiento de poblaciones con genes editados CD4+ y CD8+ de células T CAR+ produciendo mejores terapéuticos.

Ejemplo 5: La interrupción de Regnasa-1 (Reg1) aumenta la proporción de células de memoria central en una población de células CAR T

Tras activación de péptidos antigénicos presentados por células presentadoras de antígeno, las células T indiferenciadas se diferencian a varios tipos de células T en el orden célula madre T memoria (T_{SCM}), célula T de memoria central (T_{CM}), célula T de memoria efectora (T_{EM}) y célula T efectora (T_{EF}). Los marcadores de superficie ejemplares de células T en diferentes fases de diferenciación se proporcionan a continuación. Las células T_{CM} se han asociado con persistencia a largo plazo de células T in vivo: se mostró que clones CD8+ aislados de células T_{CM} persistían a largo plazo in vivo durante la transferencia de células T adoptivas en primates no humanos mientras clones aislados de células efectoras no (Berger et al., J. Clin. Invest. (2008) 118:294-305). Se proporcionan marcadores de superficie celular representativos de varios tipos de células T en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Marcadores de superficie celular representativos de varios tipos de células T

	Indiferenciadas	Memoria central madre	Memoria central	Memoria efectora
CD27	+	+	+	-
CD45RO	-	-	+	+
CD45RA	+	+	-	-
CD62L	+	+	+	-
CD95	-	+	+	+

Los niveles de marcadores de células T de memoria central CD27 y CD45 RO se evaluaron en células TRAC- β 2M-/CD70-/CAR anti-CD70+ y TRAC- β 2M-/CD70-/Reg1-/CAR anti-CD70+. Las células se tiñeron usando anticuerpos comerciales para CD27 (Biolegend, clon M-T271) y CD45 RO (Biolegend, clon UCHL1) y se analizaron por citometría de flujo.

Las células CAR-T con inactivación de Reg1 era más probable que mostraran identidad de célula T de memoria central (doble positivo para CD27 y CD45 RO) y menos probable que mostraran identidad de célula de memoria efectora (identificada como CD27- y CD45 RO+), como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Marcadores de células T de memoria central y memoria efectoras con y sin Reg1 KO

Experimento	Células	Células de memoria central CD27+/CD45 RO+	Células de memoria efectora CD27-/CD45 RO+
1	TRAC- β 2M-/CAR anti-CD70+	62,3%	30%
	TRAC- β 2M-/Reg1-/CAR anti-CD70+	82,3%	15,1%
2	TRAC- β 2M-/CAR anti-CD70+	61,8%	27,5%
	TRAC- β 2M-/Reg1-/CAR anti-CD70+	74,3%	22,2%

Los resultados obtenidos de este estudio indican que la interrupción de Reg1 produjo un nivel aumentado de células T_{CM} en la población de células T total comparada con los homólogos WT de Reg1, lo que indica que la interrupción de Reg1 podría aumentar la persistencia a largo plazo de células T in vivo, que beneficiaría la terapia CAR-T.

Ejemplo 6: La interrupción de *Reg1* no afecta la dependencia de citoquinas de células CAR T

Para determinar si la edición génica producía edición inespecífica indeseada que pudiera generar células con propiedades adversas, tal como crecimiento celular incontrolado, se evaluó la capacidad de células TRAC- β 2M-/CAR anti-CD19+ y TRAC- β 2M-/Reg1-/CAR anti-CD19+ para crecer en ausencia de citoquinas y/o suero. Se sembraron 5×10^6 células aproximadamente 2 semanas tras la producción celular (día 0) en 10 ml de medio completo que contenía IL2, IL7 y suero humano, o en medio que contenía suero y carecía de citoquinas (IL-2 e IL-7). Se añadieron medio completo o medio sin citoquinas recientes a los respectivos cultivos una vez a la semana. El volumen de medio añadido permitió que los cultivos mantuvieran una densidad de aproximadamente 1-2 millones de células/ml. Si la densidad celular estaba por debajo de 1 millón de células/ml, no se añadía medio a los cultivos. El número de células viables se contó dos veces a la semana hasta 40 días tras la siembra. TRAC- β 2M-/CAR anti-CD19+ o TRAC- β 2M-/Reg1-/CAR anti-CD19+ ya no eran detectables a los 40 días en los cultivos que carecían de citoquinas, indicando que cualquier efecto inespecífico potencial debido a edición del genoma no inducía crecimiento/proliferación independiente de factores de crecimiento a las células (Fig. 4). Las células solo proliferaron en presencia de citoquinas (medio completo que contiene citoquinas) y no proliferaron en presencia de suero solo. Por tanto, editar el genoma no indujo ningún suceso adverso que permitiera a las células crecer en ausencia de citoquinas, factores de crecimiento o estimulación de antígeno.

Ejemplo 7: Efecto *in vivo* de Reg1 KO en células CAR T alogénicas en el modelo de xenoinjerto tumoral de leucemia linfoblástica aguda humana Nalm-6 diseminada intravenosa

Se utilizó un modelo de ratón diseminado para evaluar adicionalmente la eficacia *in vivo* de células CAR T alogénicas que carecen de β 2M y TRAC, así como Reg1. El modelo diseminado intravenoso (modelo diseminado) utilizó la línea celular tumoral de leucemia linfoblástica aguda humana Nalm-6 derivada de B-LLA CD19+ en ratones NOG para demostrar la eficacia de células T TRAC- β 2M-/CAR anti-CD19+ (células CAR T anti-CD19) con o sin edición del locus *Reg1*. El gen *Reg1* se editó a través de edición génica mediada por CRISPR/Cas usando al ARN guía REG1-Z10 (véase la tabla 22). Las células CAR T anti-CD19 expresan un CAR anti-CD19 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118. Véase también las tablas de secuencias 27 y 28 posteriormente, y el documento WO2019/097305.

La eficacia de las células CAR T anti-CD19 se evaluó en el modelo diseminado usando métodos empleados por Translations Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ) y descritos en el presente documento. Brevemente, 25 ratones CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdcsl12rgtm1Sug/JicTac) hembra de 5-8 semanas de edad se enjaularon individualmente en jaulas microaisladoras ventiladas, mantenidas en condiciones sin patógenos, 5-7 días antes del inicio del estudio. Al inicio del estudio, los ratones se dividieron en 5 grupos de tratamiento como se muestra en la tabla 5. Los ratones se inocularon con células Nalm6-Fluc-GFP (Nalm6-Fluc-Neo/eGFP-Puro) por vía intravenosa para enfermedad diseminada modelo. El día 1, todos los ratones recibieron una inyección intravenosa de $0,5 \times 10^6$ células Nalm6/ratón. El día 4, los grupos 2-5 recibieron una inyección intravenosa de células CAR T (4×10^6 células CAR+/ratón) como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Grupos de tratamiento para estudio de enfermedad diseminada intravenosa

Grupo	Células tumorales Nalm6 $0,5 \times 10^6$ células/ratón	Células CAR t (i.v.) 4×10^6 células/ratón	N
-------	--	---	---

1	X	NA	5
2	X	CAR anti-CD19/TRAC- β 2M- (4e6 CAR+)	5
3	X	CAR anti-CD19/TRAC- β 2M- (8e6 CAR+)	5
4	X	CAR anti-CD19/TRAC- β 2M-/Reg1- (4e6 CAR+)	5
5	X	CAR anti-CD19/TRAC- β 2M-/Reg1- (8e6 CAR+)	5

Durante el curso del estudio, los ratones se siguieron a diario y se midió el peso corporal dos veces a la semana. Se midió la bioluminiscencia (BLI; ROI total, fotón/s) dos veces a la semana empezando el día 4 del estudio. Un punto final significativo era el tiempo a perimorbilidad y el efecto del injerto de células T también se evaluó. El porcentaje de mortalidad animal y el tiempo hasta la muerte se registraron para cada grupo en el estudio. Los ratones se sacrificaron antes de alcanzar un estado moribundo. Los ratones se pueden definir como moribundos y sacrificar si se cumplían uno o más de los siguientes criterios:

Pérdida de peso corporal del 20% o más sostenido durante un periodo de más de 1 semana;
Tumores que inhiben la función fisiológica normal tal como comer, beber, movilidad y capacidad de orinar y o defecar;
Diarrea prolongada, excesiva que produce pérdida de peso excesiva (> 20%); o
Sibilancia persistente y dificultad respiratoria.

Los animales también se consideraron moribundos si había dolor prolongado o excesivo o angustia definida por observaciones clínicas tal como: postración, postura encorvada, parálisis/paresia, abdomen distendido, úlceras, abscesos, convulsiones y/o hemorragias.

Tasa de supervivencia in vivo

Los ratones en grupos que recibieron células T TRAC- β 2M-/CAR anti-CD19+ con o sin una interrupción de Reg1 adicional mostraron un aumento en la supervivencia relativa a los ratones en grupo sin tratar (grupo 1). Los ratones que recibieron cualquier dosis de células T TRAC- β 2M-/Reg1-/CAR anti-CD19+ mostraron supervivencia aumentada en comparación a células T TRAC- β 2M-/CAR anti-CD19+ en cada dosis respectiva (Fig. 5A y 5B). Además, los ratones que recibieron cualquier dosis de células T TRAC- β 2M-/Reg1-/CAR anti-CD19+ tuvieron cargas de leucemia reducidas indicado por señal de bioluminiscencia disminuida en comparación con células T TRAC- β 2M-/CAR anti-CD19+ en cada dosis respectiva (Fig. 5C y 5D).

Estos datos demuestran que la interrupción de Reg1 en células CAR T aumenta la eficacia de las células CAR T *in vivo*, disminuyendo la carga tumoral y aumentando la supervivencia.

Ejemplo 8: Interrupción eficaz de *TGFBR2* por RNP Cas9:ARNsg en células T

Este ejemplo describe la edición eficaz del gen *TGFBR2* en células T humanas primarias *ex vivo* usando edición génica CRISPR/Cas9. Los segmentos genómicos del gen *TGFBR2* que contienen los cinco (5) primeros exones codificantes de proteína se usaron como entrada en el software de diseño de ARNg. Los segmentos genómicos también incluían secuencias flanqueantes de sitios aceptores/donantes de ajuste. Los ARNg deseados fueron esos que producirían inserciones o deleciones en la secuencia codificante, interrumpiendo la secuencia de aminoácidos de *TGFBR2*, produciendo alelo(s) fuera del marco de lectura/de pérdida de función (denominados "alelos inactivados de *TGFBR2*" o "alelos interrumpidos de *TGFBR2*"). Ocho (8) secuencias espaciadoras de ARNg identificadas in silico que se dirigen al gen *CD70* se sintetizaron, y los ARNg se modificaron específicamente, como se indica en la tabla 39 y las figuras 7A y 7B. Mientras los ARNg modificados en la tabla 39 se modificaron con modificaciones 2'-O-metilfosforotioato, se pueden usar ARNg sin modificar, o ARNg con otras modificaciones.

Se transfectaron (electroporaron) células T humanas primarias con una partícula de ribonucleoproteína (RNP) que contenía nucleasa Cas9 y un ARNg que se dirigía al gen *TGFBR2* (secuencias en la tabla 39) o controles (sin Cas9, sin ARNg). De cuatro a seis (4-6) días tras la transfección, las células se: (1) sometieron a un análisis TIDE para evaluar la frecuencia de indels, y (2) procesaron por inmunotransferencia (anticuerpo primario; anticuerpo anti-*TGFBR2* humano; clon# 16H2L4) para evaluar los niveles de expresión de *TGFBR2* en la superficie celular (Figura 7B).

Ocho (8) ARNg dieron datos cuantificables por análisis TIDE, como se indica en la figura 7A. Siete (7) secuencias de ARNg dieron porcentajes de indels (frecuencias de edición) por encima del 80% indicando edición génica muy eficaz (Fig. 7A). El nivel de expresión de la proteína *TGFBR2* se evaluó por inmunotransferencia para confirmar los datos del análisis TIDE y se usó GAPDH como un control de carga. Siete (7) de los ARNg mostraron inactivación casi completa de *TGFBR2* en células T (Fig. 7B).

*Edición específica e inespecífica de ARN guías de *TGFBR2**

Se examinaron las eficacias de edición específica e inespecífica de varios ARNg que se dirigen a *TGFBR2* indicados anteriormente según los métodos divulgados en la sección anterior. Brevemente, las células T activadas se transfectaron (electroporaron) con una partícula de ribonucleoproteína (RNP) que contenía nucleasa Cas9 y un ARNg modificado sintético que se dirigía al gen *TGFBR2* (secuencias en la tabla 39 posteriormente) o controles (sin Cas9, sin ARNg).

Para la evaluación genómica específica e inespecífica, estos métodos de electroporación se usaron para generar dos poblaciones celulares de células editadas de dos donantes de células T diferentes. Las células se sometieron a edición génica con cada una de las nueve guías indicadas en la tabla 39, y después se recogieron diez (10) días tras la transfección. Estas muestras se analizaron con captura híbrida, un método dependiente de homología para enriquecer sitios específicos e inespecíficos, combinado con secuenciación de nueva generación. Brevemente, los sitios específicos e inespecíficos con homología a cada sitio diana de ARNg se identificaron por ordenador, se usaron sondas de ARN monocatenario para enriquecer estos sitios del ADN genómico en masa, estos sitios enriquecidos se secuenciaron con secuenciación de nueva generación, y los datos se analizaron para inserciones y deleciones (indel) que indican reparación después de edición CRISPR.

Cinco (5) ARNg no mostraron efecto inespecífico con una tasa de edición específica mayor del 85%, que incluye *TGFBR2_Ex1_T1*, *TGFBR2_Ex1_T2*, *TGFBR2_Ex1_T3*, *TGFBR2_Ex2_T1* y *TGFBR2_Ex5_T1* como se muestra en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6. Eficacia de edición específica y efectos inespecíficos de ARNg anti-*TGFBR2*

Guía	Secuencia diana de ARNg + (PAM)	Número de sitios inespecíficos predichos ensayados	Edición media específica captura híbrida	Inespecíficos detectados
<i>TGFBR2_Ex1-T1</i>	CCGACTTCTGAACGTGCGGT (GGG) (SEQ ID NO: 2)	7	86,80%	Ninguno
<i>TGFBR2_Ex1-T2</i>	TGCTGGCGATACGCGTCCAC (AGG) (SEQ ID NO: 3)	8	98,30%	Ninguno
<i>TGFBR2_Ex1-T3</i>	TCGGTCTATGACGAGCAGCG (GGG) (SEQ ID NO: 4)	7	99,60%	Ninguno
<i>TGFBR2_Ex2-T1</i>	ATGGGCAGTCCTATTACAGC (TGG) (SEQ ID NO: 5)	82	96,00%	Ninguno
<i>TGFBR2_Ex3-T1</i>	ATTGTTCACTTGTTAGCCCC (AGG) (SEQ ID NO: 6)	83	98,50%	Uno <1% inespecífico
<i>TGFBR2_Ex3-T2</i>	GCTGAAGAACTGCCTCTATA (TGG) (SEQ ID NO: 7)	133	98,10%	Uno 1-10% inespecífico
<i>TGFBR2_Ex4-T1</i>	GCAGGATTTCTGGTTGTCAC (AGG) (SEQ ID NO: 8)	222	98,80%	Uno <1% inespecífico
<i>TGFBR2_Ex4-T2</i>	CTCCATCTGTGAGAAGCCAC (AGG) (SEQ ID NO: 9)	255	99,40%	Cuatro <1% inespecífico
<i>TGFBR2_Ex5-T1</i>	CCCCTACCATGACTTTATTC (TGG) (SEQ ID NO: 10)	85	94,20%	Ninguno

Las tablas 29-38 enumeran las secuencias de indel potenciales que se pueden generar por los ARNg divulgados en el presente documento (deleciones como guiones e inserciones en negrita).

Ejemplo 9: Generación de células T genéticamente modificadas que carecen de expresión de *TGFBR2* y son resistentes a TGF- β

Este ejemplo describe la producción de células CAR T que carecen de expresión de *TGFBR2* y la evaluación del efecto de TGF- β en la expansión de células CAR T con células *TGFBR2* KO hechas crecer en medio completo (X-Vvivo 15 suplementado con IL-2 e IL-7).

Brevemente, primero se aislaron células T humanas y se administraron RNP Cas9:ARNsg (Cas9 1 μ M, ARNg 5 μ M) a células T humanas activadas por electroporación, seguido por incubación con los vectores adenovíricos adenoasociados recombinantes (AAV), serotipo 6 (AAV6) (MOI 50.000). La mezcla de nucleofección contenía la solución Nucleofector™, 5 x 10⁶ células, Cas9 1 μ M, y ARNg 5 μ M (como se describe en Hendel *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2015; 33(9):985-989, PMID: 26121415). El complejo RNP comprendía Cas9 y ARNg dirigido a genes *TRAC*, *B2M*, y *CD70* y opcionalmente *TGFBR2* (las secuencias de ARNg se muestran en la tabla 23 y la tabla 39, SEQ ID NO: 58, 62, 54 y 301, respectivamente). El vector rAAV incluía la secuencia de nucleótidos que codifica un CAR anti-CD70 (el molde donante en SEQ ID NO: 169 y la secuencia de aminoácidos de CAR anti-CD70 de SEQ ID NO: 138).

Aproximadamente una semana tras la electroporación, las células CAR T con un gen *TGFBR2* intacto (es decir, homólogo de tipo salvaje o no manipuladas) se expusieron a cantidades variables de TGF- β humano recombinante

(10, 20, 50 y 100 ng/ml) y la expansión celular se registró a lo largo del tiempo. TGF- β inhibió significativamente la expansión de CAR T, una concentración tan baja como 10 ng/ml era suficiente para reducir la expansión de CAR T en células con un gen *TGFBRII* intacto (Fig. 8A).

En otro estudio, células CAR T anti-CD70 con interrupción de *TGFBRII* se incubaron con o sin 50 ng/ml de TGF- β humano recombinante, y la expansión de las células T se siguió el día 2 y el día 8 tras la incubación con TGF- β y se comparó con células control. Las células control (Fig. 8B) eran células CAR T anti-CD70 que no tenían un gen *TGFBRII* interrumpido. Como se muestra en la figuras 8C-8K, las células T con *TGFBRII* inactivado estaban protegidas contra el efecto inhibitor de TGF- β sobre la expansión de células T. El nivel de protección varió con el ARNsg usado para interrumpir el gen *TGFBRII*. Las células T que se transfectaron con ARNsg dirigido al exón 1, 4 y 5 (*TGFBRII_EX1_T2*, *TGFBRII_EX4_T1*, *TGFBRII_EX4_T2*, *TGFBRII_EX5_T1*) mostraron la mayor resistencia contra un efecto inhibitor de TGF- β . Las secuencias de estos ARNsg se proporcionan en la tabla 39 posteriormente.

Ejemplo 10: Función de destrucción celular de células CART T anti-CD70 con interrupción de *TGFBRII*

Este ejemplo describe la producción de células T humanas alogénicas que carecen de expresión del gen *TRAC*, gen *β 2M*, y gen *CD70*, y expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a CD70. Las células CAR T editadas además comprendían la inactivación del gen *TGFBRII*. Como en los ejemplos anteriores, las células T humanas activadas se electroporaron con RNP Cas9:ARNsg (Cas9 1 μ M, ARNsg 5 μ M), seguido por incubación con vectores adenovíricos adenoasociados recombinantes, serotipo 6 (AAV6) (MOI 50.000).

El AAV recombinante comprendía la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 169 (que codifica el CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138). Se usaron los siguientes ARNsg: *TRAC* (SEQ ID NO: 58), *β 2M* (SEQ ID NO: 62), *CD70* (SEQ ID NO: 54), y *TGFBRII* (SEQ ID NO: 301).

Aproximadamente una semana tras la electroporación, se comprobó la expresión de CAR en las células T por citometría de flujo. Tanto células CAR T anti-CD70 como células CAR T anti-CD70 que carecen de *TGFBRII* expresaron cantidades casi equivalentes de CAR en su superficie (el 71,5% de células CAR⁺ frente al 73,7% de células CAR⁺).

Se usó un ensayo de destrucción celular para evaluar la capacidad de las células *TRAC*-/ *β 2M*-/*CD70*-/*TGFBRII*-/*CAR* anti-CD70+ de destruir una línea celular derivada de carcinoma de células renales (RCC) adherente CD70+ (células A498). Las células adherentes se sembraron en placas de 96 pocillos a 50.000 células por pocillo y se dejaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente se añadieron células CAR T anti-CD70 editadas a los pocillos que contenían célula diana a proporciones célula CAR T:T (E:T) de 0,05:1, o 0,1:1. Después del periodo de incubación indicado, las células CAR T se eliminaron del cultivo por aspiración y se añadieron 100 μ l de Cell titer-Glo (Promega) a cada pocillo de la placa para evaluar el número de células viables restantes. La cantidad de luz emitida por pocillo se cuantificó después usando un lector de placas. Las células con *TGFBRII* inactivado mostraron una destrucción celular más potente de células derivadas de RCC después de coincubación de 24 horas. Las células CAR T anti-CD70 demostraron mayor potencia cuando *TGFBRII* estaba inactivado, lo que es claramente visible a dos proporciones de células T:A498 (0,05:1 y 0,1:1) (Fig. 9). Esto sugiere que inactivar el gen *TGFBRII* da una mayor potencia de destrucción celular a células T CAR anti-CD70+. Este hallazgo era consistente a través de un amplio panel de líneas tumorales de diferentes tejidos como se muestra en la figuras 10A-10E. Inactivar el gen *TGFBRII* aumenta la capacidad de destrucción celular de células CAR T anti-CD70 contra 786-O y CAKI-1 (líneas tumorales de carcinoma de células renales), H1975 (cáncer de pulmón no microcítico), Hs-766T (carcinoma pancreático) y SK-OV3 (cáncer ovárico) (Fig. 10A-10E).

En otro estudio, se incubó CAR T anti-CD70 con 50 ng/ml de TGF- β humano recombinante durante 24 horas y la expresión de CD25 (IL-2R) en la superficie celular se evaluó por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 11, las células CAR T anti-CD70 son susceptibles al efecto inhibitor de TGF- β que produce disminución de CD25. CD25 es un marcador de activación y está implicado en proliferación de células T. Cuando el gen *TGFBRII* se inactivó, estas células se volvieron resistentes a TGF- β y las células CAR T retienen la actividad y expresión de CD25.

Asimismo, cuando la destrucción celular de células diana (A498) se repitió en presencia de 1, 10 y 50 ng/ml de TGF- β humano recombinante, las células CAR T anti-CD70 estaban adversamente afectadas por la presencia de TGF- β como se demuestra por la reducción en la capacidad de destrucción celular por células CAR T con un gen *TGFBRII* intacto (Fig. 12). Sin embargo, las células CAR T anti-CD70 con un *TGFBRII* KO (CAR anti-CD70 + *TGFBRII_EX4_T1*) no mostraron capacidad de destrucción celular reducida en presencia de TGF- β (Fig. 12). Además, la proliferación de células T tras exposición a un antígeno diana y la producción de citoquinas efectoras (IFN- γ e IL-2) se redujeron en presencia de TGF- β (Fig. 13A-13C). Sin embargo, cuando las células carecían de expresión de *TGFBRII*, estaban completamente protegidas contra los efectos inhibidores de TGF- β , también mostrado en las figuras 13A-13C. Esto sugiere que inactivar *TGFBRII* en la superficie de células CAR T protege las células CAR T del efecto adverso de TGF- β en el microentorno tumoral.

Ejemplo 11: Generación de células CAR T anti-CD70 que carecen de expresión de *TGFBRII* y son resistentes al efecto inhibitor de fibroblastos

Este ejemplo describe la producción de células T humanas alogénicas que carecen de expresión del gen *TRAC*, gen *$\beta 2M$* , y gen *CD70*, y expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a CD70 y cómo son susceptibles al efecto inhibidor de fibroblastos, que son un componente principal del microentorno de tumores sólidos (TME). Las células CAR T editadas además comprendían inactivación del gen *TGFBR11*. Como en los ejemplos anteriores, las células T humanas activadas se electroporaron con vectores adenovíricos adenoasociados recombinantes, serotipo 6 (AAV6) (MOI 50.000) y RNP Cas9:ARNsg (Cas9 1 μ M, ARNg 5 μ M).

El AAV recombinante comprendía la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 169 (que codifica CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138). Se usaron los siguientes ARNsg: *TRAC* (SEQ ID NO: 58), *$\beta 2M$* (SEQ ID NO: 62), *CD70* (SEQ ID NO: 54), y *TGFBR11* (SEQ ID NO: 301).

Se usó un ensayo de destrucción celular para evaluar el efecto inhibidor de fibroblastos sobre células CAR T anti-CD70 para destruir líneas celulares tumorales adherentes CD70+: H1975 (cáncer de pulmón no microcítico), Hs-766T (carcinoma pancreático) o SK-OV3 (cáncer ovárico). El ensayo de destrucción celular se realizó como se describe en el ejemplo 3. Brevemente, las células adherentes se sembraron en placas de 96 pocillos a 50.000 células por pocillo y se dejaron durante la noche a 37°C y las células fibroblastos (LL 86 (LeSa) ATTC® CCL-190™) se añadieron a la cámara superior de una placa transwell sin contacto directo con las células diana. Al día siguiente las células CAR T anti-CD70 editadas se añadieron a los pocillos que contenían las células diana. Después del periodo de incubación indicado, las células CAR T se eliminaron del cultivo por aspiración y se añadieron 100 μ l de Cell titer-Glo (Promega) a cada pocillo de la placa para evaluar el número de células viables restantes. La cantidad de luz emitida por pocillo se cuantificó después usando un lector de placas. Como se muestra en la figura 14, la presencia de células fibroblastos en la cámara superior produjo una disminución de la capacidad de destrucción celular de las células CAR T anti-CD70 contra las células diana que podría sugerir que estos fibroblastos secretaban un factor que disminuye el efecto destructor de CAR T anti-CD70.

Este hallazgo se confirmó cuando este experimento se repitió con la presencia de medio condicionado de los fibroblastos en lugar de las células y se observó inhibición similar. Brevemente, 1 x 10⁶ células fibroblastos CCL-190 se sembraron/0,5 ml en una placa de 24 pocillos y se incubaron durante la noche y los sobrenadantes se recogieron. Se llevó a cabo un ensayo de destrucción celular como se ha descrito previamente con células CAR T anti-CD70 y células tumorales a una proporción de 0,1:1 de proporción de células efectoras respecto a diana, en presencia o ausencia de sobrenadante de fibroblastos y se incubó durante la noche. La destrucción celular se midió usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo®. Este experimento confirma que los fibroblastos secretan un factor que produce una reducción en la capacidad de destrucción de células CAR T anti-CD70. La interrupción del gen *TGFBR11* en la superficie de CAR T anti-CD70 protegía estas células contra este efecto inhibidor. El *TGFBR11* KO mejoró la capacidad de destruir células de células CAR T anti-CD70 contra células tumorales pancreáticas, Hs-766T (Fig. 15A), células tumorales renales, A498 (Fig. 15B), y células tumorales pulmonares, H1975 (Fig. 15C) en presencia de fibroblastos. Estos datos sugieren que los fibroblastos contribuyen a la producción de TGF- β en el TME y reducen la capacidad de destruir células de células CAR T anti-CD70 y esto se podría evitar interrumpiendo *TGFBR11* en la superficie de células CAR T.

Ejemplo 12: Generación de células CAR T con genes *TGFBR11* y *regnasa-1* interrumpidos

Se produjeron células T humanas alogénicas que carecen de expresión del gen *TRAC*, gen *$\beta 2M$* , gen *CD70*, gen *TGFBR11* y gen *regnasa-1*, y expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a CD70. Se electroporaron células T humanas activadas con RNP Cas9:ARNsg (Cas9 1 μ M, ARNg 5 μ M), seguido por incubación con vectores adenovíricos adenoasociados recombinantes, serotipo 6 (AAV6) (MOI 50.000).

El AAV recombinante comprendía la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 169 (que codifica el CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138). Se usaron los siguientes ARNsg: *TRAC* (SEQ ID NO: 58), *$\beta 2M$* (SEQ ID NO: 62), *CD70* (SEQ ID NO: 54), *TGFBR11* (SEQ ID NO: 313) y *REG-1* (SEQ ID NO: 51). Los ARNsg, que forman las RNP con la enzima Cas9, se pueden introducir en las células T en un único suceso de electroporación para producir las poblaciones celulares modificadas resultantes mostradas en la tabla 7 siguiente. Alternativamente, se pueden introducir en las células T en dos sucesos de electroporación secuenciales para producir las poblaciones celulares resultantes. Después de la electroporación, las células se transdujeron con los AAV recombinantes para introducir el molde donante que codifica el CAR anti-CD70.

Tabla 7. Poblaciones de células CAR-T genéticamente manipuladas

Población	Ediciones
Células CAR T anti-CD70	CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-
Células CAR T anti-CD70 + Reg KO	CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-
Células CAR T anti-CD70 + TGFBR11 KO	CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/TGFBR11-
Células CAR T anti-CD70 + Reg KO+ TGFBR11 KO	CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-/TGFBR11-

A los 7 días tras la electroporación, se comprobó la expresión de CAR en las células T por citometría de flujo. Tanto las células CAR T anti-CD70 como las células CAR T anti-CD70 que carecían de *regnasa* expresaron cantidades casi

equivalente de CAR en su superficie celular el día 7 tras HDR. Los resultados se proporcionan en la tabla 7A a continuación.

Tabla 7A. Niveles de expresión de CAR en células CAR T anti-CD70 genéticamente manipuladas

Población	Ediciones	% de CAR
Células CAR T anti-CD70	CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-	82,2
Células CAR T anti-CD70 + Reg KO	CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-	83,1
Células CAR T anti-CD70 + TGFBR11 KO	CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/TGFBR11-	79,7
Células CAR T anti-CD70 + Reg KO+ TGFBR11 KO	CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-/TGFBR11-	81,8

Ejemplo 13: La interrupción de *regnasa-1* y *TGFBR11* aumenta la destrucción de células CAR T tras reexposición en serie *in vitro*

Las células T CAR anti-CD70+ generadas anteriormente se reexpusieron en serie con la línea celular de cáncer de riñón CD70+, ACHN, y se evaluó su capacidad para destruir la línea celular de cáncer de riñón CD70+ ACHN.

Las células T CAR anti-CD70+ usadas en este experimento contenían las siguientes ediciones:

- Células CAR T anti-CD70: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-
- Células CAR T anti-CD70 + Reg KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-
- Células CAR T anti-CD70 + TGFBR11 KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/TGFBR11-
- Células CAR T anti-CD70 + Reg KO+ TGFBR11 KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-/TGFBR11-

En un formato de placa de 96 pocillos, las células CAR T primero se cocultivaron con células ACHN (4.000 células CAR T, 16.000 células tumorales) en D0 y se reexpusieron con células tumorales como sigue: 16.000 células tumorales en D2 y D4; 40.000 células en D7; 50.000 células en D9; 50.000 células en D11).

El análisis del número de células tumorales y células CAR T se realizó en D1, D3, D6, D8, D10 y D12 usando citometría de flujo (método adaptado de Wang et al., JoVE, 2019). Se usaron los siguientes anticuerpos en la tabla 8 a una dilución 1:100.

Tabla 8. Información de anticuerpos

Anticuerpo	Harina	Cat#	Dilución	Vendedor
CD4	BV510	344718	1:100	Biolegend
CD8	PacBlue	300546	1:100	Biolegend
CD70	FITC	355106	1:100	Biolegend
CD62L	BV605	304833	1:100	Biolegend
CD45 humano	BV785	304048	1:100	Biolegend
PD1	APC/Cy7	329922	1:100	Biolegend
CD45RO	PE/Cy7	304230	1:100	Biolegend
Estreptavidina	APC	405207	1:100	Biolegend
Tim3	PE	345006	1:100	Biolegend
Vivo/muerto	7AAD	BDB559925	1:500	BD

Los resultados demuestran que interrumpir tanto el gen TGFBR11 como el gen *regnasa* mejoró la potencia (Fig. 16A) y expansión de células T CAR+ (Fig. 16B) cuando las células CAR T se exponen repetidamente a células diana positivas CD70+. La potencia y expansión se mejora en comparación con células CAR T que no tienen ninguno, o solo uno (es decir, TGFBR11 o *regnasa*), de los genes interrumpidos.

Ejemplo 14: Eficacia de tratamiento de células CAR T anti-CD70 con múltiples interrupciones génicas en el modelo de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células renales subcutáneo

Tratamiento en el modelo tumoral de carcinoma de células renales

La capacidad de células T que expresan un CAR CD70 con ediciones en genes TGFBR11 y/o *regnasa* para eliminar células de carcinoma de células renales que expresan niveles medios de CD70 se evaluó *in vivo* usando un modelo en ratón de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células renales (CAKI-1) subcutáneo. Se produjeron células T CAR anti-CD70+ como se ha descrito anteriormente. Véase, por ejemplo, el ejemplo 13.

La capacidad de estas células T CAR anti-CD70+ de aliviar la enfermedad causada por una línea celular de carcinoma de células renales se evaluó en ratones NSG usando métodos empleados por Translations Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ). Brevemente, 20 ratones NSG hembra de 5-8 semanas de edad se enjaularon individualmente en

jaulas microaisladoras ventiladas, mantenidas en condiciones sin patógenos, 5-7 días antes del inicio del estudio. Los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 5×10^6 células de carcinoma de células renales Caki-1/ratón en el flanco derecho posterior. Cuando el tamaño de tumor medio alcanzó la diana de $\sim 70 \text{ mm}^3$, los ratones se dividieron además en 5 grupos de tratamiento como se muestra en la tabla 9. El día 1, cuatro grupos de tratamiento recibieron una única dosis intravenosa de $200 \mu\text{l}$ de 1×10^7 células T CAR anti-CD70+ según la tabla 9.

Tabla 9. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células Caki-1	Tratamiento células CAR T (i.v.)	N
1	Ninguno	5×10^6 células/ratón	Ninguno	4
2	Células CAR T anti-CD70: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-	5×10^6 células/ratón	1×10^7 células/ratón	4
3	Células CAR T anti-CD70 + Reg KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-	5×10^6 células/ratón	1×10^7 células/ratón	4
4	Células CAR T anti-CD70 + TGFBR11 KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/TGFBR11-	5×10^6 células/ratón	1×10^7 células/ratón	4
5	Células CAR T anti-CD70 + Reg KO+ TGFBR11 KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-/TGFBR11-	5×10^6 células/ratón	1×10^7 células/ratón	4

El volumen tumoral se midió 2 veces a la semana ($\sim$ cada 3-4 días) desde el día del inicio del tratamiento. El día 11 tras la inyección, las células CAR T anti-CD70 con genes tanto TGFBR11 como regnasa KO empezaron a mostrar un efecto significativo en reducir el volumen tumoral comparado con otros grupos de tratamiento. Aproximadamente un mes después las células CAR T anti-CD70 + Reg KO + TGFBR11 KO habían eliminado por completo el crecimiento tumoral en modelo CAKI-1 subcutáneo (Fig. 17A).

Estos resultados demostraron que interrumpir los genes tanto TGFBR11 como regnasa en células CAR T aumentó la potencia de células CAR T y limpió de forma eficaz los tumores en el modelo de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células renales CAKI-1 subcutáneo.

Tratamiento en el modelo tumoral de carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC)

La capacidad de células T que expresan un CAR CD70 con ediciones en genes TGFBR11 y/o regnasa para eliminar células de adenocarcinoma de pulmón que expresan niveles moderados de CD70 se evaluó *in vivo* usando un modelo en ratón de xenoinjerto tumoral de pulmón (NCI-H1975) subcutáneo. Se produjeron células T CAR anti-CD70+ como se ha descrito anteriormente. Véase, por ejemplo, el ejemplo 13.

La capacidad de células T CAR anti-CD70+ de aliviar la enfermedad causada por una línea celular de carcinoma de pulmón se evaluó en ratones NSG usando métodos empleados por Translations Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ). Brevemente, 20 ratones NSG hembra de 5-8 semanas de edad se enjaularon individualmente en jaulas microaisladoras ventiladas, mantenidas en condiciones sin patógenos, 5-7 días antes del inicio del estudio. Los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 5×10^6 células de pulmón NCI-H1975/ratón en el flanco derecho posterior. Cuando el tamaño de tumor medio alcanzó la diana de $\sim 85 \text{ mm}^3$, los ratones se dividieron además en 5 grupos de tratamiento como se muestra en la tabla 10. El día 1, cuatro grupos de tratamiento recibieron una única dosis intravenosa de $200 \mu\text{l}$ de 1×10^7 células T CAR anti-CD70+ según la tabla 10.

Tabla 10. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células NCI-H1975	Tratamiento células CAR T (i.v.)	N
1	Ninguno	5×10^6 células/ratón	Ninguno	4
2	Células CAR T anti-CD70: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-	5×10^6 células/ratón	1×10^7 células/ratón	4
3	Células CAR T anti-CD70 + Reg KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-	5×10^6 células/ratón	1×10^7 células/ratón	4
4	Células CAR T anti-CD70 + TGFBR11 KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/TGFBR11-	5×10^6 células/ratón	1×10^7 células/ratón	4
5	Células CAR T anti-CD70 + Reg KO+ TGFBR11 KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-/TGFBR11-	5×10^6 células/ratón	1×10^7 células/ratón	4

El volumen tumoral se midió 2 veces a la semana desde el día del inicio del tratamiento. El día 12 tras la inyección, el animal tratado con células CAR T anti-CD70 que tenían edición en *TGFBR11* mostraron crecimiento tumoral atenuado. Los tumores tratados con células T anti-CAR con genes tanto *TGFBR11* como *regnasa* interrumpidos empezaron a mostrar una disminución en el volumen tumoral el día 8 tras la inyección y tumores eliminados en día 29 en 4 ratones de 4. Esta regresión completa de tumores en animales tratados siguió hasta el día 53 tras la inyección. El tratamiento con células T CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-/TGFBR11- produjo actividad potente contra xenoinjertos de cáncer de pulmón H1975 establecidos hasta 53 después de la inyección (Fig. 17B). Estos datos demuestran que interrumpir *TGFBR11* solo o *TGFBR11* y *regnasa-1* en células CAR T tiene actividad potente contra tumores de cáncer de pulmón CD70+ *in vivo*.

Ejemplo 15: Modelo de reexposición tumoral modelo de xenoinjerto tumoral grande de carcinoma de células renales

La eficacia de células CAR T anti-CD70 que tienen los genes *TGFBR11* y/o *regnasa-1* interrumpidos (véase, por ejemplo, el ejemplo 10) se ensayaron en un modelo de xenoinjerto A498 subcutáneo con una reexposición de ACHN. Brevemente, se inyectaron cinco millones de células A498 por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones NSG. Los tumores se dejaron crecer hasta un tamaño medio de aproximadamente 425 mm³ después de lo cual los ratones portadores de tumores se aleatorizaron en cinco grupo (N = 5/grupo). El grupo 1 se dejó sin tratar (sin tratamiento) mientras los grupos 2-5 recibieron uno de los tratamientos de células CAR T anti-CD70 mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células A498	Tratamiento células T CAR+ (i.v.)	N
2	Células CAR T anti-CD70: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-	5 x 10 ⁶ células/ratón	8 x 10 ⁶ células/ratón	5
3	Células CAR T anti-CD70 + Reg KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-	5 x 10 ⁶ células/ratón	8 x 10 ⁶ células/ratón	5
4	Células CAR T anti-CD70 + TGFBR11 KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/TGFBR11-	5 x 10 ⁶ células/ratón	8 x 10 ⁶ células/ratón	5
5	Células CAR T anti-CD70 + Reg KO+ TGFBR11 KO: CAR anti-CD70+/TRAC-/B2M-/CD70-/Reg-/TGFBR11-	5 x 10 ⁶ células/ratón	8 x 10 ⁶ células/ratón	5

El día 56, se inició una reexposición tumoral mediante la cual se inyectaron 1 x 10⁷ células ACHN en el flanco izquierdo de los ratones tratados y en un nuevo grupo control (sin tratamiento).

Como se muestra en la figura 18A, todos los ratones tratados con todas las poblaciones de células CAR T que tenían un gen *TGFBR11* y/o *regnasa* interrumpido mostraron depuración completa del tumor A498 el día 50. Sin embargo, cuando los ratones se reexpusieron con una célula tumoral RCC nueva (ACHN) solo células CAR T con ediciones tanto de *regnasa* como *TGFBR11* fueron capaces de eliminar el tumor en comparación con células con interrupciones de *regnasa-1* o *TGFBR11* solo (Fig. 18B).

Ejemplo 16: Análisis de la fracción de células T en modelo de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células renales (CAKI-1)

Se tomaron muestras de sangre de ratones con tumores RCC CAKI-1, 44 días después de la administración de CAR T. Brevemente, se recogieron 100 µl de sangre completa de ratón a través de la vena submandibular. Se usó tampón de lisis de glóbulos rojos para lograr lisis óptima de eritrocitos con efecto mínimo en los linfocitos. Se usaron CD45 humano y CD45 de ratón como un biomarcador para separar células humanas y de ratón por FACS. Las muestras de sangre se evaluaron por citometría de flujo buscando cuentas de CAR T absolutas, así como subconjuntos de células T de memoria. Se usó un anticuerpo anti-idiotipo CAR anti-CD70 para detectar células CAR T y CD45RO+CD27+ para definir células T de memoria central. Véase la solicitud de patente en EE UU No. 63/069.889.

Los resultados demuestran que la adición de la edición de genes *TGFBR11* y *regnasa-1* aumentó significativamente la población de células T de memoria central comparado con la edición de cualquiera de *TGFBR11* o *regnasa-1* solo, que se correlaciona con la expansión masiva de células CAR T (Fig. 19A) vista en estos animales. Y la edición de *TGFBR11* además fomentó el potencial de la proliferación de células CAR T *in vivo* sugiriendo un efecto sinérgico robusto junto la edición de *regnasa* (Fig. 19B).

Ejemplo 17: Evaluación de células CAR-T anti-CD19 que tienen interrupciones de genes *TGFBR11* y/o *regnasa-1* en un modelo diseminado intravenoso en ratones NOG

Modelo de xenoinjerto tumoral de leucemia linfoblástica aguda humana Nalm-6 diseminada intravenosa

El modelo diseminado intravenoso (modelo diseminado) usando la línea celular tumoral de leucemia linfoblástica aguda humana Nalm-6 en ratones NOG se usó para demostrar adicionalmente la eficacia de células CAR T anti-CD19 con ediciones génicas de *TGFBR11* y/o *regnasa-1*. La eficacia de varias poblaciones de CAR T anti-CD19 se evaluaron en el modelo diseminado usando métodos empleados por Translations Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ) y descrito en el presente documento. Brevemente, 24 ratones CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{sid1}12rg^{tm1Sug}/JicTac) hembra de 5-8 semanas de edad se enjaularon individualmente en jaulas microaisladoras ventiladas, mantenías en condiciones sin patógenos, 5-7 días antes del inicio del estudio. Al inicio del estudio, los ratones se dividieron en 5 grupos de tratamiento como se muestra en la tabla 12. El día 1, los ratones en los grupos 2-4 recibieron una inyección intravenosa de $0,5 \times 10^6$ células Nalm6/ratón. Los ratones se inoculaban por vía intravenosa para modelar la enfermedad diseminada. El día 4 (3 días tras la inyección de células Nalm6), los grupos de tratamiento 2-4 recibieron una dosis intravenosa única de 200 μ l de células T CAR+ según la tabla 12.

Tabla 12. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células Nalm6 (i.v.)	Tratamiento CAR T anti-CD19 (i.v.)	N
1	Sin tratar	$0,5 \times 10^6$ células/ratón	Ninguno	5
2	Células CAR T anti-CD19: CAR anti-CD19+/TRAC-/B2M-	$0,5 \times 10^6$ células/ratón	4×10^6 células CAR-T positivas/ratón	5
3	Células CAR T anti-CD19 + Reg KO: CAR anti-CD19+/TRAC-/B2M- Reg-	$0,5 \times 10^6$ células/ratón	4×10^6 células CAR-T positivas/ratón	5
4	Células CAR T anti-CD19 + TGFBR11 KO: CAR anti-CD19+/TRAC-/B2M- TGFBR11-	$0,5 \times 10^6$ células/ratón	4×10^6 células CAR-T positivas/ratón	5
5	Células CAR T anti-CD19 + Reg KO+ TGFBR11 KO: CAR anti-CD19+/TRAC-/B2M- Reg-/TGFBR11-	$0,5 \times 10^6$ células/ratón	4×10^6 células CAR-T positivas/ratón	5

Durante el curso del estudio los ratones se siguieron a diario y el peso corporal se midió dos veces a la semana como se describe anteriormente.

La edición génica de *TGFBR11* combinada con edición de *regnasa* indujo una regresión tumoral de NALM6 mantenida en un punto de tiempo temprano (día 18) tras la inoculación de tumor, comparada con cualquier edición sola. Esta reducción en tamaño tumoral se mantuvo (Fig. 20A). El descenso agudo en tamaño tumoral en el grupo TGFBR11 KO el día 74 tras la inoculación de tumor representa solo 5 de 15 ratones. Diez de los 15 ratones en el grupo TGFBR11 KO ya habían alcanzado el punto final de BLI tumoral.

Mientras la interrupción de *TGFBR11* o *regnasa* mostró alguna ventaja de supervivencia en los ratones del modelo Nalm6 tratados con células CAR anti-CD19+, tener interrupciones en genes tanto *TGFBR11* como *regnasa* mostró la mayor ventaja de supervivencia (Fig. 20B).

Modelo de xenoinjerto tumoral JeKo-1 diseminado intravenoso

El modelo diseminado intravenoso (modelo diseminado) usando la línea celular tumoral de linfoma de células del manto (MCL) humana JeKo-1 en ratones NOG se usó para demostrar adicionalmente la eficacia de células CAR T anti-CD19 con ediciones génicas de *TGFBR11* y/o *regnasa-1*. La eficacia de varias poblaciones de CAR T anti-CD19 se evaluó en el modelo diseminado usando métodos empleados por Translations Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ) y descrito en el presente documento. Brevemente, 24 ratones CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{sid1}12rg^{tm1Sug}/JicTac) hembra de 5-8 semanas de edad se enjaularon individualmente en jaulas microaisladoras ventiladas, mantenías en condiciones sin patógenos, 5-7 días antes del inicio del estudio. Al inicio del estudio, los ratones se dividieron en 5 grupos de tratamiento como se muestra en la tabla 13. El día 1, los ratones en los grupos 2-4 recibieron una inyección intravenosa de $0,5 \times 10^6$ células JeKo-1/ratón. Los ratones se inoculaban por vía intravenosa para modelar la enfermedad diseminada. El día 4 (3 días después de la inyección de células JeKo-1), los grupos de tratamiento 2-4 recibieron una dosis intravenosa única de 200 μ l de células T CAR según la tabla 13.

Tabla 13. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células JeKO-1 (i.v.)	Tratamiento CAR T anti-CD19 (i.v.)	N
1	Sin tratar	5×10^6 células/ratón	Ninguno	5
2	Células CAR T anti-CD19: CAR anti-CD19+/TRAC-/B2M-	5×10^6 células/ratón	4×10^6 células/ratón*	5
3	Células CAR T anti-CD19 + Reg KO: CAR anti-CD19+/TRAC-/B2M- Reg-	5×10^6 células/ratón	4×10^6 células/ratón*	5
4	Células CAR T anti-CD19 + TGFBR11 KO: CAR anti-CD19+/TRAC-/B2M- TGFBR11-	5×10^6 células/ratón	4×10^6 células/ratón*	5

5	Células CAR T anti-CD19 + Reg KO+ TGFBRII KO: CAR anti-CD19+/TRAC-/B2M- Reg-/TGFBRII-	5 x 10 ⁶ células/ratón	4 x 10 ⁶ células/ratón*	5
---	--	--------------------------------------	---------------------------------------	---

Durante el curso del estudio los ratones se siguieron a diario y el peso corporal se midió dos veces a la semana como se describe anteriormente.

- 5 Mientras que cualquiera de TGFBRII o regnasa mostraron alguna ventaja de supervivencia en el modelo JeKo-1, los ratones tratados con células CAR anti-CD19+ que tienen ediciones génicas tanto en *TGFBRII* como *regnasa* mostraron la mayor ventaja de supervivencia. Fig. 21.

Expansión in vivo de células CAR T

- 10 La expansión de células CAR T se evaluó midiendo el número de copia de CAR por ddPCR de ADN aislado de muestras de sangre recogidas a lo largo de los estudios JeKo-1 y Nalm-6 como se describe anteriormente.

- 15 El ADN se aisló de tejido de ratón usando el kit de sangre y tejido de Qiagen Dneasy (Qiagen, Venlo, Países Bajos). La masa total de ácido nucleico de muestras con RBC lisadas se cuantificó usando máquinas o bien Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) o DropSense96 (trinean, Gentbrugge, Bélgica). Se diseñaron conjuntos de cebadores y sondas marcados con 6-carboxifluoresceína (FAM) (proporcionados en la tabla 14 posteriormente) para cuantificar los niveles de la construcción CAR integrada en el locus TRAC humano por PCR digital de gota (ddPCR). Se realizó ddPCR usando máquina(s) de generador de gotas automatizado de Bio-Rad, Bio-Rad T100 Thermal Cycler, y lector de gotas Bio-Rad QX200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se usó el software QuantaSoft versión 1.7.4.0917 (Bio-rad Laboratories) para calcular el número absoluto de copias de CAR integradas por muestra. Por último, el número de alelos CAR detectados se dividió por la cantidad de ADN total aportado para computar el número absoluto de copias de CAR por masa de muestra aportada. El ensayo ddPCR detecta el número de copias de transgén CAR integrado por masa de ADN genómico (ADNg) amplificando un amplicón de 866 pb que abarca la secuencia TRAC endógena y el promotor del casete de expresión de CAR (EF-1 α). Brevemente, la calificación del ensayo dio datos lineales ($R^2 > 0,95$) en el intervalo ensayado (de 2 a 300.000 copias por μ g de ADNg) así como generó un % de error relativo (%RE) y un % de coeficiente de variación (% CV) en intervalos normales (% RE $\leq 100\%$ y % CV $\leq 20\%$) para condiciones $\geq$ LLOQ. El LLOD y LLOQ se calcularon basados en los datos disponibles y el LLOD se ajustó a 5 copias por 0,2 μ g de ADNg y el LLOQ se ajustó a 40 copias por 0,2 μ g de ADNg.

Tabla 14. Cebadores y sondas usados para ddPCR

Cebadores y sonda de CAR	
CTX110-20-30_dd_1 Directo	GGCACCATATTCATTTTCAGGTGAA (SEQ ID NO: 11)
CTX110-20-30_dd_1 Inverso	ATGTGCGCTCTGCCACTGACGGGC (SEQ ID NO: 12)
CTX110-20-30_dd_1 Sonda (FAM)	AGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCC (SEQ ID NO: 13)

- 35 Estos análisis demuestran que la adición de cualquiera de TGFBRII o regnasa-1 KO a células CAR T alogénicas (TRAC-/B2M-; grupo C-10) permitió que las células T se expandieran a niveles mayores en la sangre de ratones tratados (por ejemplo, grupos C10-TG, C10-R, C10-TG/R) comparados con grupos tratados con las células CAR T alogénicas sin estas KO (por ejemplo, grupo C10) (Fig. 22A). Esta expansión era aparente el día 14 del estudio Jeko-1. La pérdida de tanto *TGFBRII* como *regnasa-1* (Fig. 22A, C10-TG/R) produjo una expansión más uniforme respecto a *TGFBRII* (Fig. 22A, C10-TG) o *regnasa-1* (Fig. 22A, C10-R) KO individuales. En el estudio Nalm-6, la interrupción de tanto *TGFBRII* como *regnasa-1* tuvo un efecto sinérgico en la expansión de células CAR T el día 28 como se muestra en la figura 22B.

En resumen, todos los grupos con pérdida de o bien *TGFBRII* o *regnasa-1* tuvieron célula CAR T expandidas en la sangre periférica.

Ejemplo 18: Generación de células CAR T con múltiple edición génica y verificación de ediciones de genes

- Se electroporaron células T humanas primarias activadas con complejos RNP Cas9/ARNsg (Cas9 200 pmol, ARNg 1000 pmol) para generar células editadas para TRAC-/ β 2M-, TRAC-/ β 2M-/Regnasa-1-, TRAC-/ β 2M-/TGFBRII- y TRAC-/ β 2M-/Regnasa-1-/TGFBRII-. La secuencia codificante del CAR anti-BCMA se insertó en el locus TRAC usando AAV6 recombinante que porta la secuencia de ADN para CAR anti-BCMA (SEQ ID NO: 170). Se usaron los siguientes ARNsg: *TRAC* (SEQ ID NO: 58), *β 2M* (SEQ ID NO: 62), *Reg-1* (SEQ ID NO: 51; REG1-Z10) y *TGFBRII* (SEQ ID NO: 313).

- 55 Se usó citometría de flujo para verificar la edición para *TRAC*, *β 2M* y la inserción y expresión del CAR anti-BCMA. Brevemente, aproximadamente una semana tras la electroporación, las células se tiñeron con anti-TCR humano, anti- *β 2M* humana y BCMA humano biotinilado/estreptavidina-APC para evaluar los niveles de edición para *TRAC* y *β 2M* y la inserción de la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR anti-BCMA.

Células T CAR anti-BCMA+ TRAC- β 2M-, TRAC- β 2M-/Regnasa-1-, TRAC- β 2M-/TGFBRII- y TRAC- β 2M-/Regnasa-1-/TGFBRII- mostraron tasas consistentes de interrupciones de *TRC* y β 2M a tasas de >90% y >60%, respectivamente, determinado por citometría de flujo (Fig. 23A y 23B). La expresión del CAR anti-BCMA se midió por citometría de flujo determinando el porcentaje de células que se unían al conjugado BCMA biotinilado recombinante/estreptavidina-APC. Todas las condiciones incluyendo células T CAR anti-BCMA+ TRAC- β 2M-, TRAC- β 2M-/Regnasa-1-, TRAC- β 2M-/TGFBRII- y TRAC- β 2M-/Regnasa-1-/TGFBRII- mostraron tasas consistentes de inserción de CAR (>70%), mientras las células T RNP- sin editar no tenían tinción detectable para CAR anti-BCMA (Fig. 23C). Se encontró que la proporción de células T CD4/CD8 evaluada por citometría de flujo en las células T CAR anti-BCMA+TRAC- β 2M-, TRAC- β 2M-/Reg-1-, TRAC- β 2M-/TGFBRII- y TRAC- β 2M-/Reg-1-/TGFBRII- era consistente en el intervalo de 55-60%/40-45% a través de todas las muestras (Fig. 23D).

Se realizó análisis TIDE para la verificación de tasas de edición para los genes *Reg-1* y *TGFBRII*. Brevemente, aproximadamente una semana tras la electroporación, dos millones de células de las células T CAR anti-BCMA+ TRAC- β 2M-, TRAC- β 2M-/Reg-1-, TRAC- β 2M-/TGFBRII- y TRAC- β 2M-/Reg-1-/TGFBRII- y dos millones de células T sin editar del mismo donante se retiraron del cultivo y se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Las células se centrifugaron en una microcentrífuga de mesa a 300 g durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se desechó. Las células se lavaron dos veces con 1000 μ l de PBS 1X y los precipitados celulares se congelaron a -80°C. Los precipitados celulares congelados se usaron después para la extracción de ADN genómico usando QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, catálogo no. 51106). Se usaron cebadores específicos de gen para amplificar la región que flanquea los sitios de corte de *Reg-1* y *TGFBRII* (Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ II Green PCR Master Mix, catálogo #12369050) y los amplicones de PCR derivados se secuenciaron posteriormente y analizaron por TIDE para determinar los patrones/frecuencias de indel (frecuencias de edición).

Se encontró que las frecuencias de indel analizadas estaban en el intervalo esperado de 65-80% para el ARNsg TGF y > 80% para el ARNsg de regnasa-1, respectivamente (Fig. 24A y 24B).

Ejemplo 19: Citotoxicidad de células CAR T anti-BCMA con múltiples ediciones génicas

Se usó un ensayo de citotoxicidad (destrucción celular) para evaluar la capacidad de las células T CAR anti-BCMA+ TRAC- β 2M-, TRAC- β 2M-/Reg-1-, TRAC- β 2M-/TGFBRII- y TRAC- β 2M-/Reg-1-/TGFBRII- (producidas por los métodos divulgados en el presente documento, véase, por ejemplo, el ejemplo 18) para producir lisis celular en dos líneas celulares diana, MM.1S (línea celular de mieloma múltiple) y JeKo-1 (línea celular de linfoma de células del manto). Se usaron células RNP- sin editar sin CAR como un control negativo para determinar la lisis específica por células T CAR+. Brevemente, las líneas celulares diana se tiñeron con eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™ 670 (ThermoFisher Scientific; catálogo # 65-0840-85) según las instrucciones del fabricante y se sembraron en placas de 96 pocillos a 50.000 células por pocillo. A continuación, se añadieron células T CAR o células T RNP- a los pocillos que contenían células diana en proporciones de 0, 0,5:1, 1:1, 2:1 o 4:1 (célula T:célula diana) y se incubaron adicionalmente durante aproximadamente 4 horas para MM.1S y 24 horas para JeKo-1. Después del respectivo periodo de incubación, las placas de 96 pocillos se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos y se retiraron 100 μ l de sobrenadante para cuantificación de citoquinas. Las células se lavaron después una vez con PBS 1X y se tiñeron con 150 μ l de PBS 1X suplementado con BSA al 0,5% y DAPI 5 μ g/ml (Invitrogen; no. de catálogo D3571) y se incubó durante 15 minutos en la oscuridad. Tras la incubación, se lavó el DAPI de las células, se resuspendieron en 150 μ l de PBS 1X suplementado con BSA al 0,5%, y se adquirieron y analizaron usando un citómetro de flujo. Las células diana se identificaron a través de fluorescencia basada en eFluor y después se dividieron en células vivas y muertas basado en su fluorescencia de DAPI.

Las células T TRAC- β 2M-/Reg-1-/TGFBRII- CAR anti-BCMA+ mostraron mayor citotoxicidad hacia las líneas celulares MM.1S (Fig. 25A) y JeKo-1 (Fig. 25C) en comparación con las células T CAR anti-BCMA+ TRAC- β 2M-, TRAC- β 2M-/Reg-1-, o TRAC- β 2M-/TGFBRII-. Se proporcionan datos comparativos de células K562 (como controles) en la figura 25B y la figura 25D.

Ejemplo 20: Efectos *in vivo* de interrupción de TGFBRII + Regnasa-1 en células CAR T alogénicas en el modelo tumoral de xenoinjerto RPMI-8226 subcutáneo

Se utilizó un modelo en ratón de tumor subcutáneo para evaluar la eficacia *in vivo* de CAR anti-BCMA alogénicos con las siguientes interrupciones génicas: 1) β 2M y *TRAC*, 2) β 2M, *TRAC* y *TGFBRII*, 3) β 2M, *TRAC* y *Reg-1*, y 4) β 2M, *TRAC*, *TGFBRII* y *Reg-1*. El modelo en ratón de tumor subcutáneo utilizó la línea celular tumoral RPMI-8226 derivada de mieloma múltiple BCMA+ en ratones NSG. El gen *TGFBRII* se editó a través de edición génica mediada por CRISPR/Cas usando la guía *TGFBRII* Ex5_T1 (SEQ ID NO: 313). El gen *Reg-1* se editó a través de edición génica mediada por CRISPR/Cas usando la guía Z10 (SEQ ID NO: 51). Las células CAR T anti-BCMA expresan un CAR anti-BCMA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146). Véanse también las tablas de secuencias 22, 23, 27 y 39 posteriormente.

La eficacia de las células CAR T anti-BCMA se evaluó en el modelo de xenoinjerto subcutáneo usando métodos empleados por Translations Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ). Brevemente, 25 ratones NSG hembra de 5-8 semanas de edad se enjaularon individualmente en jaulas microaisladoras ventiladas, mantenidas en condiciones sin

patógenos, 5-7 días antes del inicio del estudio. El día 1, los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 1×10^7 células RPMI-8226/ratón en el flanco derecho posterior. Nueve días después (día 10), los sitios de inoculación de tumor se inspeccionaron para determinar si los tumores eran palpables. Después de confirmar la palpabilidad, los ratones se dividieron adicionalmente en 5 grupos de tratamiento como se muestra en la tabla 1. Todos los grupos de tratamiento recibieron una única dosis intravenosa de 200 μ l de 1×10^6 células T CAR anti-BCMA+.

Tabla 15. Grupos de tratamiento para el estudio de xenoinjerto de RPMI-8226

Grupo	Células CAR T (i.v.)	N
1	NA	5
2	CAR anti-BCMA/TRAC- β 2M-	5
3	CAR anti-BCMA/TRAC- β 2M-TGFBRII-	5
4	CAR anti-BCMA/TRAC- β 2M-TGFBRII-regnasa-	5
5	CAR anti-BCMA/TRAC- β 2M-TGFBRII-regnasa-	5

A lo largo del curso del estudio, los ratones se sometieron a observaciones macroscópicas a diario, mientras el volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces a la semana (~cada 3-4 días) empezando el día 10. Un punto final significativo fue el tiempo a perimorbilidad y el efecto del injerto de las células T también se evaluó. El porcentaje de mortalidad animal y el tiempo hasta la muerte se registraron para cada grupo en el estudio. Los ratones se sacrificaron antes de alcanzar un estado moribundo. Los ratones se pueden definir como moribundos y sacrificar si se cumplían uno o más de los siguientes criterios:

- Pérdida de peso corporal del 20% o más sostenida durante un periodo de más de 1 semana;
- Tumores que inhiben la función fisiológica normal tal como comer, beber, movilidad y capacidad de orinar y o defecar;
- Diarrea prolongada, excesiva que produce pérdida de peso excesiva (> 20%); o
- Sibilancia persistente y dificultad respiratoria.

Los animales también se consideraron moribundos si había dolor prolongado o excesivo o angustia definida por observaciones clínicas tal como: postración, postura encorvada, parálisis/paresia, abdomen distendido, úlceras, abscesos, convulsiones y/o hemorragias.

Los ratones en los grupos que recibieron células T TRAC- β 2M-TGFBRII-/Reg-1- CAR anti-BCMA+ vieron un aumento en supervivencia relativo a ratones sin tratar; los ratones tratados con células T TRAC- β 2M- CAR anti-BCMA+, células T TRAC- β 2M-TGFBRII- CAR anti-BCMA+, o células T TRAC- β 2M-/Reg-1- CAR anti-BCMA+ (Fig. 26B). Los ratones que recibieron células T TRAC- β 2M-TGFBRII-/Regnasa- CAR anti-BCMA+ mostraron regresión tumoral significativa, mientras ninguna de las otras condiciones ensayadas mostró inhibición significativa del crecimiento tumoral (Fig. 26A). Estos datos demuestran que la interrupción de *TGFBRII* y *Reg-1* en células CAR T aumenta la eficacia de células CAR T en un modelo tumoral de xenoinjerto en ratón.

A continuación, se tomaron pequeñas cantidades de sangre de cada ratón para análisis de FACS para caracterizar las células CAR-T circulantes y determinar farmacocinética del fármaco. Se sacaron aproximadamente 75 μ l de sangre 2 semanas tras dosificación CAR-T a través de sangrados submandibulares. La sangre se transfirió después a tubos con K2 EDTA y se envió durante la noche a CRISPR Therapeutics en paquetes fríos de 4°C. Al día siguientes, las muestras de sangre se procesaron con tampón de lisis de RBC (glóbulos rojos) (BioLegend®, no. catálogo 420301) según las instrucciones del fabricante. Las muestras se sometieron a bloqueo con anti-CD16/32 de ratón mediante anti-Trustain FcXtm de ratón (BioLegend®, no. catálogo 101320) según las instrucciones del fabricante. Las muestras se procesaron después mediante citometría de flujo para determinar la prevalencia de células que expresan CD45 humano, que representarían células CAR-T circulantes. La sangre de ratones que habían recibido células T TRAC- β 2M-TGFBRII-/Reg-1- CAR anti-BCMA+ mostró una mayor cantidad de células CD45 humano+ circulantes, que no se vio en ningún otro grupo de tratamiento (Fig. 26C). Esto indica que las inactivaciones de *TGFBRII* y *Reg-1* confieren expansión superior a células CAR-T en un modelo de xenoinjerto en ratón de mieloma múltiple.

Ejemplo 21: Efectos sinérgicos in vivo de interrupciones de TGFBRII + regnasa-1 en células CAR T alogénicas en el modelo tumoral de xenoinjerto JeKo-1 subcutáneo

Se utilizó un modelo en ratón de tumor subcutáneo para evaluar la eficacia *in vivo* de células T TRAC- β 2M- CAR anti-BCMA+ y células T TRAC- β 2M-TGFBRII-/Reg-1-/CAR anti-BCMA+. El modelo en ratón de tumor subcutáneo utilizó la línea celular tumoral JeKo-1 derivada de linfoma de células del manto que expresa BCMA bajo en ratones NSG. TGFBRII se editó a través de edición génica mediada por CRISPR/Cas usando la guía TGFBRII Ex5_T1 (SEQ ID NO: 313). El gen Reg-1 se editó a través de edición génica mediada por CRISPR/Cas usando la guía Z10 (SEQ ID NO: 51). Las células CAR T anti-BCMA expresan un CAR anti-BCMA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146. Véanse también las tablas de secuencias 22, 23, 27 y 39 posteriormente.

La eficacia de las células CAR T anti-BCMA se evaluó en el modelo de xenoinjerto tumoral usando métodos empleados por Translations Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ). Brevemente, 15 ratones NSG hembra de 5-8 semanas de

edad se enjaularon individualmente en jaulas microaisladoras ventiladas, mantenidas en condiciones sin patógenos, 5-7 días antes del inicio del estudio. El día 1, los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 5×10^6 células JeKo-1/ratón en el flanco derecho posterior. Los tumores se calibraron después periódicamente con calibradores. Una vez el tamaño del tumor alcanzó una media de 150 mm^3 (con un intervalo aceptable de $125\text{-}175 \text{ mm}^3$), los ratones se dividieron adicionalmente en 3 grupos de tratamiento como se muestra en la tabla 1. Todos los grupos de tratamiento recibieron una única dosis intravenosa de 200 μl de 1×10^6 células T CAR anti-BCMA+. El día de la inyección de las células T se marcó como día 1.

Tabla 16. Grupos de tratamiento para el estudio de xenoinjerto de RMPI-8226

Grupo	Células CAR T (i.v.)	N
1	NA	5
2	CAR anti-BCMA/TRAC- β 2M-	5
5	CAR anti-BCMA/TRAC- β 2M-TGFBRII-/regnasa-	5

A lo largo del curso del estudio, los ratones se sometieron a observaciones macroscópicas a diario, mientras el volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces a la semana (~cada 3-4 días) empezando el día 1. Un punto final significativo fue el tiempo a perimorbilidad y el efecto del injerto de las células T también se evaluó. El porcentaje de mortalidad animal y el tiempo hasta la muerte se registraron para cada grupo en el estudio. Los ratones se sacrificaron antes de alcanzar un estado moribundo. Los ratones se pueden definir como moribundos y sacrificados si cumplían uno o más de los siguientes criterios:

- Pérdida de peso corporal del 20% o más sostenido durante un periodo de más de 1 semana;
- Tumores que inhiben la función fisiológica normal tal como comer, beber, movilidad y capacidad de orinar y o defecar;
- Diarrea prolongada, excesiva que produce pérdida de peso excesiva (> 20%); o
- Sibilancia persistente y dificultad respiratoria.

Los animales también se consideraron moribundos si había dolor prolongado o excesivo o angustia definida por observaciones clínicas tal como: postración, postura encorvada, parálisis/paresia, abdomen distendido, úlceras, abscesos, convulsiones y/o hemorragias.

Los ratones en los grupos que recibieron células T TRAC- β 2M-TGFBRII-/Reg-1- CAR anti-BCMA+ vieron un aumento en supervivencia relativo tanto a ratones sin tratar como ratones tratados con células T TRAC- β 2M- CAR anti-BCMA+ (Fig. 27B). Los ratones que recibieron células T TRAC- β 2M-TGFBRII-/Reg-1- CAR anti-BCMA+ detuvieron el crecimiento del tumor, mientras las células T TRAC- β 2M- CAR anti-BCMA+ no inhibieron significativamente el crecimiento tumoral (Fig. 27A). Estos datos demuestran que la interrupción de los genes *TGFBRII* y *Reg-1* en células CAR T aumenta la eficacia de células CAR T en un modelo tumoral de xenoinjerto en ratón.

A continuación, se tomaron pequeñas cantidades de sangre de cada ratón para análisis de FACS para caracterizar las células CAR-T circulantes y determinar farmacocinética del fármaco. Se sacaron aproximadamente 75 μl de sangre 2 y 3 semanas tras dosificación CAR-T a través de sangrados submandibulares. La sangre se transfirió a tubos con K2 EDTA y se envió durante la noche a CRISPR Therapeutics en paquetes fríos de 4°C. Al día siguiente, las muestras de sangre se procesaron con tampón de lisis de RBC (glóbulos rojos) (BioLegend®, no. Catálogo 420301) según las instrucciones del fabricante. Las muestras se sometieron a bloqueo con anti-CD16/32 de ratón mediante anti-Trustain FcXtm de ratón (BioLegend®, no. catálogo 101320) según las instrucciones del fabricante. Para cuantificar el número de células T circulantes, se determinó la suma de células positivas para CD4 y CD8 humanos. En el punto temporal de dos semanas, la sangre de ratones que habían recibido células T TRAC- β 2M-TGFBRII-/Reg-1- CAR anti-BCMA+ mostró concentraciones significativamente mayores de células que expresan CD4 humano y CD8+ humano relativa a la sangre de ratones que recibieron células T TRAC- β 2M- CAR anti-BCMA+ (Fig. 27C).

Además, las células T TRAC- β 2M-TGFBRII-/Reg-1- CAR anti-BCMA+ mostraron menor expresión de los marcadores de agotamiento de células T Lag3 y PD1 relativas a las células T TRAC- β 2M- CAR anti-BCMA+ (Fig. 27D). En el punto temporal de tres semanas, el nivel global de células hCD45+ en circulación se había igualado entre grupos (Fig. 27E), pero la expresión de Lag3 y PD1 permaneció menor en ratones tratados con células T TRAC- β 2M-TGFBRII-/Reg-1- CAR anti-BCMA+ (Fig. 27F). Esto indica que las células CAR-T que contienen las inactivaciones de *TGFBRII* y *regnasa* tienen una capacidad superior para expandirse cuando se comparan con células CAR-T que carecen de estas ediciones mientras también reducen la expresión de marcadores de agotamiento de células T PD-1 y Lag3.

Ejemplo 22: Generación de células CAR T anti-PTK7 con genes *TGFBRII* y *regnasa-1* interrumpidos

Se produjeron células T alogénicas que carecen de expresión del gen *TRAC*, el gen *β 2M*, el gen *TGFBRII* y el gen *Reg-1*, y expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se dirige al gen PTK7. Células T humanas activadas se electroporaron con RNP cas9:ARNsg (Cas9 1 μM , ARNg 5 μM), seguido por incubación con vectores adenovíricos adenoasociados recombinantes, serotipo 6 (AAV6) (MOI 50.000).

El AAV recombinante comprendía una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR anti-PTK7 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 349. Se usaron los siguientes ARNsg: *TRAC* (SEQ ID NO: 58), *β2M* (SEQ ID NO: 62), *TGFBR11* (SEQ ID NO: 313) y *REG-1* (SEQ ID NO: 51). Los ARNsg, que forman las RNP con la enzima Cas9, se pueden introducir en las células T en un único suceso de electroporación para producir las poblaciones celulares modificadas resultantes mostradas en la tabla 17 siguiente. Después de la electroporación, las células se transdujeron con los AAV recombinantes para introducir el molde donante que codifica el CAR anti-PTK7

Tabla 17. Poblaciones de células CAR-T genéticamente manipuladas

Población	Ediciones
Células CAR T anti-PTK7	CAR anti-PTK7+/TRAC-/B2M-
Células CAR T anti-PTK7 + TGFBR11 KO	CAR anti-PTK7+/TRAC-/B2M-/TGFBR11-
Células CAR T anti-PTK7 + TGFBR11 KO + Reg KO	CAR anti-PTK7+/TRAC-/B2M-/TGFBR11-/Reg-

A los 7 días tras la electroporación, se comprobó la expresión de CAR en las células T por citometría de flujo. Tanto las células CAR T anti-PTK7 como las células CAR T anti-PTK7 que carecían de TGFBR11 y células CAR T anti-PTK7 que carecían de TGFBR11 y regnasa expresaron cantidades casi equivalente de CAR en su superficie celular el día 7 tras HDR. Los resultados se proporcionan en la tabla 18 a continuación.

Tabla 18. Porcentaje de expresión de CAR, TCR y β2M l día 7 tras HDR

Tratamiento	% CAR+	% TCR+	% β2M+
Sin RNP	3,33	92	93,7
Sin AAV	5,16	2,63	3,87
CAR anti-Ptk7	82,2	1,24	2,49
CAR anti-Ptk7 & TGFBR11 KO	83,2	0,82	2,1
CAR anti-Ptk7 & TGFBR11/Reg-1 KO	81,7	0,77	2

Se alcanzó edición eficaz de TGFBR11 y/o regnasa en la célula CAR T anti-Ptk7 manipulada (tabla 19 posterior) y muestra un aumento en proliferación celular con interrupción de TGFBR11 y Reg-1 (Fig. 28), mientras la viabilidad celular y las proporciones de células T CD4+/CD8+ se mantienen sin cambios.

Tabla 19. Porcentaje de indels en TGFBR11 y regnasa-1 el día 7 tras HDR

Tratamiento	% de indel en TGFBR11	% de indel en Reg-1
Sin RNP	1,8	1,6
Sin AAV	97,75	88,8
CAR anti-Ptk7	1,45	2,2
CAR anti-Ptk7 & TGFBR11 KO	97,15	3
CAR anti-Ptk7 & TGFBR11/Reg-1 KO	97,7	92,2

En resumen, los datos presentados en este ejemplo demostraron que la interrupción de TGFBR11 y/o Reg-1 en células CAR T anti-Ptk7 (por ejemplo, CAR anti-Ptk7+/TRAC-/B2M-/TGFBR11- o CAR anti-Ptk7+/TRAC-/B2M-/TGFBR11-/Reg-1-), pueden aumentar la proliferación celular, mientras no afectan la viabilidad celular o las proporciones de células CD4/CD8.

Ejemplo 23: La interrupción de TGFBR11 solo aumenta la destrucción celular por células CAR T tras reexposición en serie *in vitro*

Las células T CAR anti-PTK7+ generadas anteriormente se reexpusieron en serie con la línea celular cancerosa de osteosarcoma PTK7+, Saos2, y se evaluó su capacidad de destruir la línea celular cancerosa de osteosarcoma PTK7+ Saos2.

Las células T CAR anti-PTK7+ usadas en este experimento contenían las siguientes ediciones:

- Células CAR T anti-PTK7: CAR anti-PTK7+/TRAC-/B2M-
- Células CAR T anti-PTK7 + TGFBR11 KO: CAR anti-PTK7+/TRAC-/B2M-/TGFBR11-
- Células CAR T anti-PTK7 + TGFBR11 KO + Reg KO: CAR anti-PTK7+/TRAC-/B2M-/TGFBR11-/Reg-

En un formato de placa de 96 pocillos, las células CAR T primero se cocultivaron con células Saos2 (6.250 células CAR T, 50.000 células tumorales) en D0 y se reexpusieron con 50.000 células tumorales en D2, D4, D6, D8, D10, D12 y D14.

El análisis del número de células tumorales y células CAR T se realizó en D1, D3, D5, D7, D9, D11 y D13 usando citometría de flujo (método adaptado de Wang et al., JoVE, 2019). Se usaron los siguientes anticuerpos en la tabla 20 a una dilución 1:100.

Tabla 20. Información de anticuerpos

Anticuerpo	Harina	Cat#	Dilución	Vendedor
CD4	BV510	300546	1:100	Biolegend
CD8	FITC	344704	1:100	Biolegend
PTK7	PE	130-091-364	1:50	Miltenyi
CD62L	BV605	304833	1:100	Biolegend
CD45 humano	BV785	304048	1:100	Biolegend
PD1	APC/Cy7	329922	1:100	Biolegend
CD45RO	PE/Cy7	304230	1:100	Biolegend
Estreptavidina	APC	405207	1:100	Biolegend
Tim3	BV421	345008	1:100	Biolegend
Vivo/muerto	7AAD	BDB559925	1:500	BD

Los resultados demuestran que interrumpir el gen *TGFBR11* mejoró la potencia (Fig. 29A) y expansión de células CAR T (Fig. 29B) medido por tinción de CD45 hum, cuando las células CAR T se exponen repetidamente a células diana positivas PTK7+. La adición de la interrupción del gen regnasa no proporciona una ventaja añadida en potencia sobre la delección de *TGFBR11* solo. La potencia y expansión se mejora en comparación con células CAR T que no tienen ninguno, o ambos (es decir, *TGFBR11* y regnasa), de los genes interrumpidos. Además, los resultados demuestran que las células CAR T CD8+ citotóxicas persisten más tiempo durante la reexposición en serie (Fig. 29C) con células tumorales si el gen *TGFBR11* está interrumpido comparado con células CAR T anti-PTK7 y que no tienen ninguno o ambos (es decir, *TGFBR11* y regnasa) de los genes interrumpidos. Las células CAR T CD4+ permanecen consistentes independientemente de si los genes *TGFBR11* y/o regnasa están interrumpidos (Fig. 29D).

Ejemplo 24: Eficacia de tratamiento de células CART anti-PTK7 con múltiples interrupciones génicas en el modelo de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células pancreáticas subcutáneo

Tratamiento en el modelo tumoral de carcinoma de células pancreáticas

La capacidad de células T que expresan un CAR PTK7 con ediciones génicas de *TGFBR11* y/o *Reg-1* para eliminar células de carcinoma de células pancreáticas que expresan niveles medios de PTK7 se evaluó *in vivo* usando un modelo en ratón de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células renales (Hs766T) subcutáneo. Se produjeron células T CAR anti-PTK7+ como se describe anteriormente. Véase, por ejemplo, el ejemplo 22.

La capacidad de estas células T CAR anti-PTK7+ de mejorar la enfermedad causada por una línea celular de carcinoma pancreático PTK7+ se evaluó en ratones NSG usando métodos empleados por Translations Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ). Brevemente, 20 ratones NSG hembra de 5-8 semanas de edad se enjaularon individualmente en jaulas microaisladoras ventiladas, mantenidas en condiciones sin patógenos, 5-7 días antes del inicio del estudio. Los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 5×10^6 células de carcinoma de células pancreáticas Hs766T/ratón en el flanco derecho posterior. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó la diana de $\sim 50 \text{ mm}^3$, los ratones se dividieron adicionalmente en 3 grupos de tratamiento como se muestra en la tabla 21. El día 1, los cuatro grupos de tratamiento recibieron una única dosis intravenosa de $200 \mu\text{l}$ de $0,5 \times 10^7$ células T CAR anti-PTK7+ según la tabla 21.

Tabla 21. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células Hs766T	Tratamiento con células CAR-T (i.v.)	N
1	Ninguno	5×10^6 células/ratón	Ninguno	5
2	Células CAR T anti-PTK7: CAR anti-PTK7+/TRC-/B2M-	5×10^6 células/ratón	$0,5 \times 10^7$ células/ratón	5
3	Células CAR T anti-PTK7 + <i>TGFBR11</i> KO: CAR anti-PTK7+/TRC-/B2M-/TGFBR11-	5×10^6 células/ratón	$0,5 \times 10^7$ células/ratón	5

El volumen tumoral se midió dos veces a la semana ($\sim$ cada 3-4 días) desde el día del inicio del tratamiento. El día 11 tras la inyección, las células CAR T anti-PTK7 con y sin KO del gen *TGFBR11* empezaron a mostrar un efecto significativo en reducir el volumen tumoral en comparación al grupo sin tratamiento 1. Aproximadamente un mes después las células CAR T anti-PTK7 con y sin *TGFBR11* KO habían eliminado completamente el crecimiento tumoral en el modelo Hs766T subcutáneo (Fig. 30A).

Estos resultados demostraron que interrumpir el gen *TGFBR11* en células CAR T eliminó de forma eficaz tumores en el modelo de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células renales Hs766T subcutáneo. No se observaron signos clínicos de GvHD en células CART anti-PTK7 con y sin células *TGFBR11* KO (Fig. 30B).

Ejemplo 25: Análisis de la fracción de células T en el modelo de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células pancreáticas (Hs766T)

Se tomaron muestras de sangre de ratones con tumores Hs766T, 47 días después de la administración de CAR T. Brevemente, se recogieron 100 ul de sangre completa de ratón a través de la vena submaxilar. Se usó tampón de lisis de glóbulos rojos para alcanzar lisis óptima de eritrocitos con efecto mínimo en linfocitos. Se usaron CD45 humano y CD45 de ratón como un biomarcador para separar células humanas y de ratón por FACS. Las muestras de sangre se evaluaron por citometría de flujo buscando cuentas absolutas de CD45+ humano así como subconjuntos de células T de memoria. La tinción para CD45RO+CD27+ se usó para definir células T de memoria central.

Los resultados demuestran que la adición de la edición génica de *TGFBR1* aumentó significativamente la población de células T de memoria central (Fig. 31B) comparado con células CAR T anti-PTK7 sin *TGFBR1* KO que se correlaciona con expansión masiva de las células CAR T (Fig. 31A) vista en estos animales. Y la edición de *TGFBR1* además fomentó el potencial de proliferación de células CAR T in vivo (Fig. 31B).

Tablas de secuencias

Las siguientes tablas proporcionan detalles para las varias secuencias de nucleótidos y aminoácidos divulgadas en el presente documento.

Tabla 22. Secuencias de ARNsg y secuencias de genes diana para Reg1

Nombre	Secuencia sin modificar	Secuencia modificada	Secuencias diana (PAM)
ARNsg REG1-Z01 (EX2_T1)	GGUCAUCCGAUGGGAGCAA CGguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguuaucaacuu gaaaaaguggcacccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 14)	G*G*U*CAUCCGAUGGGAGCAAC Gguuuuagagcuagaaaauagca aguuaaaauaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcac cgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 15)	GGTCATCGATGGGAGCAACG (TGG) (SEQ ID NO: 171) GGTCATCGATGGGAGCAACG (SEQ ID NO: 318)
ARNsg REG1-Z01 (EX2_T1) espaciador	GGUCAUCCGAUGGGAGCAA CG (SEQ ID NO: 16)	G*G*U*CAUCCGAUGGGAGCAAC G (SEQ ID NO: 17)	
ARNsg REG1-Z02 (EX2_T2)	CACCACCCCGCGGGACTAGA GAguuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguuaucaacuu gaaaaaguggcacccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 18)	C*A*C*CACCCCGCGGGACTAG Aguuuagagcuagaaaauagca aguuaaaauaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcac cgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 19)	CACCACCCCGCGGGACTAGA (GGG) (SEQ ID NO: 172) CACCACCCCGCGGGACTAGA (SEQ ID NO: 319)

Nombre	Secuencia sin modificar	Secuencia modificada	Secuencias diana (PAM)
ARNsg REG1-Z02 (EX2_T2) espaciador	CAUACCCCCGCGGGACUA GA (SEQ ID NO: 20)	mC*mA*mC*CACCCCGCGGGAC UAGA (SEQ ID NO: 21)	
ARNsg REG1-Z03 (EX2_T3)	GGUCUGGGCGUCCCGCUC GGguuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuuaucaacu gaaaaaguggcacccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 22)	G*G*U*CUGGGCGUCCCGCUCG Gguuuuagagcuagaaaauagca aguuuuuuuuagggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcac cgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 23)	GGTCTGGCGCTCCCGCTCGG (TGG) (SEQ ID NO: 173) GGTCTGGCGCTCCCGCTCGG (SEQ ID NO: 320)
ARNsg REG1-Z03 (EX2_T3) espaciador	GGUCUGGGCGUCCCGCUC GG (SEQ ID NO: 24)	mG*mG*mU*CUGGGCGUCCCGC UCGG (SEQ ID NO: 25)	
ARNsg REG1-Z04 (EX4_T1)	UUCACACCAUCACGACGC GUguuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuuaucaacu gaaaaaguggcacccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 26)	U*U*C*ACACCAUCACGACGCG Uguuuuagagcuagaaaauagca aguuuuuuuuagggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcac cgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 27)	TTCACACCATCACGACGCGT (GGG) (SEQ ID NO: 174) TTCACACCATCACGACGCGT (SEQ ID NO: 321)
ARNsg REG1-Z04 (EX4_T1) espaciador	UUCACACCAUCACGACGC GU (SEQ ID NO: 28)	U*U*C*ACACCAUCACGACGCG U (SEQ ID NO: 29)	
ARNsg REG1-Z05 (EX4_T2)	ACACCAUCACGACGCGUG GGguuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuuaucaacu gaaaaaguggcacccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 30)	A*C*A*CAUCACGACGCGUGG Gguuuuagagcuagaaaauagca aguuuuuuuuagggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcac cgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 31)	ACACCATCACGACGCGTGGG (TGG) (SEQ ID NO: 175) ACACCATCACGACGCGTGGG (SEQ ID NO: 322)
ARNsg REG1-Z05 (EX4_T2) espaciador	ACACCAUCACGACGCGUG GG (SEQ ID NO: 32)	A*C*A*CAUCACGACGCGUGG G (SEQ ID NO: 33)	
ARNsg REG1-Z06 (EX4_T3)	CUACGAGUCUGACGGGAU CGguuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuuaucaacu gaaaaaguggcacccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 34)	C*U*A*CGAGUCUGACGGGAUC Gguuuuagagcuagaaaauagca aguuuuuuuuagggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcac cgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 35)	CTACGAGTCTGACGGGATCG (TGG) (SEQ ID NO: 176) CTACGAGTCTGACGGGATCG (SEQ ID NO: 323)
ARNsg REG1-Z06 (EX4_T3) espaciador	CUACGAGUCUGACGGGAU CG (SEQ ID NO: 36)	C*U*A*CGAGUCUGACGGGAUC G (SEQ ID NO: 37)	
ARNsg REG1-Z07 (EX4_T4)	UUGCCACCCACGCGUCGU GAguuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuuaucaacu gaaaaaguggcacccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 39)	U*U*G*CCACCCACGCGUCGUG Aguuuagagcuagaaaauagca aguuuuuuuuagggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcac cgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 39)	TTGCCACCCACGCGTCTGTA (TGG) (SEQ ID NO: 177) TTGCCACCCACGCGTCTGTA (SEQ ID NO: 324)
ARNsg	UUGCCACCCACGCGUCGU	U*U*G*CCACCCACGCGUCGUG	

Nombre	Secuencia sin modificar	Secuencia modificada	Secuencias diana (PAM)
REG1-Z07 (EX4_T4) espaciador	GA (SEQ ID NO: 40)	A (SEQ ID NO: 41)	
ARNsg REG1-Z08 (EX4_T5)	GUUCACACCAUCACGACG CGguuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuuaucaacu gaaaaagugggcacogagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 42)	G*U*U*CACACCAUCACGACG Gguuuuagagcuagaaaauagca aguuuuuuuuuuagggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcac ogagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 43)	GTTACACCATCAGGACGCG (TGG) (SEQ ID NO: 178) GTTACACCATCAGGACGCG (SEQ ID NO: 325)
ARNsg REG1-Z08 (EX4_T5) espaciador	GUUCACACCAUCACGACG CG (SEQ ID NO: 44)	G*U*U*CACACCAUCACGACG G (SEQ ID NO: 45)	
ARNsg REG1-Z09 (EX4_T6)	CACGAUCCCGUCAGACUC GUguuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuuaucaacu gaaaaagugggcacogagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 46)	C*A*C*GAUCCCGUCAGACUCG Uguuuuagagcuagaaaauagca aguuuuuuuuuuagggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcac cgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 47)	CACGATCCCGTCAGACTCGT (AGG) (SEQ ID NO: 179) CACGATCCCGTCAGACTCGT (SEQ ID NO: 326)
ARNsg REG1-Z09 (EX4_T6) espaciador	CACGAUCCCGUCAGACUC GU (SEQ ID NO: 48)	C*A*C*GAUCCCGUCAGACUCG U (SEQ ID NO: 49)	
ARNsg REG1-Z10 (EX4_T7)	ACGACCGCGGGUGGCAAG GCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuuaucaacu gaaaaagugggcacogagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 50)	A*C*G*ACGCGGGUGGCAAG Cguuuuagagcuagaaaauagca aguuuuuuuuuuagggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcac cgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 51)	ACGACCGCGTGGTGGCAAGC (GGG) (SEQ ID NO: 180) ACGACCGCGTGGTGGCAAGC (SEQ ID NO: 327)
ARNsg REG1-Z10 (EX4_T7) espaciador	ACGACCGCGGGUGGCAAG GC (SEQ ID NO: 52)	A*C*G*ACGCGGGUGGCAAG C (SEQ ID NO: 53)	

* indica un nucleótido con una modificación 2'-O-metilfosforotioato

Tabla 23. Secuencias de ARNsg y secuencias de genes diana para *TRAC*, $\beta 2M$, y *CD70*

Secuencias de ARNsg			SEQ ID NO:
ARNsg <i>CD70</i> (CD70-7)	Modificado	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGCGuuuuuagagcuagaaaauagc aaquuuuuuuuuuagggcuaguccguuuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U	54
	Sin modificar	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGCGuuuuuagagcuagaaaauagcaag uuuuuuuuuuuagggcuaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccc gagucggugcUUUU	55
ARNsg <i>CD70</i> espaciador	Modificado	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGCG	56
	Sin modificar	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGCG	57
ARNsg <i>TRAC</i> (TA-1)	Modificado	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaaauagc aaquuuuuuuuuuagggcuaguccguuuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U	58
	Sin modificar	AGAGCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaaauagcaag uuuuuuuuuuuagggcuaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccc	59

Descripción	Secuencia (Deleciones indicadas por guiones (-); inserciones indicadas en negrita)	SEQ ID NO:
Edición gen $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAAGTCTCTCTACCCCTCCCGCT	83
Edición gen $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAAGTCTCTCTACCCCTCCCGCT	84
Edición gen $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT- CTGGAGGCTATCCAGCGTGAAGTCTCTCTACCCCTCCCGCT	85
Edición gen $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGATAGCGCTGGAGGC TATCCAGCGTGAAGTCTCTCTACCCCTCCCGCT	86
Edición gen $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGC----- GCTATCCAGCGTGAAGTCTCTCTACCCCTCCCGCT	87
Edición gen $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCGCTGGAGGCTA TCCAGCGTGAAGTCTCTCTACCCCTCCCGCT	88

Tabla de secuencia 26. Secuencia del gen *CD70* editada

Descripción	Secuencia (Deleciones indicadas por guiones (-); inserciones indicadas en negrita)	SEQ ID NO:
Edición gen <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATCACCAGCCCGCG-- CAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	89
Edición gen <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATCACCAGCCCGCGAACCAGTGGGACCAAAGCAGCC CGCAGGACG	90
Edición gen <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATC----- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	91
Edición gen <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATCACCAGCCCGCG- CCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	92
Edición gen <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATCACCAGCCCGCG- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	93
Edición gen <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATCACCAGCCCGCAGGACG	94

5

Tabla de secuencia 27. Secuencias de receptores de antígeno quiméricos

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
95	péptido señal	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIIP
96	péptido señal	MALPVTALLFLALLLHAARE
97	dominio transmembrana CD8a	IYIWAFLASTCGVLLLSLVITLY
98	secuencia de nucleótidos de 4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGA GACCACTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCC AGAAGAAGAAGAAGCAGGATGTGAAGT
99	secuencia de aminoácidos de 4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCEL
100	secuencia de nucleótidos de CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTC GCCGGCCTGGGGCCGACAAAGAAACATTACCAACCCCTATGCCCCCCCAG AGACTTCGCTGCGTACAGGTCC

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
101	secuencia de amino-ácidos de CD28	SKRSRLHSDYMNMTPRRFGFTRKHYQPYAPPRDFAAYS
102	secuencia de nucleótidos de CD3-zeta	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGAC AGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCGCCGAGGAGTATGA CCTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCC CGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACATGAACTCCAGAAGGATA AGATGGCGGAGGCGCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACG GGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGASTACGGCAACCAAA GATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCCTCCAGA
103	secuencia de amino-ácidos de CD3-zeta	RVKFSRSADAPAYQQGQNLVNEINLGRREEYDVLDRRGGRUPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEICMKGERRRGKHGDCLYQGLSTATK DTYDALEHMQALPPR
105	anti-CD19 VL CDR1 (Kabat)	RASQDISKYLN
106	anti-CD19 VL CDR2 (Kabat)	HTSRLHS
107	anti-CD19 VL CDR3 (Kabat)	QQGNTLPYT
108	anti-CD19 VH CDR1 (Kabat)	DYGVVS
109	anti-CD19 VH CDR2 (Kabat)	VIWGSETTYINSALKS
110	anti-CD19 VH CDR3 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY
111	anti-CD19 VL CDR1 (Chothia)	RASQDISKYLN
112	anti-CD19 VL CDR2 (Chothia)	HTSRLHS
113	anti-CD19 VL CDR3 (Chothia)	QQGNTLPYT
114	anti-CD19 VH CDR1 (Chothia)	GVSLPDY
115	anti-CD19 VH CDR2 (Chothia)	WGSET
116	anti-CD19 VH CDR3 (Chothia)	HYYYGGSYAMDY
117	CAR anti-CD19 FMC63-28Z (FMC63-CD8[tm]-CD28[dominio coestimulador]-CD3z)	ATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGGGAACTTCCTCATCCAG CGTTCTTGCTGATCCCCGATATTCAGATGACTCAGACCACCACTAGCTT GTCTGCCCTCACTGGGAGACCGAGTAACAATCTCTGCAGGCCAAGTCAA GACATTAGCAAATACCTCAATPGGTACCAGCAGAAAGCCCGACGGAACGG TAAAACTCCTCATCTATCATACGTCAAGGTTGCAFTCCGGAGTACCGTC ACGATTTTTCAGGTTCTGGGAGCGGAACTGACTATTCTTGAATTTTCA AACCTCGAGCAGGAGGACATTCCGACATATTTTGTCAACAAGGTAATA CCCTCCCTTACACTTTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAATTAACGGGTC CACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCASTGGAGAAGGTTCCACTAAAGGC GAGGTGAAGCTCCAGGASAGCGGCCCGGTCTCGTTGCCCCCACTCAA

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		GCCTCTCTGTAACGTGCACAGTGAAGTGGTGTATCAATTGCCTGATTATGG CGTCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAAGGGTCTTGAATGGCTTGGG GTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAAAASTC GCTTGACGATAATAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAT GAACAGTTTGCAGACTGACGATACCGCTATATATTATTGTGCTAAACAT TATTACTACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATTGGGGGCGAGGGGACTT CTGTCACAGTCAAGTAGTGCTGCTGCTTTTGTCCCGGTATTTCTCCGAGC CAAACCGACACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCAAC ATCGCTCTCAACCTCTTAGTCTTCCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCG CCGGGGGTGCTGTTTATACGAGGGGCTTGGACTTCCGCTTGTGATATTA CATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCTTTTGTGTGCTACTC GTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGT TGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGCCGGCTTGGGCGGAC AAGAAAACATTACCAACCTATGCCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTAC AGGTCCCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGC AAGGACAGAATCAGCTGTATACGAAGTGAATTTGGGACGCGCGGAGGA GTATGACGTGCTTGATAAACCGCGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGT AAACCCCGAAGAAAGAAATCCCAAGAAGGACTCTACAATGAATCCAGA AGGATAAGATGGCGGAGGCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAAGC ACGACGGGGGAAAAGGTACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCA ACCAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCGA 118 CAR anti-CD19 FMC63-28Z (FMC63-CD8[tm]- CD28[dominio coestimulador]- CD3z) Aminoácido con péptido señal MELLVTSLLLCELPHPAFLLLIPDIQMTQTTSLSASLGDPVTISCRASQ DISKVLNWWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS NLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKG EVLQESGPGVLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VTWGSETTYNSALKSRLLTIKDNSSKQVFLKMNSLQDDTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAFT IASQPLSLRPEACRFAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCNHRNRSKRSRLHSDYNNMTFRPRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGPRREYDVLDKRRGRDPMEGG KPRRNPKQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHGDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQLPFR 353 CAR anti-CD19 FMC63-28Z (FMC63-CD8[tm]- CD28[dominio coestimulador]- CD3z) Aminoácido sin péptido señal DIQMTQTTSLSASLGDPVTISCRASQDISKVLNWWYQQKPDGTVKLLIY HTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF GGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVLQESGPGVLVAPSQSLSVTC TVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLLTIK DNSSKQVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAFTIASQPLSLRPEACRFAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLITLYCNHRNRSKRSRLHSDY NNMTFRPRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGPRREYDVLDKRRGRDPMEGGKPRRNPKQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRRGKHGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPFR 119 scFv anti-CD19 secuencia codificante GATATTTCAGATGACTCAGACCACCACTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAG ACCGAGTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAAAATACCT CAATTGGTACCAGCAGAAGCCCCGACGGAACGGTAAACTCCTCATCTAT CATACCTCAAGCTTGCAATCCCGACTACCGTCACGATTTTCAGGTTCTG GGAGCGGAAGTACTATTCTTGAATATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGA CATTGCGACATATTTTTGTCAACAAGGTAATACCCTCCCTTACACTTTC GGAGGAGGAACCAAACTCGAAATTACCGGGTCCACCACTGGCTCTGGGA AGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAAAGGCGAGGTGAAGTCCAGGA GAGCGGCCCCGGTCTCGTTGCCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACGTGC ACAGTGAGTGGTGTATCATTTGCCGTGATTATGGCGTCTCTCGGATAAGGC AGCCCCCGGAAAGGTTCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGA GACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAAAAGTCCGTTGACGATAATAAAA GATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAATGAACAGTTTGCAGACTG ACGATACCGCTATATATTATTGTGCTAAACATTATTACTACGGCGGTAG

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
120	acFv anti-CD19 secuencia de aminoácidos Enlazador subrayado	TTACGCGATGGATTATTGGGGGCGAGGGGACTTCTGTCCACAGTCAGTAGT DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIY HTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAITYFCQQGNTLPYTF GGGTKLEITFGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTC TVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIK DNSKQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAKHYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS
121	CD8a extracelular + CD8a transmembrana + 5' Enlazador (subrayado)	GCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTC CCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCACCATCGCCTCTCAACCTCT TAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCCGCGGGGTGCTGTTTAT ACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTACATTTGGGCTCCGTTGG CGGGTACGTCCGGCGCTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTG TAATCACAGGAATCGC
122	CD8a extracelular + CD8a transmembrana (sin enlazador)	TTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGC GCCCTCCGACACCCGCTCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCG CCCCGAGGCATGCCGACCCGCCCGCGGGGTGCTGTTTATACGAGGGGC TTGGACTTCGCTTGTGATATTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGT GCGGCGTCCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAG GAATCGC
123	CD8a extracelular + CD8a transmembrana	FVPVLEPAKPTTTPAPRPPTTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYTWAPLAGTCGVLLLSLVITTLVYCNHRN
124	Anti-CD19 VH	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS
125	Anti-CD19 VL	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIY HTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAITYFCQQGNTLPYTF GGGTKLEIT
126	CD19 enlazador	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
127	CD70 VL CDR1 (Kabat)	RASKSVSTSGYSFMH
128	CD70 VL CDR1 (Chothia)	SKSVSTSGYSF
129	CD70 VL CDR2 (Kabat)	LASNLES
N/A	CD70 VL CDR2 (Chothia)	LAS
130	CD70 VL CDR3 (Kabat)	QHSREVPWT
131	CD70 VL CDR3 (Chothia)	SREVPW
132	CD70 VH CDR1 (Kabat)	NYGMN
133	CD70 VH CDR1 (Chothia)	GYTFTNYGMN
134	CD70 VH CDR2 (Kabat)	WINTYTGEPTYADAFKG
135	CD70 VH CDR2 (Chothia)	NTYTGE
136	CD70 VH CDR3 (Kabat)	DYGDYGM DY
137	CD70 VH CDR3	CARDYGDYGM DYWG

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
	(Chothia)	
138	CAR CD70 secuencia de aminoácidos (scFv CD70B con 41BB) Con péptido señal	MALPVTALLLP LALLLHAAEPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPYADAFKGRVTMTRDTSIS TAYMELSR LRSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGGSGDI VMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLASNLES GVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVY YCQHSREVPWTFGQGTKVEI KSAAAFV FVFLPAKPTTTPAPRPPTTAPT IASQPLSLRPEACPPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSL VITFLYCNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQPTQEEDGCCSCRFPEEEEG GCCLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGRPRKPNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPFR
354	CAR CD70 secuencia de aminoácidos (scFv CD70B con 41BB) Sin péptido señal	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMG WINTYTGEPYADAFKGRVTMTRDTSIS TAYMELSR LRSDDTAVYYCAR DYGDYGM DYWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGGSGDI VMTQSPDSLAV SLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLASNLES GVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEI K SAAAFV FVFLPAKPTTTPAPRPPTTAPT IASQPLSLRPEACPPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSL VITFLYCNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQPTQEEDGCCSCRFPEEEEGGCCLRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRKPNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPFR
139	scFv anti-CD70A secuencia de nucleótidos	GATATAGTTATGACCCAATCACCCGATAGTCTTGCGGTAAGCCTGGGGG AGCGAGCAACAATAAACTGTGCGGCATCAAAATCCGTCACTACAAGCGG GTATTTCATTCATGCACTGGTATCAACAGAAACCCGGTCAGCCACCCAAG CTCCTGATTTATCTTGCGTCTAATCTTGAGTCCGGCGTCCAGACCGGT TTTCGGGCTCCGGGAGCGGCACGGATTTTACTCTTACTATTCTAGCCT TCAGGCCGAAGATGTGGCGGTATACTACTGCCAGCATCAAGGGAAGTT CCTTGGACGTTTCGGTCAGGGGCACGAAAGTGGAAATTAAGGCGGGGGG GATCCGGCGGGGAGGGTCTGGAGGAGGTGGCAGTGGTCAGSTCCAAC TGGTGAGTCCGGGCGAGAGGTAAAAAACCCGGCGCGTCTGTAAAGGTT TCATGCAAGGCCAGTGGATATACTTTACCAATTACGGAATGAACTGGG TGAGGCAGGCCCCGTGCTCAAGGCCTGAAATGGATGGGATGGATAAACAC GTACACCGGTGAACCTACCTATGCCGATGCCTTTAAGGGTCCGGTTACG ATGACGAGAGACACCTCCATATCAACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGAT TGAGGAGTGACGATACGGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGACTACGGCGA TTATGGCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACTACAGTAACCGTTTCCAGC
140	scFv anti-CD70A secuencia de aminoácidos (enlazador subrayado)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQ QKPGQPPK LLIYLASNLES GVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQHSREV PWTFGQGTKVEI KGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPYADAFKGRVT MTRDTSIS TAYMELSR LRSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TTVTVSS
141	scFv anti-CD70B secuencia de nucleótidos	CAGGTCCAGTTGGTGCAAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAACCCGGCGCTT CCGTGAAGGTGTCTGTAAAGCGTCCGGTTATACGTTACAGAACTACGG GATGAATTGGGTTCCGCCAAGCGCGGGGCGAGGACTGAAATGGATGGGG TGGATAAATACCTACACCGCGCAACCTACATACGCCGACGCTTTAAAG GGCGAGTCACTATGACGCGCGATACCAGCATATCCACCGCATACATGGA GCTGTCCCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATTGTGCTCGG GACTATGGCGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAAGGTACAGGTGTAA CAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCGAGTGGCGGGGGGGAAGCGGAGGAGG GGGTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAATCCCGAGATAGTTTGGCGGTT TCTCTGGGCGAGAGGCGCAACGATTAATTGTGCGCATCAAGAGCGTTT CAACGAGCGGATATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGACA ACCGCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGGGGTG

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		CCGGACCGATTCTCTGGTAGTGGGAAGCGGAACTGACTTTACGCTCACGA TCAGTTCACTGCAGGCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAG TAGAGAAGTCCCTCGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTAGAAATTAA
142	scFv anti-CD70B secuencia de aminoácidos (enlazador subrayado)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFETNYGMNWRQAPGQGLKWMG WINTYTGEPTYADAFKGRVTNTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR DYGDYGM DYWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGDI VMTQSPDSLAV SLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKFGQPPKLLIYLASNLESGV PDREFSGSGGTDFLTITISSLQAE DVAVYYCQHSREV PWTFGQGT KVEIK
143	Anti-CD70 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFETNYGMNWRQAPGQGLKWMG WINTYTGEPTYADAFKGRVTNTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR DYGDYGM DYWGQGT TTVTVSS
144	Anti-CD70 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKFGQPPK LLIYLASNLESGV PDREFSGSGGTDFLTITISSLQAE DVAVYYCQHSREV PWTFGQGT KVEIK
145	CAR BCMA secuencia de nucleótidos	ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCTTGGCGCTGTGCTCC ACGCAGCAAGGCCGCGAGGTGCGAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAA GAAGCCCGGAGCCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCAACACC CTGACCAACTACGTGATCCACTGGGTGAGACAAGCCCCCGGCCAAAGGC TGGAGTGGATGGGCTACATCCTGCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAG CCAGAAGTTCAGGGGCGGGTGACCATCAACAGGGGATAAGAGCGCCTCC ACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGGAGGACACCGCTGTGT ACTACTGTACAAGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGACCCCTGGGGCCA GGGCACAACAGTGACCGTCAGCAGCGGGCGGGGAGGCGAGCGGGCGGGC GGCAGCGGGCGGAGGCGGAAGCGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCA CACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCTG CAGGGCTAG CCAAAGCCTGGTGACAGCAACGGCAACACCCACCTGCACTGGTACCAG CAGAGACCCGACAGGCTCCCGAGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACA GGTTCTCCGAGGTGCCCTGCCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGA CTTTACCCTGACCATCAGCAGCGTGGAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTAT TACTGCAGCCAGACCAGCCACATCCCTTACACCTTCGGCGGGCGGCACCA AGCTGGAGATCAAAAGTGCTGCTGCCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGC CAAACCGACCAAGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCAAC ATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCGGAGGCATGCCGACCCGCGG CCGGGGGTGCTGTTCAACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTA CATTTGGGCTCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGCTCCTTTGTGTCACTC GTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGSGGCGAAGA AACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCACTACAACTAC TCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGA GGATGTGAAGTGGAGTGAAGTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCAT ATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCGG CGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATG GGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAAC TCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGG CGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGT ACGGCAACCAAGATACSTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCCTC CCAGA
146	CAR BCMA secuencia de aminoácidos Con péptido señal	MALPVTALLLFLALLLHAARFQVQLVQSGAELKKPGASVKVSKASGNT LTNYVIHWVRQAPGQRLKWMGYLLPYNDLTQYSQKFGQGRVFTTRDKSAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCTRNDWDGFFDFWGQGT TTVTVSSGGGGSGGG SGGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNNGNTHLHWYQ QRPQAPRLLIYSVSNRFSEVPAFSGSGGTDFLTITISSVESEDFAVY YC3QTSHPYTFGGGFKLEIKSAAAFVVPVLEAFKPTTTPAFRPTTPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		VITLYCNHRNRKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPFEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPFR
355	CAR BCMA secuencia de aminoácidos Sin péptido señal	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGNTLTNYVIHWVRQAPGQRLEWMG YILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR WDWDGFFDFWGGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVS FGERASISCRASQSLVHSNGNTHLHWYQQRPGQAPRLLIYSVSNRFSEV EARFSGSGSGTDFTLTISVSESEDAVYYCSQTSHPYTFGGGTGLEIK SAAAFVFPVFLPAKETTTTEAPRPPTTAPPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCCGVLLLSLVITLYCNHRNRKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGN QLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPFEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPFR
147	scFv BCMA secuencia de nucleótidos	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCGGAGCCT CCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCAACACCTGACCACTACGTF GATCCACTGGGTGAGACAAGCCCCCGGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGC TACATCCTGCCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAGCCAGAAGTTCCAGG GCAGGGTGACCATCACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCGCCTATATGGA GCTGAGCAGCCTEAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGTACAAGG TGGGACTGGGACGGCTTCTTTGACCCCTGGGGCCAGGSCACACAGTGA CCGTGAGCAGCGCGCGCGGAGGAGCGCGCGCGCGCGGAGCGCGGAGG CGGAAGCGGAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACTGAGCGTGAGC CCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGC ACAGCAACGGCAACACCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAGACCCGGACA GGCTCCCAAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGGTTCTCCGAGGTG CCTGCCAGGTTTAGCGGCGAGCGGAAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCA TCAGCAGCGTGGAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCAGAC CAGCCACATCCCTTACACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAA
148	scFv BCMA secuencia de aminoácidos (enlazador subrayado)	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGNTLTNYVIHWVRQAPGQRLEWMG YILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR WDWDGFFDFWGGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVS FGERASISCRASQSLVHSNGNTHLHWYQQRPGQAPRLLIYSVSNRFSEV EARFSGSGSGTDFTLTISVSESEDAVYYCSQTSHPYTFGGGTGLEIK
149	BCMA VH	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGNTLTNYVIHWVRQAPGQRLEWMG YILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR WDWDGFFDFWGGQTTVTVSS
150	BCMA VL	EIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHLHWYQQRPGQAP RLLIYSVSNRFSEVPAERFSGSGSGTDFTLTISVSESEDAVYYCSQTS HPYTFGGGTGLEIK
151	BCMA VL CDR1 (Kabat & Chothia)	RASQSLVHSNGNTHLH
152	BCMA VL CDR2 (Kabat & Chothia)	SVSNRFS
153	BCMA VL CDR3 (Kabat)	SQTSHPYT
154	BCMA VL CDR3 (Chothia)	SQTSHPYT
155	BCMA VH CDR1 (Kabat)	NYVIH

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
156	BCMA VH CDR1 (Chothia)	GNTLTNY
157	BCMA VH CDR2 (Kabat)	YILPYNDLTKYSQKFGG
158	BCMA VH CDR2 (Chothia)	LFYNDE
159	BCMA VH CDR3 (Kabat)	WDWDGFFDF
160	BCMA VH CDR3 (Chothia)	WDWDGFFDF
328	anticuerpo anti-CD33 VH CDR1 (Kabat)	<u>SYIIR</u>
329	anticuerpo anti-CD33 VH CDR2 (Kabat)	<u>VIYPGNDDISYNQKFGG</u>
330	anticuerpo anti-CD33 VH CDR3 (Kabat)	<u>EVRLPYFDV</u>
331	anticuerpo anti-CD33 VL CDR1 (Kabat)	<u>KSSQSVEFFSSSQKNYLA</u>
332	anticuerpo anti-CD33 VL CDR2 (Kabat)	<u>WASTRES</u>
333	anticuerpo anti-CD33 VL CDR3 (Kabat)	<u>HGYLSSRT</u>
334	anticuerpo anti-CD33 VH	QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVG VIYPGNDDISYNQKFGGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR EVRLRYFDVWGQGTITVTVSS
335	anticuerpo anti-CD33 VL	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVEFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS FRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYL SSRTFGGGTKLEIK
336	scFV anti-CD33 y anti-CD33b Enlazador subrayado	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVEFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS FRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYL SSRTFGGGTKLEIKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGVQLQPGAEVVKPGASVK MSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFGGKA TLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARVRLRYFDVWGQGTITVTVS S
337	scFV anti-CD33 y anti-CD33b	GAAATCGTCCTCACACAATCCCCGGGGAGCCTCGCAGTCAGTCCTGGGG AACGAGTCAGTATGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTGTTTTTTCTCAAG TAGCCAGAGAAGAACTACCTCGCATGGTACCAACAAATACCGGGGCAATCT CCCCGCTTGCTTATATACTGGGCAAGTACCCGCGAATCCGGCGTACCGG ATCGATTACGGGGATCTGGGTGAGTACTGATTTCACTTTGACTATCAG CTCTGTTGAGCCTGAAGATTTGGCAATTTACTACTGTCAACAACTACTG AGTAGCCGAAGCTTTTCGGCCAGGACCGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAG GGGAGGTTCTGGTGGGGGGCGGTTCTGCGCGTGGAGGAAGCCAAAGTACA GTTGCAACAGCCAGGGGGGGAGGTCGTAAAACCTGGGGGCGTCTGTCAAG ATGAGCTGTAAAGCAAGTGGATACACCTTCACCTCCTACTATATACATT GGATTAAGCAAACTCCGGGTGAGGGGCTGGAATGGGTGGCGTTATATA CCCCGGGAACGATGATATATCATACAACCAAAAATTTCAAGGCAAGGGG ACTCTGACTGCCGATAAGAGTAGCACAACAGCTTACATGCAGCTTCTT CCCTGACCAGCGAAGATTCASCACTTTACTACTGCGCTCGGGGAAGTGGG CCTGCGATACTTTGATGTCTGGGGTCAAGGAAGTACAGTTACTGTATCA AGC
338	CAR anti-CD33	MAIPVTFALLLFLALLLHAARPEIIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQS VEFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSFRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
	CD28 coestim. Con péptido señal	TLTISSVQPEDLAIIYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKGGGGGSGGGGSGGGG GSQVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEW VGVIYFGNDDISYNQKFQGGKATLTADKSSSTAYMQLSSSLTSEDSAVYYC AREVRLRYFDVWGQGTITVTVSSSAAAFVPEFLPAKPTTTTAPRPPTPEAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTTCGVLLLS LVITLYCNHRNRSKRSLHSDYNNMTFRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEINLGRREEYDVLDRKRRGRDP EMGCKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPFR
356	CAR anti-CD33 CD28 coestim. Sin péptido señal	ETVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS PRLIIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIIYCHQYL SSRTFGQGTKLEIKGGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLQQPGAEEVVKPGASVK MSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYFGNDDISYNQKFQGGK TLTADKSSSTAYMQLSSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTITVTVS SSAAAFVPEFLPAKPTTTTAPRPPTPEAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSLHSD YNNMTFRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNEINLGRREEYDVLDRKRRGRDP EMGCKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPFR
339	CAR anti-CD33b 41BB coestim. Con péptido señal	MALPVTALLPLALLLHAARFEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQS VFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLIIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDF TLTISSVQPEDLAIIYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKGGGGGSGGGGSGGGG GSQVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEW VGVIYFGNDDISYNQKFQGGKATLTADKSSSTAYMQLSSSLTSEDSAVYYC AREVRLRYFDVWGQGTITVTVSSSAAAFVPEFLPAKPTTTTAPRPPTPEAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTTCGVLLLS LVITLYCNHRNRSKRSLHSDYNNMTFRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNEINLGRREEYDVLDRKRRGRDP EMGCKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPFR
357	CAR anti-CD33b 41BB coestim. Sin péptido señal	ETVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS PRLIIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIIYCHQYL SSRTFGQGTKLEIKGGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLQQPGAEEVVKPGASVK MSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYFGNDDISYNQKFQGGK TLTADKSSSTAYMQLSSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTITVTVS SSAAAFVPEFLPAKPTTTTAPRPPTPEAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSLHSD YNNMTFRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNEINLGRREEYDVLDRKRRGRDP EMGCKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPFR
340	Anti-PTK7 VH CDR1	SYGMH
341	Anti-PTK7 VH CDR2	VIWDDGSNKYYVDSVKG
342	Anti-PTK7 VH CDR3	DDYYGSGSFNSYYGTDV
343	Anti-PTK7 VL CDR1	RASQSVSIYLA
344	Anti-PTK7 VL CDR2	DASNRAT
345	Anti-PTK7 VL CDR3	QQRSNWPFPT
346	Anti-PTK7 V _H	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWDGGSNKYYVDSVKGRTTISRDNSENKNTLYLQMNLSRAED TAVYYCARDYYGSGSFNSYYGTDVWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
347	Anti-PTK7 V _L	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSIYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPPFTFGPGTKVDIK
348	Anti-PTK7 scFv (enlazador subrayado)	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWDDGSNKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDYYGSGSFNSYYGTDVWGQGT VTVVSSGGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSIYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFA VYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK
349	CAR anti-PKT7 CD28 coestim Con péptido señal	MALPVTALLLPLALLLHAARFQVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAA SGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLWVAVIWDDGSNKYYVDSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYYGSGSFNSYYGTD VWGQGT VTVVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSIYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARF SGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK SAAAFVVPFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSK RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKEYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSBS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRGRDFEMGGKPRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
358	CAR anti-PKT7 CD28 coestim Sin péptido señal	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWDDGSNKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDYYGSGSFNSYYGTDVWGQGT VTVVSSGGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSIYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFA VYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKSAAAFVVPFLPAKPTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSBSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR RERYDVLDRRRGRDFEMGGKPRKKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
350	CAR anti-PKT7 41BB coestim Con péptido señal	MALPVTALLLPLALLLHAARFQVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAA SGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLWVAVIWDDGSNKYYVDSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYYGSGSFNSYYGTD VWGQGT VTVVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSIYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARF SGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK SAAAFVVPFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRGRDFEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR
359	CAR anti-PKT7 41BB coestim Sin péptido señal	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWDDGSNKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDYYGSGSFNSYYGTDVWGQGT VTVVSSGGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSIYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFA VYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKSAAAFVVPFLPAKPTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKFRKKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRPGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Tabla 28. Secuencias de moldes donantes de AAV

161	ITR izquierda (5' ITR)	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGAC CAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGA GCCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCT
162	ITR izquierda (5' ITR) (alternativa)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGCTC GGGCGACCTTTGGTGGCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCT
163	ITR derecha (3' ITR)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTC GCTCACTGAGGCCGGCCGGSCAAAGCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGT CGCCCGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA
164	ITR derecha (3' ITR) (alternativa)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTC GCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGCC CGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
165	ITR-LHA (800bp)	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTEACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAA CGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTATAGTTCAAAAC CTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAAC TTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTTCTGCTAATGCCAGCCATAA GTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGG CCTTTTTCCCATGCTGCTTTTACTCTGCGCAGAGTTATATTGCTGGGGT TTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAASCAGTATTATTAAAGTAG CCCTGCATTTCAGGTTTCCCTTGAAGTGGCAGGCCAGGCCCTGGCCGTGAAC GTTCACTGAAATCATGGCTCTTGGCCAGATTTGATAGCTTGTGCTGTG CCCTGAGTCCAGTCCATCAGCAGCAGCTGCTTCTAAGATGCTATTTC CCGTATAAAGCATCAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGGCC TTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCTGGGGTGGGGGCAAGAGGG AAATGAGATCATGTCTTAACCCGTATCCTCTTGTCCACAGATATCCAG AACCCGTGACCTGCGGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACA AGTCTGTCTGCTATTACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTACACA AAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACGTGCTAGACATG AGGTCTATGGACTTCA
166	ITR-RHA (800bp)	TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAACACAGCA TTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCAGGTAAGGGCAGCTTTGG TGCCCTTCGAGGCTGTTTCCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCA GAGCTCTGCTCAATGATGTCTAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCC TTATCCATTGGCACCACAAACCTCTTTTACTAAGAAACAGTGAAGGCTT GTTCTGGCAGTCCAGAGATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAG GTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCCTCAGTCTCTCCAACAGATTTC CTGCTGCTGCTGCTTTGCTCAGACTGTTTGGCCCTTACTGCTCTTCTAG GCCTCATTTCTAAGCCCTTCTCCAAGTTGCTCTCTTATTCTCCCTG TCTGCCAAAAATCTTTCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCAC TCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCGGCACATGAATGCACAGGT GTTGAAGTGGAGGAATTAAGAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAA GCACCATTTCTASTTGGGGGAGCCCATCTGTGAGCTGGGAAAAGTCCAAA TAACCTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTAC CTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAA GATACAGCCCTACCAAGGCGAGGAGAGGACCCATAGAGGCCCTGGGA CAGGAGCTCAATGAGAAAGG
167	EF1a	GGCTCCGGTGCCCTCAGTGGGCGAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCG AGAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACCGGTGCTAGAGAAGGTG GCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTACTGGCTCCGCCCTTTT CCCCAGGGTGGGGGAGAACCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG TTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTG TGGTTCCCGCGGGGCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCT

		TGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCG GGTTGGAAAGTGGGTGGGAGAGTTCCAGAGCCTTTCGCTTAAGGAGCCCCCT TCGCCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCTTGGCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCG TGCGAATCTGTTGGCACCTTCGCGCTGTCGCTGCTTTGATAAAGTC TCTAGCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGG CAAGATACTCTTGTAATGCGGGCCAGATCTGCACACTGGTATTTCCG TTTTTTGGGGCCCGGGGGCGGACGGGGCCCGTGGCTCCAGCGCACATG TTCGGCGAGGGGGGGCTGCGAGCGCGGGCCACCGAGAATCGGACGGGGG TAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGGTGGCTGGCTTCGGCGCCCGCT GTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGCTCGGCACCAAGTTGC GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCGAGCGAGCTCAAAA TGGAGGACCGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAA GGAAAAGGGCTTTCCGTCCTCAGCGCTCGCTTCATGTTGACTCCACGGA GTACCGGGCGCGCTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGT ACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTTCCCC ACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA ATTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGGAGTTGGATCTTGGTTCATTCTC AAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCTG GA
168	CD19 LHA a RHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAA CGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAAC CTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAAC TTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTTCTGCTAATGCCAGCCATAA GTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGG CCTTTTTCCCATGCGCTGCCCTTACTCTGCCAGASTTATATTGCTGGGGT TTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAAATAGCAGTATTATTAAGTAG CCCTGCAATTTAGGTTTCCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCTGGCCCGTGAAC GTTCACTGAAATCATGGCTCTTGGCCAAAGATTGATAGCTTGTGCCCTGT CCCTGAGTCCCACTCCATCAGGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTTC CCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGGCAGCCCCACAGAGCCCCGCC TTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCTGGGTTGGGGCAAAGAGGG AAATGAGATCATGTCTTAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAG AACCCTGACCCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACA AGTCTGTCTGCTATTACCCGATTTTGATTTCTCAAACAAATGTGTACA AAGTAAGGATTTCTGATGTGTATATCACAGACAAAATCTGTCTAGACATG AGGTCTATGACTTCCAGCTCCGGTGCCCGTCACTGGGCGAGAGCGCACA TCGCCCCACAGTCCCCGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTTGAAACG GTGCTTAGAGAAGGTGGCGGGGTAAACTGGGAAAGTATGTCTGTGTA CTGGCTCCGCTTTTTTCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCA GTAGTCGCCGTEAACGTTCTTTTTCCCAACGGGTTTCCCGCCAGAACAC AGGTAAGTCCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCTGGCTCTTTACGGGTTA TGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTC TTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAAGTGGTGGGAGAGTTCCAGGGCCTTG CGCTTAAGGAGCCCTTCGCCCTCGTGTGAGTTGAGGCTTGGCTGGG CGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCG CTGCTTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGC GACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGGGGGCCAAGATCTG CACACTGGTATTTCCGTTTTTGGGGCCCGGGCGGCGACGGGGCCCGTG CGTCCCAAGCGCACATGTTGGCGAGGCGGGGCTTGGAGCGCGGGCCACC GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCGGCTGCTCTGGTGCCT GGCTTCGCGCGCGCTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCC GGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGC TGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCTCGGGAGAGCGGGCGGGT GAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCTTTCCGTCCTCAGCCGTGCTT CATGTGACTCCACGGAGTACGGGGCGCGTCCAGGCACCTCGATTAGTT CTCGAGCTTTTGGASTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTAT GCGATGGAGTTTCCCGACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG CTTGGCACTTGATGTAATTTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGGAGTTTGG ATCTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTT CCATTTCAAGGTGTCTGACCACCATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTT GCTTTCCGAACCTTCTCATCCAGCCTTCTTCTGATCCCCGATATTCA

		ATGACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCTCCTCACTGGGAGACCGAGTAA CAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCTCAATTGGTA CCAGCAGAAGCCCCGACGGAACGGTAAAACTCCTCATCTATCATACGTCA AGGTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGATTTTCAGGTTCTGGGAGCGGAA CTGACTATTCTTGACTATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGACATTGCGAC ATATTTTTGTCAACAAGGTAATACCTCCCTTACACTTTTCGGAGGAGGA ACCAAACTCGAAATTACCGGGTCCACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCA GTGGAGAAGGTTCCACTAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCCC CGGTCTCGTTGCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACGTGCACAGTGAGT GGTGTATCATTPGCTGATTATGGCGTCTCCTGGATAAGSCAGCCCCCGC GAAAGGGTCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTA TTATAACTCCGCTCTCAAAAGTCGCTTGACGATAATAAAAGATAACTCC AAGAGTCAAGTTTTCTTAAATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACCG CTATATATTATTGTGCTAAACATTATTACTACGGCGGTAGTTACGCGAT GGATTATTGGGGGCAGGGGACTTCTGTCAAGTCACTAGTGTCTGCTGCC TTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACTCCCGCCCCCGC GCCCTCCGACACCCGCTCCCAOCATCGCTCTCAACCTCTTAGTCTTCG CCCCGAGGCATGCCGACCCGCGCGGGGGTGTCTTATACGAGGGGC TTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGT CGCGCGTCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAG GAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATG ACTCCTCGCCGGCCTGGGCGGACAAGAAAACATTACCAACCTATGCCC CCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAGTGAAGTTTTCCCGAAG CGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAA CTGAATTTGGGACGCCCGGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGG GGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGA AGGACTCTACAATGAACCTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCCTACTCA GAAATAGGTATGAAGGGCGAAGCAGCAGCGGGGAAAGGTCACGATGGCC TCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTACGATGCACTGCA TATGCAGGCCCTGCCTCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCATCGAAG ATGGATGTGTGTTGGTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGC ATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTC CCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGACGCTGTTTCTCTG CTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAA AACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCCTTATCCATTGCCACCAAAACCT CTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCGSCAGTCCAGAGAATGAC ACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCC CAGCCTCAGTCTCTCCAACAGGTTCTGCTGCTGCTGCTTTGCTCAGA CTGTTTGGCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCCTCATTCTAAGCCCTTCTCC AAGTTGCTCTCTTATTCTCTCTGCTGCTGCAAAAAATCTTCCAGC TCACTAAGTCAGTCTCAGCAGTCACTCATTAACCCCACTGATGAT TGTGCCGGCAGATGAATGCAACAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAGG TCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCC CATCTGTGAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTT TAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAG GGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAG GGAGAGGACCTATAGAGCCCTGGGACAGGAGCTCAATCAGAAAGG
169	CD70 LHA a RHA (scFv CD70B con 41BB)	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCCTTATATCGAGTAA CGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAAC CTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAAC TAAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTTCTGCTAATGCCAGCCTAA GTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGTCTTGTGCGG CCTTTTTCCCATGCTGCTTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGT TTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAGAATAAGCAGTATTATTAAAGTAG CCCTGCATTTCAGGTTTCTTGAAGTGGCAGGCCAGGCTGGCGTGAAC GTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCTGT CCCTGAGTCCCAGTCCATCACAGCAGCTGGTTTTCTAAGATGCTATTTT CCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGGCAGCCCCACAGAGCCCCGCCC TTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAGAGGGG AAATGAGATCATGTCTAACCCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAG AACCTGACCCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAATCCAGTGACA

	AGTCTGTCTGCCTATTCAACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAACA AAGTAAGGATTTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATG AGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGGCCCTCACTGGGCAGAGCGCACA TCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGSGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCG GTGCCATAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTATA CTGGCTCCGCCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCA GTAGTGGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTCGCCGCCAGAACAC AGGTAAAGTGCUGTGTGTGGTTCCCGCGGGGCTGGCCTCTTTACGGGTTA TGGCCCTTGGCTGCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTC TTGATCCCGAGCTTCGGGTGGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCCGAGGCCTTG CGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCTCGTGTGCTTGAAGTTGAGGCCTGGCCTGGG CGCTGGGGCCCGCGCGTGGCAATCTGGTGGCACTTCGCGCCTGTCTCG CTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTTTGATGACCTGCTGC GACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGGGGGCCAAGATCTG CACACTGGTATTTCCGTTTTTTGGGGCCCGCGGGCGAGCGGGCCCGTG CGTCCACAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGGGGCTTCCGAGCGCGGCCAACC GAGAATCCGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGGCTGCTCTGGTGGCT GGCTTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCTTGGGCGGCAAGGCTGGCCC GGTCCGCACCASTTGCCTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGC TGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACCGCGGCTCGGGAGAGCGGGCGGGT GAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTGGCTT CATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGCTCCAGGCACCTCGATTAGTT CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTAT GCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG CTTGGCACTTGATGTAATTTCTCTTGGAAATTTGGCCCTTTTGGAGTTTGG ATCTTGGTTCAATTTCAAGCCTCAGACASTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTT CCATTTCAGGTGTCTGTGACCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCT CCTCCCTTTGGCGCTGTGTCTCCACGCAGCAAGGCCGAGGTCCAGTTG GTGCAAGCGGGCGGAGGTGAAAAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGT OCTGTAAGGCTTCCGTTTATACGTTCAACGAACACGGGATGAATGGGT TCGCCAAAGCGCGCGGCGGAGGACTGAAATGGATGGGGTGGATAAATAACC TACACCGCGGAACCTACATAACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTA TGACGCGCGATACCAGCATATCCACCGCATACATGGAGCTGTCCCGACT CCGGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATTGTCTCGGGACTATGGCGAT TATGGCATGGACTACTGGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAGTG CTGGAGCGGCACTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGCGGCTTCTGCTGA CATAGTTATGACCCAATCCCCAGATAGTTTGGCGGTTTTCTCTGGGCGAG AGGGCAACGATTAATTTGTCCGCGATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGAT ATTCTTTTATGCAATTGTTACCAGCAAAAACCCGGACAACCGCCGAAGCT GCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGGGGTSCCGGACCGATTT TCTGGTAGTGGAAAGCGGAAGTGAATTTAGGCTCAGGATCAGTTCACTGC AGGCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAACTCCC CTGGACCTTCGGTCAAGGCAAGAAAGTAGAAATTAAGAGTGTCTGCTGCC TTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCAAGCTCCCGCCCCGC GCGCTCCGACACCCGCTCCCAACATCGCTCTCAACCTCTTAGTCTTTCG CCCCCAGGCATGCCGACCCGCGCGGGGGTGTCTTATACGAGGGGC TTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGT GCGGCGTCTTTTTGTGTGCTACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAG GAATCGCAACCGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA TTTATGAGACCACTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCC GATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGGCGAGTGAAGTTTTTC CCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTAT AACGAACTGAATTTGGGACGCGCGGAGGASTATGACGTGCTTGATAAAC GCGGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGATCC CCAAGAAGGACTCTACAATGAAGTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCC TACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAAGCAGCAGGGGAAAGGTACAG ATGGCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTACGATGC ACTGCATATGCAGGCCCTGCTCCAGATAATAATAAATCGCTATCCA TCGAAGATGGATGTGTGTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGA CTTTGCATGTGCAACGCCCTTCAACAACAGCATTAATCCAGAAGACACC TTCTTCCCAGCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGAGGCTGTT
--	---

		TCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGAT GTCFAAACTCCTCTGATPGGTGGTCTCGGCCCTTATCCATTGGCCACCAA AACCCCTCTTTTACTAAGAAACASTGAGCCTPTGTTCTGGCAGTCCAGAG AATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGGCAC GTGGCCCGAGCCTCACTCTCTCCAACTGASTTCTCTGCTGCTGCTGCTTTG CTCAGACTGTTTGGCCCCCTACTGCTCTTCTAGGCCCTCATTCTAAGCCCC TTCTCCAASTTGGCTCTCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAATCTTT CCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCAGCCAGTCACTCATTAAUCCACCAATC ACTGATTGTGCCGGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATT AAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGG GGAGCCCATCTGTCACTGGGAAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAAT GTGTTTAACTCAGGGTTGAGAAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCA GGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAA GGGCAGGGAGAGGACCTATAGAGGCCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAA AGG
170	BCMA RHA a LHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGTCTCAAGGCCCTATATCGAGTAAA CGGTAGTGTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAAC CTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAAC TTAATGCCAACATACATAAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAGCCCTAA GTTGGGGAGACCCTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGTCTTGTCTGGG CCTTTTTCCTATGCTGCTGCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGT TTTGAAGAAGATCCTATTTAAATAAAAAGAAATAGCAGTATTATTTAAGTAG CCCTGCAATTCAGGTTTCTCTGAGTGGCAGGCCAGGCCCTGGCCGTGAAC GTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCTGT CCTGAGTCCCACTCCATCAGGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTTC CCGTATAAAGCATGAGACCGTGAATTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCC TTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAGAGGG AAATGAGATCATGTCTTAACCCCTGATCTCTTGTCCACAGATATCCAG AACCTGACCCCTGCGGTGTACCACTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACA AGTCTGTCTGCCATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTCTCACA AAGTAAGGATPTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATG AGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGGCCGCTCAGTGGGCAGAGCGCACA TCGCCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACCG GTGCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTATA CTGGCTCCGCTTTTTCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCA GTAGTGGCCGTGAACCTTCTTTTCGCAACGGGTTTGGCCGCCAGAACAC AGGTAAAGTGCCGTGTGTGTTCCCGCGGGCTTGGCCTCTTTACGGGTTA TGGCCCTTGGCTGCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCT TTGATCCCGAGCTTGGGCTTGGAACTGGGTGGGAGAGTTCCAGGCCCTTG CGCTTAAGGAGCCCTTCCGCTCTGTGCTTGAATTGAGGCCTGGCCTGGG CGCTGGGSCCGCGCTGCGAATCTGGTGGCACCCTTCCGCGCTGTCTCG CTGCTTTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTGTATGACCTGTCTGC GACGCTTTTTCGTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCCAAGATCTG CACACTGGTATTTCCGTTTGTGGGCGCGCGGGCCGACGGGGCCCTG CGTCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGGCGGGGCTTGGAGCGCGGGCCACC GAGAAATCGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT GGCCTCGCGCGCGCTGTATCGCCCCGCTTGGGCGGCAAGGCTGGCCC GGTCGGCACCASTTGGCTGAGCGGAAAGATGGCGGCTTCCCGGCCCTGC TGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACCGGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGT GAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTGCTT CATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGCTCCAGGCACCTCGATTAGTT CTCGAGCTTTTGGAGTACCTGCTCTTTAGCTTGGGGGGAGGGGTTTTAT GCGATGGASTTTCCCCACACTGASTGGGTGGGAGTGAAGTTAGGCCAG CTTGGCACTTGATGTAATPTCTCTTGGAAATTTGCCCTTTTGTAGTTTGG ATCTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTT CCATTTCAAGTGTCTGTGACCCATGGCGCTTCCGGTGACAGCAGTGTCT CCTCCCCCTGGCGCTGTGTCTCCACGACGCAAGCGGACAGTGCAGCTG GTGCAAGGCGGAGCCGAGCTCAAGAAAGCCCGGAGCTCTCGTGAAGGTGA GCTGCAAGGCGGAGCGGCAACACCCCTGACCAACTACGTGATCCACTGGGT GAGACAAGCCCCCGGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGCTACATCCTGCCC

		TACAACGACCTGACCAAGTACAGCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCA TCACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCT GAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGTACAAGGTGGGACTGGGAC GGCTTCTTTGACCCCTGGGGCCAGGGCACAACAGTGACCGTCAGCAGCG GCGGCGGAGGCGAGCGCGCGCGCGGCGGCGGAGGCGGAAGCGAAAT CGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGG GCCAGCATCTCTGACAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGCA ACACCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAGACCCGGACAGGCTCCAGGCT GCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGGTTCTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTT AGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAGCGTGG AGTCCGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCAGCCACATCCC TTACACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAAAGTGCTGCTGCC TTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACACGACTCCCGCCCCGC GCCCTCCGACACCGCTCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCG CCCCGAGGCATGCCGACCCGCGCGCGGGGTGCTGTTCAACGAGGGG TTGGACTTCGCTTGTGATATTACATTTGGGCTCCCTTGGCGGGTACGT CGCGCGTCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAG GAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA TTTATGAGACCACTACAACTACTCAASAGGAAGATGGCTGTAGCTGCC GATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTCCGAGTGAAGTTTTC CCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTAT AACGAAGTGAATTTGGGACGCGCGGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAAC GCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCC CCAAGAAGGACTCTACAATGAAGTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCC TACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCAAG ATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTACGATGC ACTGCATATGCAGGCCCTGCCCTCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCA TCGAAGATGGATGTGTGTGTTGTTTGTGTGTGGAGCAACAATCTGA CTTGTGATGTGCAAAACGCTTCAACAACAGCATATTCCAGAAGACACC TTCTTCCCCAGCCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCCGAGGCTGT TCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGAT GTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAA AAACCCTCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTCTTCTGGCAGTCCAGAG AATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCAC GTGGCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGAATTCCTGCCCTGCCCTTTG CTCAGACTCTTTGCCCTTACTGCTCTCTAGGCCCTCATTTCAAGCCCC TTCTCCAAGTTGCCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAATCTTT CCAGCTCACTAAGTCAGTCTCAGCGAGTCACTCATTAACCCACCAATC ACTGATTTGTGCGGCACATGAATGCACAGGTTGTTGAAGTGGAGGAAT AAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGG GGAGCCCATCTGTGAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAAT GTGTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTCAGGACAAAAGTCA GGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACAGCCCTACCAA GGGCAGGAGAGGACCTATAGAGGCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAA AGG
351	CAR anti-CD33 Donante LHA a RHA CD28 coestim.	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTCACTTGTCTCAAGGCCCTATATCGAGTAAA CGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAAC CTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAAC TTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTTCTGCTAATGCCAGCCTAA GTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGG CCTTTTCCCATGCCCTGCCCTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGT TTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAAGTAG CCCTGCAATTTAGGTTTCTTGTGAGTGGCAGGCCAGGCCCTGGCCGTGAAC GTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGT CCCTGAGTCCAGTCCATCAGCAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTC CCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTCCAGCCCCACAGAGCCCGCCCC TTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAGAGGG AAATGAGATCATGTCTAACCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAG AACCTTGACCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACA AGTCTGTCTGCCATTACCGATTTTGATTCTCAACAAATGTGTACA AAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATG

	AGGTCTATGGACTTCAGggtccgggtgcccgtcagtgggcagagcgcaca tcgcccacaggtcccgagaaagtctgggggggaggggtcggcaattgaaccg gtgcctagagaaggtggcgcggggtaaaactgggaaagtgatgtcgtgta ctggctccggccctttttcccgaggggtgggggagaaaccgtatataagtga gtagtgcgctgaaacgttctttttcgcaacgggtttgcccgcagaacac aggtaagtgcgctgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggtta tggcccttgctgccttgaattacttccactggctgcagtaagtgtatc ttgatcccgagcttccgggttggaagtgggtgggagaggttcgaggcccttg cgcttaaggagcccttcgcctcgtgcttgagttgaggccctggcctggg cgctggggcgcgccgctgcgaatctgggtggcaccttcgcgcctgtctcg ctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgc gacgctttttttctggcaagatagctcttgtaaattgcggggccaagatctg cactctggatatttcgggtttttggggcgcgggggcgagcggggcccgtg cgctccagcgcacatgttccggcgagggcggggctgcgagcgcggccacc gagaatcggagcggggttagtctcaagctggcggcctgctctggtgcct ggcctcgcgcccgctgtatcgccccgcctgggggggcaaggctggccc ggctcgccaccagtttgctgtgagcggaaagatggccgttcccgccctgpc tgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcggtg gagtcacccacacaaaggaaaaggccctttccgtcctcagccgtcgctt catgtgactccacggagtaacggggcgccgtccaggcacctcgattagtt ctcgagcttttggagtaagtcgtcttttaggttggggggaggggtttttat gagatggagtttcccccacactgagtggtgggagactgaagttaggccag cttggcacttgatgtaattctccttgggaatttgcccttttttgagtttg atcttgggttcattctcaagcctcagacagtygttcaaaagttttttctt ccatttcagggtgtcgtgaCCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCT CCTCCCCCTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGGAATCGTCCCTC ACACAATCCCCGGGGAGCCTCGCAGTCAGTCTTGGGGAACGAGTCACTA TGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTGTTTTTTTTCTCAAGTAGCCAGAAGAA CTACCTCGCATGGTACCAACAAATACCGGGGCAATCTCCCCGCTTGCTT ATATACTGGGCAAGTACCCGCGAATCCGGCGTACCGGATCGATTCAAGG GATCTGGGTCAAGTACTGATTTCACTTTGACTATCAGCTCTGTTCAAGC TGAAGATTTGCCAATTTACTACTGTCAACCAATACTTGAGTAGCCGAAGT TTCGGCCAGGGCACGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGGAGGTTCTG GTGGGGGCGGTTCTGGCGGTGGAGGAAGCCAAGTACAGTTGCAACAGCC AGGGGGCGGAGGTGTAATAACCTGGGGCGTCTGTCAAGATGAGCTGTAAA GCAAGTGGATACACCTTCACCTCTACTATATACATTGGATTAAAGCAAA CTCCGGGTCAAGGGCTGGAATGGGTGGCGTTATATACCCCGGGAACGA TGATATATCATACAAACAAAATTTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTGCC GATAAGAGTAGCACACAGCTTACATGCAGCTTTCTTCCCTGACCAAGC AAGATTCAGCASTTTACTACTGCGCTCGGGAAGTGCGCTGCGATACTT TGATGTCTGGGGTCAAGGAACACTACAGTTACTGTATCAAGCAGTGCTGCT GCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCAAGACTCCCGGCC CGCGCCCTCCGACACCCGCTCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCT TCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCGCGCGGGGTGCTGTTCATACGAGG GGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTA CGTGGGGCGTCTTTTGTGTCTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAAECA CAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAAT ATGACTCCTCGCGGGCTGGGCCGACAAGAAAACATTTACCAACCCATG CCCCCCCAGGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAGTGAAGTTTCCCG AAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAAC GAAGTGAATTTGGGACGCCCGGAGGAGTATGAGTGTCTGTATAAACGCC GGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCGGAAGAAAGAAATCCCCA AGAAGGACTCTACAATGAAGTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTAC TCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAGGTACAGATG GCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTACGATGCAT GCATATGCAGGCCCTGCCTCCAGATAATAATAAATCGCTATCCATCG AAGATGGATGTGTGTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTT TGCATGTGCAACGCCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTC TTCCCCAGGCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGAGGCTGTTTCC TTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTC TAAACCTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTTGCCACCAAAAC
--	--

		CCTCTTTTTTACTAAGAAACAGTGGACCTTGTCTCTGGCAGCTCCAGAGAAAT GACACGGGGAAGAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCAGCTG GCCCCAGCTTCACTCTCTCCAACTGAGTTCTCTGCTGCTGCTCTTTGCTC AGACTGTTTGGCCCTTACTGCTCTTCTAGGCTTCATTCTAAGCCCCCTTC TCCAAGTTGCTCTCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAATCTTTCCC AGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCGAGTCACTCATTAAACCCACCAATCACT GATTCTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGA GCCCCATCTGTGAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTG TTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGG AAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGG CAGGGGAGAGACCTATAGAGGGCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG GAGATGTAAGGAGCTGCTGTCACTTGTCTCAAGGCCCTTATATCGAGTAAA CGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCGAGGTGTTCTGATTATAGTTCAAAAC CTCTATCAATGAGACAGCAATCTCTGTAATGTATAGATTTCCTCAAC TTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTTCTGTAATGCCAGCCTAA GTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGG CCTTTTTTCCCATGCTGCTTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGT TTTGAAGAGATCCTATTAATAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAG CCCTGCATTTCAGGTTTCTTGAAGTGGCAGGCCAGGCCCTGGCCGTGAAC GTTCACTGAAATCATGGCTCTTGGCCAGATTGATAGCTTGTGCTGT CCCTGAGTCCCACTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTT CCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGGCAGCCCCACAGAGCCCCGGCC TTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGG AAATGAGATCATGTCTTAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAG AACCCTGACCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACA AGTCTGTCTGCTTATTCAACGATTTTGATTCTCAACAAATGTGTACA AAGTAAGGATTCTGATGTCTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATG AGGTCTATGGACTTCAggtccggtgcccgtcagtgggcagagcgcaca tcgcccacagtcacccgagagagttgggggggaggggtccggaattgaacgc gtgcctagagaaaggtggcgccgggttaaacctgggaagtgatgtcgtgta ctgggtccgccttttcccgagggtggggggagaaacccgtatataagtgca gtagtcgcccgtgaacgtttcttttgcgaacgggtttgcccgcagaaacac aggttaagtgccgtgtgtgtgttcccgccgggctggcctctttacgggtta tggcccttgccgtgcttgaattacttccactggctgcagtaagtgattc ttgatcccgagcttcgggttgggaagtggttgggagagttcagagcccttg cgcttaaggagccctctcgccctcgtgcttgagttgagggcctggcctggg cgctggggccgcgcgcgtgcgaatctggtggcaccttcgogccctgtctcg ctgctttcgataagtccttagccattttaaatttttgatgaacctgctgc gaagcttttttctggcaagatagttctgtaaatgcggggccaagatctg cacactgggtatttcggtttttggggccgcggggcgggcagcggggcccggtg cgtccacagcgcacatgttcggcgagggcggggcctgcgagcgcggccacc gagaatcggacgggggttagtctcaagctggccggcctgctctggtgctt ggcttcgcgcgcgcgtgtatcgcccccctggcgccgcaaggctggccc ggtcgggagctcgaatggtgagcgggaagatggcgcttcccgccctgc tgacgggagctcaaaatggaggacgcggcgctcggggagagcgggcgggt gagtcacccacacaaaggaaaaaggcccttccgtcctcagccgtcgtt catgtgactccaagagtagtaccggggcgccgtccaggcacctcgattagtt ctcgagcttttggagtagctcgtcttttaggttggggggaggggttttat gcgatggagtttccccacactgagtggttggagactgaagtttagggccag cttggcacttgatgtaattctccttggaaatttgccttttttaggttgg atcttgggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaggttttttctt ccatttcaggtgtcgtgaacacCATGGCGCTTCCGGTCAACGCACTGCT CCTCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCGAGCAAGGCCGGAAATCGTCTC ACACATCCCCGGGGAGCCTCGCAGTCAGTCTTGGGGAACGAGTCACTA TGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTGTTTTTTTCTCAAGTAGCCAGAAGAA CTACCTCGCATGGTACCAACAAATACCGGGGCAATCTCCCCGCTTGCTT ATATACTGGGCAAGTACCCCGCAATCCGGGCTACCGGATCGATTACGG GATCTGGTCAAGTACTGATTTCACCTTTGACTATTCACTCTGTTCAAGC TGAAGATTGGCAATTTACTACTGTACCAATACTATTGATTGATGCGCAACT TTCCGGCCAGGGCACGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGGGAGGTTCTG
352	CAR anti-CD33b Donante LHA a RHA 41BB coestim.	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTCACTTGTCTCAAGGCCCTTATATCGAGTAAA CGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCGAGGTGTTCTGATTATAGTTCAAAAC CTCTATCAATGAGACAGCAATCTCTGTAATGTATAGATTTCCTCAAC TTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTTCTGTAATGCCAGCCTAA GTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGG CCTTTTTTCCCATGCTGCTTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGT TTTGAAGAGATCCTATTAATAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAG CCCTGCATTTCAGGTTTCTTGAAGTGGCAGGCCAGGCCCTGGCCGTGAAC GTTCACTGAAATCATGGCTCTTGGCCAGATTGATAGCTTGTGCTGT CCCTGAGTCCCACTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTT CCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGGCAGCCCCACAGAGCCCCGGCC TTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGG AAATGAGATCATGTCTTAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAG AACCCTGACCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACA AGTCTGTCTGCTTATTCAACGATTTTGATTCTCAACAAATGTGTACA AAGTAAGGATTCTGATGTCTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATG AGGTCTATGGACTTCAggtccggtgcccgtcagtgggcagagcgcaca tcgcccacagtcacccgagagagttgggggggaggggtccggaattgaacgc gtgcctagagaaaggtggcgccgggttaaacctgggaagtgatgtcgtgta ctgggtccgccttttcccgagggtggggggagaaacccgtatataagtgca gtagtcgcccgtgaacgtttcttttgcgaacgggtttgcccgcagaaacac aggttaagtgccgtgtgtgtgttcccgccgggctggcctctttacgggtta tggcccttgccgtgcttgaattacttccactggctgcagtaagtgattc ttgatcccgagcttcgggttgggaagtggttgggagagttcagagcccttg cgcttaaggagccctctcgccctcgtgcttgagttgagggcctggcctggg cgctggggccgcgcgcgtgcgaatctggtggcaccttcgogccctgtctcg ctgctttcgataagtccttagccattttaaatttttgatgaacctgctgc gaagcttttttctggcaagatagttctgtaaatgcggggccaagatctg cacactgggtatttcggtttttggggccgcggggcgggcagcggggcccggtg cgtccacagcgcacatgttcggcgagggcggggcctgcgagcgcggccacc gagaatcggacgggggttagtctcaagctggccggcctgctctggtgctt ggcttcgcgcgcgcgtgtatcgcccccctggcgccgcaaggctggccc ggtcgggagctcgaatggtgagcgggaagatggcgcttcccgccctgc tgacgggagctcaaaatggaggacgcggcgctcggggagagcgggcgggt gagtcacccacacaaaggaaaaaggcccttccgtcctcagccgtcgtt catgtgactccaagagtagtaccggggcgccgtccaggcacctcgattagtt ctcgagcttttggagtagctcgtcttttaggttggggggaggggttttat gcgatggagtttccccacactgagtggttggagactgaagtttagggccag cttggcacttgatgtaattctccttggaaatttgccttttttaggttgg atcttgggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaggttttttctt ccatttcaggtgtcgtgaacacCATGGCGCTTCCGGTCAACGCACTGCT CCTCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCGAGCAAGGCCGGAAATCGTCTC ACACATCCCCGGGGAGCCTCGCAGTCAGTCTTGGGGAACGAGTCACTA TGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTGTTTTTTTCTCAAGTAGCCAGAAGAA CTACCTCGCATGGTACCAACAAATACCGGGGCAATCTCCCCGCTTGCTT ATATACTGGGCAAGTACCCCGCAATCCGGGCTACCGGATCGATTACGG GATCTGGTCAAGTACTGATTTCACCTTTGACTATTCACTCTGTTCAAGC TGAAGATTGGCAATTTACTACTGTACCAATACTATTGATTGATGCGCAACT TTCCGGCCAGGGCACGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGGGAGGTTCTG

	GTGGGGGGGGTCTGCGGGTGGGAGGAAGCCAGTACAGTTGCAACAGCC AGGGGCGGAGGTCGTAAAAACCTGGGGCGTCTGTCAAGATGAGCTGTAAA GCAAGTGGATACACCTTCACCTCCTACTATATACATTGGATTAAAGCAA CTCCGGGTCAGGGGCTGGAATGGGTGGCGTTATATACCCCGGGAACGA TGATATATCATACAACCAAAAAATTTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTGCC GATAAGAGTAGCACAACAGCTTACATSCAGCTTTCTTCCCTGACCAGCG AAGATTGAGCAGTTTACTACTGCGCTCGGGAAGTGC9CCTGCGATACTT TGATGTCTGGGGTCAAGGAACCTACAGTTACTGTATCAAGCAGTGCTGCT GCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCAGACTCCCCCCCC CGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCAACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCT TCGCCCCGAGGCATGCGGACCCGCGCGCGGGGGTGTGTTTCATACGAGG GGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGGCTCCGTTGGCGGGTA CGTGGCGGCTCCTTTTGTGTCTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCA CAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAA CCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCT GCGATTTCAGAGAAGAAGAAGAGGAGATGTGAAGTGGAGTGAAGTT TTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTG TATAACGAACTGAATTTGGGACGCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATA AACGCGGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAA TCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAAGTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAG GCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAAGCAGCAGCGGGGAAAAGGTC ACGATGGCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTACGA TGCCTGCATATGCAGGCGCTGCTCCAGATAATAATAAAATCGCTAT CCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTFTTGTGTGTGGAGCAACAAATC TGACTTTGCATGTGCAAAACGCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGAC ACCTTCTTCCCGAGCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGAGGCT GTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGCTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAAT GATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCTTATCCATTGCCAC CAAAACCTCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTCTGCGAGTCCA GAGATGACACGGGAAAAAACAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGG CACGTGGCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGAAGTTCCTGCCTGCCTGCCT TTGCTCAGACTGTTTCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGC CCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAATC TTTCCAGCTCACTAAGTCACTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCA ATCACTGATTGTGCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGA ATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTT GGGGAGCCCATCTGTCAAGTGGGAAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGG AATGTCTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAG TCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTAC CAAGGGCAGGAGAGGACCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGA GAAAGG
--	--

Tabla 29. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg REG1-Z01

Secuencia específica de referencia*: GATGGGAGCAACG (TGG) CCAT (SEQ ID NO: 104)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
181	GATGGGAGCAACGTTGGCCAT	46.1	43.9	45.0	1.6
	-----GTGGCCAT	6.5	4.3	5.4	1.6
182	GATGGGAGC-ACGTGGCCAT	4.1	4.9	4.5	0.6
	GA-----TGGCCAT	3.5	3.9	3.7	0.3
	-----	3.3	3.7	3.5	0.3
183	GATGGG----AACGTGGCCAT	2.6	3.6	3.1	0.7
184	GATGGGA-----GCCAT	3.6	2.1	2.8	1.1

	-----CAT	2.4	1.8	2.1	0.4
	-----CGTGGCCAT	1.4	1.2	1.3	0.1
185	GATG-----GGCCAT	1.1	1.3	1.2	0.1
	GAT-----	0.9	1.1	1.0	0.1
	GATGG-----	0.7	1.2	1.0	0.4
186	-----ACGTTGGCCAT	1.1	0.5	0.8	0.4

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

5 ^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

Tabla 30. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg REG1-Z02

Secuencia específica de referencia ^a : CCGCGGGACTAGAGGGAGCT (GGG) AGCT (SEQ ID NO: 268)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
187	CCGCGGGACT T AGAGGGAGCT	49.2	39.4	44.3	6.9
188	CCGCGGGA-----GCT	11.9	11.5	11.7	0.3
	-----	2.6	4.6	3.6	1.4
	CCGCGGG-----	2.1	3.4	2.8	0.9
	-----T	2.1	2.0	2.0	0.1
189	CCGCGGGA~TAGAGGGAGCT	1.7	1.8	1.8	0.1
190	CCGCGGGACT-----	1.8	1.3	1.6	0.4
191	CCGCGGG--TAGAGGGAGCT	1.0	1.6	1.3	0.4
192	CCGCGGG-----GAGCT	1.1	1.3	1.2	0.1
193	CCGCGGGAC~AGAGGGAGCT	1.0	1.2	1.1	0.1
194	CCGCGGGACT~GAGGGAGCT	1.3	0.9	1.1	0.3
195	CCG-----AGGGAGCT	1.2	0.9	1.0	0.2
196	CCGCGGGA-----GGGAGCT	0.8	1.1	1.0	0.2
197	CCG-----TAGAGGGAGCT	0.3	1.1	0.7	0.6

10 ^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

15 Tabla 31. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg REG1-Z03

Secuencia específica de referencia ^a : CGCTCCCGCTCGG (TGG) CTGT (SEQ ID NO: 274)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
198	CGCTCCCGCTCGGCTGGCTGT	41.3	38.6	40.0	1.9
	C-----TGT	7.9	7.8	7.8	0.1
	CGCTCCCG-----	7.9	7.5	7.7	0.3
199	CGCTCCCGC-CGGTGGCTGT	3.3	3.7	3.5	0.3
	-----	2.7	3.7	3.2	0.7
200	CGCTCCCG-TGGTGGCTGT	2.8	3.7	3.2	0.6
201	CGCTCCCGC--GGTGGCTGT	2.3	2.8	2.6	0.4
	-----T	1.7	3.0	2.4	0.9
202	CGCTCCCGCT-GGTGGCTGT	2.2	2.4	2.3	0.1
	-----GCTGT	2.3	1.7	2.0	0.4
203	CGCTCC--TCGGTGGCTGT	1.6	1.8	1.7	0.1
204	CGCTCCCGCTTCGGTGGCTGT	1.1	1.4	1.2	0.2
205	CGCTCCCG-----GTGGCTGT	1.3	0.8	1.0	0.4

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

5 ^b Las delecciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

Tabla 32. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg REG1-Z04

Secuencia específica de referencia ^a : CATCACGACGGT (GGG) TGGC (SEQ ID NO: 280)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
206	CATCACGA--CGTGGGTGGC	34.0	32.9	33.4	0.8
207	CATCA-----CGTGGGTGGC	7.7	6.2	7.0	1.1
	-----	2.9	3.8	3.4	0.6
208	CATCACGACGCCGTGGGTGGC	2.5	4.2	3.4	1.2
209	CATCACGAC-----GTGGC	3.1	3.6	3.4	0.4
210	CATCACGACGGCGGTGGGTGGC	2.3	3.4	2.8	0.8
	CATCACGA-----	2.3	2.4	2.3	0.1
211	-----CGTGGGTGGC	1.5	1.7	1.6	0.1
212	CATCACGACG---TGCTGGC	1.8	1.2	1.5	0.4
213	CATCACGACGTCGTGGGTGGC	1.5	1.2	1.4	0.2
	CATCACGAC-----	1.7	1.1	1.4	0.4
	-----C	1.5	1.2	1.4	0.2
	-----GGTGGC	1.1	1.3	1.2	0.1
	-----TGGC	1.1	1.0	1.0	0.1
214	CATCACGAC-----GGGTGGC	0.7	1.3	1.0	0.4
	CATCA-----	0.9	1.1	1.0	0.1
215	CATCACGAC-----GGTGGC	1.1	0.7	0.9	0.3

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

Tabla 33. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg REG1-Z05

Secuencia específica de referencia ^a : CACGACGCGTGGG (TGG) CAAG (SEQ ID NO: 286)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
216	CACGACGCGT T GGGTGGCAAG	58.4	50.0	54.2	5.9
	CACGAC-----G	5.5	7.8	6.6	1.6
217	CACGACGC--GGGTGGCAAG	1.7	3.7	2.7	1.4
218	CACGAC-----GCAAG	2.2	2.8	2.5	0.4
219	CACGACGC-----GTGGCAAG	2.4	1.5	2.0	0.6
220	CACGACGCG- G GGTGGCAAG	1.6	1.9	1.8	0.2
	-----	1.4	1.5	1.4	0.1
	CACGA-----	1.0	1.4	1.2	0.3
	CACGACGC-----	0.9	1.3	1.1	0.3

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

Tabla 34. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg REG1-Z06

Secuencia específica de referencia ^a : TCTGACGGGATCG (TGG) TTTC (SEQ ID NO: 292)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
221	TCTGACGGGA A TCGTGGTTTC	28.1	21.9	25.0	4.4
222	TCTGACG-----CGTTTC	7.0	7.4	7.2	0.3
223	TCTGA-----CGTGGTTTC	7.3	7.2	7.2	0.1
224	TCTGACGGGAT T CGTGGTTTC	5.4	2.6	4.0	2.0
225	TCTGACGGGA- C GTGGTTTC	4.2	2.8	3.5	1.0
226	TCTG-----TCGTGGTTTC	3.5	3.1	3.3	0.3
	TCTG-----	2.3	3.4	2.8	0.8
	-----	2.4	3.1	2.8	0.5
	-----TC	2.9	2.2	2.6	0.5
227	TCTGAC-----GGTTTC	2.0	2.0	2.0	0.0
	TCT-----	1.5	2.3	1.9	0.6
228	TCTGACGGG-TCGTGGTTTC	1.7	2.1	1.9	0.3
229	TCTGACGGGAG T CGTGGTTTC	2.4	1.3	1.8	0.8
230	TCTGACGGGAC T CGTGGTTTC	1.5	1.8	1.6	0.2
231	-----TCGTGGTTTC	1.3	1.6	1.5	0.2
	-----C	1.0	1.5	1.2	0.4
232	TCTGACGG--TCGTGGTTTC	0.6	1.4	1.0	0.6
233	TCTGACGGGA--GTGGTTTC	1.2	0.5	0.8	0.5

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

Tabla 35. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg REG1-Z07

Secuencia específica de referencia ^a : CCACGCGTCGTGA (TGG) TGFG (SEQ ID NO: 298)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
234	CCACGCGTCGGTGAIGGTGTG	15.1	12.9	14.0	1.6
235	CCACGCGTCGTTGATGGTGTG	12.3	8.5	10.4	2.7
	-----	4.4	5.1	4.8	0.5
236	CCACGCGT-----GTG	4.9	4.4	4.6	0.4
	CCACGCGT-----G	3.6	3.0	3.3	0.4
237	CCACGCGTCGATGATGGTGTG	2.9	1.4	2.2	1.1
	CCACGCGTC-----	1.9	2.5	2.2	0.4
238	CCACGCGTCG--ATGGTGTG	2.2	2.1	2.2	0.1
239	CCACGCGTC-TGATGGTGTG	2.0	2.2	2.1	0.1
	CCAC-----	1.9	2.2	2.0	0.2
	C-----	2.2	1.9	2.0	0.2
240	CCACGCGTCGGTGAIGGTGTG	1.9	1.6	1.8	0.2
241	CCACGCGTCG-----	2.0	1.7	1.8	0.2
242	CCACGCGTCG-----GTGTG	1.7	1.7	1.7	0.0
243	CCACGCGTGG-----GTGTG	1.8	1.5	1.6	0.2
244	CCACGCGT---GATGGTGTG	1.4	1.3	1.4	0.1
	CCA-----	1.1	1.7	1.4	0.4
245	CCACGCGTCGTG-----TG	1.4	1.1	1.2	0.2
246	CCACGCGTCGTGA-----	1.2	1.1	1.2	0.1
	CCACGC-----	0.8	1.5	1.2	0.5
	CCACCG-----	1.1	0.9	1.0	0.1
	CCACG-----TGFG	0.8	1.2	1.0	0.3
247	CCACGCGTGG-----GTG	1.1	0.7	0.9	0.3

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

Tabla 36. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg REG1-Z08

Secuencia específica de referencia ^a : CCATCACGACGCG (TGG) GTGG (SEQ ID NO: 304)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
248	CCATCACGACCGCGTGGGTGG	28.0	15.4	21.7	8.9
249	CCATCA-----CGTGGGTGG	8.5	3.4	6.0	3.6
250	CCATC-----ACGCGTGGGTGG	4.4	2.4	3.4	1.4
	-----	2.3	1.8	2.0	0.4
	-----CGTGG	1.5	0.7	1.1	0.6
251	CCATCACGACAGCGTGGGTGG	1.3	0.2	0.8	0.8

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

Tabla 37. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg REG1-Z09

Secuencia específica de referencia ^a : <u>CCGTCAGACTCGT</u> (AGG) CCAG (SEQ ID NO: 310)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
	CCGTCAG-----	13.5	9.9	11.7	2.5
252	CCGTCAGACTTCGTAGGCCAG	11.3	8.5	9.9	2.0
253	CCGT-----AGGCCAG	7.5	8.3	7.9	0.6
254	CCGTCAGACT-----	6.9	6.1	6.5	0.6
255	CCGTCAGAC-----CAG	4.2	4.3	4.2	0.1
	-----	3.9	4.2	4.0	0.2
	CCGTCA-----	3.6	2.3	3.0	0.9
256	CCGTCAGAC--GTAGGCCAG	2.5	2.4	2.4	0.1
257	CCGTCAG-----GCCAG	1.9	2.4	2.2	0.4
	CCG-----CCAG	1.2	2.2	1.7	0.7
258	CCGTCAGAC-CGTAGGCCAG	1.7	1.4	1.5	0.2
	-----TAGGCCAG	1.0	1.4	1.2	0.3
259	CCGTCAGACT-GTAGGCCAG	1.5	1.0	1.2	0.4
	CCGTCAGA-----	1.6	0.7	1.2	0.6
	CCGTCAGAC-----	1.2	0.6	0.9	0.4

5 ^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

10 Tabla 38. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg REG1-Z10

Secuencia específica de referencia ^a : <u>GTGGGTGGCAAGC</u> (GGG) TGGT (SEQ ID NO: 316)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
260	GTGGGTGGCAAGCGGGTGGT	23.8	21.7	22.8	1.5
	GT-----GGGTGGT	20.7	22.9	21.8	1.6
	-----CGGGTGGT	10.4	7.7	9.0	1.9
261	GTGGGTGGGC-AGCGGGTGGT	7.0	6.5	6.8	0.4
	-----GTGGT	3.3	4.3	3.8	0.7
	GTG-----GGT	2.8	4.0	3.4	0.8
	-----CGGGTGGT	2.6	3.3	3.0	0.5
	-----	2.0	3.5	2.8	1.1
	GTGGGTGGC-----	2.4	1.8	2.1	0.4
262	GTGGGTGGCATAGCGGGTGGT	1.8	1.8	1.8	0.0
	GTGGGTG-----	1.6	1.5	1.6	0.1
	GTGG-----	1.5	1.8	1.6	0.2
263	GTGGGTGG--AGCGGGTGGT	0.9	1.1	1.0	0.1

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

Tabla 39. Secuencias de ARNsg TGFBRII/secuencias diana

Nombre	Secuencia sin modificar	Secuencia modificada	Secuencia diana (PAM)
ARNsg TGFBRII (EX1_T1)	CCGACUUCUGAACGUGCG GUuuuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuuuaggg cuaguccguuuuuuuuuuu gaaaaaguggcacccgagu cggugcmUUUU (SEQ ID NO: 264)	C*C*G*ACUUCUGAACGUG CGGUGGGguuuuagagcu gaaauagcaaguuuuuuuu aggcuaguccguuuuuuuuu uugaaaaaguggcacccgag ucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 265)	CCGACTTCTGAACGTGCGGT (GGG) (SEQ ID NO: 2) CCGACTTCTGAACGTGCGGT (SEQ ID NO: 269)
ARNsg TGFBRII (EX1_T1) espaciador	CCGACUUCUGAACGUGCG GU (SEQ ID NO: 266)	C*C*G*GACUUCUGAACGU GCGGU (SEQ ID NO: 267)	
ARNsg TGFBRII (EX1_T2)	UGCUGGCGAUACGCGUCC ACguuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuuuaggg cuaguccguuuuuuuuuuu gaaaaaguggcacccgagu cggugcmUUUU (SEQ ID NO: 270)	U*G*C*UGGCGAUACGCGU CCACguuuuagagcuagaa auagcaaguuuuuuuuuaggg cuaguccguuuuuuuuuuu aaaaaguggcacccgaguog gugcmU*U*U*U (SEQ ID NO: 271)	TGCTGGCGATACGCGTCCAC (AGG) (SEQ ID NO: 3) TGCTGGCGATACGCGTCCAC (SEQ ID NO: 275)
ARNsg TGFBRII (EX1_T2) espaciador	UGCUGGCGAUACGCGUCC AC (SEQ ID NO: 272)	U*G*C*UGGCGAUACGCGU CCAC (SEQ ID NO: 273)	
ARNsg	UCGGUCUAUGACGAGCAG	U*C*G*GUCUAUGACGAGC	TCGGTCTATGACGAGCAGCG (

Nombre	Secuencia sin modificar	Secuencia modificada	Secuencia diana (PAM)
TGFBR2 (EX1_T3)	CGuuuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuaucaacuu gaaaaagugggcacccaguc cgguccUUUU (SEQ ID NO: 276)	AGCGuuuuuagagcuagaa auagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuaucaacuu aaaaagugggcacccagucg gugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 277)	GGG (SEQ ID NO: 4) TCGGTCTATGACGAGCAGCG (SEQ ID NO: 281)
ARNsg TGFBR2 (EX1_T3) espaciador	UCGGUCUAUGACGAGCAG CG (SEQ ID NO: 278)	U*C*G*GUCUAUGACGAGC AGCG (SEQ ID NO: 279)	
ARNsg TGFBR2 (EX2_T1)	AUGGGCAGUCCUAUUACA GCuuuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuaucaacuu gaaaaagugggcacccaguc cgguccmUUUU (SEQ ID NO: 282)	A*U*G*GGCAGUCCUAUUA CAGCGuuuuuagagcuagaa auagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuaucaacuu aaaaagugggcacccagucg gugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 283)	ATGGGCAGTCCTATTACAGC (TGG) (SEQ ID NO: 5) ATGGGCAGTCCTATTACAGC (SEQ ID NO: 287)
ARNsg TGFBR2 (EX2_T1) espaciador	AUGGGCAGUCCUAUUACA GC (SEQ ID NO: 284)	A*U*G*GGCAGUCCUAUUA CAGC (SEQ ID NO: 285)	
ARNsg TGFBR2 (EX3_T1)	AUUGUUCACUUGUUAGCC CCuuuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuaucaacuu gaaaaagugggcacccaguc cgguccUUUU (SEQ ID NO: 288)	A*U*U*GUUCACUUGUUAG CCCCAGGguuuuagagcu gaaauagcaaguuuuuuu aggcuaguccguuuaucaac uuuuuuuagugggcacccag ucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 289)	ATTGTTCACTTGTAGCCCC (AGG) (SEQ ID NO: 6) ATTGTTCACTTGTAGCCCC (SEQ ID NO: 293)
ARNsg TGFBR2 (EX3_T1) espaciador	AUUGUUCACUUGUUAGCC CC (SEQ ID NO: 290)	A*U*U*GUUCACUUGUUAG CCCC (SEQ ID NO: 291)	
ARNsg TGFBR2 (EX3_T2)	GCUGAAGAACUGCCUCUA UAGuuuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuaucaacuu gaaaaagugggcacccaguc cgguccUUUU (SEQ ID NO: 294)	G*C*U*GAAGAACUGCCUC UAGuuuuuagagcuagaa auagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuaucaacuu aaaaagugggcacccagucg gugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 295)	GCTGAAGAAGTGCCTCTATA (TGG) (SEQ ID NO: 7) GCTGAAGAAGTGCCTCTATA (SEQ ID NO: 299)
ARNsg TGFBR2 (EX3_T2) espaciador	GCUGAAGAACUGCCUCUA UA (SEQ ID NO: 296)	G*C*U*GAAGAACUGCCUC UAAU (SEQ ID NO: 297)	
ARNsg TGFBR2 (EX4_T1)	GCAGGAUUUCUGGUUGUC ACuuuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuaucaacuu gaaaaagugggcacccaguc cgguccUUUU (SEQ ID NO: 300)	G*C*A*GGAUUUCUGGUUG UCACGuuuuagagcuagaa auagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuaucaacuu aaaaagugggcacccagucg gugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 301)	GCAGGATTTCTGTTTGTAC (AGG) (SEQ ID NO: 8) GCAGGATTTCTGTTTGTAC (SEQ ID NO: 305)
ARNsg TGFBR2 (EX4_T1) espaciador	GCAGGAUUUCUGGUUGUC AC (SEQ ID NO: 302)	G*C*A*GGAUUUCUGGUUG UCAC (SEQ ID NO: 303)	
ARNsg TGFBR2 (EX4_T2)	CUCCAUCUGUGAGAAGCC ACuuuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuaucaacuu	C*U*C*CAUCUGUGAGAAG CCACGuuuuagagcuagaa auagcaaguuuuuuuaggg cuaguccguuuaucaacuu	CTCCATCTGTGAGAAGCCAC (AGG) (SEQ ID NO: 9)

Nombre	Secuencia sin modificar	Secuencia modificada	Secuencia diana (PAM)
	gaaaaagugggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 306)	aaaaagugggcaccgagucg gugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 307)	CTCCATCTCTGAGAAGCCAC (SEQ ID NO: 311)
ARNsg TGFBRII (EX4_T2) espaciador	CUCCAUCUGUGAGAAGCC AC (SEQ ID NO: 308)	C*U*C*CAUCUGUGAGAAG CCAC (SEQ ID NO: 309)	
ARNsg TGFBRII (EX5_T1)	CCCCUACCAUGACUUUUAU UCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuuuuuuuaagg cuaguccguuuaucaacuu gaaaaagugggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 312)	C*C*C*CUACCAUGACUUU AUUCguuuuagagcuagaa uagcaaguuuuuuuuaagg cuaguccguuuaucaacuu aaaaagugggcaccgagucg gugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 313)	CCCCTACCATGACTTTATTC (TGG) (SEQ ID NO: 10) CCCCTACCATGACTTTATTC (SEQ ID NO: 317)
ARNsg TGFBRII (EX5_T1) espaciador	CCCCUACCAUGACUUUUAU UC (SEQ ID NO: 314)	C*C*C*CUACCAUGACUUU AUUC (SEQ ID NO: 315)	

* residuo de 2'-O-metilfosfororrioato

Tabla 40. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg TGFBRII-Ex1-T1

Secuencia específica de referencia*:CTGAACGTGCGGT(GGG)ATCG (SEQ ID NO: 360)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
361	CTGAACGTG-----	28.7	29.8	29.2	0.8
362	CTGAACGTG-----GGATCG	10.7	12	11.4	0.9
	CTGA-----TCG	9.8	9.3	9.6	0.4
	-----	3.7	1.3	2.5	1.7
363	CTGAACGTGCGCGGTGGGATCG	1.2	3.2	2.2	1.4
	CTG-----	2.8	1.1	2	1.2
364	CTGAACGTG-GGTGGGATCG	0.8	2.1	1.5	0.9
365	-----GGTGGGATCG	2.2	0.8	1.5	1
366	CTGAACGTG--GTGGGATCG	1	1.6	1.3	0.4
367	CTGAACG----GTGGGATCG	1.5	0.8	1.2	0.5
	CTGAACG-----	1.3	1	1.2	0.2
368	CTG-----GTGGGATCG	1.3	0.4	0.8	0.6
369	CTGAACGTGCAAGGTGGGATCG	1.3	0.3	0.8	0.7
370	CTGAACGTGCGT--GGATCG	0	1.1	0.6	0.8
	-----TCG	0	1.1	0.6	0.8

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

^c Las posiciones de bases insertadas en la secuencia editada del gen indicadas por guiones (-) en la secuencia de referencia

Tabla 41. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg TGFBRII-Ex1-T2

Secuencia específica de referencia ^a : GATACGGGTCCAC (AGG) ACGA (SEQ ID NO: 371)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
372	GATACGGGTCC-ACAGGACGA	15.2	15.3	15.2	0.1
	GAT-----	8.5	10.3	9.4	1.3
	GATACGC-----	6.7	5.9	6.3	0.6
373	GATACGGGTCCACAGGACGA	3.7	6.1	4.9	1.7
	GATACG-----A	4.3	5.6	4.9	0.9
	-----	5.4	3.5	4.4	1.3
	-----ACGA	3.4	3.9	3.6	0.4
	-----AGGACGA	3.7	2.2	3	1.1
374	GATACGGGTCCA--GGACGA	2.2	3.2	2.7	0.7
375	GATACGC-----ACAGGACGA	2.3	2.8	2.6	0.4
376	GATAC-----ACAGGACGA	2.8	1.7	2.2	0.8
	-----ACAGGACGA	1.4	2.5	2	0.8
	GATACGCG-----A	2.5	1.4	2	0.8
377	GATACGGGTCC-----CA	1.9	1.7	1.8	0.1
378	GATACGGGTCC-----GA	1.1	2	1.6	0.6
379	GATACGGGTCC---AGGACGA	1.9	1.1	1.5	0.6
380	GATAC-----AGGACGA	1.2	1.5	1.4	0.2
381	GATACGC---CACAGGACGA	1.5	0.8	1.2	0.5
382	GATACGGGTCC-----	1	1.3	1.2	0.2
383	GATACGGGTCCACACAGGACGA	1.4	0.8	1.1	0.4
384	GATACGC-TGCACAGGACGA	1.1	0.8	1	0.2
385	GATACGC-----AGGACGA	0.8	1.3	1	0.4
	GATACGCG-----	0.6	1.1	0.8	0.4
	GATACGGGT-----	0.6	1.1	0.8	0.4
	-----A	1.1	0.3	0.7	0.6
386	---ACGC---ACAGGACGA	1.2	0	0.6	0.8

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

5 ^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

^c Las posiciones de bases insertadas en la secuencia editada del gen indicadas por guiones (-) en la secuencia de referencia

10 Tabla 42. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg TGFBR2-Ex1-T3

Secuencia específica de referencia ^a : ATGACGAGCAGCG (GGG) TCTG (SEQ ID NO: 387)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
388	ATGACGAGCAAGCGGGGTCTG	66.7	65.9	66.3	0.6
389	ATGACG---AGCGGGGTCTG	4.5	5.8	5.2	0.9
	-----GGTCTG	2.2	2.5	2.4	0.2
390	ATGACGA--AGCGGGGTCTG	1.9	1.9	1.9	0
	-----	2.1	1.4	1.8	0.5

	-----GGGGTCTG	1	1.7	1.4	0.5
391	ATG-----AGCGGGGTCTG	1.6	1.1	1.4	0.4
392	ATGACGAGC AA AGCGGGGTCTG	1.8	0.6	1.2	0.8
393	ATGA-----CGGGGTCTG	0.7	1.5	1.1	0.6
	A-----TG	1.2	0.5	0.8	0.5

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

5 ^b Las delecciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

^c Las posiciones de bases insertadas en la secuencia editada del gen indicadas por guiones (-) en la secuencia de referencia

Tabla 43. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg TGFBR11-Ex5-T1

Secuencia específica de referencia ^a : CATGACTTTATTC(TGG)AAGA (SEQ ID NO: 394)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
395	CATGA-----CTGGAAGA	10.6	12.4	11.5	1.3
396	CATGAC-----TTCTGGAAGA	8.8	8.9	8.9	0.1
397	CATGACT---TTCTGGAAGA	7	5.4	6.2	1.1
398	CATGACTTTATTTCTGGAAGA	5	6.2	5.6	0.8
399	CATGACTTTAATTTCTGGAAGA	5.1	6.2	5.6	0.8
	CA-----TGGAAGA	3.7	3.8	3.8	0.1
400	CATGACTT--TTCTGGAAGA	3.6	3	3.3	0.4
	CAT-----GAAGA	2.2	3.2	2.7	0.7
	C-----A	2.5	2.1	2.3	0.3
	-----	2.5	1.9	2.2	0.4
	CATGA-----	2.6	1.8	2.2	0.6
	CAT-----GA	2	2	2	0
401	CA-----TCTGGAAGA	2	2.1	2	0.1
402	CATGACTTT-TTCTGGAAGA	1.6	2.3	2	0.5
403	CATGACTTTA-TCTGGAAGA	2.1	1.4	1.8	0.5
404	CATGACTTT-----AAGA	1.1	1	1	0.1
405	-----TTCTGGAAGA	1.2	0.9	1	0.2
406	CATGACTTTA--CTGGAAGA	1.1	0.9	1	0.1

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

15 ^b Las delecciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

^c Las posiciones de bases insertadas en la secuencia editada del gen indicadas por guiones (-) en la secuencia de referencia

Tabla 44. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg TGFBR11-Ex2-T1

Secuencia específica de referencia ^a : GTCCTATTACAGC(TGG)GGCA (SEQ ID NO: 407)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada ^b	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
	G-----	18.4	17.4	17.9	0.7
408	GTCCTATTA--GCTGGGGCA	6.4	13	9.7	4.7
	-----GCA	9.2	5.7	7.4	2.5

409	GTCCTATTAGCTGGGGCA	7.5	7.1	7.3	0.3
410	GTCCTAT---AGCTGGGGCA	6.8	7.5	7.2	0.5
411	GTCCTA---AGCTGGGGCA	7.3	4.6	5.9	1.9
412	GTCCTA-----GCTGGGGCA	7.5	4.2	5.8	2.3
	-----	2.8	2.2	2.5	0.4
413	GTCCTATTAC---TGGGGCA	2	1.7	1.8	0.2
	G-----CTGGGGCA	1	2	1.5	0.7
414	GTCC-----AGCTGGGGCA	1	1.7	1.4	0.5
415	GTCCTATTACAGCTGGGGCA	1.2	1.3	1.2	0.1
	GTCCTAT-----	1.4	0.8	1.1	0.4
416	GTCCTATT---GCTGGGGCA	1.1	1.1	1.1	0
417	GTCCTATTAC-GCTGGGGCA	0.7	1.2	1	0.4
418	GTCCT-----GGGGCA	1.6	0.3	1	0.9
	GT-----	1.1	0.1	0.6	0.7

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

5 ^b Las delecciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

^c Las posiciones de bases insertadas en la secuencia editada del gen indicadas por guiones (-) en la secuencia de referencia

Tabla 45. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg TGFBR1-Ex3-T1

Secuencia específica de referencia ^a : ACTTGTTAGCCCC (AGG) GCCA (SEQ ID NO: 419)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada	Donante 1(%)	Donante 2(%)	Media(%)	Dev. Est. (%)
420	ACTTGTTAG--CCAGGGCCA	26.7	22.6	24.6	2.9
421	ACTTGTTAG-CCCAGGGCCA	5.1	9.1	7.1	2.8
	-----	6	4.1	5	1.3
422	ACTTGTTAG---CAGGGCCA	4.9	3.7	4.3	0.8
423	ACTTGTTA-----GCCA	4.6	3.1	3.8	1.1
	-----CAGGGCCA	4.1	2.7	3.4	1
424	ACTTGTT-----AGGGCCA	2.1	3.3	2.7	0.8
	-----CA	3.6	1.6	2.6	1.4
425	ACTTGTTAGCCCCAGGGCCA	2	3.3	2.6	0.9
426	ACTTGTT---CCCAGGGCCA	1.3	3	2.2	1.2
427	-----CCCAGGGCCA	2.3	1.7	2	0.4
428	ACTTGTTA--CCCAGGGCCA	2	1.8	1.9	0.1
429	ACTTG-----CCCAGGGCCA	2	1.7	1.8	0.2
	ACT-----	1.3	1.3	1.3	0
430	ACTTGT-----CCCAGGGCCA	0.8	1.5	1.2	0.5
431	A-----CCAGGGCCA	1.6	0.7	1.2	0.6
	-----GGCCA	1.1	1.1	1.1	0
	A-----CAGGGCCA	0.5	1.1	0.8	0.4
432	ACTTG-----CAGGGCCA	0.2	1.2	0.7	0.7
433	ACTTGTTAGC-----CCA	0.3	1.1	0.7	0.6

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las delecciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

° Las posiciones de bases insertadas en la secuencia editada del gen indicadas por guiones (-) en la secuencia de referencia

Tabla 46. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg TGFBR2-Ex3-T2

Secuencia específica de referencia ^a : AACTGCCTCTATA(TGG)TGTG (SEQ ID NO: 434)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada	Donante 1(%)	Donante 2(%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
435	AACTGCCTCTATATGGTGTG	37.1	41.7	39.4	3.3
	AAC-----	7	6	6.5	0.7
	-----	7.2	5	6.1	1.6
436	AACTGCCT--ATATGGTGTG	2.9	4.1	3.5	0.8
437	AACTGCCTCTAT--GGTGTG	3	3	3	0
	AACTG-----	2.7	2.3	2.5	0.3
438	AACTGCCTC-ATATGGTGTG	2	2.4	2.2	0.3
439	AACTG----TATATGGTGTG	1.6	2.4	2	0.6
440	AACTGC---TATATGGTGTG	1.6	1.8	1.7	0.1
441	AACT-----ATATGGTGTG	1.1	1.8	1.5	0.5
	AACTGCC-----	1.2	1.5	1.4	0.2
	A-----	1.8	0.9	1.4	0.6
442	AACTGCCT-TATATGGTGTG	1.1	1.3	1.2	0.1
443	AACTGCCTCT-----	1.5	1	1.2	0.4
444	-----TATATGGTGTG	1.1	0.9	1	0.1
	AACTG-----TG	0.8	1.1	1	0.2
	AACTGCCTC-----	0.6	1.4	1	0.6
	AACT-----	1.1	1	1	0.1
445	AACTGCCTCTA-----	1.1	0.7	0.9	0.3
446	AACTGCCTCT-TATGGTGTG	0.7	1.1	0.9	0.3
447	AACTG-----GTGTG	1.1	0.7	0.9	0.3

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las delecciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

^c Las posiciones de bases insertadas en la secuencia editada del gen indicadas por guiones (-) en la secuencia de referencia

Tabla 47. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg TGFBR2-Ex4-T1

Secuencia específica de referencia ^a : TTCTGGTTGTTCAC(AGG)TGGG (SEQ ID NO: 448)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada	Donante 1 (%)	Donante 2 (%)	Media (%)	Dev. Est. (%)
449	TTCTGGTTGTTCACAGGTGGA	31.3	33.1	32.2	1.3
450	TTCTGGT-----GGA	11.2	11.5	11.4	0.2
451	TTC-----AGGTGGA	5.2	4	4.6	0.8
	-----TGGG	4.2	3.7	4	0.4
452	TTCTGGTT--CACAGGTGGA	3.5	3.5	3.5	0
453	TTCTGGTTGT TT CACAGGTGGA	2.1	2.7	2.4	0.4
454	TTCTGGTTG-----GA	2.3	2.2	2.2	0.1
	TTCTGG-----A	1.9	1.6	1.8	0.2

455	TTCTGGTTGTC C ACAGGTGGA	1.6	1.9	1.8	0.2
456	TTC-----CACAGGTGGA	1.4	2.1	1.8	0.5
457	TTCTGGTT-TCACAGGTGGA	1.4	2	1.7	0.4
	-----	2	1.1	1.6	0.6
458	TTCTGGTTG-CACAGGTGGA	1.1	1.4	1.2	0.2
459	TTCTGGTTGT A CACAGGTGGA	1.1	1.2	1.2	0.1
	TTCT-----	1.4	0.7	1	0.5
460	TTCTGGTTG-----A	1.1	1	1	0.1
461	TTCTGGTTGT-ACAGGTGGA	0.7	1.2	1	0.4

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

^c Las posiciones de bases insertadas en la secuencia editada del gen indicadas por guiones (-) en la secuencia de referencia

Tabla 48. Secuencias génicas editadas específicas con frecuencia >1% en al menos un donante de células T con edición génica para el ARNg TGFBR2-Ex4-T2

Secuencia específica de referencia ^a : TGTGAGAAGCCAC (AGG) AAGT (SEQ ID NO: 462)					
SEQ ID NO:	Secuencia génica editada	Donante 1(%)	Donante 2(%)	Media(%)	Dev. Est. (%)
463	TGTGA-----GAAGT	22.3	17.3	19.8	3.5
464	TGTGAGAAG-CACAGGAAGT	9.9	12.7	11.3	2
	-----T	11.8	8.2	10	2.5
465	TGTGAGAAGCC C ACAGGAAGT	4.8	8.1	6.4	2.3
466	TGTG-----AGGAAGT	3.1	3.5	3.3	0.3
467	TGTGAGAAGC--CAGGAAGT	3	3.1	3	0.1
468	TGTGAGA-----AGGAAGT	3	2.8	2.9	0.1
469	-----CACAGGAAGT	2.5	2.7	2.6	0.1
470	TGTGAGAAGC A CACAGGAAGT	1.2	2.3	1.8	0.8
471	TGTGAGAAG---CAGGAAGT	1.6	1.6	1.6	0
	-----CAGGAAGT	1.3	1.8	1.6	0.4
472	TGTG-----CACAGGAAGT	1.2	1.8	1.5	0.4
	-----	1.7	1	1.4	0.5
473	-----CCACAGGAAGT	1.5	1.4	1.4	0.1
474	TGTGAGA-----CACAGGAAGT	0.7	1.4	1	0.5
475	TGTGAG-----ACAGGAAGT	1.2	0.8	1	0.3
	TGT-----GAAGT	1.2	0.7	1	0.4
476	TGTGAGAA--CACAGGAAGT	0.6	1.4	1	0.6
477	TGTGAGAAGC-----	0.8	1.1	1	0.2
478	TGTGAGAAGC C ACAGGAAGT	1.4	0.7	1	0.5

^a Secuencia específica centrada en un sitio de corte, con 10 pb en cualquier dirección. Por comparación, la porción de la secuencia diana de ARNg que se alinea con la secuencia específica de referencia está subrayada y el PAM se indica en paréntesis.

^b Las deleciones indicadas por guiones (-); las inserciones indicadas en negrita.

^c Las posiciones de bases insertadas en la secuencia editada del gen indicadas por guiones (-) en la secuencia de referencia

Se debe entender que todas las definiciones como se definen y usan en el presente documento, controlan sobre las definiciones de diccionario, y/o significados habituales de los términos definidos.

Los artículos indefinidos "un" y "una", como se usan en el presente documento en la especificación y en las reivindicaciones, a menos que claramente se indique lo contrario, se debe entender que significan "al menos uno".

La frase "y/o", como se usa en el presente documento en la especificación y las reivindicaciones, se debe entender que significa "cualquiera o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están conjuntamente presentes en algunos casos y disyuntivamente presentes en otros casos. Múltiples elementos enumerados con "y/o" se deben interpretar de la misma manera, es decir, "uno o más" de los elementos así unidos. Otros elementos pueden estar presentes opcionalmente diferentes de esos elementos específicamente identificados por la cláusula "y/o", estén relacionados o no relacionados a esos elementos específicamente identificados. Por tanto, como un ejemplo no limitantes, una referencia a "A y/o B", cuando se usa junto con lenguaje abierto tal como "comprender" se puede referir, en una forma de realización, a A solo (opcionalmente incluyendo elementos diferentes de B); en otra forma de realización, a B solo (opcionalmente incluyendo elementos diferentes de A); en aun otra forma de realización, a tanto A como B (opcionalmente incluyendo otros elementos); etc.

Como se usa en el presente documento en la especificación y las reivindicaciones, se debe entender que "o" tiene el mismo significado que "y/o" como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan artículos en una lista, se debe interpretar que "o" o "y/o" son inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también incluyendo más de uno, de un número o lista de elementos, y, opcionalmente, artículos adicionales no enumerados. Solo los términos claramente indicados a lo contrario, tal como "solo uno de" o "exactamente uno de", o cuando se usa en las reivindicaciones, "consistir en", se referirá a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término "o" como se usa en el presente documento se interpretará solo como que indica alternativas exclusivas (es decir, "uno o el otro, pero no ambos") cuando está precedido por términos de exclusividad, tal como "o bien", "uno de", "solo uno de", o "exactamente uno de". "Consistir esencialmente en", cuando se usa en las reivindicaciones, tendrá su significado habitual usado en el campo de ley de patentes.

El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de una desviación estándar aceptable, según la práctica en la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el $\pm 20\%$, preferiblemente hasta el $\pm 10\%$, más preferiblemente hasta el $\pm 5\%$, y más preferiblemente todavía hasta el $\pm 1\%$ de una valor determinado. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique otra cosa, el término "aproximadamente" está implícito y en este contexto significa en un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Como se usa en el presente documento en la especificación y las reivindicaciones, la frase "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, se debe entender que significa al menos un elemento seleccionado de uno cualquiera o más de los elementos en la lista de elementos, pero no necesariamente incluyendo al menos uno de cada elemento específicamente enumerado en la lista de elementos y sin excluir cualquier combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que puedan opcionalmente estar presentes elementos diferentes de los elementos específicamente identificados en la lista de elementos a la que la frase "al menos uno" se refiere, estén relacionados o no relacionados a esos elementos específicamente identificados. Por tanto, como un ejemplo no limitante, "al menos uno de A y B" (o, de forma equivalente, "al menos uno de A o B", o, de forma equivalente, "al menos uno de A y/o B") se puede referir, en una forma de realización, a al menos uno, opcionalmente incluyendo más de uno, A, sin B presente (y opcionalmente incluyendo elementos diferentes de B); en otra forma de realización, a al menos uno, opcionalmente incluyendo más de uno, B, sin A presente (y opcionalmente incluyendo elementos diferentes de A); y en aun otra forma de realización, a al menos uno, opcionalmente incluyendo más de uno, A, y al menos uno, opcionalmente más de uno, B (y opcionalmente incluyendo otros elementos); etc.

Se debe entender también que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluya más de una etapa o acto, el orden de las etapas o actos del método no está necesariamente limitado al orden en que las etapas o actos del método se enumeran.

REIVINDICACIONES

1. Una población de células T genéticamente manipuladas, que comprende:

- (i) un gen *Regnasa-1* (*Reg1*) interrumpido; y
- (ii) un gen del receptor del factor de crecimiento transformante beta II (*TGFBRII*) interrumpido;

en donde las células T además están manipuladas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral.

2. La población de células T genéticamente manipuladas de la reivindicación 1, en donde la población de células T genéticamente manipuladas, en comparación con células T homólogas no manipuladas, tiene una o más de las siguientes características:

- (a) actividad de crecimiento celular mejorada;
- (b) persistencia mejorada;
- (c) agotamiento de células T reducido;
- (d) resistente a efectos inhibidores inducidos por TGF- β ;
- (e) capacidad de destrucción celular mejorada; y
- (f) resistencia a los efectos inhibidores por fibroblastos y/o factores inhibidores secretados por los mismos.

3. La población de células T genéticamente manipuladas de la reivindicación 1 o 2, en donde el gen *Reg1* interrumpido está genéticamente editado en el exón 2 y/o el exón 4, en donde el gen *TGFBRII* interrumpido está genéticamente editado en el exón 1, exón 2, exón 3, exón 4 o exón 5.

4. La población de células T genéticamente manipuladas de la reivindicación 3, en donde el gen *Reg1* interrumpido está genéticamente editado por un sistema de edición génica mediado por CRISPR/Cas, que comprende un ARN guía (ARNg) que se dirige a un sitio en el gen *Reg1* que comprende una secuencia de nucleótidos enumerada en la tabla 22, que opcionalmente se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 320, 322, 323, y 327,

opcionalmente, en donde el ARNg que se dirige al gen *Reg1* comprende una secuencia de nucleótidos enumerada en la tabla 22, que opcionalmente se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, 32, 36, o 52,

opcionalmente, en donde el ARNg que se dirige al gen *Reg1* comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEQ ID NO: 22, 30, 34, o 50; y

opcionalmente, en donde el gen *Reg1* interrumpido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de las enumeradas en la tabla 31, 33, 34, o 38.

5. La población de células T genéticamente manipuladas de la reivindicación 3, en donde el gen *TGFBRII* interrumpido está genéticamente editado por un sistema de edición génica mediado por CRISPR/Cas, que comprende un ARN guía (ARNg) que se dirige a un sitio en el gen *TGFBRII* que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 269, 275, 281, 287, 293, 299, 305, 311, y 317,

opcionalmente, en donde el ARNg que se dirige al gen *TGFBRII* comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 270, 300, 306, o 312, y

opcionalmente, en donde el ARNg que se dirige al gen *TGFBRII* comprende un espaciador que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 266, 272, 278, 284, 290, 296, 302, 308, y 314.

6. La población de células T genéticamente manipuladas de la reivindicación 4 o 5, en donde el ARNg además comprende una secuencia de andamiaje.

7. La población de células T genéticamente manipuladas de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que además comprende:

- (iii) un gen de la región constante de cadena alfa del receptor de células T (*TRAC*) interrumpido,
- (iv) un gen de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$) interrumpido,
- (v) un gen *CD70* interrumpido, o
- (vi) una combinación de cualquiera de (iii)-(v).

8. La población de células T genéticamente manipuladas de la reivindicación 7, en donde las células T comprenden un gen de la región constante de cadena alfa del receptor de células T (*TRAC*) interrumpido y un gen de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$) interrumpido,
- 5 opcionalmente, en donde las células T comprenden un gen *CD70* interrumpido,
- opcionalmente, en donde el gen *TRAC* interrumpido, el gen $\beta 2M$ interrumpido y/o el gen *CD70* interrumpido está genéticamente editado por uno o más sistemas de edición génica mediada por CRISPR/Cas.
- 10 9. La población de células T genéticamente manipuladas de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde las células T comprenden un ácido nucleico que codifica el CAR, y en donde el ácido nucleico se inserta en el genoma de las células T,
- 15 opcionalmente, en donde el ácido nucleico que codifica el CAR se inserta en el gen *Reg1* interrumpido, el gen *TGFBRII* interrumpido, el gen *TRAC* interrumpido, el gen $\beta 2M$ interrumpido o el gen *CD70* interrumpido,
- opcionalmente, en donde el ácido nucleico que codifica el CAR se inserta en el gen *TRAC* interrumpido, y opcionalmente en donde el ácido nucleico que codifica el CAR sustituye al fragmento deletado que comprende SEQ ID NO: 69 en el gen *TRAC*.
- 20 10. La población de células T genéticamente manipuladas de la reivindicación 7, en donde el gen *Reg1* interrumpido comprende una secuencia de nucleótidos enumerada en las tablas 31, 33, 34, o 38, el gen *TRAC* interrumpido comprende una secuencia de nucleótidos enumerada en la tabla 24; el gen $\beta 2M$ interrumpido comprende una secuencia de nucleótidos enumerada en la tabla 25 y/o el gen *CD70* interrumpido comprende una secuencia de nucleótidos enumerada en la tabla 26.
- 25 11. La población de células T genéticamente manipuladas de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para un antígeno tumoral, un dominio de señalización coestimulador de 4-1BB o CD28, y un dominio de señalización citoplásmico de CD3 ζ ,
- 30 opcionalmente, en donde el antígeno tumoral es CD19, BCMA, CD70, CD33 o PTK7.
12. La población de células T genéticamente manipuladas de la reivindicación 11, en donde el CAR se une a CD19 (CAR anti-CD19) y en donde el dominio de unión a antígeno extracelular en el CAR anti-CD19 es un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a CD19 (scFv anti-CD19),
- 35 opcionalmente, en donde el scFv anti-CD19 comprende (i) una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada que esas en SEQ ID NO: 124; y (ii) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende las mismas CDR de cadena ligera que esas en SEQ ID NO: 125; opcionalmente en donde la V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 y la V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125,
- 40 opcionalmente, en donde el scFv anti-CD19 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120,
- 45 opcionalmente, en donde el CAR anti-CD19 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 353.
13. La población de células T genéticamente manipuladas de la reivindicación 11, en donde el CAR se une a CD70 (CAR anti-CD70) y en donde el dominio de unión a antígeno extracelular en el CAR anti-CD70 es un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a CD70 (scFv anti-CD70),
- 50 opcionalmente, en donde el scFv anti-CD70 comprende (i) una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada que esas en SEQ ID NO: 143; y (ii) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende las mismas CDR de cadena ligera que esas en SEQ ID NO: 144; opcionalmente en donde la V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143 y la V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144,
- 55 opcionalmente, en donde el scFv anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 o 142,
- 60 opcionalmente, en donde el CAR anti-CD709 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 o SEQ ID NO: 354.
- 65 14. La población de células T genéticamente manipuladas de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde las células T genéticamente manipuladas derivan de células T primarias de uno o más donantes humanos,

opcionalmente, en donde las células T genéticamente manipuladas muestran crecimiento dependiente de citoquinas,

opcionalmente, en donde las células T son alogénicas a un sujeto.

- 5 15. La población de células T genéticamente manipuladas de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para uso como un medicamento.
- 10 16. La población de células T genéticamente manipuladas de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para uso en tratar cáncer.
- 15 17. La población de células T genéticamente manipuladas para uso de la reivindicación 16, en donde el cáncer es un cáncer hematopoyético o un tumor sólido, opcionalmente en donde el cáncer es CD19⁺, BCMA⁺, CD70⁺, CD33⁺, o PTK7⁺.

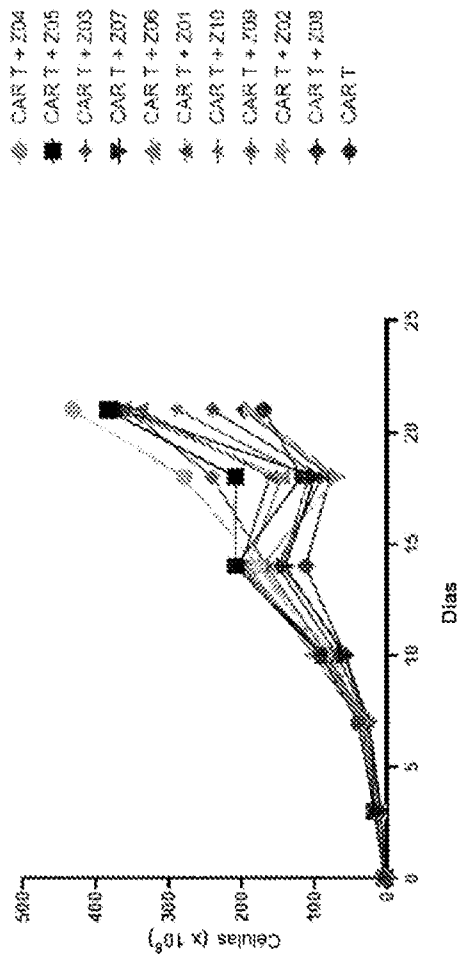
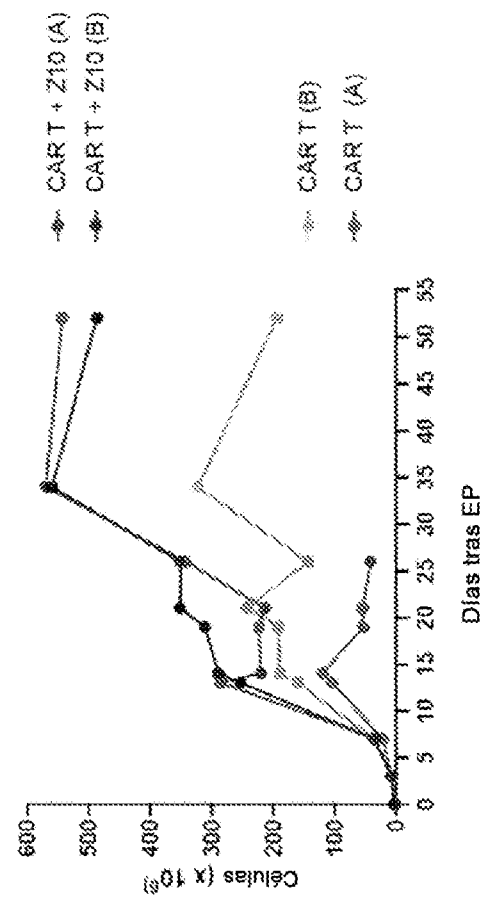


FIG. 1A



മുഖ്യമന്ത്രി

FIG. 2A

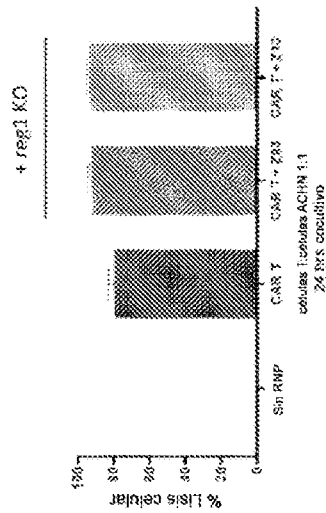


FIG. 2B

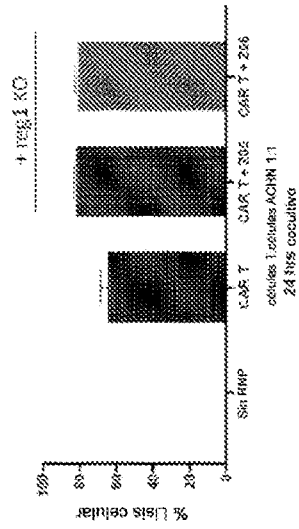


FIG. 2C

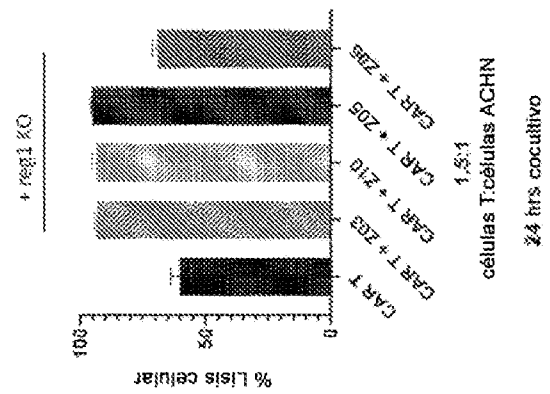


FIG. 2D

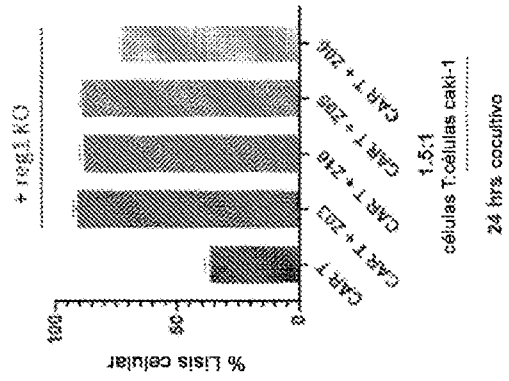


FIG. 2E

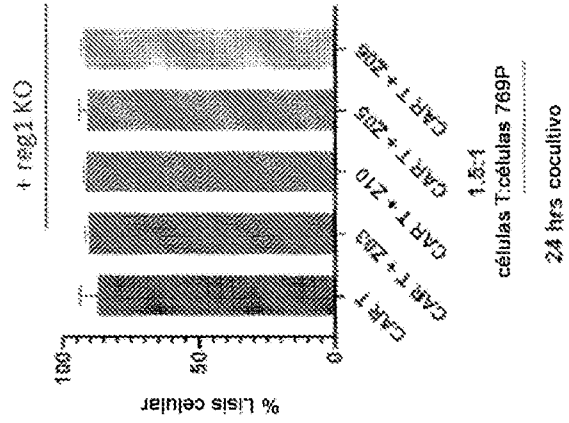


FIG. 3A

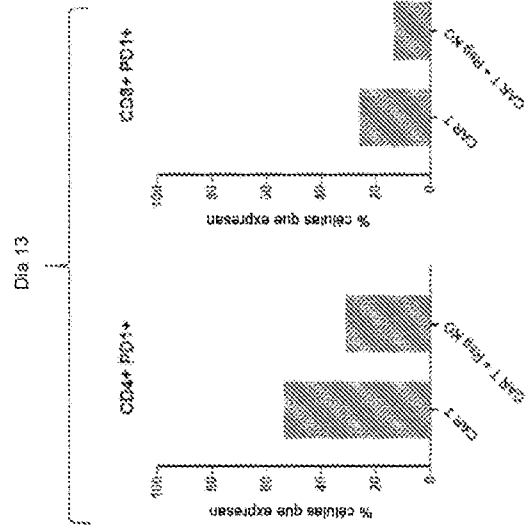


FIG. 3C

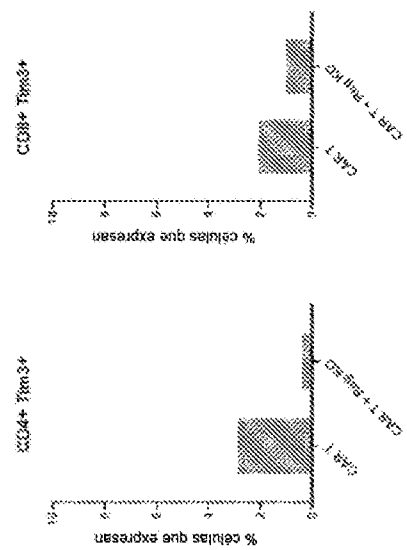


FIG. 3B

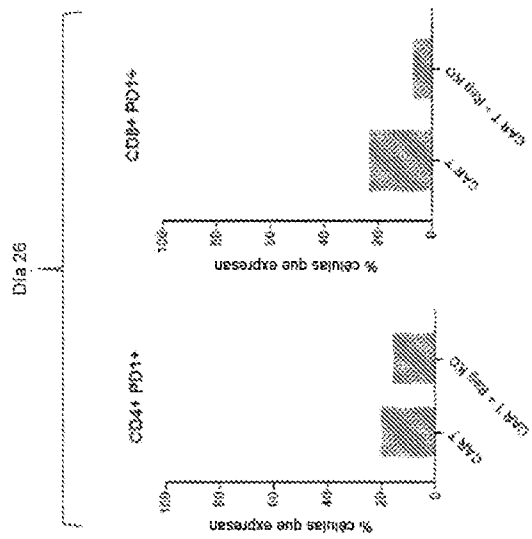


FIG. 3D

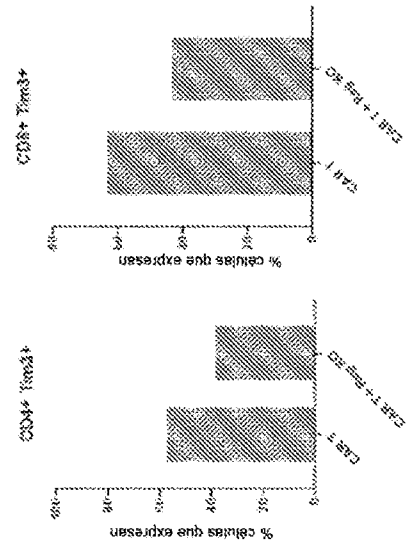


FIG. 4

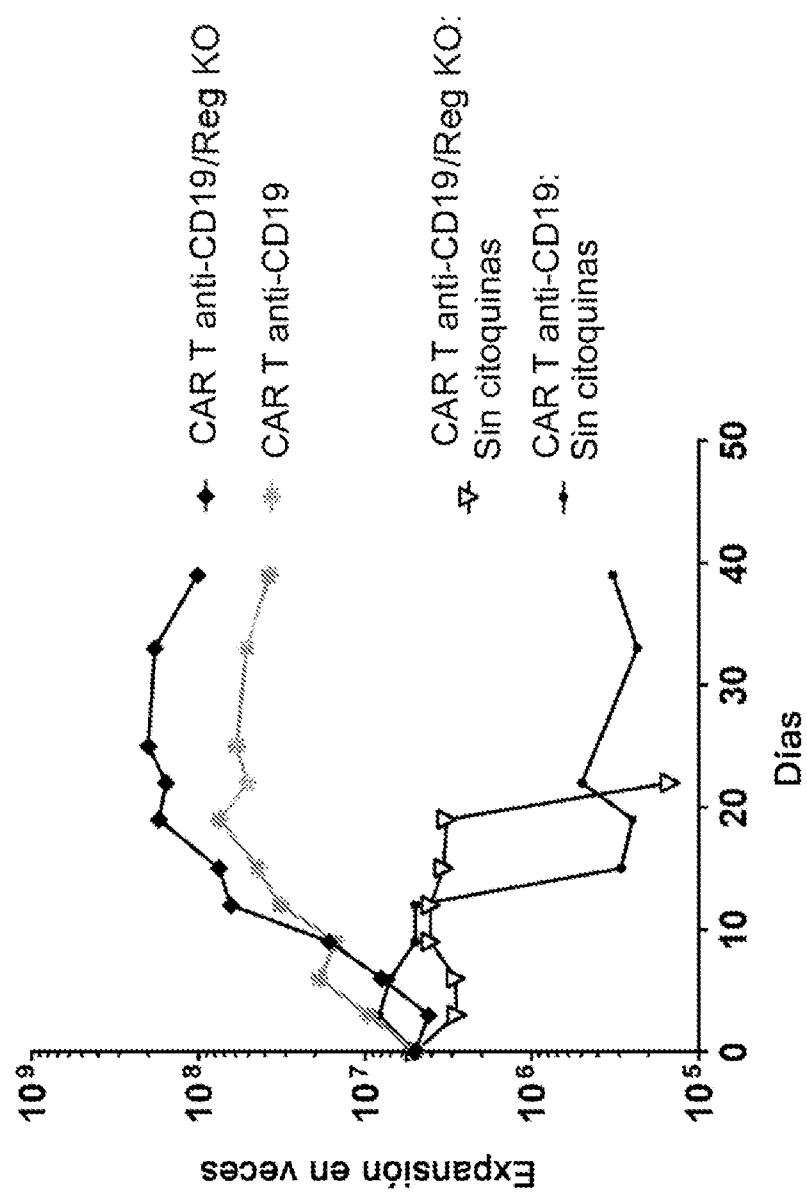


FIG. 5A

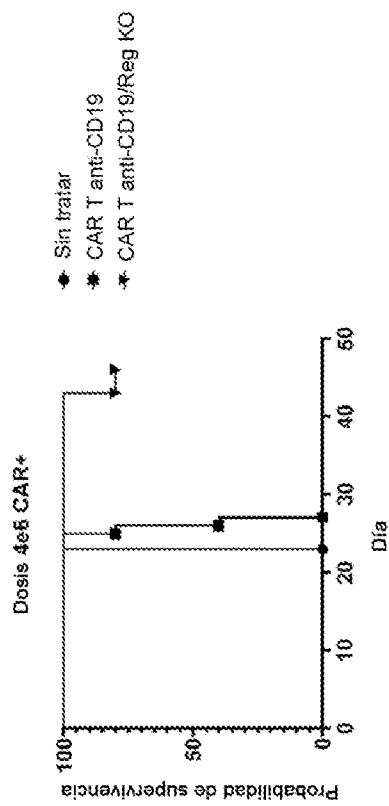


FIG. 5B

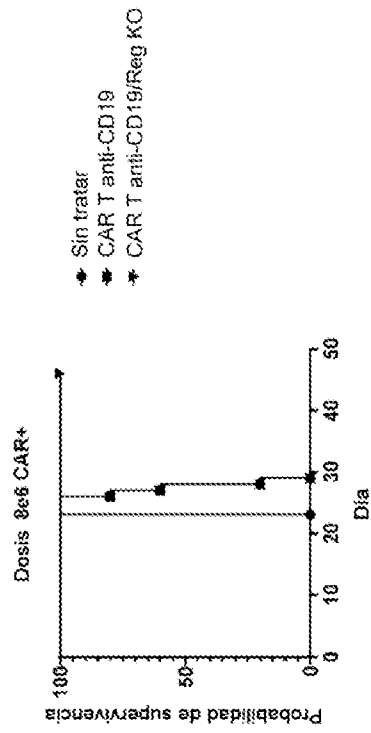


FIG. 5C

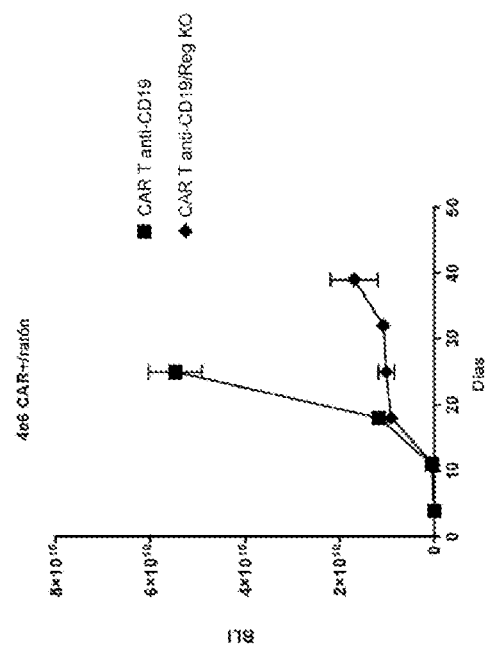


FIG. 5D

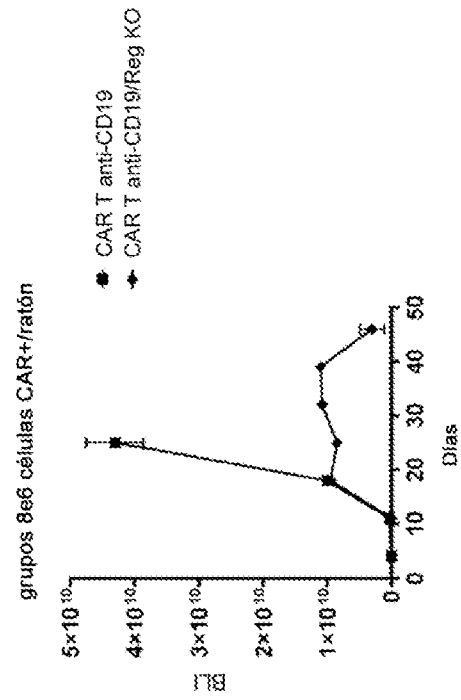


FIG. 6A

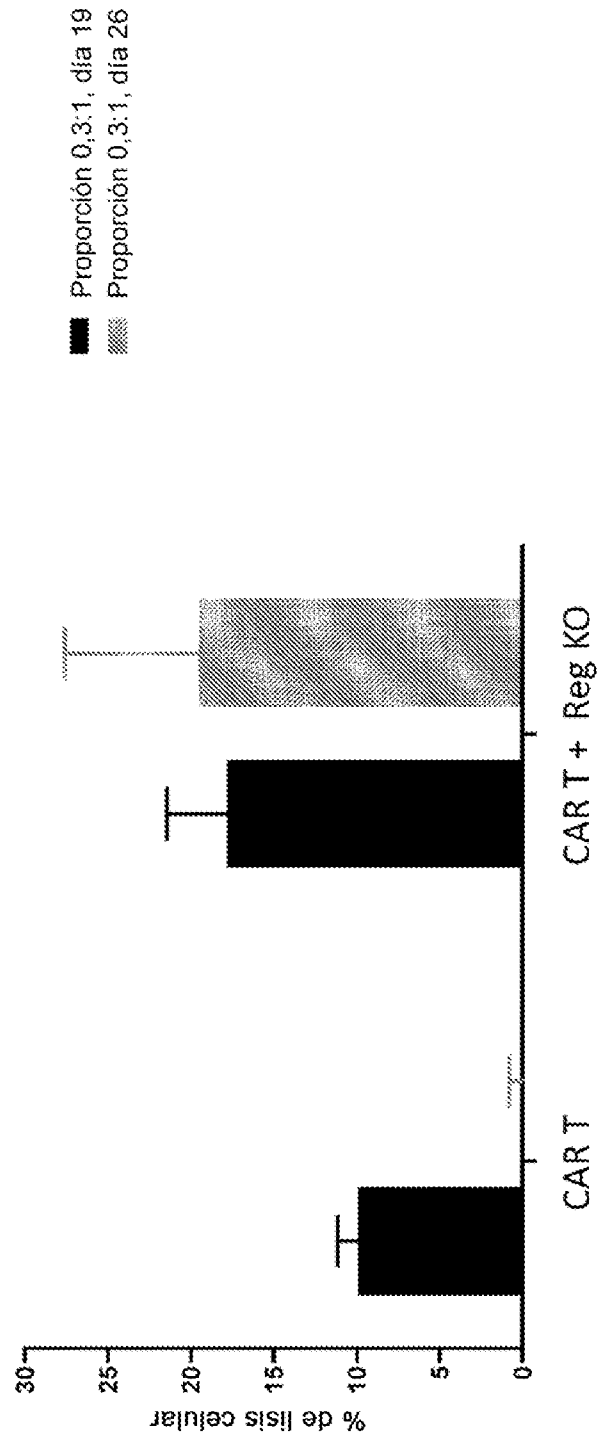
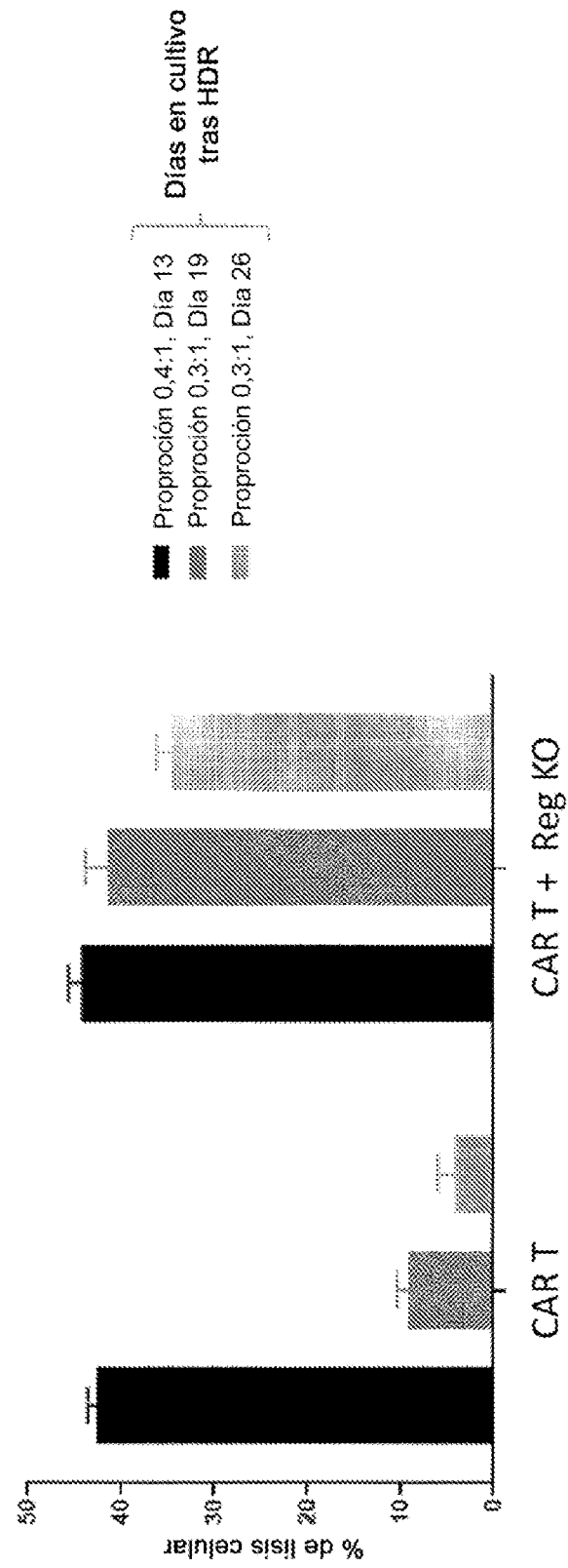


FIG. 6B



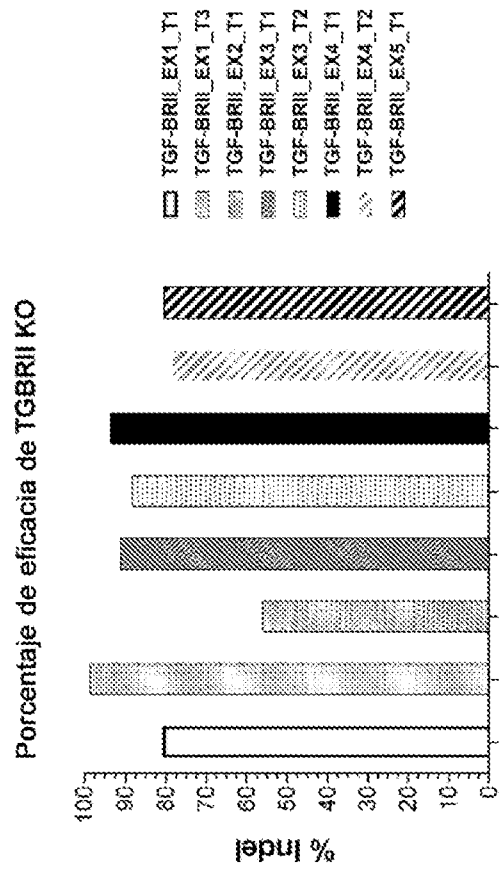


FIG. 7A

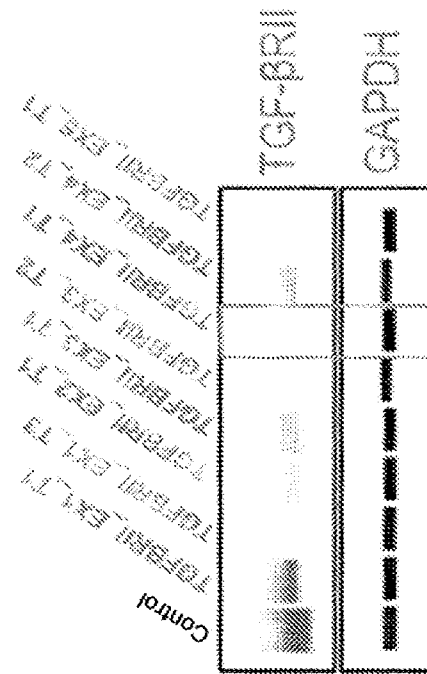


FIG. 7B

FIG. 8A

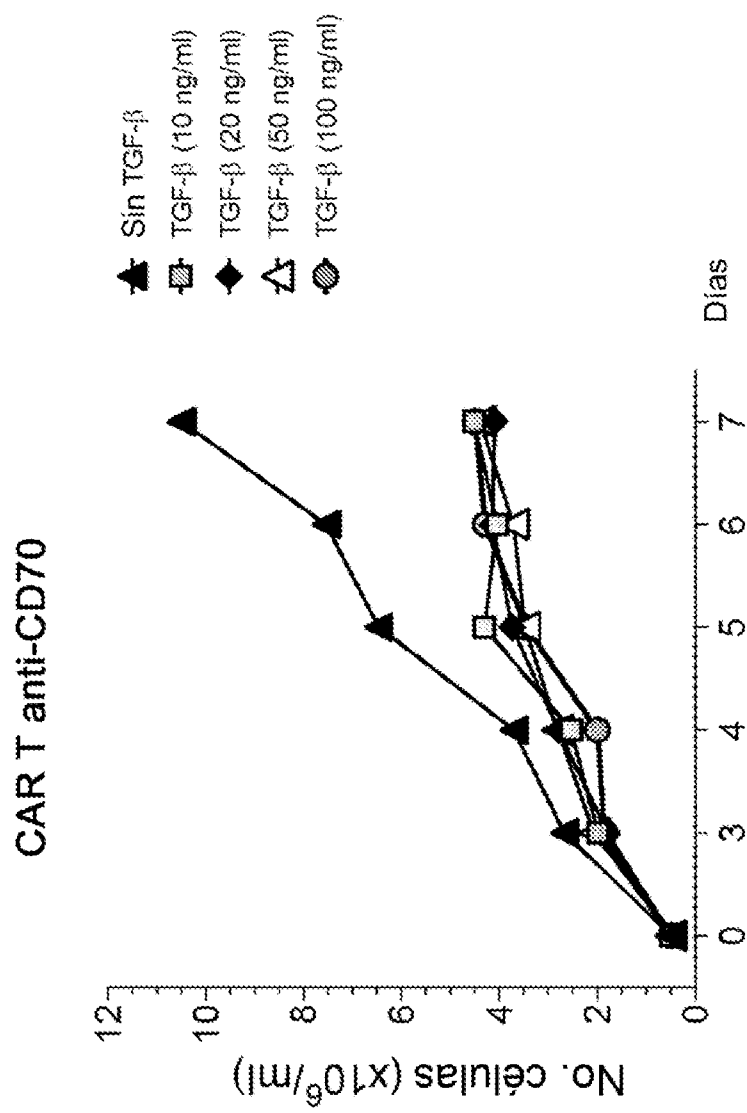


FIG. 8C

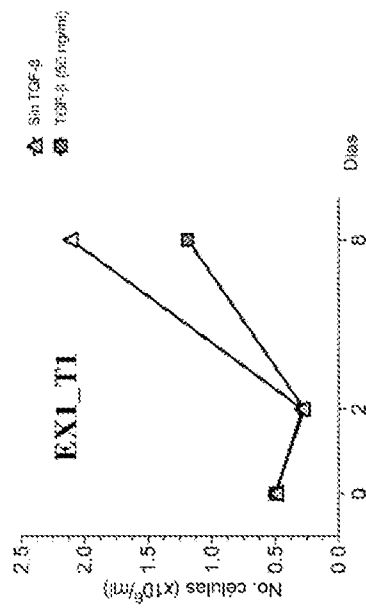


FIG. 8E

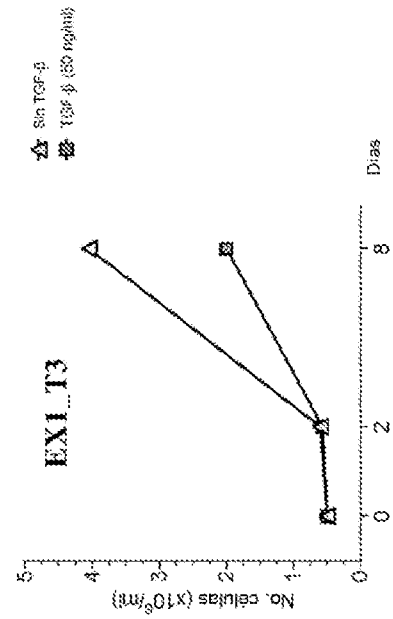


FIG. 8B

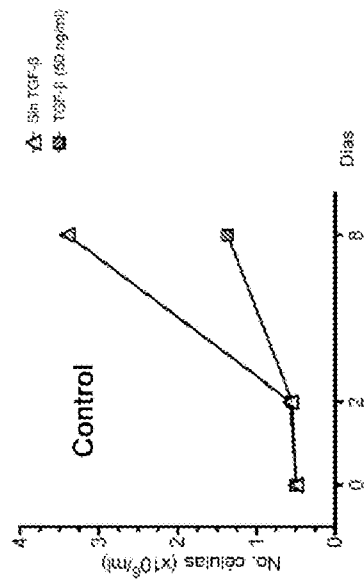


FIG. 8D

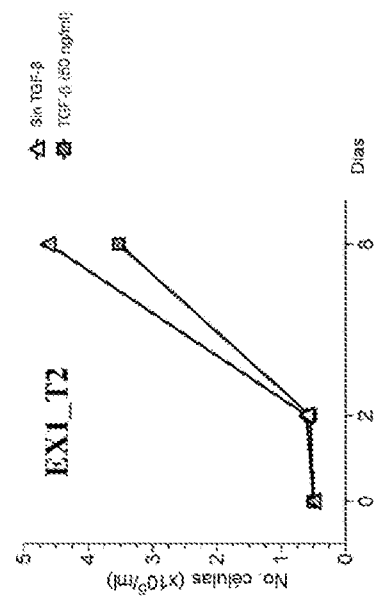


FIG. 8F

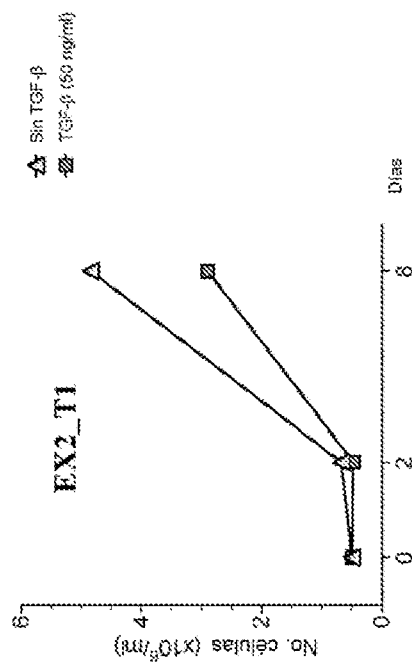


FIG. 8G

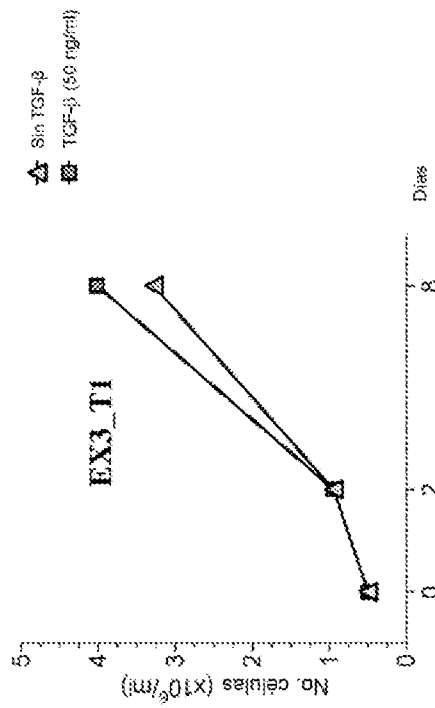


FIG. 8H

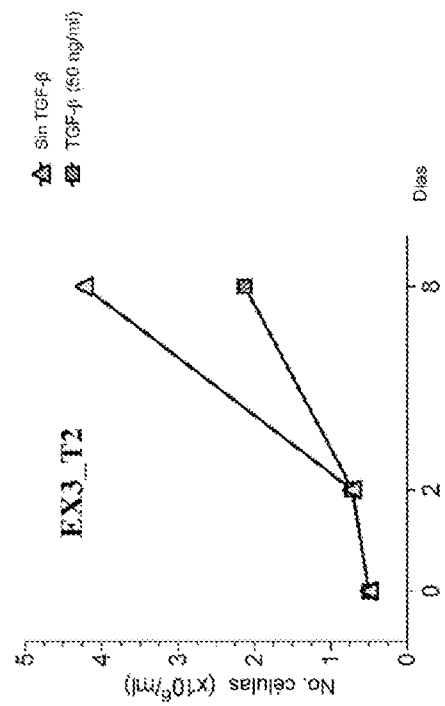


FIG. 8I

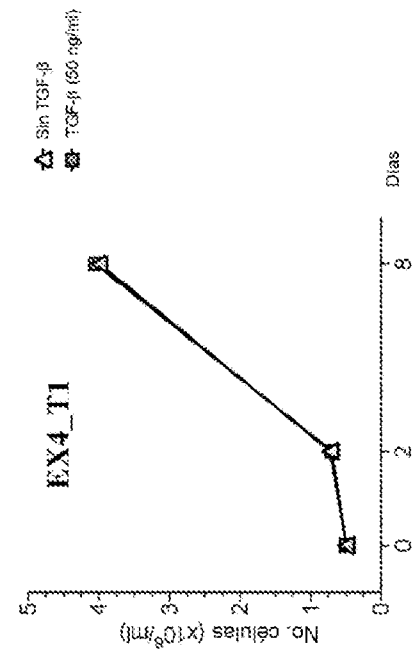


FIG. 8K

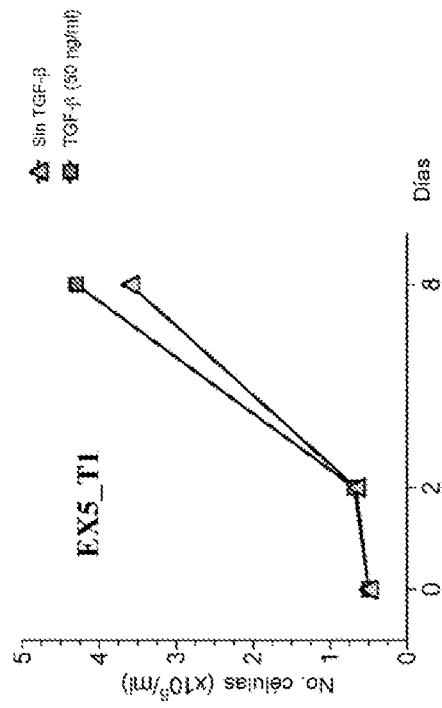


FIG. 8J

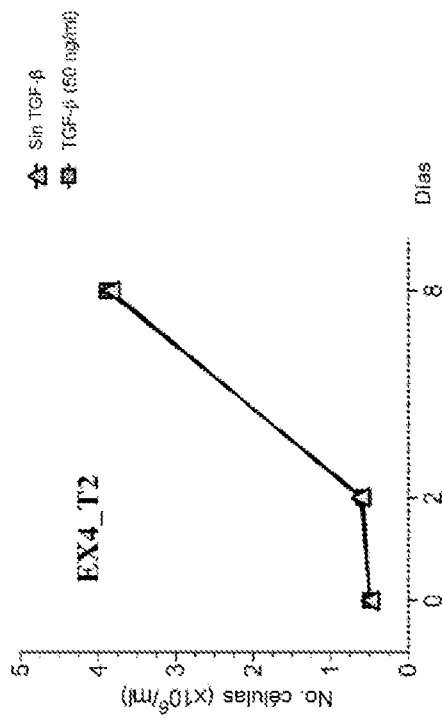


FIG. 9

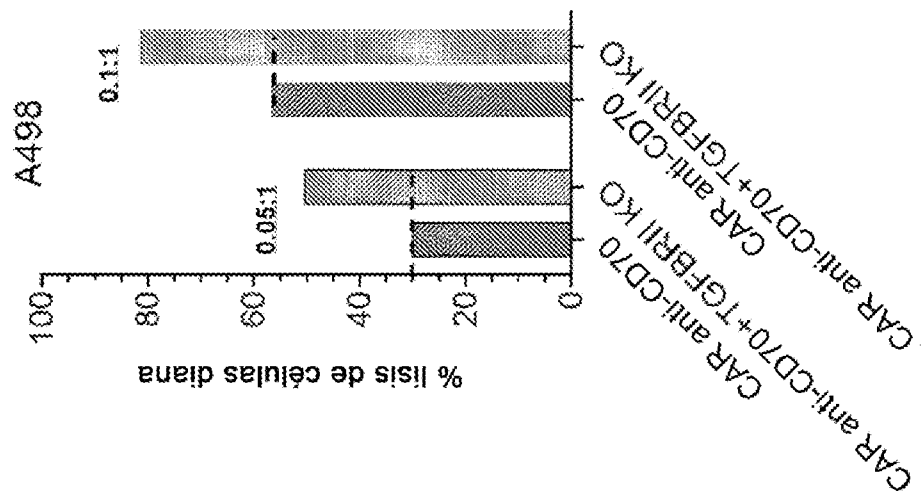


FIG. 10A

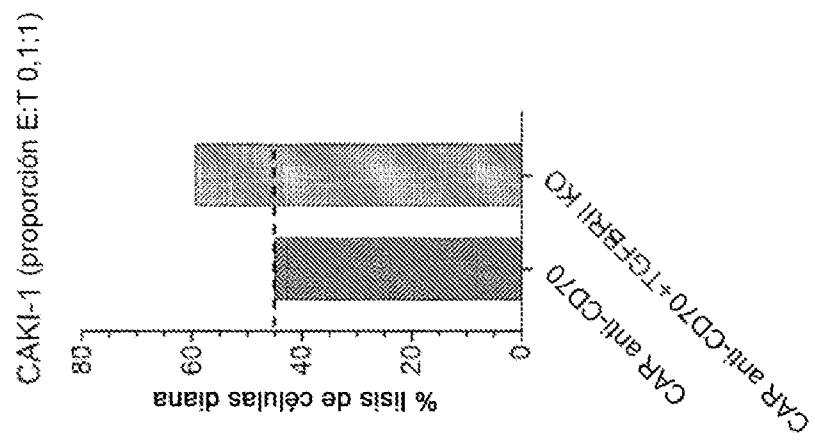


FIG. 10B

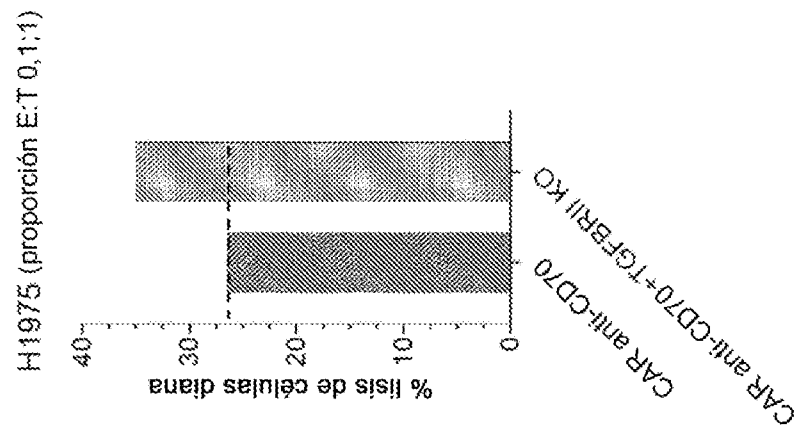


FIG. 10C

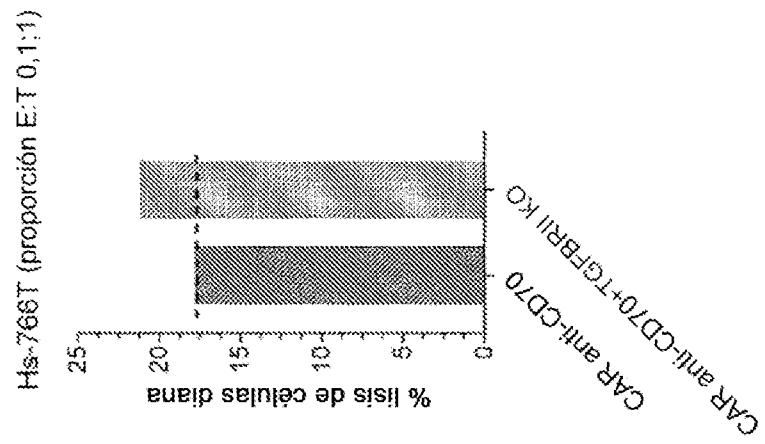


FIG. 10E

SK-OV-3 (proporción E:T 0,1:1)

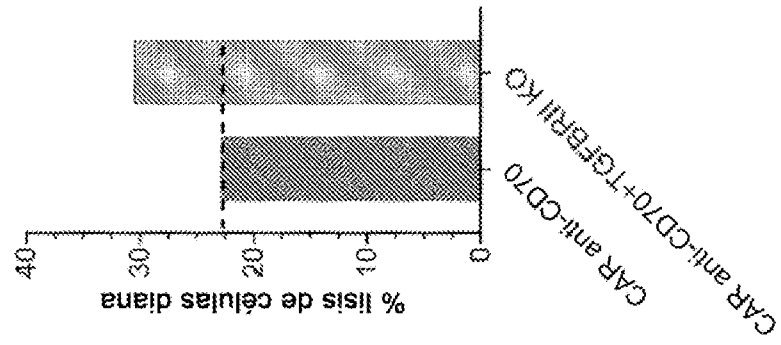


FIG. 10D

786-O (proporción E:T 0,1:1)

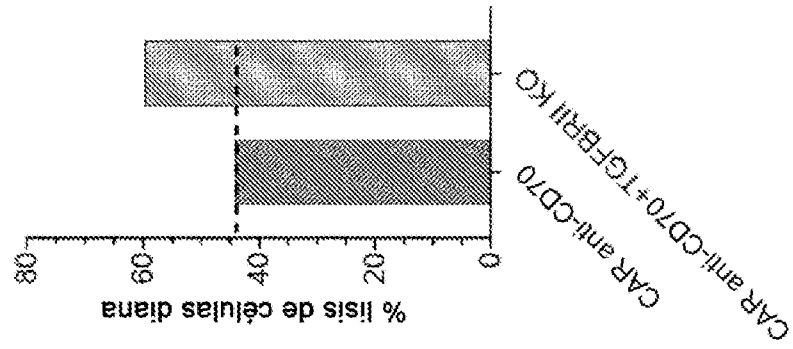


FIG. 11

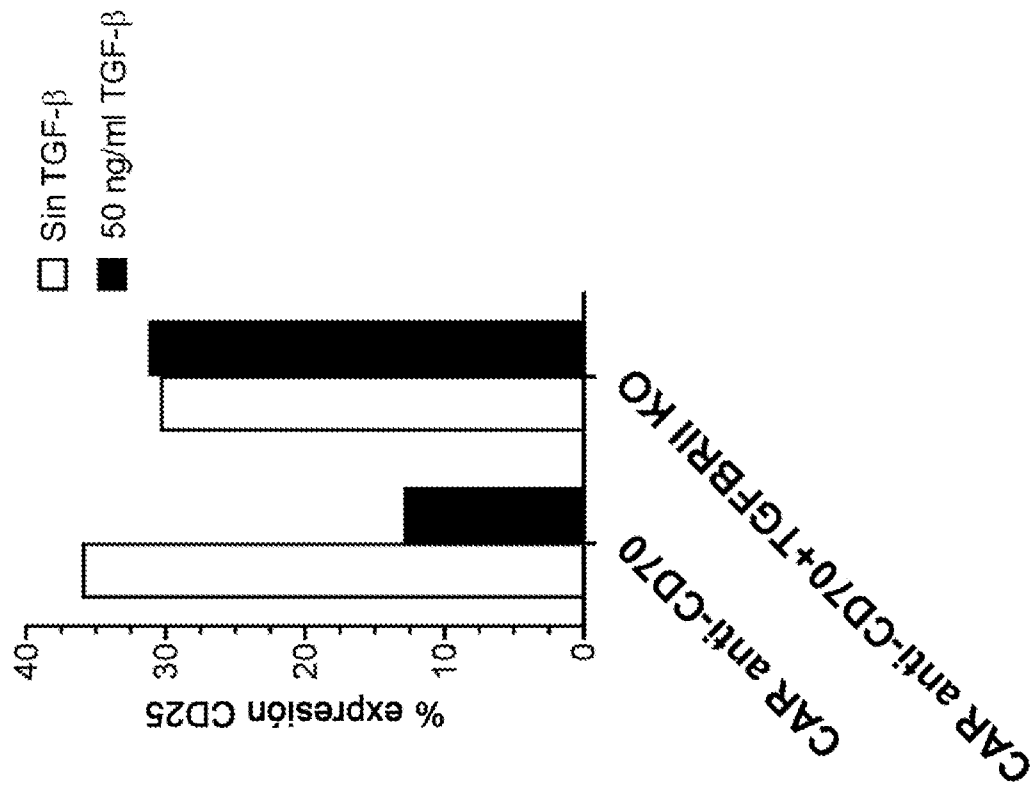
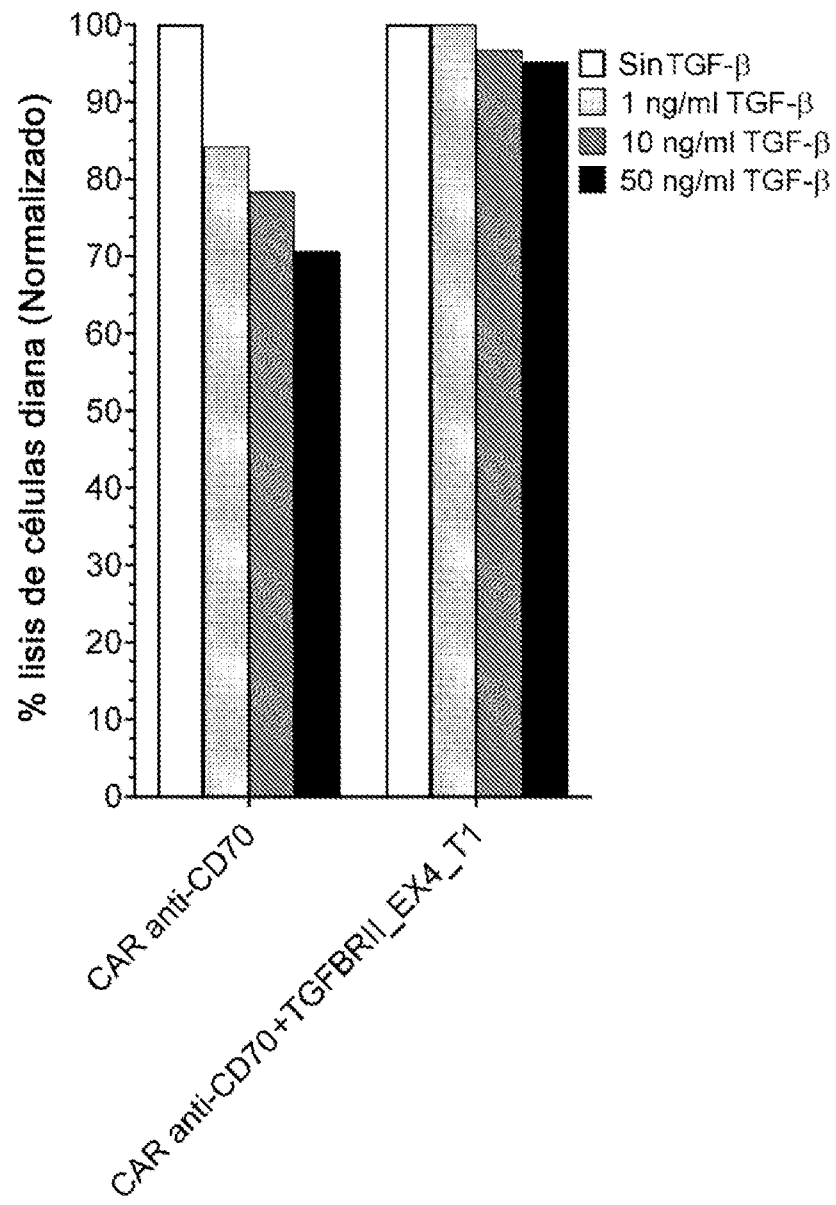


FIG. 12



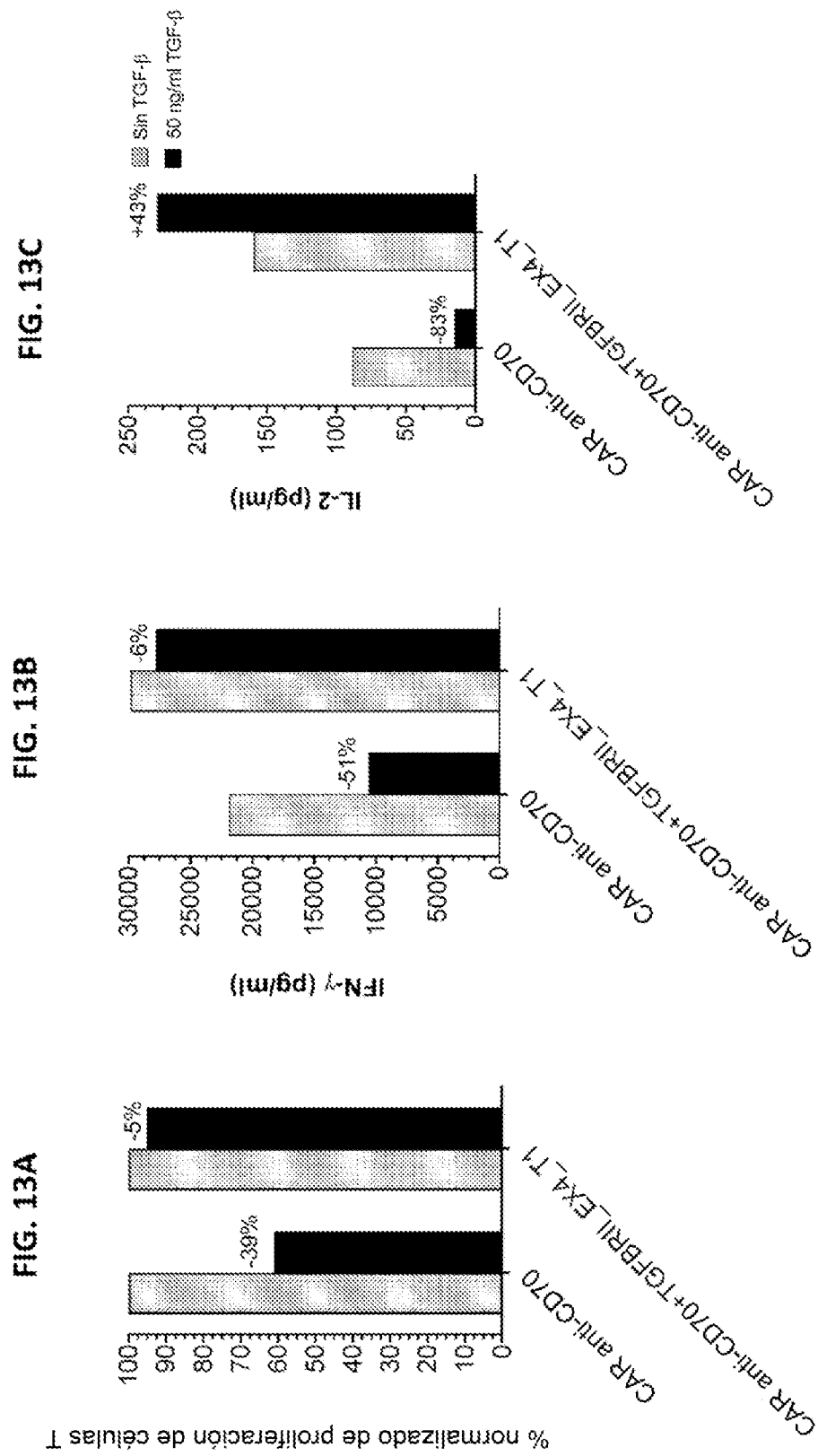


FIG. 14

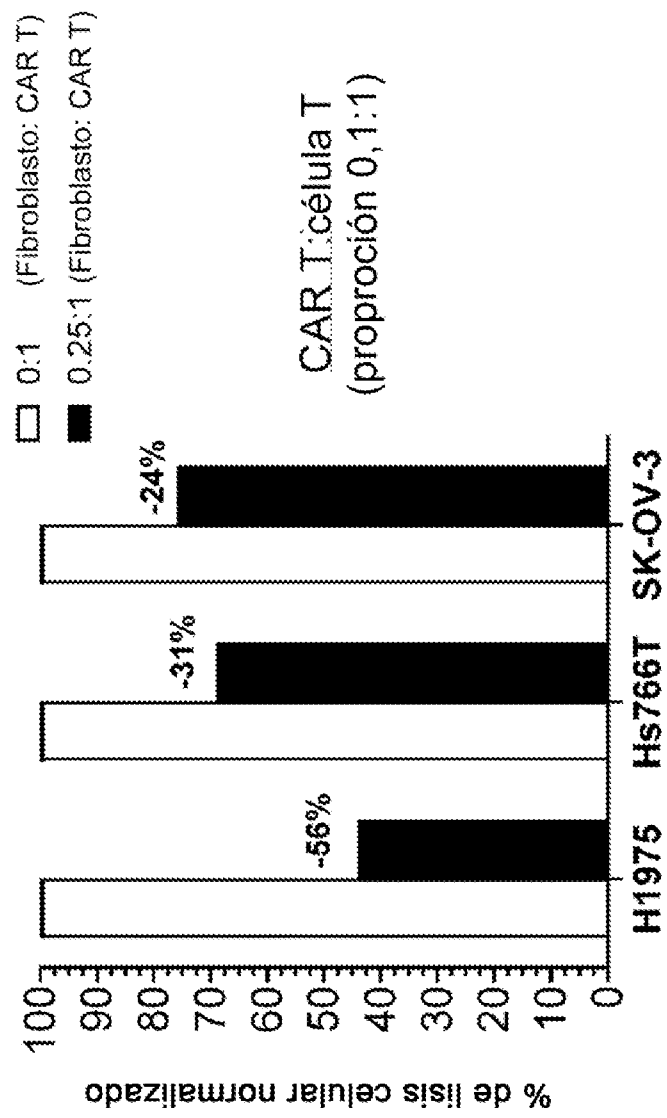


FIG. 15A

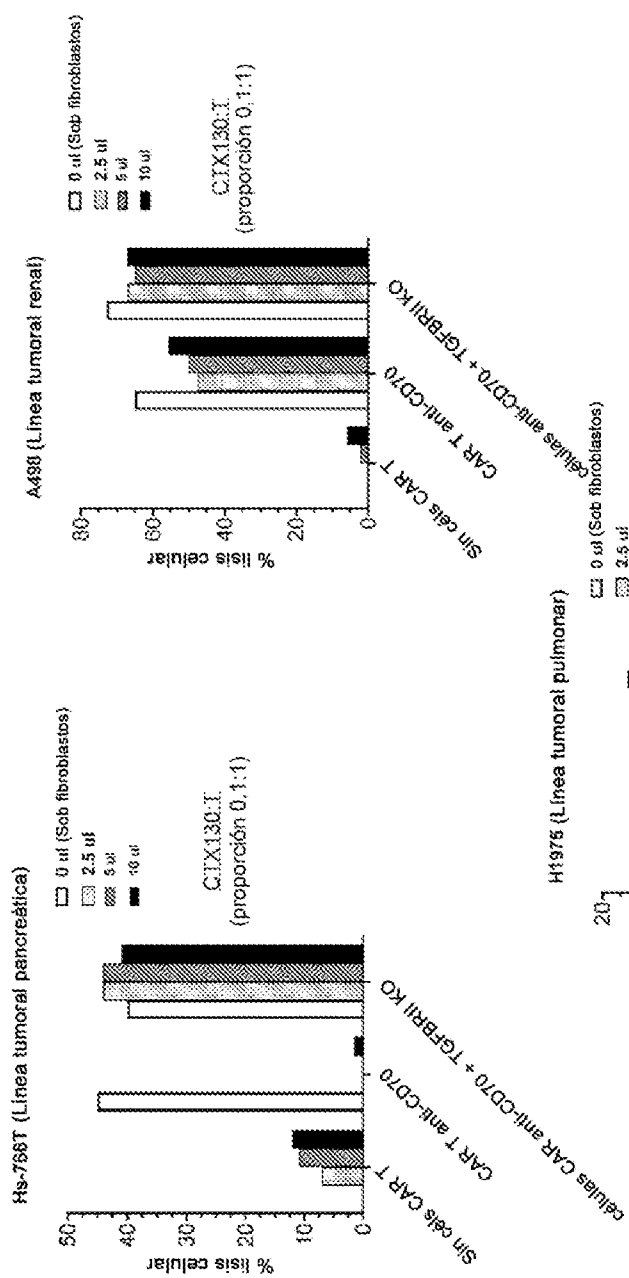


FIG. 15B

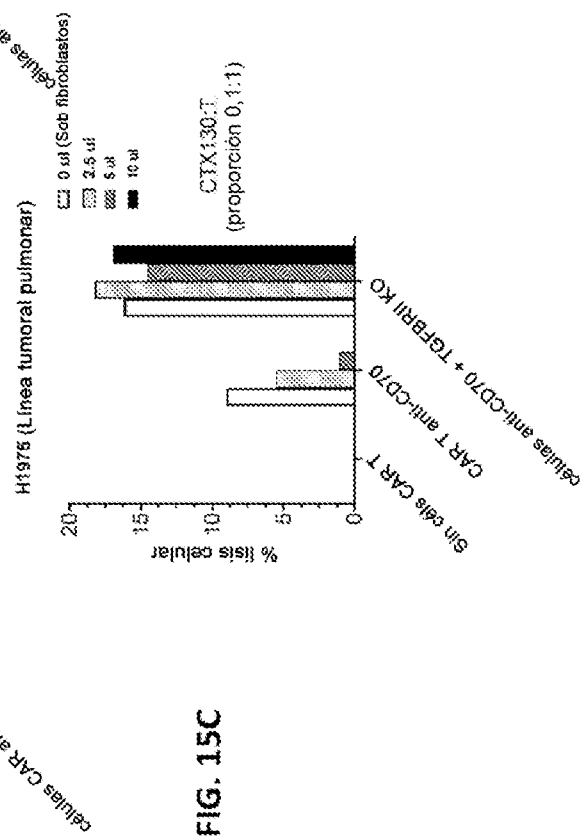


FIG. 15C

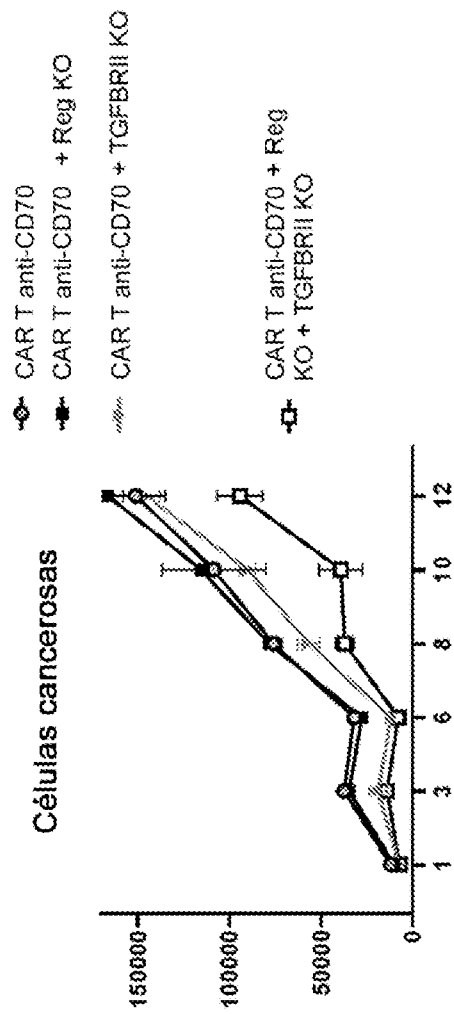


FIG. 16A

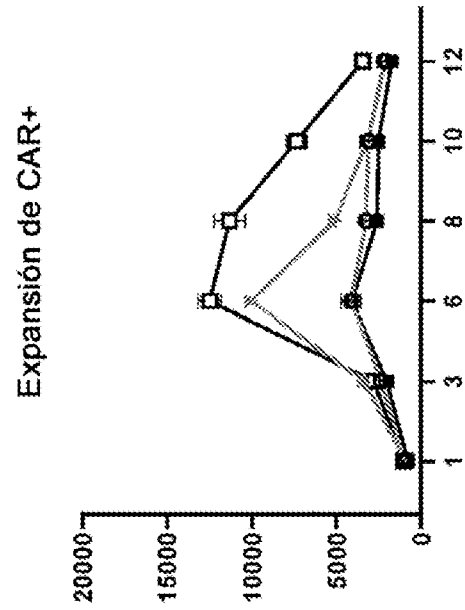


FIG. 16B

FIG. 17A

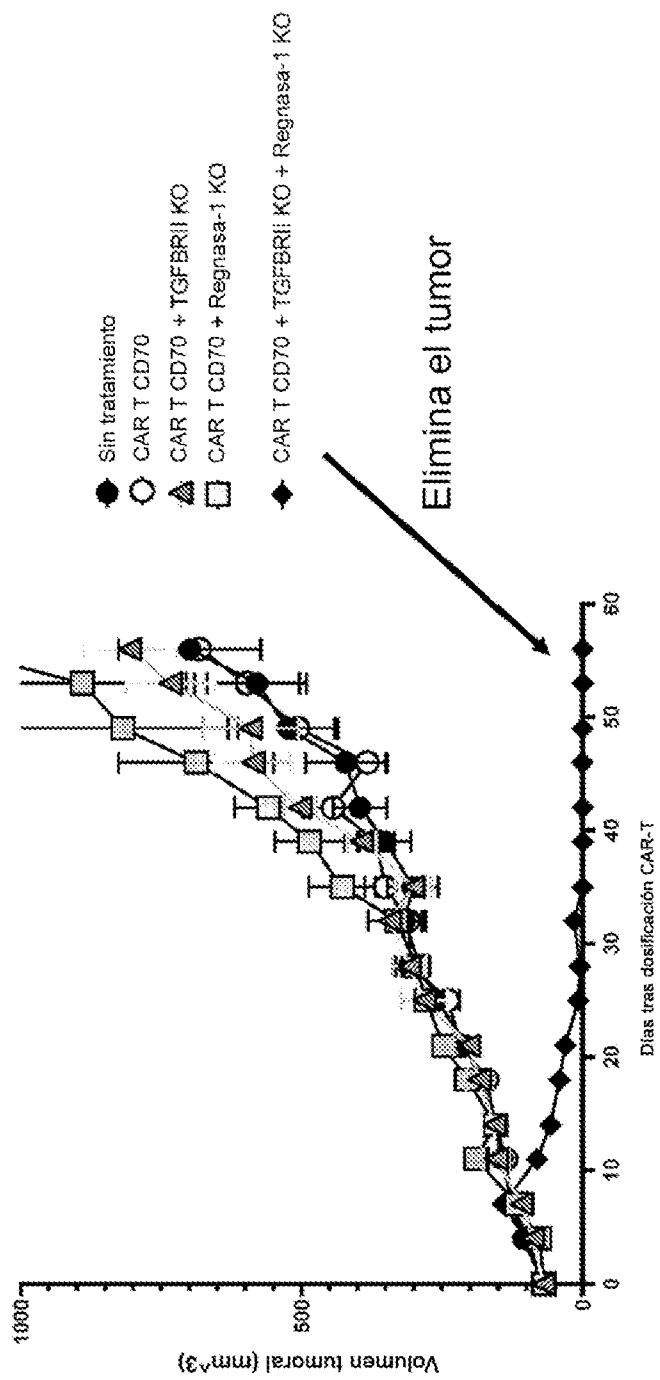


FIG. 17B

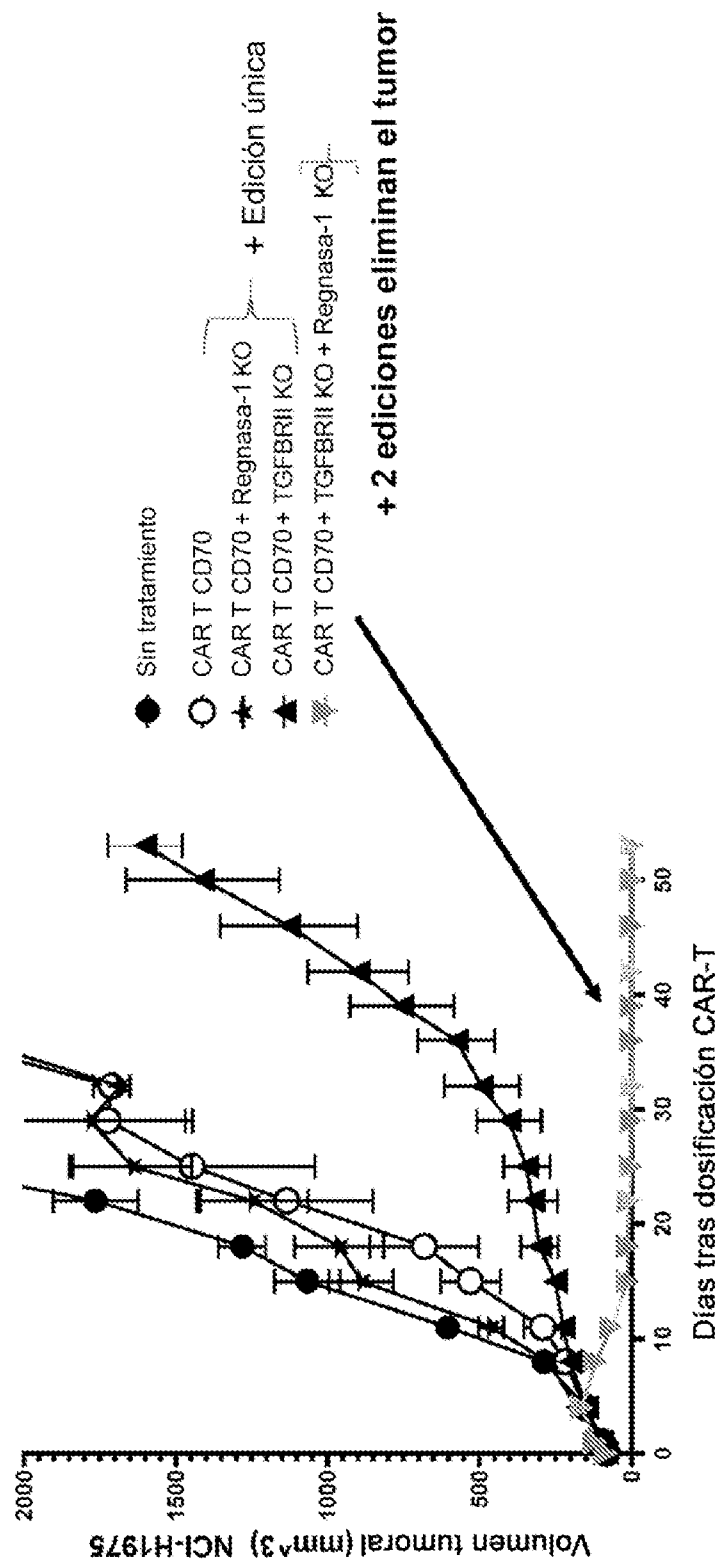


FIG. 18A

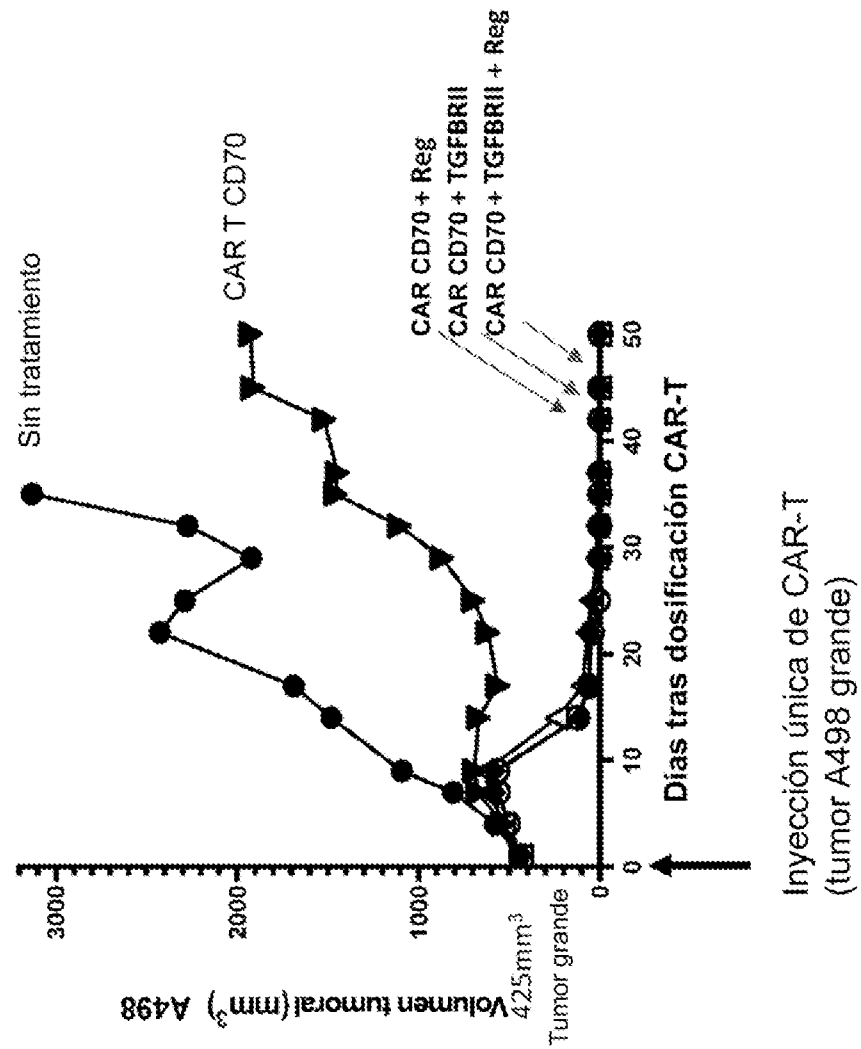


FIG. 18B

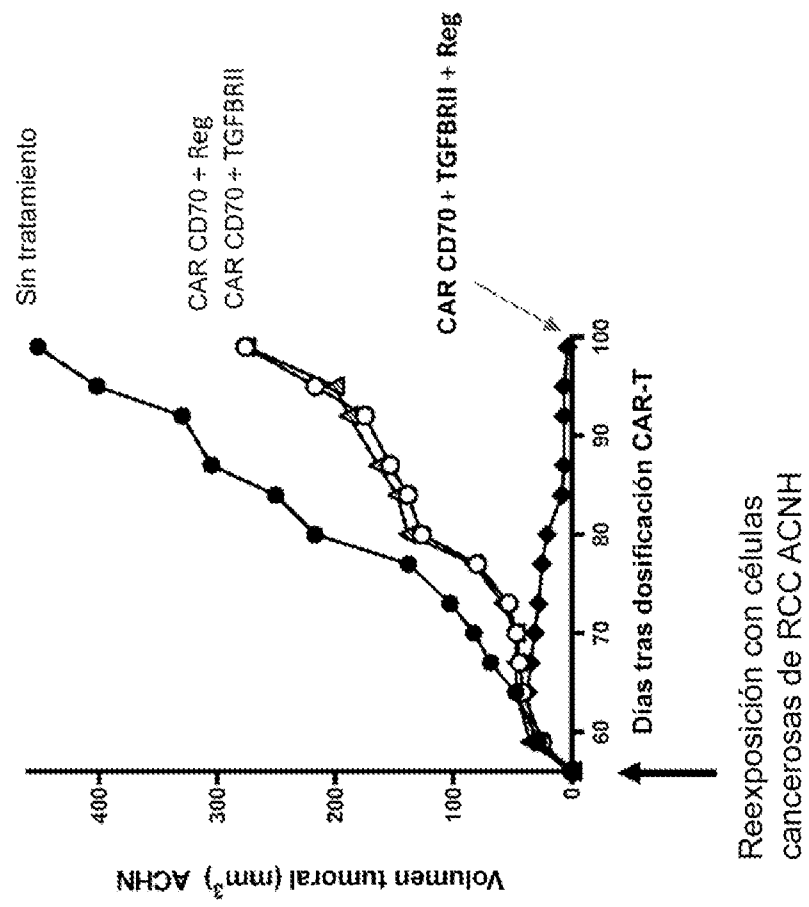


FIG. 19A

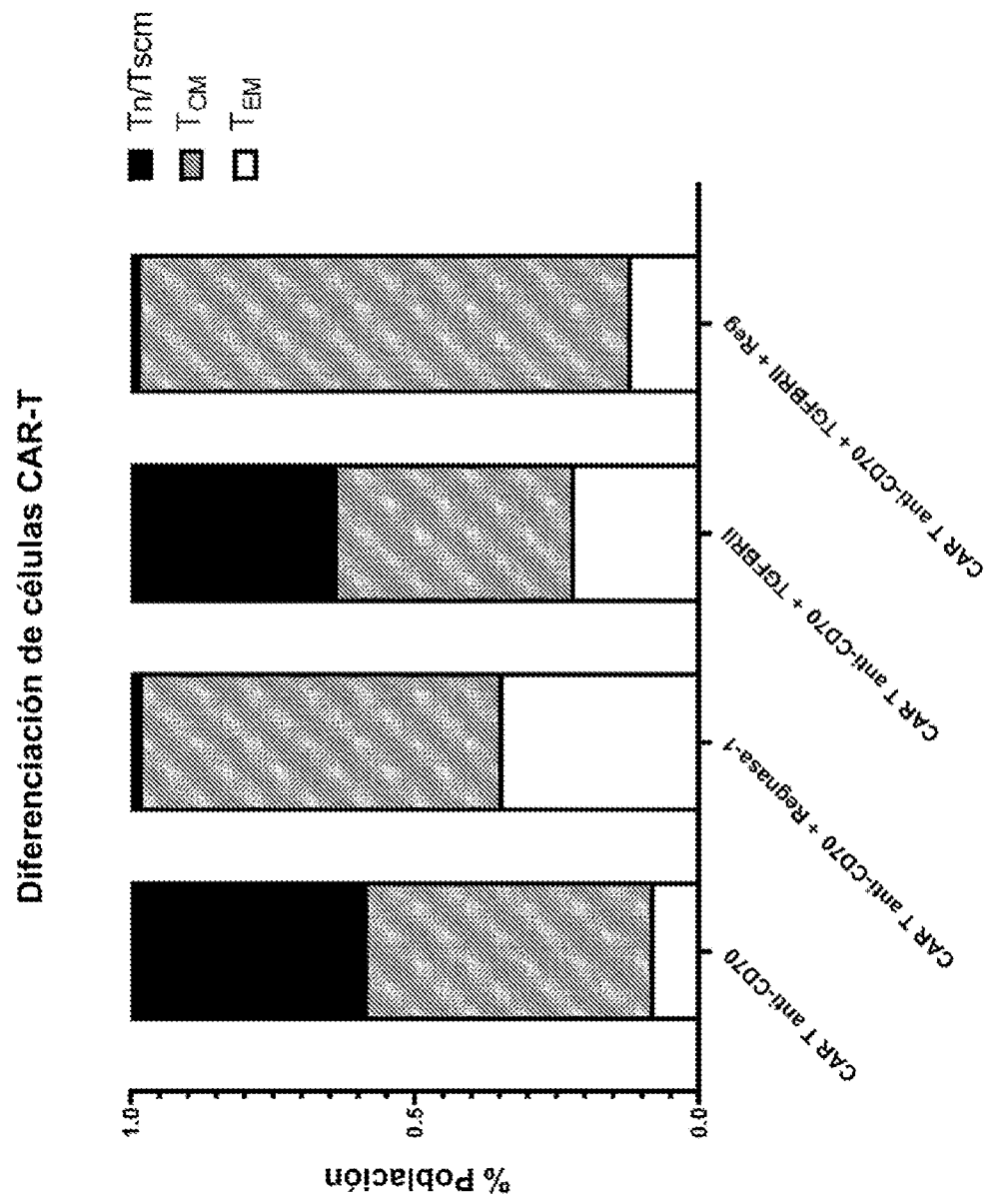


FIG. 19B

Células CAR+ en 100 ul de sangre

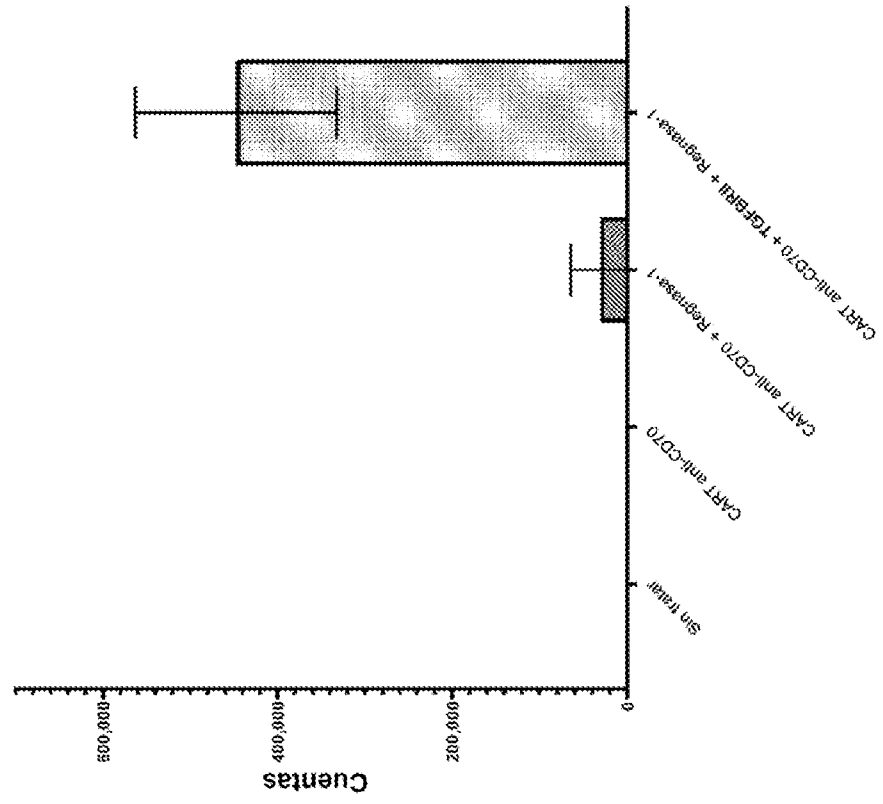


FIG. 20A

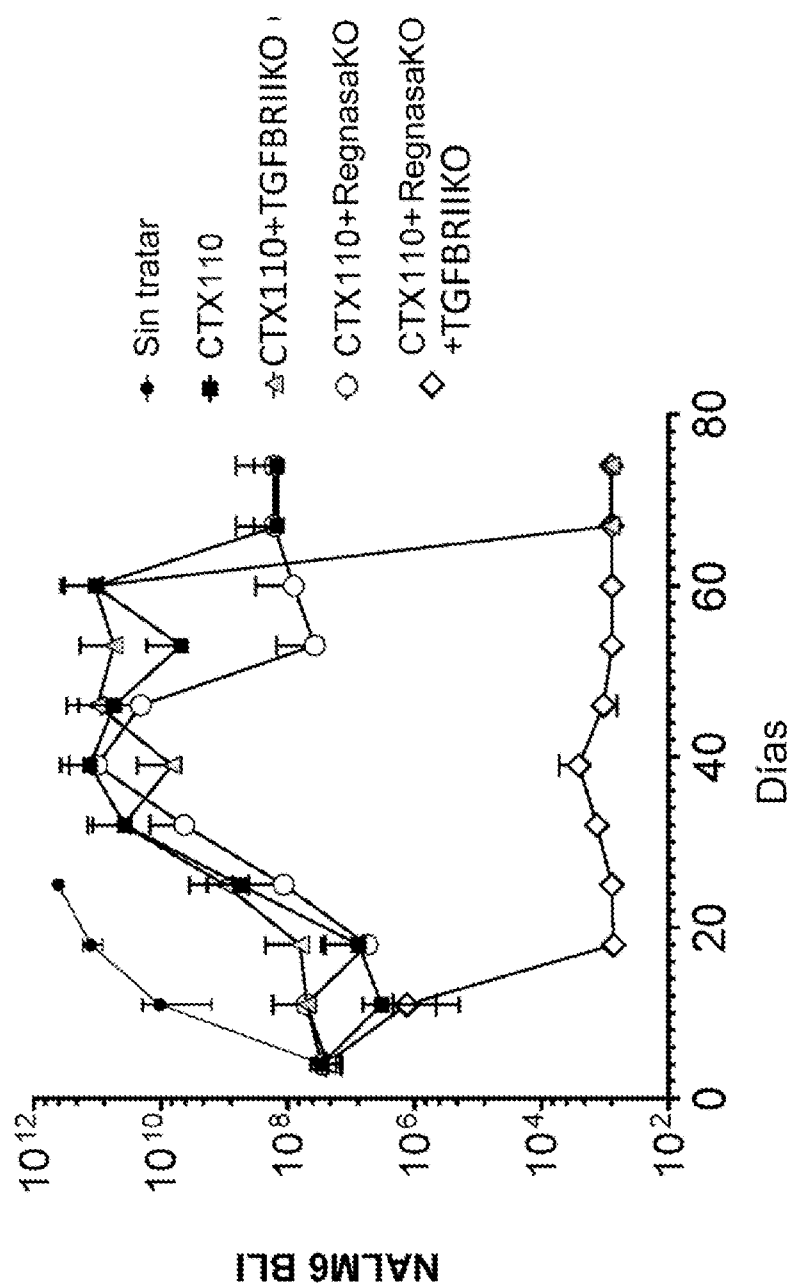


FIG. 20B

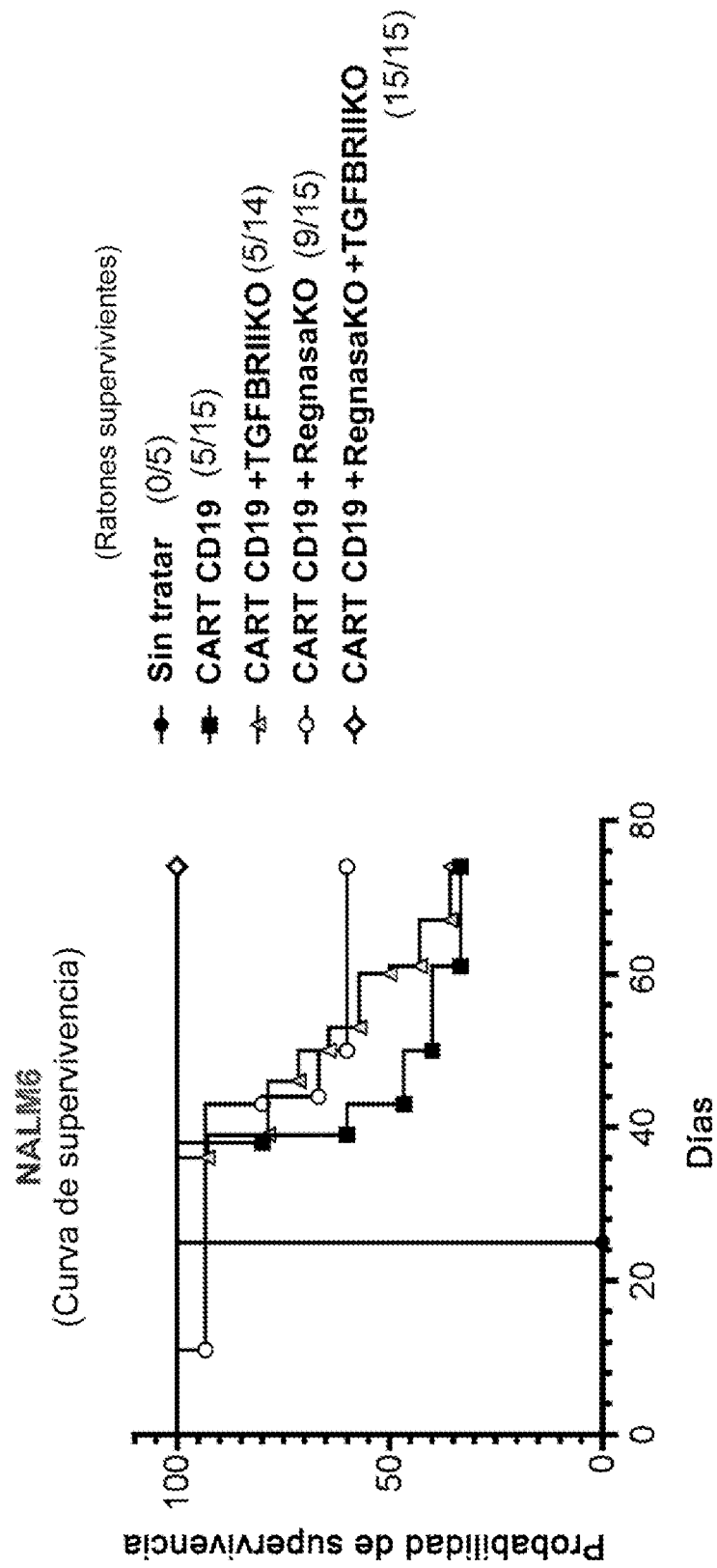


FIG. 21

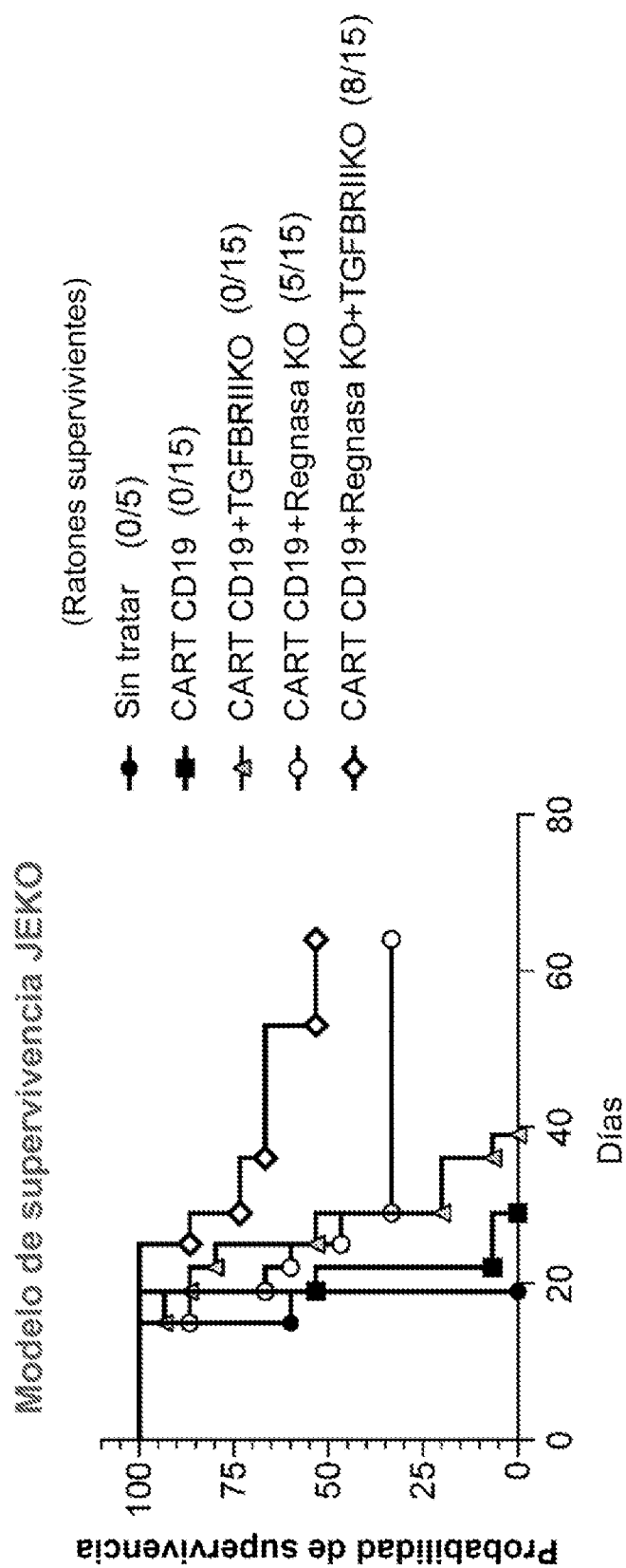


FIG. 22A

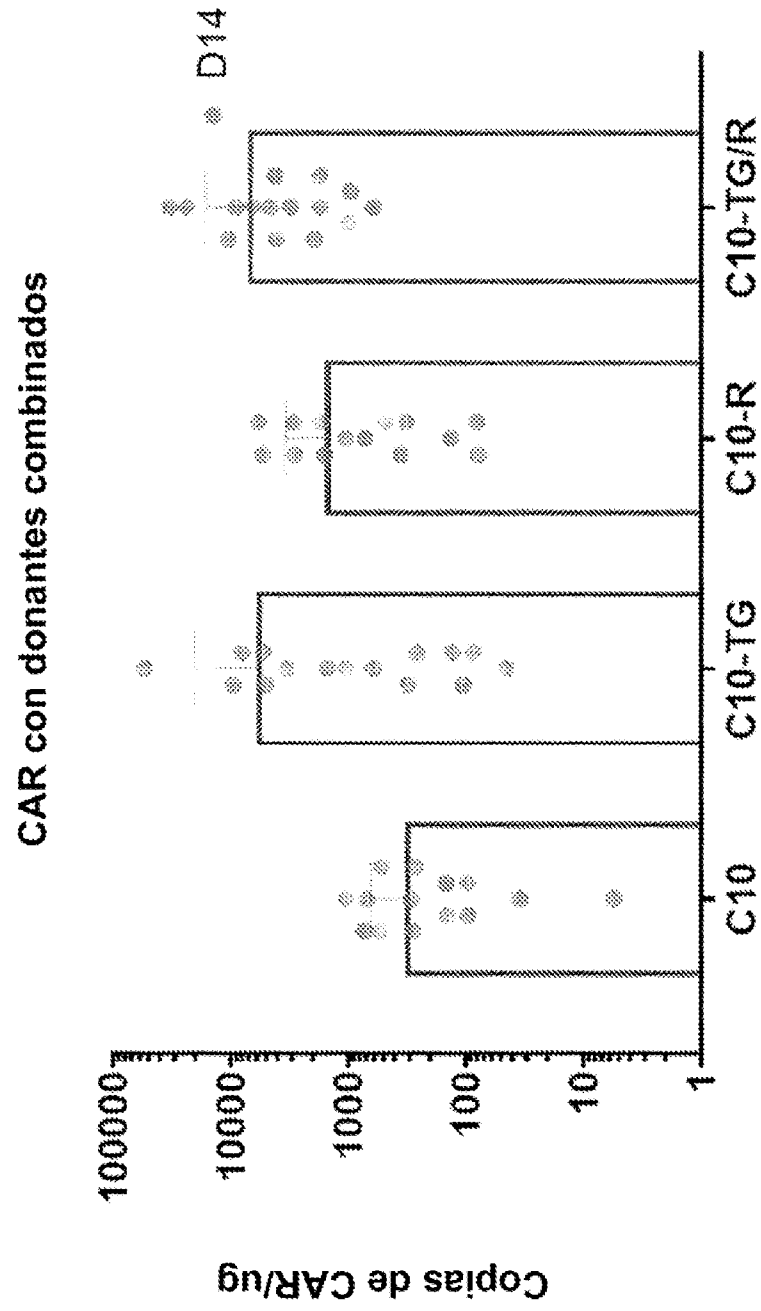


FIG. 22B

Nalm6 (B-LLA)

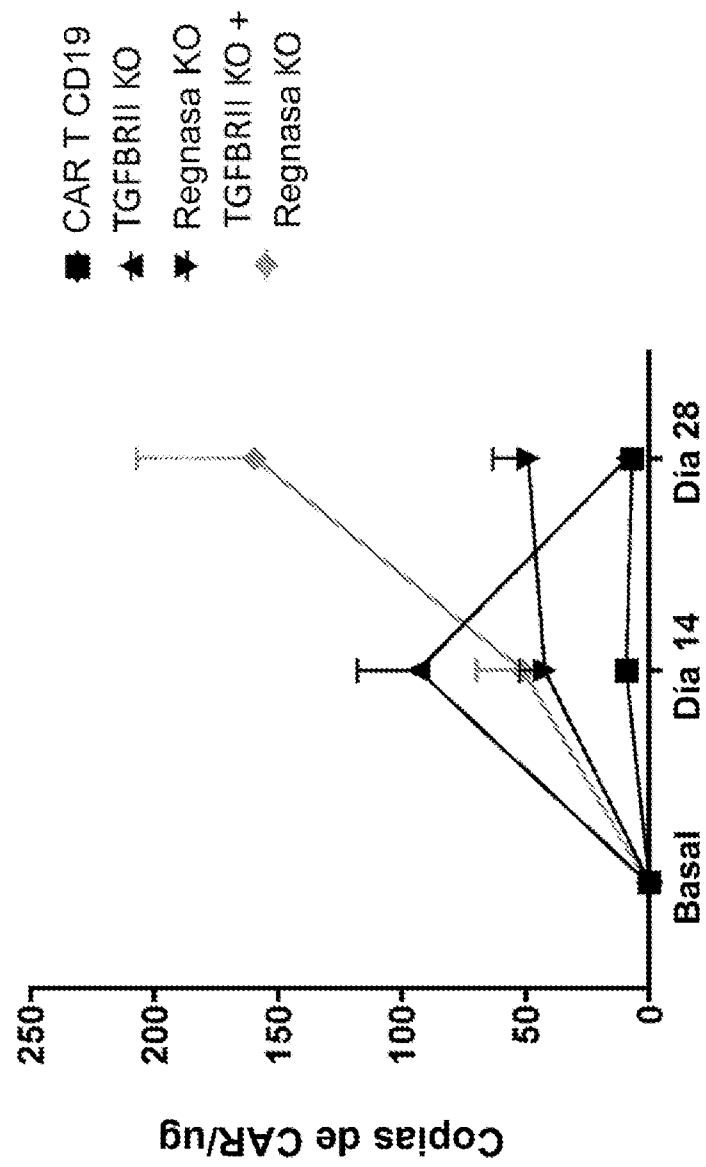


FIG. 23B

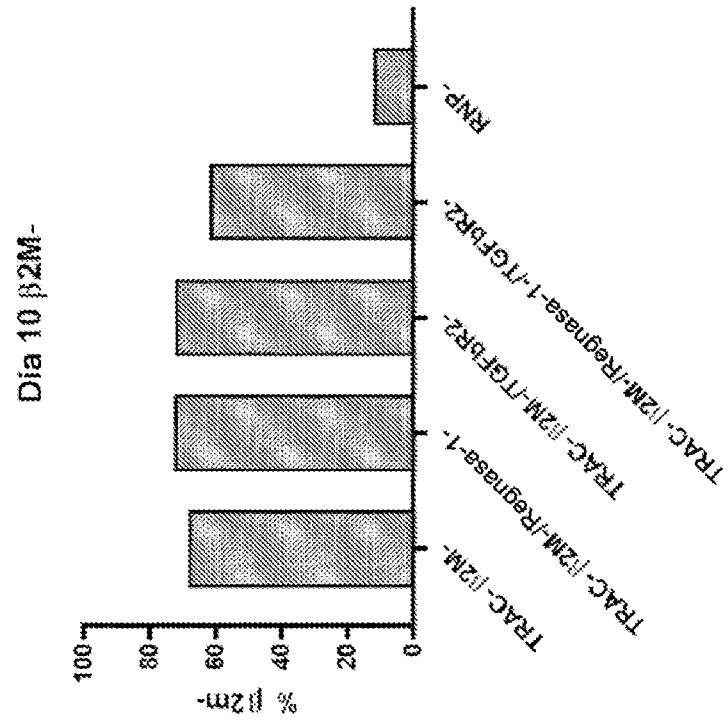


FIG. 23A

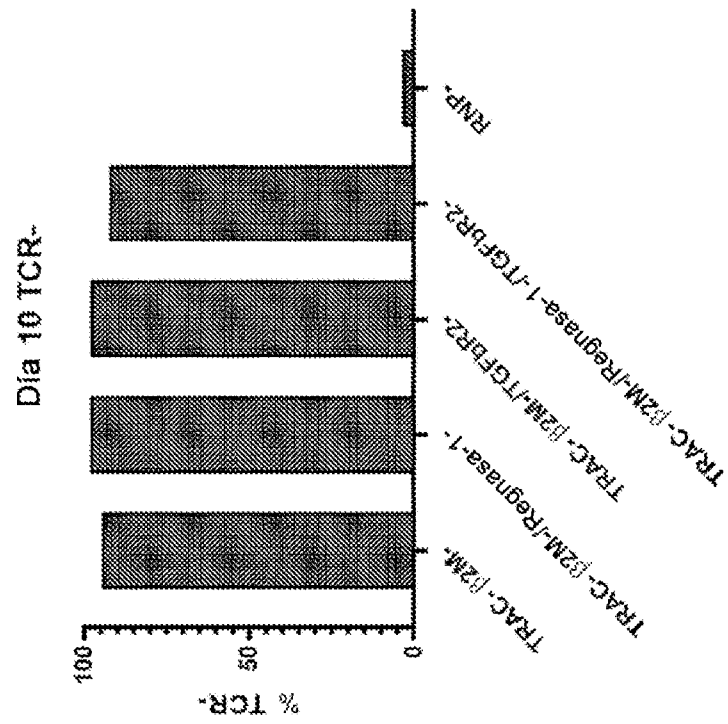


FIG. 23C

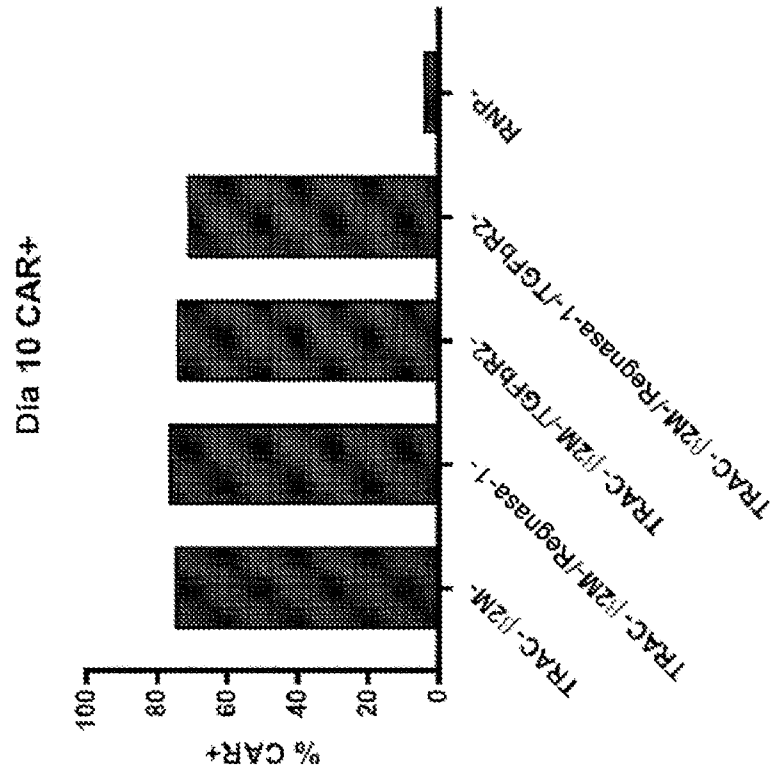


FIG. 23D

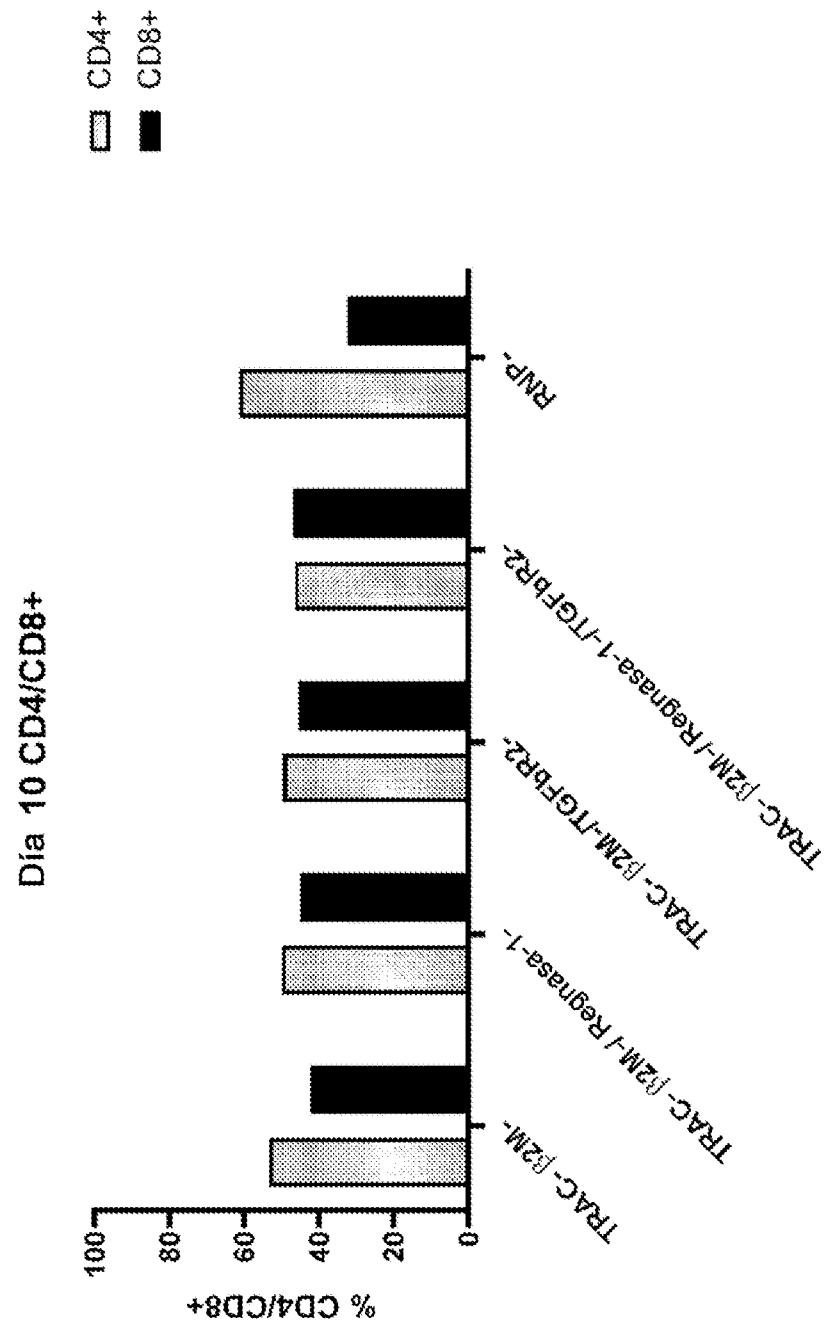


FIG. 24B

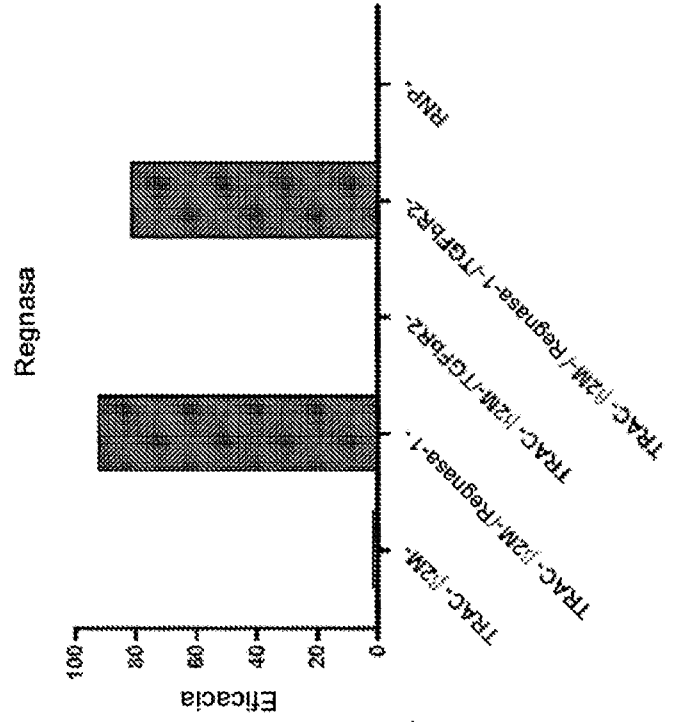


FIG. 24A

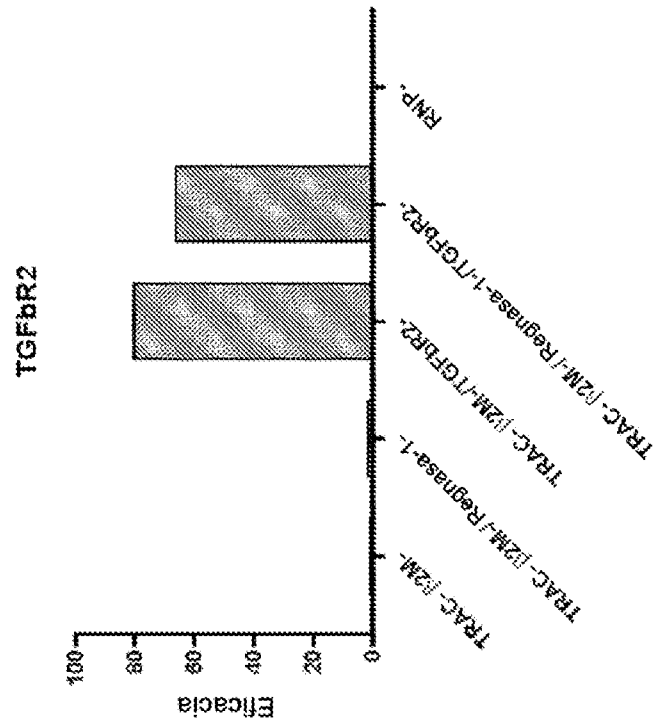


FIG. 25A

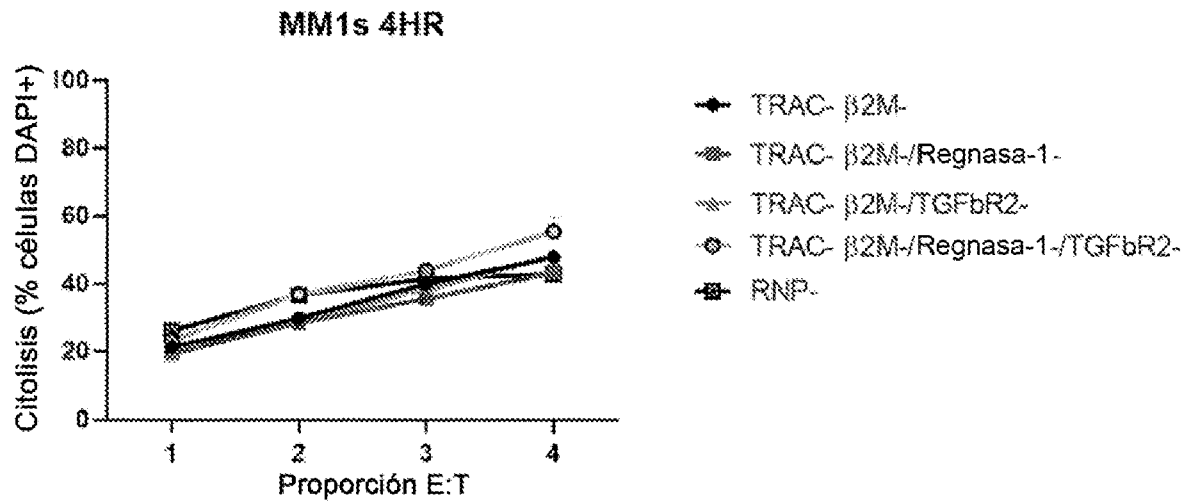


FIG. 25B

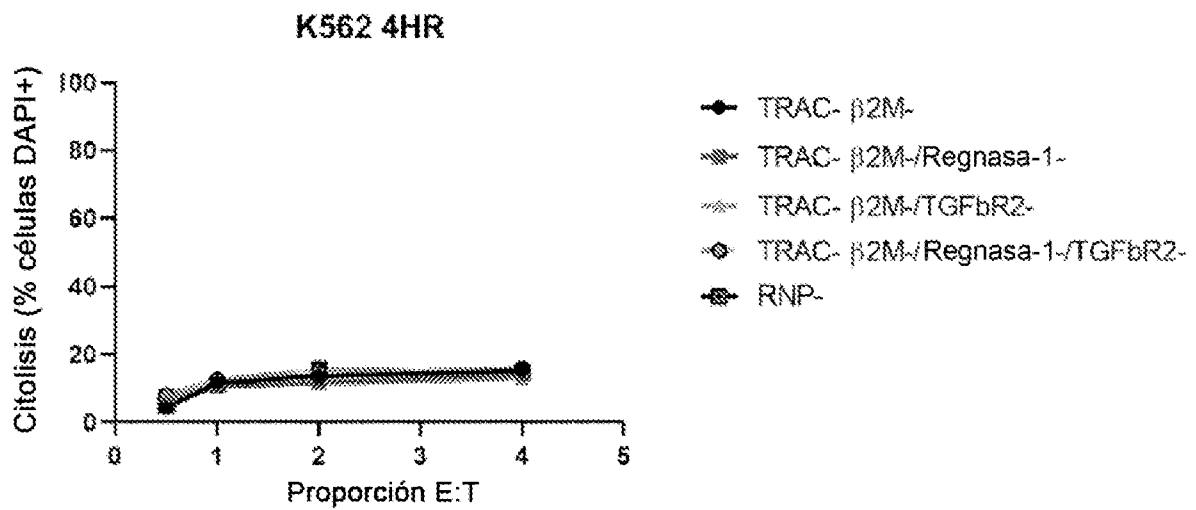


FIG. 25C

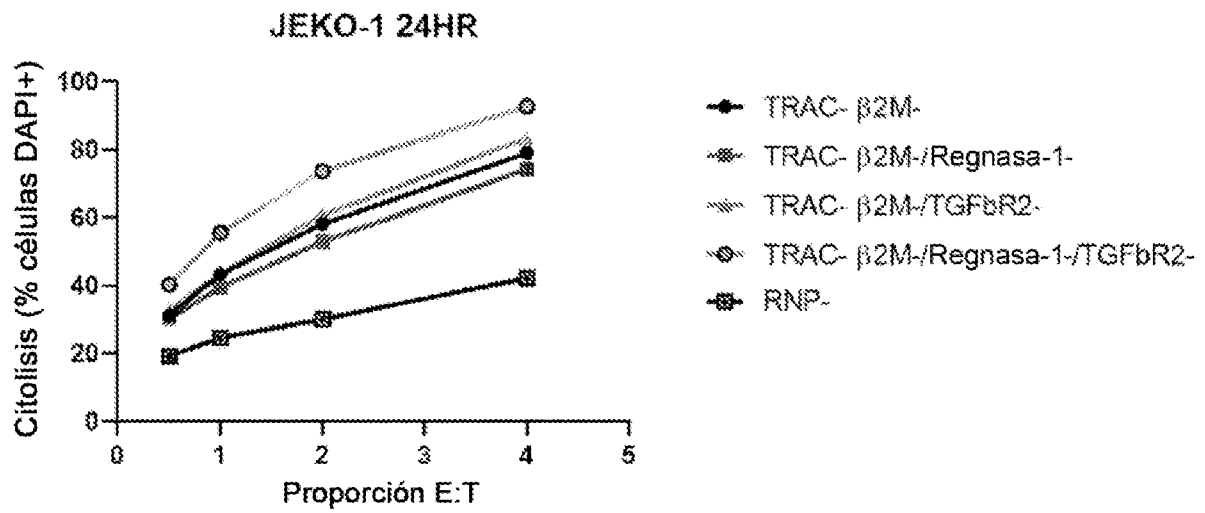


FIG. 25D

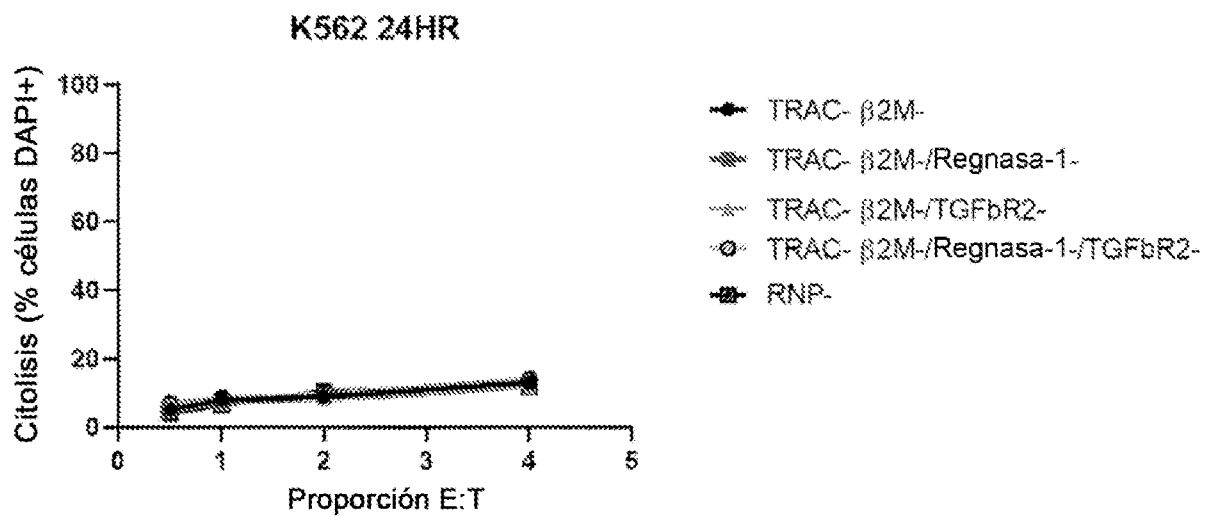


FIG. 26A

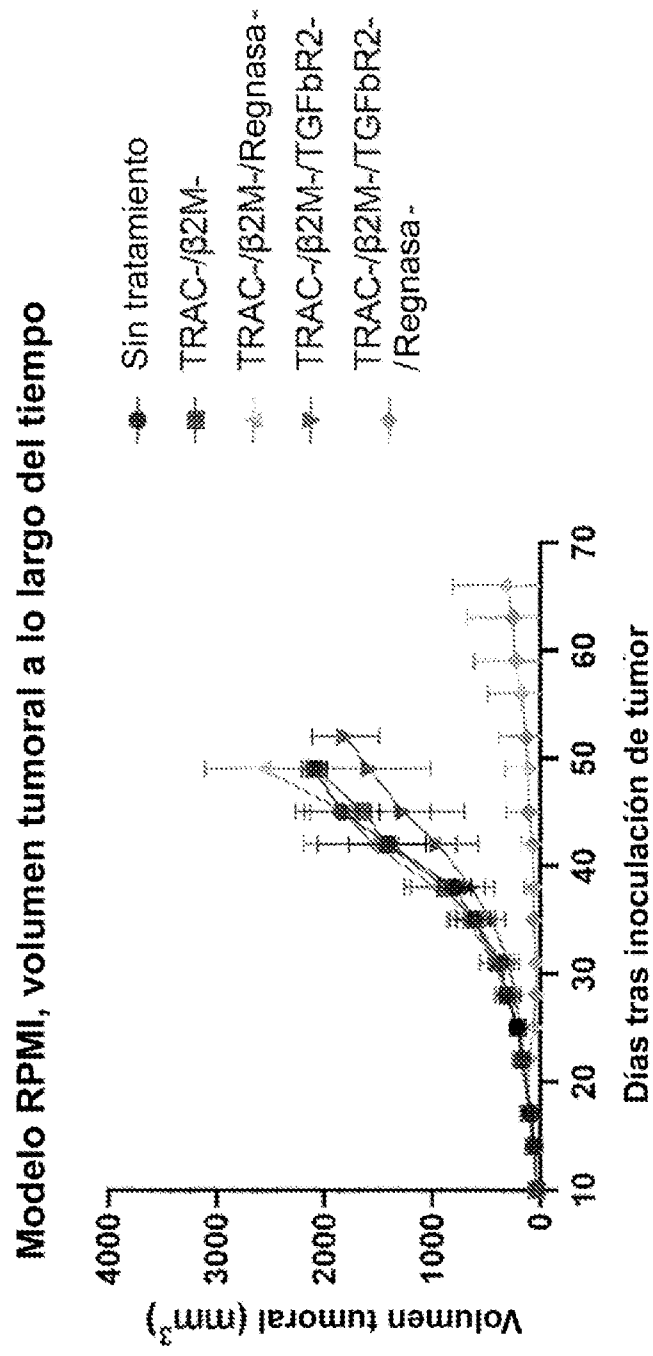


FIG. 26B

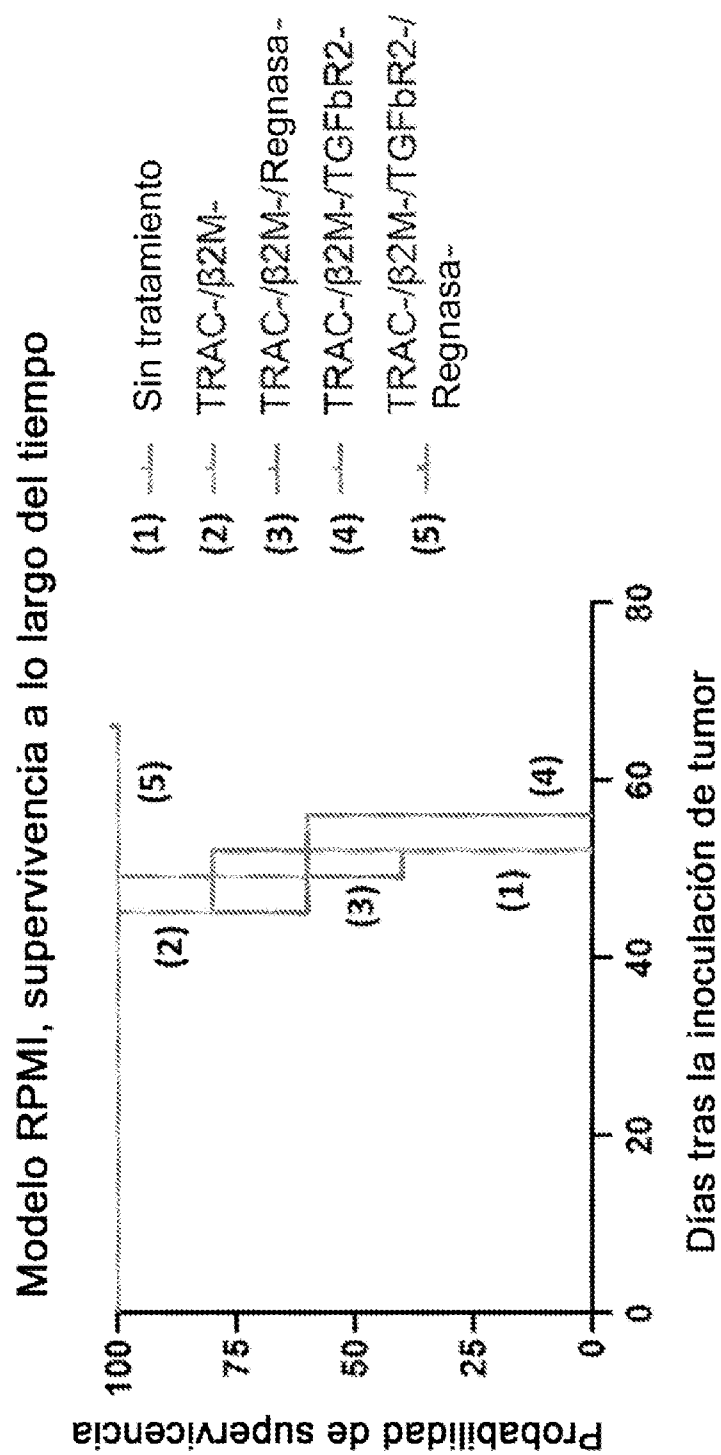


FIG. 26C

Modelo RPMI, recogida de sangre la semana 2

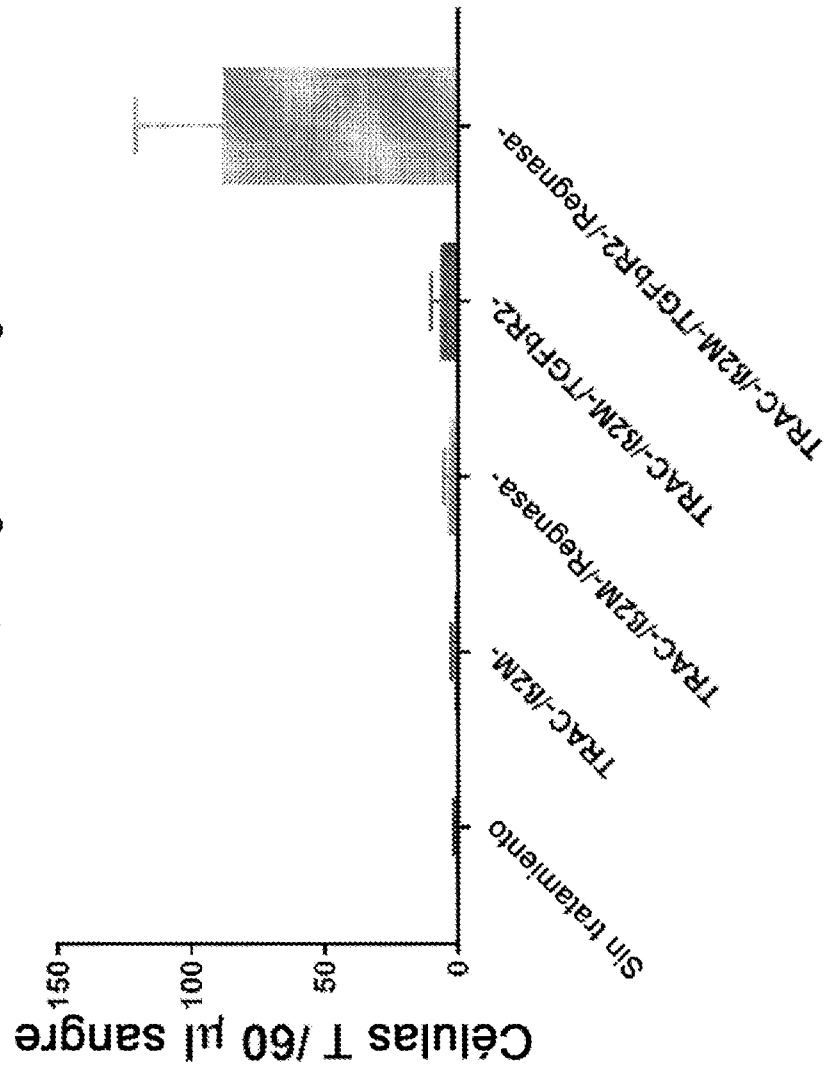


FIG. 27A

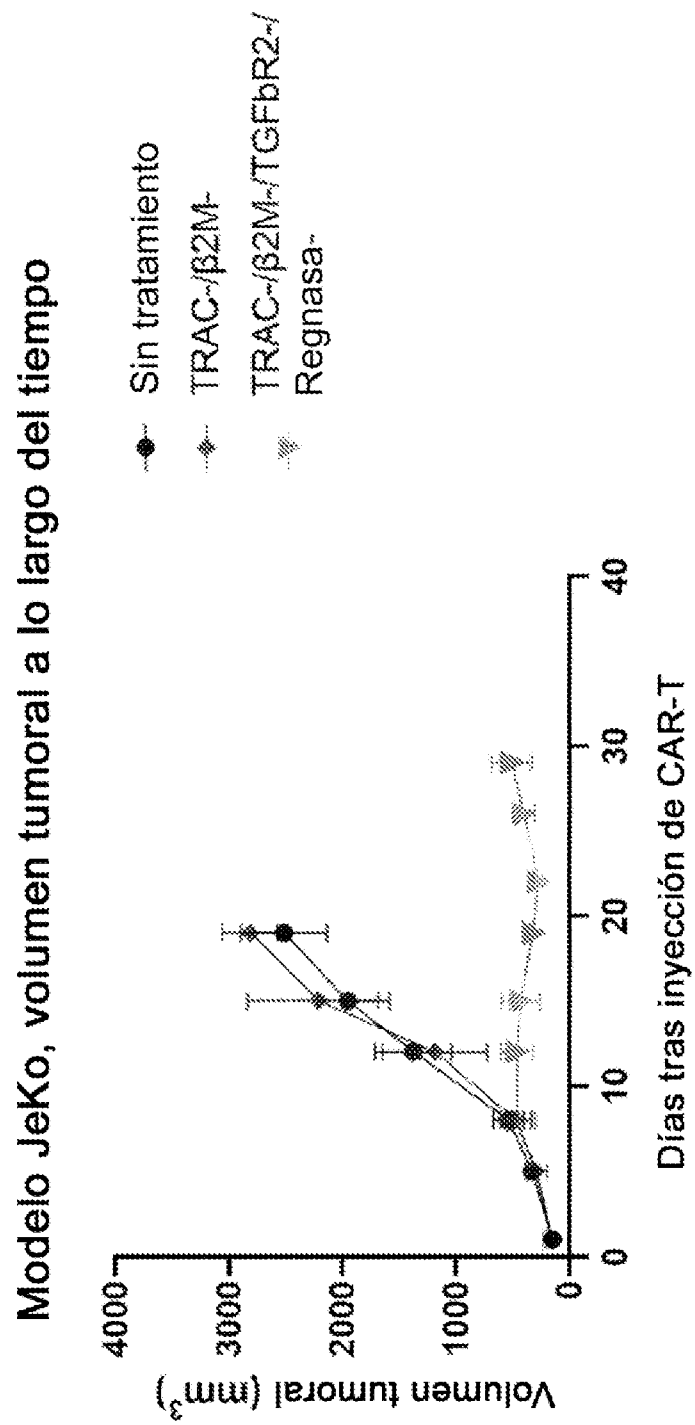


FIG. 27B

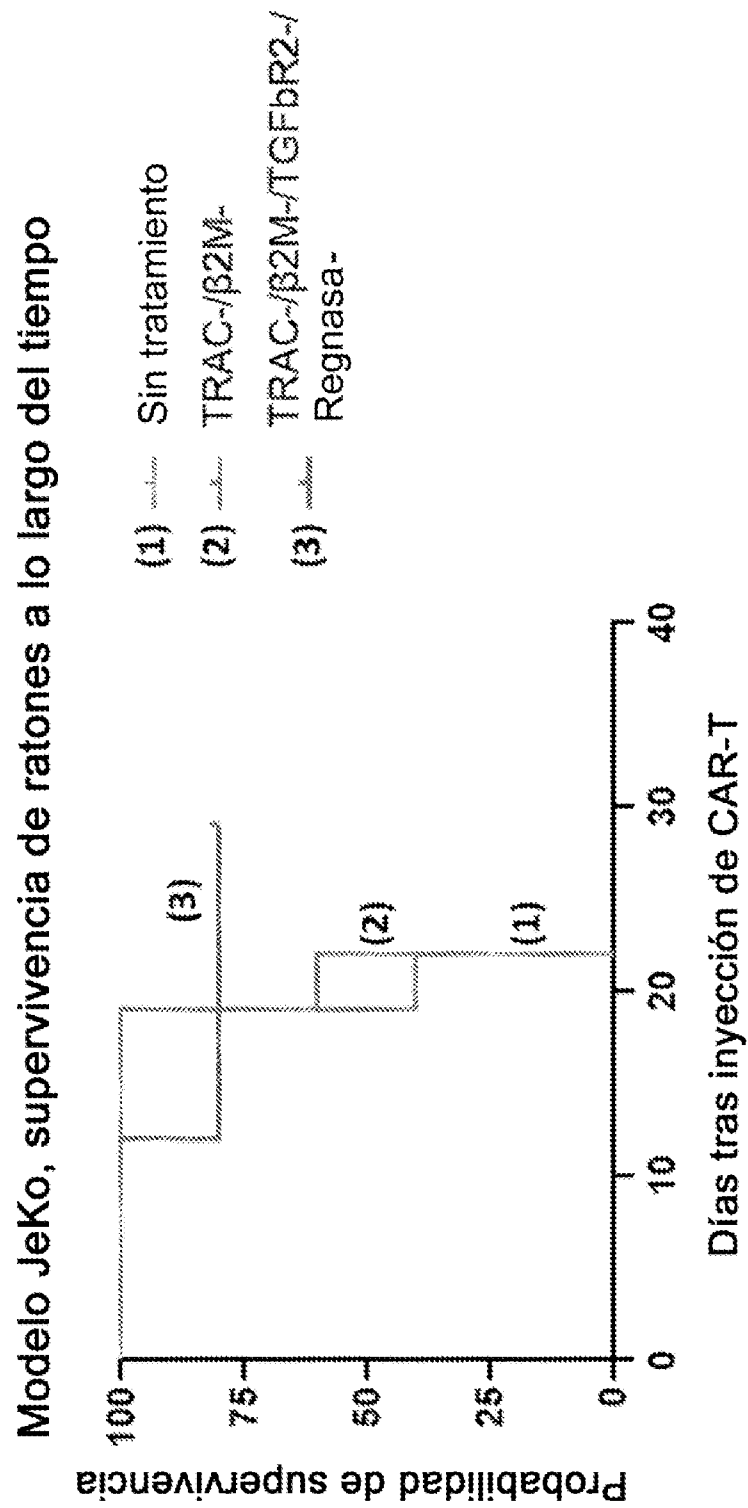


FIG. 27C

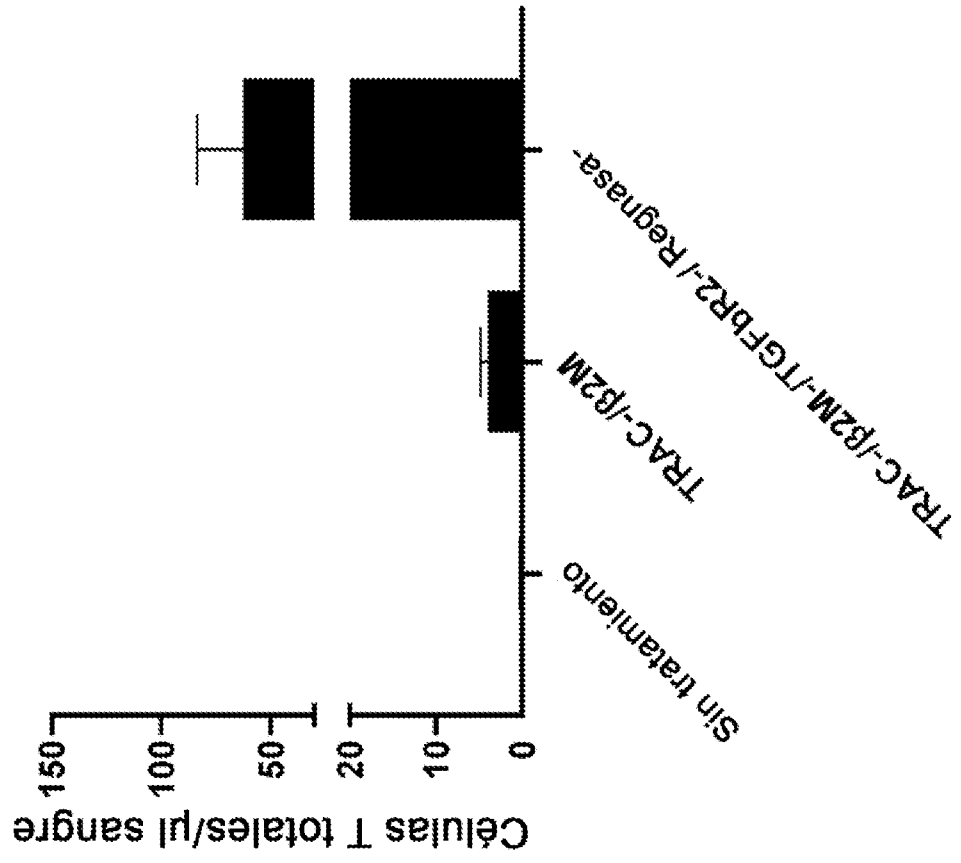


FIG. 27D

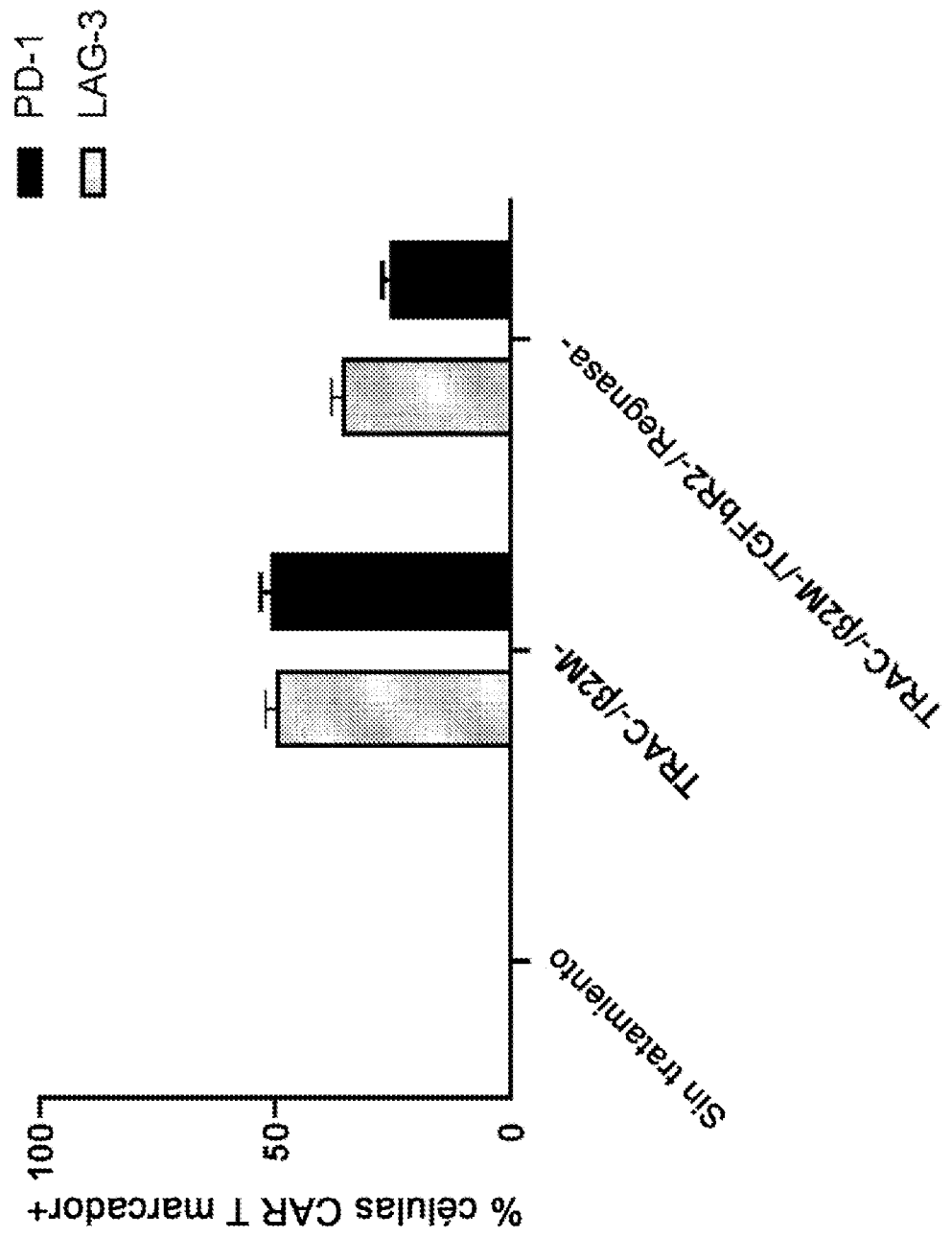


FIG. 27E

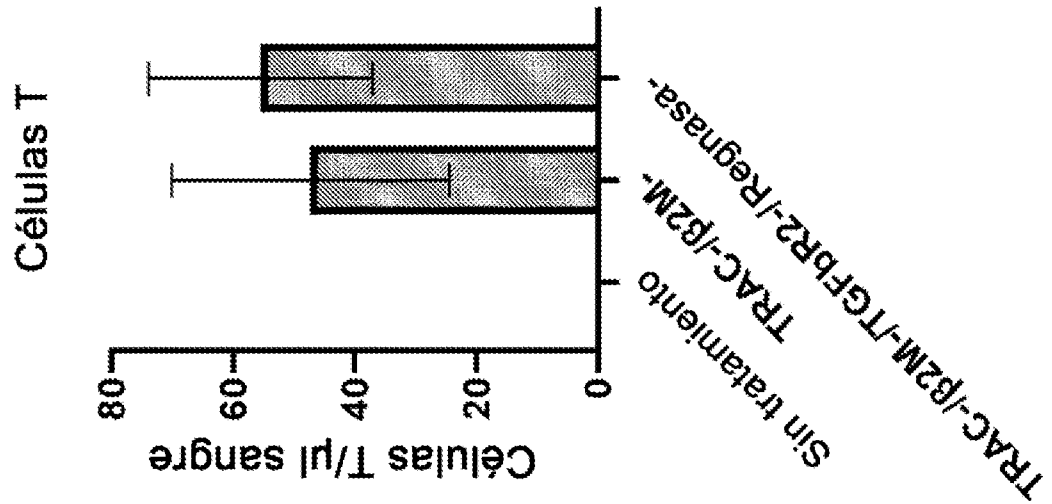


FIG. 27F

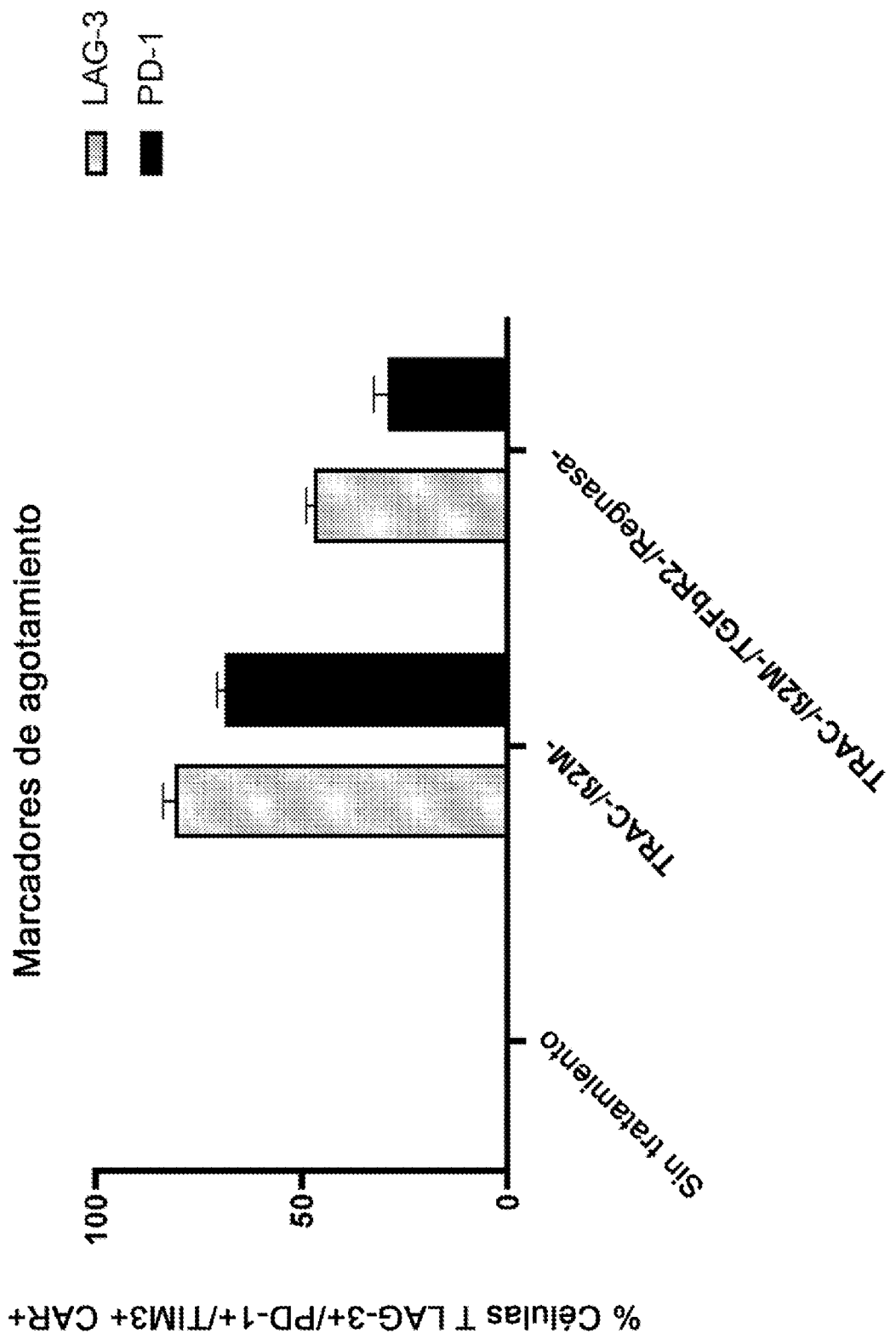


FIG. 28

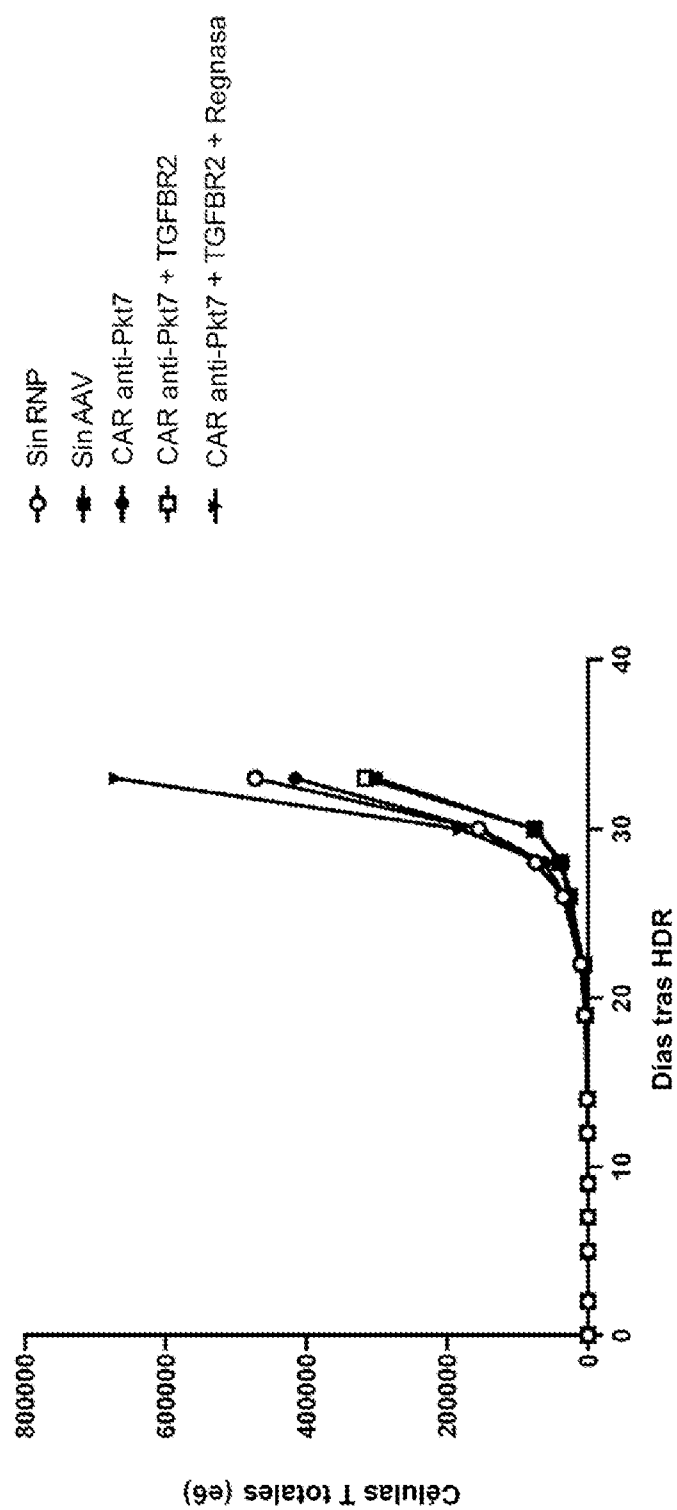


FIG. 29A

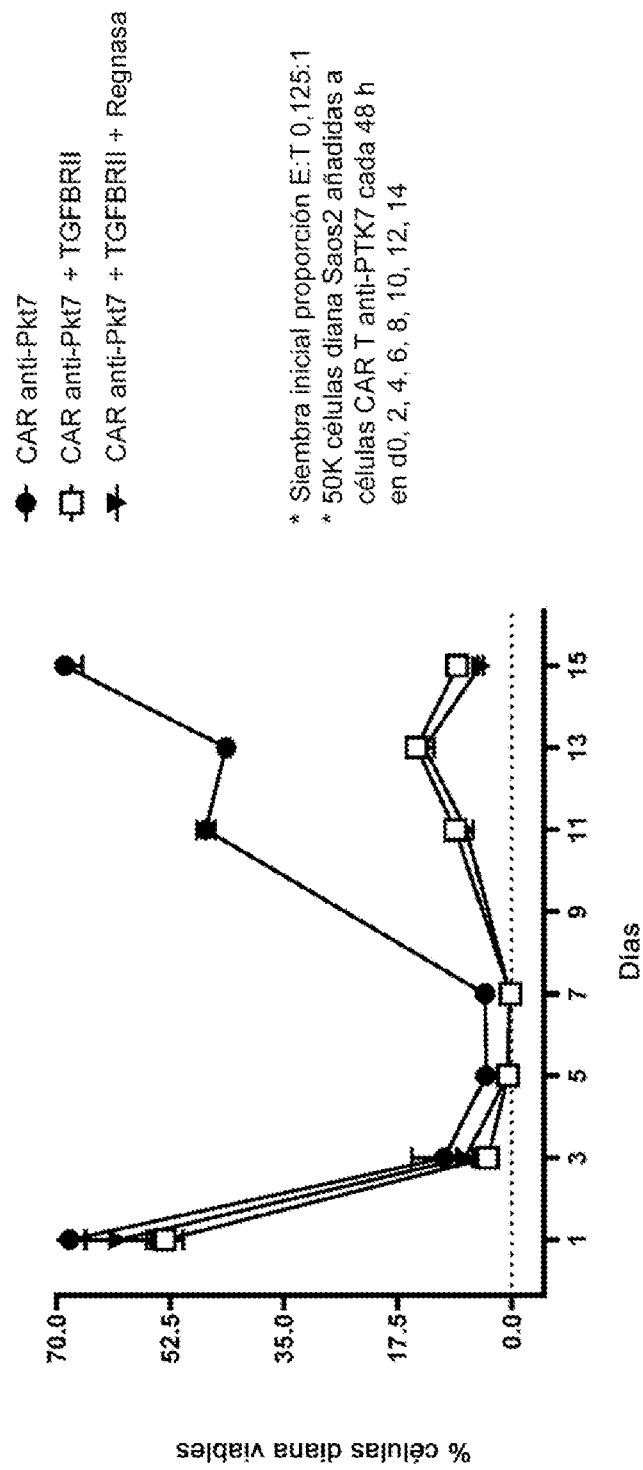


FIG. 29B

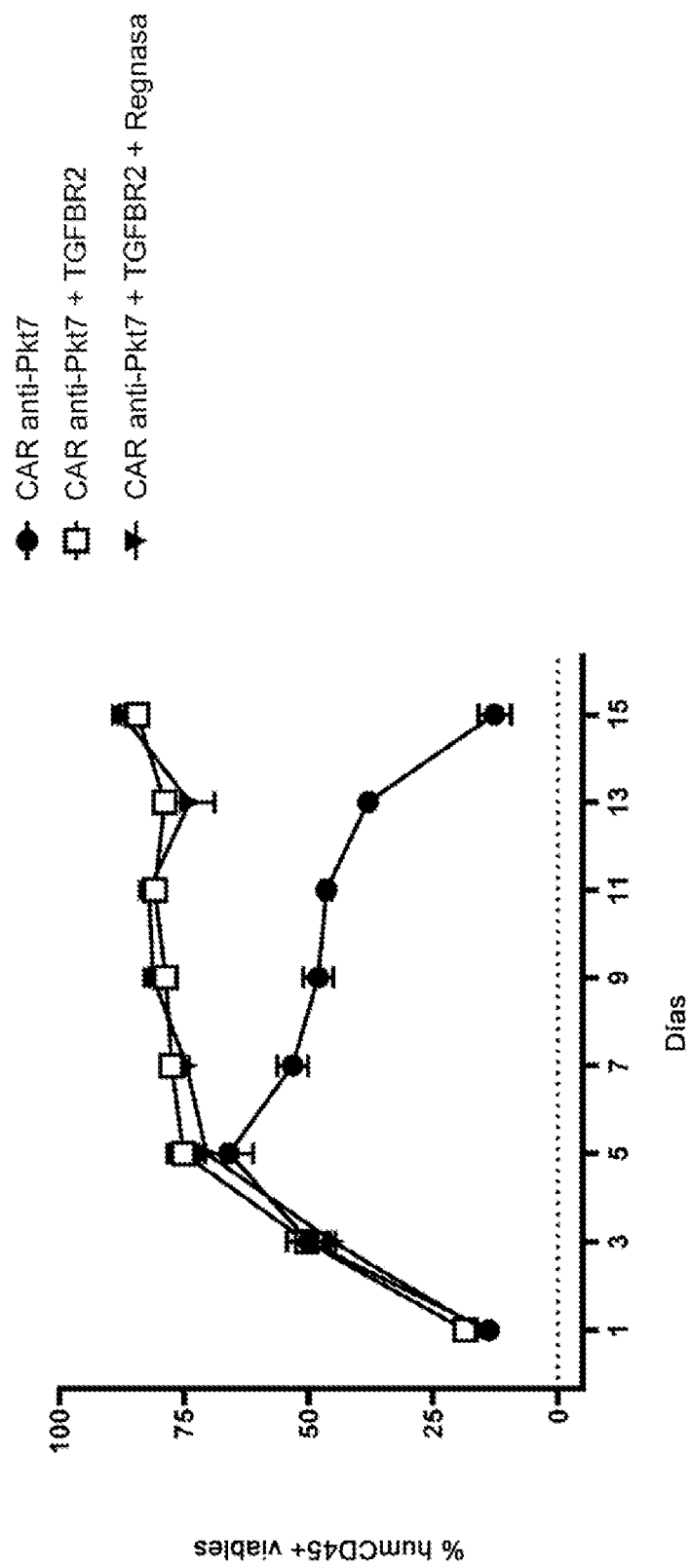


FIG. 29C

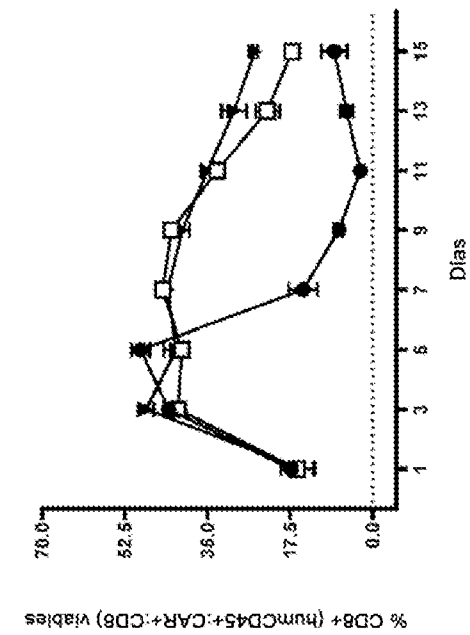


FIG. 29D

● CAR anti-Pk17
 □ CAR anti-Pk17 + TGFBR2
 ▲ CAR anti-Pk17 + TGFBR2 + Regnasa

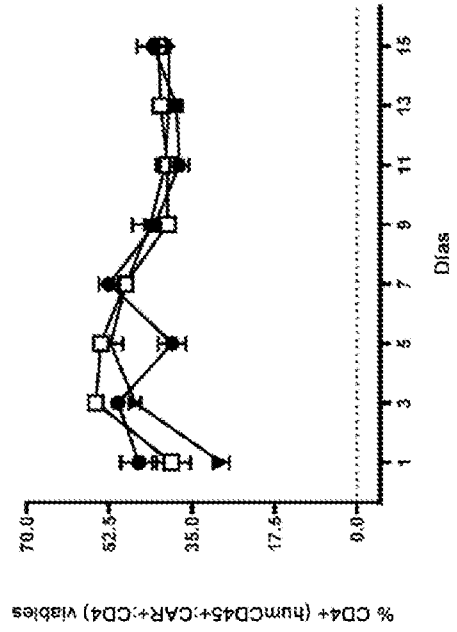


FIG. 30A

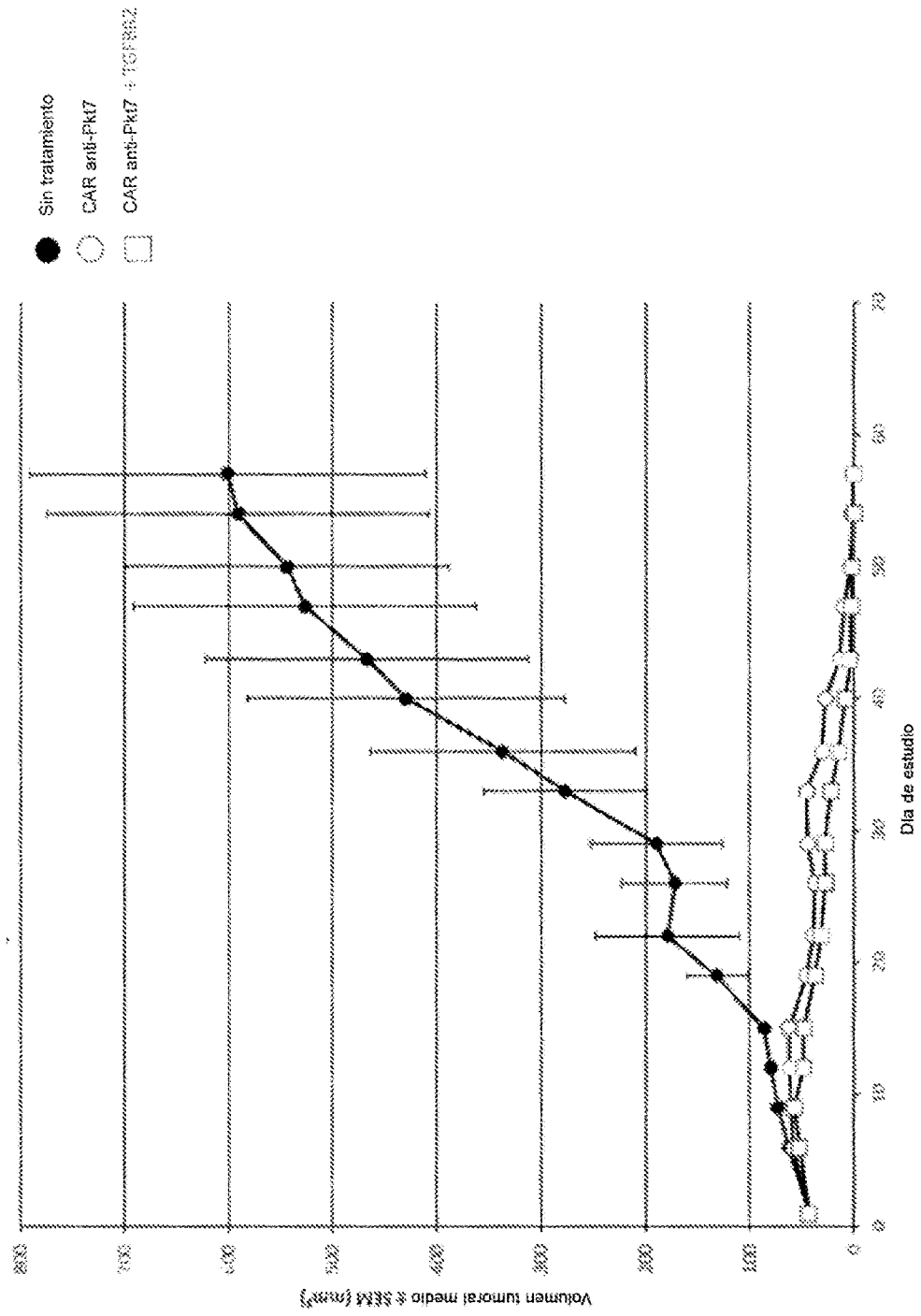


FIG. 30B

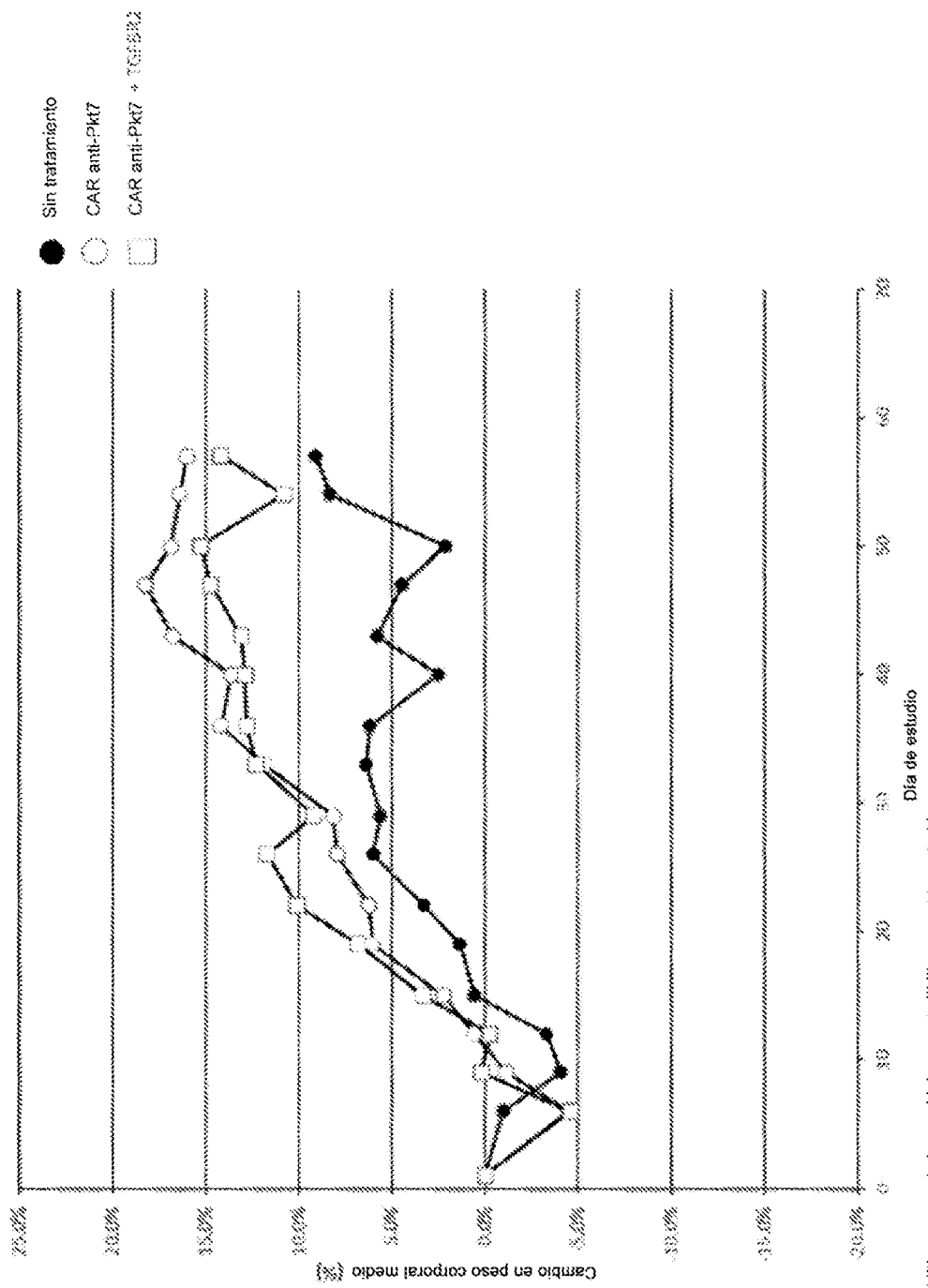


FIG. 31B

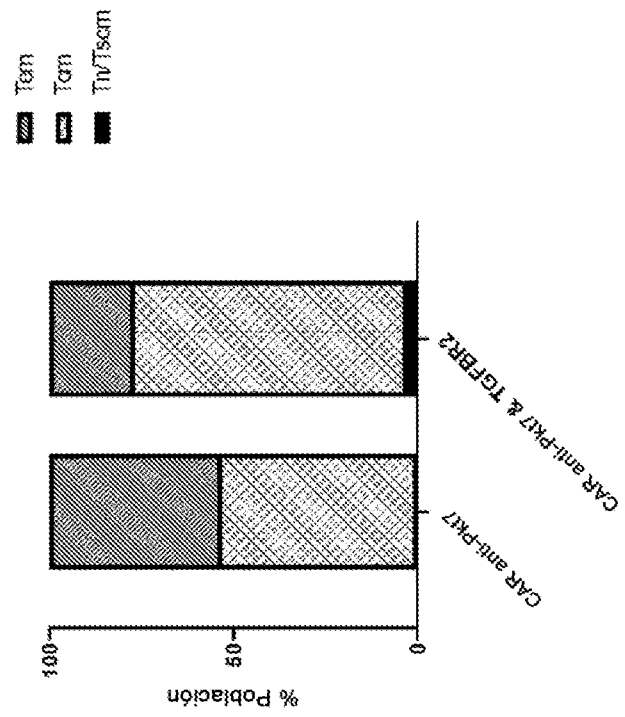


FIG. 31A

