

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 094**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/17** (2015.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**C12N 15/113** (2010.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 35/26** (2015.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2015** **PCT/US2015/055799**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016** **WO16069283**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2015** **E 15855440 (2)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 3215166**

54 Título: **Alteración de la expresión génica en células CAR-T y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**31.10.2014 US 201462073651 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.10.2024**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF  
PENNSYLVANIA (100.0%)  
3600 Civic Center Boulevard, 9th Floor  
Philadelphia PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**ZHAO, YANGBING;  
REN, JIANGTAO;  
LIU, XIAOJUN y  
JUNE, CARL H.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

### Observaciones:

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

ES 2 983 094 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

Alteración de la expresión génica en células CAR-T y usos de los mismos

## 5 Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que la transferencia celular adoptiva (ACT, por sus siglas en inglés) usando linfocitos T modificados con receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) es una estrategia prometedora para el tratamiento de cánceres (Louis *et al.*, 2011, Blood 118:6050-6056; Kochenderfer *et al.*, 2010, Blood 116:3875-3886 y Porter *et al.*, 2011, N Engl J Med 365:725-733).

Los problemas de seguridad asociados a la integración usando vectores lentivíricos o retrovíricos son una preocupación importante para la modificación de las células usadas para la ACT. Se han realizado algunos avances para evitar efectos secundarios no deseados específicos o inespecíficos, tales como la transfección de ARN de linfocitos T con receptor de linfocitos T (TCR) o la electroporación de ARN con CAR (Zhao, 2006, Mol Ther 13:151-159; Mitchell *et al.*, Smits *et al.*, 2004, Leukemia 18:1898-1902). Al minimizar la dosis tanto de ARN como de linfocitos T, dichos métodos permiten de manera eficiente la introducción de múltiples genes en las células. Sin embargo, la principal limitación para la expresión transitoria de los CAR es la actividad efectora y la funcionalidad subóptimas de los linfocitos T transfectados con ARN. Se han usado múltiples infusiones de linfocitos T y/o el uso significativo de quimioterapia en dosis bajas para mejorar la función de CAR (Barrett *et al.*, 2013, Hum Gene Ther 24(8):717-27).

Se han hecho diversos intentos para mejorar la actividad efectora y la funcionalidad de los CAR y al mismo tiempo evitar la necesidad de terapias combinadas y tratamientos adicionales. El aumento del ARN durante el proceso de transfección plantea un impacto negativo en la función de los linfocitos T, especialmente en las actividades antitumorales *in vivo* (Barrett *et al.*, 2011, Hum Gene Ther 22:1575-1586). También se han ensayado construcciones alternativas que fusionan un fragmento de anticuerpo del antígeno anti CD3 con un fragmento de anticuerpo del antígeno antitumoral en ensayos clínicos para tratamientos contra el cáncer (Bargou *et al.*, 2008, Science 321:974-977; Klinger *et al.*, 2012, Blood 119:6226-6233.). Desafortunadamente, estas construcciones tenían una funcionalidad muy limitada debido a una semivida corta, una mala accesibilidad a los sitios celulares diana y una falta de función de señalización adecuada a largo plazo.

El documento WO 2014/059173 A2 divulga compuestos modificadores de linfocitos T y usos de los mismos. El documento WO 2015/136001 A1 divulga un método para generar linfocitos T compatibles para el trasplante alogénico. El documento WO 2013/074916 A1 divulga linfocitos T con CAR+ modificados genéticamente para eliminar la expresión del receptor de linfocitos T y/o HLA. El documento WO 2014/153470 A2 divulga la alteración dirigida de genes del receptor de linfocitos T usando proteínas nucleasas con dedos de cinc genomanipuladas. Kershaw *et al.*, Nature Reviews Cancer, vol. 13, n.º 8, 1 de agosto de 2013 (2013-08-01), páginas 525-541, divulgan que la inhibición de FAS puede mejorar la supervivencia de los linfocitos T en entornos ricos en ligando FAS. Dotti *et al.* Blood (2005) vol. 105, número 12, páginas 4677-4684, divulgan que silenciar la expresión de FAS en los linfocitos T previene la apoptosis inducida por FAS.

Los estudios clínicos de TCR se han visto obstaculizados por los bajos niveles de expresión del TCR transducido, así como por el emparejamiento erróneo de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Debido a que potencialmente se pueden expresar cuatro TCR en la superficie celular cuando un linfocito T transcribe las cadenas de dos TCR diferentes (heterodímeros "mal emparejados" alfa/beta naturales, alfa/beta exógenos y naturales/exógenos), resultan evidentes obstáculos importantes para el uso de este enfoque. En los estudios realizados hasta la fecha, los estudios preclínicos han demostrado claramente que los emparejamientos erróneos de TCR tienen el potencial de inducir un reconocimiento perjudicial de los autoantígenos.

Aunque los datos clínicos tempranos de TCR y linfocitos T con CAR obtenidos en el tratamiento de cánceres han mostrado resultados prometedores, el riesgo para el paciente es alto, y los linfocitos T de algunos pacientes no son lo suficientemente potentes para un tratamiento eficaz incluso después de la redirección de TCR o CAR, lo que obliga modificación de los linfocitos T alogénicos procedentes de donantes. Sin embargo, el receptor endógeno de linfocitos T  $\alpha\beta$  y los linfocitos T alogénicos infundidos pueden reconocer antígenos de histocompatibilidad mayores y menores en el receptor, lo que lleva a la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD, por sus siglas en inglés). Como resultado, la mayoría de los ensayos clínicos actuales que usan la infusión de linfocitos T con CAR autólogos se basan en la tolerancia inmunitaria para prevenir el reconocimiento perjudicial de tejidos normales mediado por TCR después de la transferencia celular adoptiva. Este enfoque ha logrado éxitos clínicos tempranos, pero está limitado por el tiempo y el coste de fabricar productos de linfocitos T específicos para cada paciente. Por lo tanto, existe la necesidad de métodos más seguros para modificar los linfocitos T, evitando al mismo tiempo el tiempo y el coste necesarios para fabricar productos de linfocitos T específicos para cada paciente.

## Sumario de la invención

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

Un aspecto de la invención se refiere a un linfocito T modificado que comprende:

- (a) un ácido nucleico capaz de disminuir o eliminar la expresión de un gen FAS endógeno; y
- (b) un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula coestimuladora.

5

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para generar un linfocito T modificado que comprende: introducir en un linfocito T

- (a) un ácido nucleico capaz de disminuir o eliminar la expresión de un gen FAS endógeno; y
- (b) un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula coestimuladora.

10

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado anterior de la invención para su uso como un medicamento. Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado anterior de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una inmunidad mejorada en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de dicha composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite.

15

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado anterior de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéutica, en donde dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona preferentemente del grupo que consiste en síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED, por sus siglas en inglés), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS, por sus siglas en inglés), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP, por sus siglas en inglés), enfermedad de Behcet, miocardiopatía, esprue celiac-dermatitis herpetiforme, síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica (CFIDS, por sus siglas en inglés), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD, por sus siglas en inglés), penfigoide cicatricial, enfermedad de las crioaglutininas, síndrome de crest, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis-juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP, por sus siglas en inglés), nefropatía de IgA, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artropatía psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (PSS, por sus siglas en inglés), también conocida como esclerosis sistémica (SS, por sus siglas en inglés)), síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo, granulomatosis de Wegener y cualquier combinación de las mismas.

20

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado anterior de la invención para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéutica, en donde el cáncer se selecciona preferentemente del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello del útero, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y cualquier combinación de los mismos.

25

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado anterior de la invención para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en una célula o tejido diana en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto una cantidad eficaz de dicha composición farmacéutica, en donde dicho método comprende preferentemente inducir la lisis de la célula o tejido diana, en donde dicha lisis inducida es preferentemente citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés).

30

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado anterior de la invención para su uso en un método para terapia de transferencia celular adoptiva, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de dicha composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite para prevenir o tratar una reacción inmunitaria que sea adversa para el sujeto.

35

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición que comprende el linfocito T modificado generado de acuerdo con el método anterior de la invención.

40

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado generado de acuerdo con el método de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

45

Como se describe en el presente documento, la presente invención se refiere a composiciones y métodos para generar

un linfocito T modificado con un ácido nucleico capaz de alterar la expresión génica de un gen endógeno que es FAS y que comprende además un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR).

Un aspecto de la invención incluye un linfocito T modificado que comprende un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión génica de un gen endógeno que es FAS; y un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula coestimuladora.

Los métodos de tratamiento enumerados en los párrafos siguientes en el contexto de la invención deben entenderse como pertenecientes a la una o más sustancias mencionadas para su uso en métodos para tratar las enfermedades/afecciones mencionadas.

En otro aspecto más, la invención incluye un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una inmunidad mejorada en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado descrito en el presente documento a un sujeto que lo necesite.

En otro aspecto más, la invención incluye un método para tratar una afección en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado descrito en el presente documento.

En otro aspecto, la invención incluye un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en una célula o tejido diana en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado descrito en el presente documento.

En otro aspecto más, la invención incluye un método para la terapia de transferencia celular adoptiva que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado descrito en el presente documento a un sujeto que lo necesite para prevenir o tratar una reacción inmunitaria que sea adversa para el sujeto.

En otro aspecto, la invención incluye una composición que comprende el linfocito T modificado generado de acuerdo con el método descrito en el presente documento.

En otro aspecto más, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado generado de acuerdo con el método descrito en el presente documento.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores o cualquier otro aspecto de la invención delineada en el presente documento, el ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión génica se selecciona del grupo que consiste en un ARN no codificante, antagomiR, ARNip, ARNhc y un sistema CRISPR, tal como un vector pAd5/F35-CRISPR.

En una realización, el dominio de unión a antígeno del CAR comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo sintético, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo de dominio único, fragmento variable monocatenario y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En otra realización, el dominio de unión a antígeno del CAR se une específicamente a un antígeno en una célula diana. Aún en otra realización, el dominio intracelular del CAR comprende dominios de señalización duales.

En otra realización, el linfocito T modificado descrito en el presente documento comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una molécula coestimuladora, tales como CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BBL, PD1 y PD1L. En una realización, el método para generar el linfocito T modificado descrito en el presente documento comprende además la electroporación de un ARN que codifica una molécula coestimuladora en el linfocito T. En algunas realizaciones donde la molécula coestimuladora es CD3, CD3 comprende al menos dos cadenas de CD3 diferentes, tales como las cadenas CD3 zeta y CD3 épsilon.

En otra realización, el linfocito T se obtiene del grupo que consiste en células mononucleares de sangre periférica, células sanguíneas de cordón umbilical, una población purificada de linfocitos T y una línea de linfocitos T.

Aún en otra realización, el método para generar el linfocito T modificado como se describe en el presente documento comprende además expandir el linfocito T. En una realización, expandir el linfocito T comprende cultivar el linfocito T con un factor seleccionado del grupo que consiste en flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit.

En otra realización más, el método para generar el linfocito T modificado como se describe en el presente documento comprende además criopreservar el linfocito T. En otra realización, el método descrito en el presente documento comprende además descongelar el linfocito T criopreservado antes de introducir el ácido nucleico en el linfocito T.

En una realización, la introducción del ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en transducir los linfocitos T expandidos, transfectar los linfocitos T expandidos y someter a electroporación los linfocitos T expandidos.



Aún en otra realización, el método descrito en el presente documento comprende además expresar Klf4, Oct3/4 y Sox2 en los linfocitos T para inducir la pluripotencia del linfocito T.

- En diversas realizaciones de los aspectos anteriores o cualquier otro aspecto de la invención delineada en el presente documento, la invención incluye administrar el linfocito T modificado a un sujeto. En una realización, el sujeto tiene una afección, tal como una enfermedad autoinmunitaria. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad de Behcet, miocardiopatía, esprúe celíaco-dermatitis herpetiforme; síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), penfigoide cicatricial, enfermedad de las crioglobulinas, síndrome de crest, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis-juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía de IgA, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artropatía psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (PSS), también conocida como esclerosis sistémica (SS)), síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo, granulomatosis de Wegener y cualquier combinación de las mismas.
- En otra realización, la afección es un cáncer, tal como un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello del útero, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y cualquier combinación de los mismos.
- En otra realización, el método descrito en el presente documento comprende además inducir la lisis, tal como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), de la célula o tejido diana.

### Breve descripción de los dibujos

- La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. A fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos las realizaciones que se prefieren actualmente. Debe entenderse que, sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones precisas e instrumentos de las realizaciones mostradas en los dibujos.
- La figura 1, que comprende las figuras 1A-1C, es una ilustración del diseño CRISPR y el direccionamiento del complejo de TCR  $\alpha\beta$ -CD3 en células 293T. La figura 1A muestra los sitios de direccionamiento de ARNg de CRISPR dentro del locus genómico de la región constante de TCR  $\alpha$  y  $\beta$ . Cada exón se muestra mediante un bloque. Los bloques de color negro representan regiones codificantes. Las columnas de color gris representan regiones no codificantes. Se diseñaron trece ARNg para dirigirse al exón 1 de la región constante de TCR  $\alpha$  (TRAC), 10 ARNg se dirigen a una secuencia conservada en el exón 1 de las regiones constantes de TCR  $\beta$  1 (TRBC1) y 2 (TRBC2), y 10 ARNg se dirigen al exón 1 del gen de la microglobina beta-2. La figura 1B muestra una secuencia de almacén de ARNg típica. Los productos de PCR de ARNg se generaron mediante PCR de superposición y se clonaron en un vector MSGV con un promotor T7. La figura 1C muestra los resultados de la secuenciación de Sanger que muestran que existen múltiples picos en los productos de PCR genómica de TCR TRAC y TRBC de 293T después de la transfección de ARNm de CAS9 y ARNg en las células.
- La figura 2, que comprende las figuras 2A-2E, muestra la alteración del complejo de TCR  $\alpha\beta$ -CD3 en linfocitos T primarios. La figura 2A es una tabla que muestra los parámetros usados para la electroporación de ARNm de CAS9 y ARNg en linfocitos T primarios con BTX830. 360 V durante 1 ms con cubetas de 2 mm produjeron la mejor intensidad fluorescente media (IFM) y eficiencia para la electroporación de linfocitos T primarios estimulados con perlas del día 3. La figura 2B es un panel de gráficos que muestra linfocitos T incubados a 32 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % que tienen una IFM mucho mayor que en condiciones normales a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. La figura 2C es una ilustración esquemática del sistema CRISPR transferido a linfocitos T primarios. El ARNm de CAS9 y el ARNg se electrotransfieren a linfocitos T tres días después de la estimulación con perlas de los linfocitos T primarios. A continuación, se cultivaron linfocitos T con 100 UI/ml de IL-2 y algunas células se incubaron a 32 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 1 día y, a continuación, durante 7 a 9 días más. La expresión de CD3 se analizó los días 7-9 después de la electroporación mediante citometría de flujo. La figura 2D es un panel de gráficos que muestran que la eficiencia del direccionamiento a 37 °C fue aproximadamente 2,5 veces mayor que a 32 °C. La figura 2E es un panel de gráficos que muestran la regulación negativa de CD3 el día 6 después de la electrotransferencia de cantidades y relaciones variables de CAS9 y ARNg dirigidos a TCR $\beta$ . La expresión de CD3 se analizó mediante tinción para CD3. Se muestran los datos de flujo representativos el día 6 después de la electroporación. El cuadrante representa el porcentaje de células CD3 negativas

en poblaciones de linfocitos T.

La figura 3, que comprende las figuras 3A-3D, muestra que la inactivación de TCR<sup>neg</sup> alfa o beta en linfocitos T se puede enriquecer mediante el agotamiento de los linfocitos T TCR<sup>pos</sup>. La figura 3A es un panel de gráficos que muestran la expresión de CD3 antes y después del agotamiento con microperlas de la inactivación de TCR<sup>neg</sup> alfa o beta en linfocitos T. La citometría de flujo ilustra la expresión de CD3. Los números en el cuadrante inferior derecho representan el porcentaje de células CD3 negativas en las poblaciones de linfocitos T. La figura 3B es un panel de gráficos de secuenciación que muestran que se observaron múltiples picos en productos de PCR genómica de linfocitos T enriquecidos con CD3<sup>neg</sup>. La figura 3C es un panel de gráficos que muestran el análisis del repertorio de linfocitos T CD4 y CD8 después del enriquecimiento con microperlas de CD3 en linfocitos T inactivados de cadena alfa simples, de cadena beta y doble alfa beta modificados con CRISPR. Los datos muestran que la relación de la población de linfocitos T CD8 se enriqueció mediante la modificación con CRISPR, lo que sugiere que los linfocitos T CD8 pueden modificarse más fácilmente que los linfocitos T CD4. La figura 3D muestra los resultados de la secuenciación de deleciones e inserciones introducidas en el locus de TCR alfa y beta después de la modificación con CRISPR.

La figura 4, que comprende las figuras 4A-4C, muestra que múltiples electrotransferencias de ARNg mejoraron en gran medida la eficiencia del direccionamiento del sistema CRISPR en los linfocitos T primarios. La figura 4A es un panel de gráficos que muestran que múltiples electroporaciones de ARNg mejoraron en gran medida la eficiencia del direccionamiento. La electroporación de linfocitos T hasta tres veces en 24 horas dio la mayor eficiencia de direccionamiento, casi el 80 %. En el experimento inicial, sólo se logró un 15 % de eficacia de direccionamiento de TCR en los linfocitos T. Se observó una expresión sostenida de CAS9 después de la electrotransferencia del ARNm de CAS9 a los linfocitos T. Una razón probable de la baja eficiencia de escisión puede deberse a la rápida degradación de los ARNg. Se obtuvo una mayor población CD3 negativa. La figura 4B es un panel de gráficos que muestran que la limitación afecta a la función del ARNg, mientras que la introducción temprana de ARNg en una segunda ronda produjo mayores eficiencias. La figura 4C es un panel de gráficos que muestran que múltiples electrotransferencias de ARNg dirigido a TRAC y TRBC en ND221 dieron una tasa de escisión de aproximadamente el 64,5 % y el 57,5 %, respectivamente.

La figura 5, que comprende las figuras 5A y 5B, muestra que los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> podrían expandirse en diferentes condiciones de estimulación. La figura 5A es un panel de gráficos que muestran que los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> restauraron la expresión de CD3 después de la reintroducción de las cadenas alfa y beta de TCR en los linfocitos T TCR<sup>neg</sup>. CD3 y Vb13.1 se detectaron después de la electroporación de la cadena alfa y beta de TCR en los linfocitos T TCR<sup>neg</sup>. El nivel de expresión de CD3 fue comparable al de los linfocitos T TCR<sup>pos</sup>. La figura 5B es un panel de gráficos que muestran el factor de expansión después de diferentes condiciones usadas para estimular los linfocitos T TCR<sup>neg</sup>. El REP de PBMC produjo una expansión de aproximadamente 500 veces, mientras que la reestimulación con perlas CD3/CD28 o K562 aAPC produjo una expansión de aproximadamente 25-58 veces.

La figura 6, que comprende las figuras 6A y 6B, muestra las características de los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> después de la expansión en diferentes condiciones. La figura 6A es un panel de gráficos que muestran las características del fenotipo de los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> después de la expansión en diferentes condiciones. La figura 6B es un panel de gráficos que muestran las características del fenotipo de los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> después de la expansión en diferentes condiciones.

La figura 7, que comprende las figuras 7A-7C, muestra linfocitos T TCR<sup>neg</sup> expandidos con potente actividad antitumoral después de la redirección *in vitro*. La figura 7A es un panel de gráficos que muestran que los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> podrían redirigirse mediante la introducción de un TCR anti NY-ESO 1G4 en las células. En comparación con el grupo CAS9 SIMULADO, cuando se redirigieron por 1G4 TCR, los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> mostraron un mayor nivel de expresión de Vb13.1 debido a un menor emparejamiento erróneo de las cadenas alfa y beta de TCR *exo* y *endógenas*. La figura 7B es un panel de gráficos que muestran que los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> redirigidos con 1G4 TCR tenían una alta actividad de desgranulación cuando se cultivaban conjuntamente con una línea celular tumoral (Nalm6-ESO). La figura 7C es un gráfico que muestra que los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> redirigidos con 1G4 TCR tenían una alta citotoxicidad contra una línea celular tumoral.

La figura 8 es un panel de ilustraciones que muestran que los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> dirigidos controlan el crecimiento del tumor en ratones NSG después de la redirección.

La figura 9, que comprende la figura 9A-9D, muestra que la eliminación de HLA-CLASE I se obtuvo mediante la alteración de la microglobina beta-2. La figura 9A muestra datos de secuenciación de CRISPR capaces de alterar el locus de microglobina beta-2 en células HEK293. La figura 9B es un panel de gráficos que muestran que la población de linfocitos T negativos para HLA-CLASE I se generó mediante la alteración de la microglobina beta-2. La figura 9C es un panel de gráficos que muestran que el IFNg mejoró la eficacia de direccionamiento de la microglobina beta-2 en linfocitos T primarios. La figura 9D es un panel de gráficos que muestran que los linfocitos T HLA-CLASE I<sup>neg</sup> se enriquecieron mediante el agotamiento con microperlas.

La figura 10 es un panel de gráficos que muestran la inactivación simultánea de HLA CLASE I y TCR en linfocitos T

primarios. Los linfocitos T CD4 y CD8 se estimularon con dynabeads CD3/CD28. Tres días después de la estimulación, los linfocitos T expandidos se sometieron a electroporación con ARNm de CAS9 junto con la región constante de TCR  $\beta$  (TRBC) y ARNg dirigidos a microglobina beta-2. Tanto la expresión de TCR como la expresión de microglobina beta-2 se evaluaron usando anticuerpo monoclonal (mAb) anti CD3 y mAb anti microglobina beta-2 seis días después de la electroporación. Los números representan el porcentaje de población en cada cuadrante.

La figura 11, que comprende las figuras 11A-11D, muestra la triple inactivación de HLA-CLASE I y de la cadena alfa y beta de TCR en linfocitos T primarios. La figura 11A es un panel de gráficos que muestran que los linfocitos T CD4 y CD8 se estimularon con dynabeads CD3/CD28. Tres días después de la estimulación, los linfocitos T expandidos se sometieron a electroporación con ARNm de CAS9, junto con la región constante de TCR alfa, beta (TRAC, TRBC) y ARNg dirigido a microglobina beta-2. Tanto la expresión de TCR como la expresión de HLA-CLASE I se evaluaron usando anticuerpo monoclonal (mAb) anti CD3 y mAb anti microglobina beta-2 seis días después de la electroporación. Los números representan el porcentaje de población en cada cuadrante. La figura 11B es un esquema que ilustra el aislamiento de linfocitos T con triple inactivación de HLA-CLASE I y cadena alfa y beta de TCR. La figura 11C es un panel de gráficos que muestran la eficiencia de electroporación ensayada mediante expresión de GFP. La figura 11D es un panel de gráficos que muestran la reintroducción de cadenas alfa y beta de TCR en linfocitos T TCR<sup>neg</sup> medida mediante citometría de flujo. Se observó aproximadamente el 64 % de la población alfa negativa y aproximadamente el 14 % de la población beta negativa en los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> totales.

La figura 12, que comprende las figuras 12A-12D, muestra la inactivación de FAS en las células 293T. La figura 12A es una imagen que muestra los resultados de la secuenciación de Sanger de múltiples picos cuando FAS se inactivó en las células 293T. La figura 12B es un panel de gráficos que muestran datos de FACS que revelan que la expresión superficial de la proteína FAS se alteró por CRISPR. La figura 12C es un panel de imágenes que muestra que la proteína FAS se reemplazó por GFP después de una recombinación homóloga con CRISPR. La figura 12D es un panel de gráficos de datos de FACS que muestran el porcentaje de recombinaciones homólogas con CRISPR.

La figura 13 muestra la inactivación de FAS en linfocitos T primarios. Los datos de FACS ilustraron que CRISPR abolió la expresión de la proteína FAS de superficie.

La figura 14, que comprende las figuras 14A y 14B, muestra la inactivación de PD1 en 293T y linfocitos T primarios. La figura 14A es una imagen que muestra los resultados de la secuenciación de Sanger de múltiples picos cuando PD1 se dirigió en células 293T. La figura 14B es un panel de gráficos que muestran datos de FACS de expresión superficial de la proteína PD1 alterada por CRISPR.

La figura 15, que comprende las figuras 15A y 15B, muestra la inactivación de CTLA4 en 293T y células primarias, tal como CCD1079-SK. La figura 15A es una imagen que muestra los resultados de la secuenciación de Sanger de múltiples picos cuando CTLA4 se dirigió en células 293T. La figura 15B es una imagen que muestra datos de secuencia después de limitar la dilución y la expansión de células individuales. Los resultados de la secuenciación de Sanger identificaron las delecciones e inserciones en el locus genómico de CTLA4.

La figura 16 muestra la inactivación de PPP2r2d en 293T. Los datos de secuenciación de Sanger indicaron que PPP2r2d se dirigió en las células 293T por CRISPR.

La figura 17, que comprende las figuras 17A y 17B, muestra la generación de iPSC a partir de linfocitos T inactivados por FAS. La figura 17A es un panel de imágenes que muestran el cambio morfológico durante el proceso de reprogramación de linfocitos T FAS<sup>neg</sup> en iPSC. La formación típica de la morfología de las células madre embrionarias indica que los linfocitos T FAS<sup>neg</sup> se pueden inducir al estado pluripotente. La figura 17B es un gráfico que muestra que los linfocitos T FAS<sup>neg</sup> se reprogramaron en iPSC con una eficiencia de aproximadamente 5 veces la de sus homólogos de tipo natural. Se ha informado que las líneas celulares deficientes en p53 son más fáciles de reprogramar debido al obstáculo de la vía de la apoptosis. La inactivación de FAS puede facilitar el proceso de reprogramación mediante un mecanismo similar.

La figura 18, que comprende las figuras 18A y 18B, muestra la generación de iPSC a partir de linfocitos T CD3<sup>neg</sup>. La figura 18A es un panel de imágenes que muestra una morfología de tipo ES formada por linfocitos T inactivados de cadena alfa o beta de TCR CD3<sup>neg</sup> en condiciones de reprogramación definidas. La morfología permanece constante después de varios pases. La figura 18B es una serie de gráficos que muestran que la reprogramación de linfocitos T CD3<sup>neg</sup> fue aproximadamente 5 veces más eficiente que la de sus homólogos de tipo natural, lo que sugiere que la inactivación de TCR puede desempeñar una función en el proceso de reprogramación de linfocitos T o afectar a la viabilidad celular después de la infección por el virus Sendai.

La figura 19 es un gráfico que muestra la atenuación de receptores de linfocitos T (TCR) endógenos con ARNip y la adición de un segundo enlace disulfuro y des-N-glucosilación a la cadena beta.

La figura 20, que comprende las figuras 20A y 20B, muestra la inactivación de TCR mediante ARN de CAS9 y ARNg. Seis días después de la electroporación, se analizó la expresión de TCR en las células mediante la evaluación de CD3.

La figura 21 es una ilustración que muestra los resultados de la secuenciación por PCR después del agotamiento con microperlas CD3.

- 5 La figura 22 es un panel de gráficos que muestran la reexpresión de CD3 cuatro horas después de la electroporación del ARN de NY-ESO-1 TCR.

La figura 23, que comprende las figuras 23A-23D, es un panel de gráficos que muestran que la atenuación del TCR endógeno mejoró tanto la expresión transgénica como la función de los linfocitos T sometidos a electroporación con ARN de TCR. La figura 23A muestra la expresión de TCR de linfocitos T sometidos a electroporación con ARNip de TCR (histograma de color blanco con línea continua), ARNip de control (histograma de color blanco con línea discontinua) y linfocitos T sin ningún ARNip (histograma con relleno). La figura 23B muestra la expresión del transgén (TCR vb13.1) de linfocitos T sometidos a electroporación con ARN de NY-ESO-1 TCR de tipo natural (wt) o TCR modificado (SD) con ARNip de TCR, ARNip de control o sin ARNip. La figura 23C muestra la tinción del tetrámero NY-ESO-1 de linfocitos T sometidos a electroporación con ARN de NY-ESO-1 TCR de tipo natural (wt) o ARN de TCR (SD) modificado con ARNip de TCR, ARNip de control o sin ARNip. La figura 23D muestra la lisis específica de una línea tumoral positiva para HLA-A2/NY-ESO-1 mediante la atenuación de ARNip de TCR, linfocitos T sometidos a electroporación con ARN de NY-ESO-1 TCR de tipo natural.

20 La figura 24 es un gráfico que muestra la fluorescencia de células tumorales después de la inyección de linfocitos T en un modelo de ratón. Se inyectaron por vía intravenosa diez millones de células tumorales Nalm6-CBG-ESO-GFP (escarabajo clic verde) que expresaban tanto NY-ESO-1 como GFP en ratones NOD/SCID. Cinco días después de la inoculación del tumor, se inyectaron linfocitos T transducidos con CBR y sometidos a electroporación con ARN como se indica en los diferentes grupos y las células tumorales se detectaron mediante fluorescencia.

25 La figura 25 es un panel de imágenes que muestra la fluorescencia de linfocitos T TCR híbridos y tumorales inyectados en modelos de ratón en el tiempo.

30 La figura 26 es un panel de imágenes que muestra la generación de linfocitos T con CAR 19 universales. La parte superior de la figura es una ilustración del protocolo para generar los linfocitos T con CAR19 universales. El gráfico de la izquierda muestra el porcentaje de linfocitos T positivos para CAR19 después de la transducción del gen CAR19 lentivírico. El panel derecho de gráficos muestra el porcentaje de linfocitos T únicamente negativos para TCR y doblemente negativos para TCR/HLA-A antes y después de la clasificación.

35 La figura 27 es un panel de gráficos y una tabla que muestra el factor de expansión de células positivas para CD19 después de la estimulación con células K562 presentadoras de CD19 irradiadas.

La figura 28A es un panel de gráficos que muestran la expresión génica endógena y transgénica de células expandidas K562-CD19.

40 La figura 28B es un panel de gráficos que muestran que la expresión de TCR endógena permaneció negativa en células únicamente negativas para TCR, mientras que la expresión de TCR y HLA-A permaneció negativa en linfocitos T doblemente negativos para TCR/HLA-A después de la expansión estimulada por K562-CD19

45 La figura 29A es un panel de gráficos que muestran que la mayoría de los linfocitos T con CAR19 universales expandidos son positivos para CD45RO y expresan niveles medios de expresión de CD28.

La figura 29B es un panel de gráficos que muestran que la mayoría de los linfocitos T con CAR19 universales expandidos conservaron altos niveles de expresión de CD621 y bajos niveles de expresión de CCR7.

50 La figura 30A es un gráfico que muestra que la edición génica CRISPR no afectó a la actividad antitumoral de los linfocitos T con CAR19 universales *in vitro*.

55 La figura 30B es un panel de gráficos que muestran que los linfocitos T con CAR19 únicamente negativos para TCR y doblemente negativos para TCR/HLA-A mostraron una capacidad lítica fuerte cuando se expusieron a células tumorales Nalm6.

La figura 30C es un panel de gráficos que muestran la secreción de citocinas como parte de la potente actividad antitumoral de estas células.

60 La figura 30D es un panel de gráficos que muestran la ablación única de TCR o la ablación doble de TCR y HLA-A en linfocitos T con CAR19 que exhibieron una cinética de proliferación similar después de la exposición a células tumorales Nalm6.

65 La figura 31 es un panel de imágenes que muestran que la edición génica CRISPR no afectó a la actividad antitumoral de los linfocitos T con CAR19 universales *in vivo*. Todos los ratones que recibieron linfocitos T no manipulados y los

ratones infundidos con linfocitos T de tipo natural transducidos con GFP lentivíricos murieron en las 3 semanas posteriores a la infusión de células tumorales. Se observó una regresión tumoral objetiva en ratones que recibieron linfocitos T con CAR19. Los linfocitos T con CAR19 universales únicamente negativos para TCR o doblemente negativos para TCR/HLAA editados con CRISPR mostraron la misma actividad antitumoral.

5 La figura 32A es un panel de gráficos que muestran la ablación única de TCR o la ablación doble de TCR y HLA-A en linfocitos T con una alorreactividad marcadamente reducida.

10 La figura 32B es un panel de gráficos que muestran la eliminación de linfocitos NK activados por moléculas HLA-A con un largo período de cocultivo (5 días).

La figura 32C es un gráfico que muestra que no se observó actividad inespecífica cuando las células se expusieron a PBMC de sangre entera alogénica durante 24 horas en un ensayo de IFN $\gamma$  Elispot.

15 La figura 33 es un panel de gráficos que muestran que la ablación de FAS mejoró la actividad antitumoral de los linfocitos T con CAR19. Se generaron linfocitos T con CAR19 negativos para FAS. La ablación de FAS se confirmó mediante análisis de citometría de flujo. La expresión del gen CAR19 de los linfocitos T FAS<sup>neg</sup> fue comparable a la del tipo natural. Incluso después de la incubación con células tumorales Nalm6 durante un corto período de 4 horas, la expresión de CD107a mejoró enormemente en los linfocitos T con CAR19 FAS<sup>neg</sup> en comparación con los homólogos de tipo natural.

20 La figura 34A es un gráfico que muestra que la ablación de FAS en linfocitos T con CAR19 mejoró la supervivencia y proliferación de los linfocitos T con CAR en condiciones antigénicas *in vitro*. Los linfocitos T con CAR19 FAS<sup>neg</sup> se expandieron más rápido que los linfocitos T con CAR19 de tipo natural cuando las células fueron estimuladas con altos niveles de células CD19+ K562.

La figura 34B es un panel de gráficos que muestran que los linfocitos T con CAR19 FAS<sup>neg</sup> tenían niveles de apoptosis reducidos según lo medido mediante tinción con Anexina V.

30 La figura 35A es un gráfico que muestra que la ablación de FAS en linfocitos T con CAR19 mejoró la función de los linfocitos T con CAR en un modelo animal. Como se había observado *in vitro*, los linfocitos T FAS<sup>neg</sup> mostraron una proliferación mejorada en comparación con los linfocitos T de tipo natural.

35 La figura 35B es un panel de imágenes que muestran que el grupo FAS<sup>neg</sup> CAR19 demostró una actividad antitumoral superior en comparación con el grupo de tipo natural.

La figura 35C es un gráfico que muestra diferencias significativas en los datos de bioluminiscencia entre el grupo FAS<sup>neg</sup> CAR19 y el grupo de tipo natural.

40 La figura 36 es un panel de gráficos que muestran la generación de linfocitos T con PSCA-CAR negativos para PD1. La ablación de PD1 se confirmó mediante análisis de citometría de flujo. Las células negativas para PD1 se enriquecieron mediante agotamiento con micropérlas. Los linfocitos T con PSCA-CAR de tipo natural o negativos para PD1 se expandieron mediante estimulación con células tumorales PC3 presentadoras de antígeno PSCA irradiadas. Las células positivas para PSCA-CAR se enriquecieron después de la expansión.

45 La figura 37 es un panel de gráficos que muestran que la ablación de PD1 y la expresión de CD137 en linfocitos T con PSCA-CAR mejoraron la activación de los linfocitos T con CAR en condiciones antigénicas *in vitro*.

50 La figura 38A es un panel de imágenes que muestran la ablación de PD1 en un modelo PC3-PSCA-PDL1 NSG *in vivo*. Los linfocitos T con PSCA-CAR demostraron una actividad antitumoral *in vivo* mejorada de los linfocitos T con CAR en comparación con el grupo de tipo natural.

55 La figura 38B es un gráfico que muestra la diferencia en la carga tumoral entre el grupo negativo para PD1 y el de tipo natural.

60 La figura 39 es un panel de imágenes histológicas que muestran que los linfocitos T con ablación de TCR o TCR/HLA-I no causaron enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD). Los ratones tratados con linfocitos T con CAR con inactivación doble o triple no desarrollaron ningún signo de GVHD. Por el contrario, 3 de cada 4 ratones del grupo CD19 CART de tipo natural desarrollaron GVHD para el día 65, lo que se confirmó mediante examen histológico de diferentes órganos.

65 La figura 40A es un gráfico que muestra el porcentaje de supervivencia de animales inyectados con linfocitos T con ablación de TCR o TCR/HLA-1. Los ratones fueron irradiados e inyectados de forma subletal. Cuatro de cada cinco ratones que recibieron linfocitos T de tipo natural murieron de GVHD durante el estudio de 60 días. Los grupos tratados con linfocitos T tratados con PBS, con ablación única de TCR y con ablación doble de TCR/HLA-I no mostraron ningún signo de GVHD.

La figura 40B es un panel de gráficos que muestran el peso corporal de ratones que reciben linfocitos T de tipo natural, linfocitos T tratados con PBS con ablación única de TCR o ablación doble de TCR/HLA-I.

5 La figura 41A es un panel de imágenes que muestran una actividad antitumoral mejorada de los linfocitos T con CAR universales después de bloquear las vías PD1 y Fas con CRISPR/Cas9. Se detectó una actividad antitumoral superior en linfocitos T con CD19-CAR universales inactivadas por PD1 cuando se inyectaron en ratones portadores de Nalm6-PDL1.

10 La figura 41B es un gráfico que muestra datos cuantitativos de bioluminiscencia de ratones que recibieron diferentes linfocitos T editados por CRISPR/Cas9.

La figura 42 es un panel de ilustraciones que muestra un sistema One-shot para generar linfocitos T con CAR universales. Dado que los ARNg son propensos a degradarse, se desarrolló un método One-shot simplificado para  
15 expresar constitutivamente los ARNg junto con CAR en un único vector lentivírico.

La figura 43 es un panel de gráficos que muestran la ablación génica eficiente con el sistema One-shot. Se observaron diferentes cantidades de ablación de CD3 después de la electrotransferencia de ARNm de Cas9.

20 La figura 44A es un panel de imágenes que muestra los cambios morfológicos durante el proceso de reprogramación de iPSC a partir de linfocitos T con inactivación de Fas. La formación típica de la morfología de las células madre embrionarias indica que los linfocitos T FAS<sup>neg</sup> se pueden inducir al estado pluripotente.

La figura 44B es un gráfico que muestra que los linfocitos T FAS<sup>neg</sup> se reprogramaron en iPSC con una eficiencia de  
25 aproximadamente 5 veces la de sus homólogos de tipo natural. Se ha informado que las líneas celulares deficientes en p53 son más fáciles de reprogramar debido al obstáculo de la vía de la apoptosis. La inactivación de FAS puede facilitar el proceso de reprogramación usando un mecanismo similar.

La figura 45A es un panel de imágenes que muestran la morfología de tipo ES de iPSC de linfocitos T inactivados de  
30 cadena alfa o beta de TCR CD3<sup>neg</sup> en condiciones de reprogramación definidas. La morfología permaneció constante después de varios pases.

La figura 45B es un gráfico que muestra que la reprogramación de linfocitos T CD3<sup>neg</sup> fue aproximadamente 5 veces  
35 menos eficiente que los homólogos de tipo natural, lo que sugiere que la inactivación de TCR puede desempeñar una función en el proceso de reprogramación de linfocitos T o afectar a la viabilidad celular después de la infección por el virus Sendai.

La figura 45C es un panel de imágenes que muestran la tinción con fosfatasa de células CD3<sup>neg</sup> iPSC.

40 La figura 46 es un panel de gráficos que muestran la inducción de genes de células madre pluripotentes endógenas en diferentes líneas celulares T-iPSC.

La figura 47A es un panel de imágenes que muestran la inmunotinción para determinar la expresión de Tra-1-60 y  
45 SSEA4.

La figura 47B es una imagen que muestra la confirmación de la inactivación de Fas de T-iPSC mediante secuenciación de Sanger.

La figura 48A es un panel de gráficos que muestran la ablación génica en linfocitos T no tratados con una versión  
50 diferente de Cas9. CD3 se inactivó con dCas9 y FokI-Cas9.

La figura 48B es un panel de gráficos que muestran que se necesitaban dos ARNg para la ablación génica de dCas9 y FokI-Cas9.

55 La figura 48C es una imagen que muestra eventos inespecíficos ratos en linfocitos T modificados genéticamente con CRISPR/cas9.

La figura 49 es un panel de imágenes que muestra la estrategia de introducir CRISPR/Cas9 en linfocitos T. A la  
60 izquierda se muestra una representación esquemática de los ARNg impulsados por el promotor T7. A la derecha se muestra una representación esquemática de la generación de linfocitos T específicos de antígeno editados con genes usando el sistema CRISPR. Los linfocitos T se sometieron a electroporación con ARNm de Cas9 y ARNg dirigidos a un gen específico 3 días después de la estimulación con perlas CD3/CD28 y a continuación se cultivaron durante 24 horas a 32 °C en presencia de IL2 antes de devolverlos a la condición de cultivo normal a 37 °C. Los linfocitos T alterados con genes específicos se clasificaron el día 8 y se redirigieron con CAR o TCR mediante transducción  
65 lentivírica o transferencia génica por electroporación de ARNm.

La figura 50A es un panel de gráficos que muestran la alteración eficiente de TCR mediada por CRISPR/Cas9 en linfocitos T. Expresión de CD3 de linfocitos T editadas con CRISPR/Cas9 cultivados a 37 °C o 32 °C.

La figura 50B es un panel de gráficos que muestran la expresión de CD3 de linfocitos T editados con CRISPR/Cas9 cultivados después de la electroporación de ARN de CRISPR secuencial.

La figura 51A es un panel de gráficos que muestran la alteración génica eficaz con CRISPR que se produjo en los linfocitos T. Expresión de CD3 de linfocitos T transferidos con CRISPR usando diferentes relaciones de Cas9:ARNg (panel superior e intermedio) y cantidad de ARN de CRISPR total (panel inferior).

La figura 51B es una tabla que muestra la eficiencia de direccionamiento calculada tanto por citometría de flujo como por secuenciación clonal.

La figura 52 es una imagen que muestra la cantidad de alteración génica dirigida a TCR medida mediante un ensayo de nucleasa Surveyor T7 selectivo para emparejamientos erróneos en ADN amplificado a partir de las células. La cantidad calculada de alteración génica dirigida en TRAC y TRBC se muestra en la parte inferior. Las flechas indican las bandas esperadas.

La figura 53A es una imagen de indeles (en la alteración génica) observados mediante análisis de secuencia clonal de amplicones de PCR después de la recombinación mediada por CRISPR del locus de TCR  $\alpha$  y  $\beta$ .

La figura 53B es una imagen de un diagrama del locus humano que codifica los sitios de direccionamiento de ARNg de CRISPR de TCR  $\alpha$  y  $\beta$  dentro del locus genómico de la región constante de TCR  $\alpha$  y  $\beta$ . Cada exón se muestra mediante un bloque. Flecha: Sitio de direccionamiento del ARNg de la cadena codificante; flecha de color azul: Sitio de direccionamiento del ARNg de la cadena no codificante. Múltiples picos en los resultados de la secuenciación de Sanger muestran los eventos de NHEJ mediados por CRISPR en los locus genómicos TRAC y TRBC.

La figura 54 es un panel de gráficos que muestran la expresión de CD3 en células TCR<sup>neg</sup> purificadas.

La figura 55 es un panel de gráficos que muestran la redirección de células TCR/CD3<sup>neg</sup> mediante la electrotransferencia de ARNm de 1G4 TCR ( $\alpha$  y  $\beta$ ) o CAR19.

La figura 56 es un gráfico que muestra la expansión de las células TCR/CD3<sup>neg</sup> después de 10 días usando diferentes condiciones de estimulación.

La figura 57 es un panel de gráficos que muestran que la edición CRISPR/Cas9 no perjudicó la eficacia antitumoral de los linfocitos T primarios. Se muestran los fenotipos de las células TCR/CD3<sup>neg</sup> después de las cuatro técnicas de expansión diferentes.

La figura 58 es un panel de gráficos que muestran la expresión relativa de CD19-CAR después de la electrotransferencia de ARN de CD19-CAR en células Cas9 SIMULADO y TCR/CD3<sup>neg</sup>.

La figura 59A es un panel de gráficos que muestran que no se observó ninguna diferencia funcional significativa entre las células Cas9 SIMULADO y TCR/CD3<sup>neg</sup> redirigidas con CD19-CAR, como se confirmó mediante el ensayo de liberación de CD107 después de la incubación con células diana Nalm6. Se muestran datos representativos de 3 experimentos independientes. Barras, error estándar.

La figura 59B es un gráfico que muestra que no se observó ninguna diferencia funcional significativa entre las células Cas9 SIMULADO y TCR/CD3<sup>neg</sup> redirigidas con CD19-CAR, como se confirmó mediante el ensayo de citotoxicidad después de la incubación con células diana Nalm6. Se muestran datos representativos de 3 experimentos independientes. Barras, EE = error estándar.

La figura 59C es un panel de gráficos que muestran que no se observó ninguna diferencia funcional significativa entre las células Cas9 SIMULADO y TCR/CD3<sup>neg</sup> redirigidas con CD19-CAR, como se confirmó mediante la secreción de IL2 e IFN $\gamma$  después de la incubación con células diana Nalm6. Se muestran datos representativos de 3 experimentos independientes. Barras, EE = error estándar.

La figura 59D es un panel de imágenes de ratones NOD/scid/yc(-/-) (n = 12) inyectados con  $1 \times 10^6$  células tumorales Nalm6 (i.v.). Los ratones se clasificaron aleatoriamente en tres grupos. Se inyectaron i.v. linfocitos T Cas9 SIMULADO y TCR/CD3<sup>neg</sup> ( $10 \times 10^6$ ) que expresaban CD19-CAR después de la electroporación cada 4 días para un total de tres inyecciones (flechas). Los ratones tratados con linfocitos T sometidos a electroporación sin ARN sirvieron como controles. Se obtuvieron imágenes de los animales supervivientes como se indica. Las imágenes comenzaron 1 día antes del inicio del tratamiento con linfocitos T. Barras, EE = error estándar, EP = electroporación; E:D = relación efector-tumor; flecha, punto temporal de la infusión de linfocitos T; ns, no significativo. \*\*\*\* $P < 0,0001$ , ns mediante ANOVA bidireccional más la prueba de Bonferroni posterior.

La figura 59E es un gráfico que muestra el resplandor de las células fluorescentes.

La figura 60 es un panel de gráficos que muestran la ablación génica doble y triple mediante CRISPR/Cas9 para generar células efectoras universales. Alteración de HLA-I con ARNg dirigido a B2M.

La figura 61 es un diagrama de flujo del protocolo para generar células efectoras universales como se describe en el presente documento.

La figura 62 es un panel de gráficos que muestran que la ablación de TCR anuló la actividad de destrucción no específica. Se incubaron líneas celulares de tumor 624mel-CBG y PC3-CBG con linfocitos T tratados previamente con o sin PHA en una relación efector:diana de 20:1 durante 24 horas y se calculó la citotoxicidad basándose en un ensayo de luciferasa. Los datos son las medias  $\pm$  DE;  $n = 3$ .

La figura 63 es un panel de gráficos que muestran un ensayo Elispot de IFN $\gamma$  para medir la alorreactividad de TCR y la alteración de TCR/HLA exponiendo los linfocitos T con ablación génica a PBMC alogénicas irradiadas (panel izquierdo) o cocultivando PBMC alogénicas con linfocitos T con ablación génica irradiados. Los puntos específicos se muestran en el eje y como los puntos producidos en presencia de estimuladores menos los puntos producidos por los efectores solos. \*\* $P < 0,01$  por la prueba de Mann-Whitney.

La figura 64 es un panel de gráficos que muestran que la alteración del TCR endógeno por CRISPR/Cas9 mejoró la función de los linfocitos T redirigidos por TCR. La expresión de Vb13.1 y CD3 se muestra en linfocitos T transfectados con ARNm de Cas9 solo (Cas9 Simulado) o linfocitos T CD3<sup>neg</sup> con TCR endógeno alterado  $\alpha$  solo ( $\alpha$  KO),  $\beta$  solo ( $\beta$  KO),  $\alpha$  y  $\beta$  doble ( $\alpha\beta$  KO) que se sometieron a electroporación con ARN de NY-ESO-1 TCR  $\alpha$  (1G4  $\alpha$ , 2 ug), ARN  $\beta$  (1G4  $\beta$ , 2 ug) o  $\alpha\beta$  (1G4  $\alpha\beta$ , 2+2 ug).

La figura 65A es un panel de gráficos que muestran la regulación positiva de CD107a de los linfocitos T con inactivación única de TCR  $\alpha$  o  $\beta$  o inactivación doble  $\alpha\beta$  sometidos a electroporación con ARN de TCR (1G4)  $\alpha\beta$  estimulados con una línea celular positiva para HLA-A2/NY-ESO-1 (Nahn6-ESO) o la línea celular de control Nahn6.

La figura 65B es un gráfico que muestra la capacidad lítica de los linfocitos T con inactivación única de TCR  $\alpha$  o  $\beta$  o inactivación doble  $\alpha\beta$  sometidos a electroporación con ARN de TCR  $\alpha\beta$  (1G4 TCR) mostrada en (a) un ensayo de CTL basado en luciferasa contra Nalm6-ESO.

La figura 66 es un panel de gráfico que muestran la expresión de Vbeta y CD3 en los linfocitos T con doble alteración de TCR  $\alpha\beta$  (linfocitos T TCR<sup>neg</sup>) sometidos a electroporación con dos ARN de NY-ESO-1 TCR (1G4 TCR, 10 ug o 8F TCR, 10 ug) en comparación con linfocitos T de control Cas9 Simulado.

La figura 67A es un panel de gráfico que muestran la regulación positiva de CD107a en linfocitos T CD8<sup>+</sup> con inactivación doble de TCR sometidos a electroporación con ARN de NY-ESO-1 TCR (1G4 TCR o 8F TCR) estimulados con las líneas celulares positivas para HLA-A2/NY-ESO-1 Nalm6-ESO, 624-mel o U266. Se usó Nalm6 como control negativo.

La figura 67B es un panel de gráfico que muestran la producción de citocinas (IL-2 y TNF- $\alpha$ ) de linfocitos T con inactivación doble de TCR sometidos a electroporación con ARN de NY-ESO-1 TCR (1G4 TCR o 8F TCR) después de la estimulación con las líneas celulares positivas para HLA-A2/NY-ESO-1 Nalm6-ESO o U266; se usaron líneas de melanoma 888mel como control negativo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  \*\*\*\* $P < 0,0001$ , mediante ANOVA bidireccional más la prueba de Bonferroni posterior.

La figura 68 es un panel de imágenes que muestra la generación de linfocitos T con CAR universales con una combinación de transferencia génica lentivírica y electroporación de CRISPR/Cas9. Se muestra un diagrama de flujo de la generación de linfocitos T con CD19-CAR universales. Los linfocitos T se transdujeron con CD19-CAR lentivírico el día 1 después de la estimulación, y los ARNm de Cas9 y ARNg dirigidos a las cadenas  $\alpha$  de TCR y  $\beta$  de TCR y B2M se sometieron a electroporación en los linfocitos T 2 días después. La población de células doblemente negativas para TCR y HLA-I se enriqueció antes de la nueva simulación para determinar la expansión.

La figura 69 es un panel de gráficos que muestran la expresión de CD19-CAR en linfocitos T con lenti-CD19-CAR modificados genéticamente expandidos mediante estimulación con perlas CD3/CD28 después de electroporación con 1G4 TCR.

La figura 70 es un panel de gráficos que muestran el fenotipo de los linfocitos T con CD19-CAR.

La figura 71 es un gráfico que muestra la liberación de CD107a en linfocitos T con CD19-CAR negativos para TCR y doblemente negativos para TCR/HLA-I. Se muestran datos representativos de 3 experimentos independientes. Barras, EE = error estándar.

La figura 72 es un panel de gráficos que muestran la secreción de citocinas de linfocitos T con CD19-CAR negativos



TCR y doblemente negativos para TCR/HLA-I. Se muestran datos representativos de 3 experimentos independientes. Barras, EE = error estándar.

La figura 73 es un gráfico que muestra la capacidad lítica tumoral de linfocitos T con CD19-CAR negativos para TCR y doblemente negativos para TCR/HLA-I. Se muestran datos representativos de 3 experimentos independientes. Barras, EE = error estándar.

La figura 74 es un panel de gráficos que muestran linfocitos T con CD19-CAR marcados con CFSE y no transducidos incubados con células tumorales K562 y K562-CD19 diana en una relación de 1 con respecto a 10 durante 72 horas.

La figura 75A es un gráfico que muestra una BLI de ratones tratados con una única inyección el día 7 que expresan CD19-CAR y GFP usando un vector lentivírico, ns, sin diferencias mediante ANOVA bidireccional más la prueba de Bonferroni posterior. Los tumores se establecieron en ratones NSG (n = 4 por grupo) mediante administración i.v. inyección de  $1 \times 10^6$  células Nalm6. A partir del día 7, se infundieron linfocitos T ( $1 \times 10^7$ ) que expresaban CD19-CAR transducido con lentivirus (LV) con una única inyección. Se inyectaron linfocitos T que expresaban la proteína LV GFP como controles.

La figura 75B es un gráfico que muestra la supervivencia global de ratones que reciben linfocitos T LV-GFP, LV-CD19-CAR, LV-CD19-CAR-TCR/CD3<sup>neg</sup> y LV-CD19-CAR-TCR/HLA-I<sup>neg</sup>. ns, no hay diferencias según la prueba de Mantel-Cox de rango logarítmico.

La figura 76 es un panel de imágenes que muestran que los linfocitos T CAR modificados genéticamente conservaron la eficacia antitumoral y no indujeron GVHD. Los tumores se establecieron en ratones NSG (n = 4 por grupo) mediante administración i.v. inyección con  $1 \times 10^6$  células Nalm6. A partir del día 7, se infundieron linfocitos T ( $2 \times 10^7$ ) que expresaban LV-CD19-CAR con una única inyección. Se inyectaron linfocitos T que expresaban la proteína LV GFP como controles. Las imágenes comenzaron 1 día antes del tratamiento con linfocitos T. Se recogieron órganos de ratones elegidos al azar de diferentes grupos de tratamiento el día 65 y se usaron para la tinción inmunohistoquímica de CD3. La figura 77 es una serie de esquemas de vectores que muestran el diseño de pAd5F35-CRISPR dirigido a PD1, Fas y la cadena alfa de TCR.

La figura 78 es una ilustración que muestra el diseño de pAd5F35-CRISPR modificado con pentón con ScFv anti CD3 y el suministro esquemático de pAd5F35-CRISPR para activar/inactivar el receptor de antígeno quimérico en linfocitos T *in vitro* e *in vivo*.

La figura 79A es un gráfico que muestra la secuenciación de Sanger de productos de PCR que flanquean el sitio de direccionamiento de ARNg de PD1. El virus adenovírico-pAd5F35-CRISPR-PD1 se transdujo en células MD231. 3 días después, se extrajo el ADN genómico y se realizó el análisis por PCR.

La figura 79B muestra las secuencias de los eventos de direccionamiento en células MDA231 después de la manipulación con adenovirus-CRISPR. Los productos de PCR de PD1 se clonaron en el vector TOPO y se secuenciaron.

La figura 80 es un gráfico que muestra que una disminución en el uso de ARNg mejoró el factor de expansión de los linfocitos T y solo disminuyó ligeramente la eficiencia de inactivación.

La figura 81 es un gráfico que muestra los parámetros usados para optimizar las condiciones de electroporación para obtener una alta eficiencia de inactivación de CD3/B2M con un factor de expansión de linfocitos T mejorado. En comparación con las condiciones de electroporación (EP) estándar en una cubeta de 2 mm (EP n.º 10-13) o una cubeta de 4 mm. Se observó una alta eficiencia de inactivación de CD3/B2M con un factor de expansión de linfocitos T mejorado (EP n.º 1 y 5).

La figura 82 es un gráfico que muestra la optimización de las condiciones de EP para lograr el máximo factor de expansión con una eficiencia de inactivación tolerable.

La figura 83 es un gráfico que muestra la optimización adicional de las condiciones de EP para lograr el máximo factor de expansión con una eficiencia de inactivación tolerable.

La figura 84 muestra diagramas del procedimiento de estimulación, transducción lentivírica y electroporación de CRISPR de linfocitos T.

La figura 85 es un gráfico que muestra el número de linfocitos T (gráfico superior) y el factor de expansión (gráfico inferior) después del procedimiento de electroporación y cultivo.

La figura 86 es un panel de gráficos que muestran la expansión promedio de los linfocitos T. Factor de expansión de los linfocitos T transducidos con CD19 CAR solo (TD solo) o transducidos con CD19 CAR y editados con CRISPR (TD/KO) (gráfico izquierdo). En el gráfico de la derecha se muestra el factor de expansión de los linfocitos T el día 10.

La figura 87 es un panel de gráficos de flujo que muestran la expresión de CD3/B2M/CAR el día 8 de linfocitos T expandidos.

5 La figura 88 es un panel de gráficos que muestran la expresión de CD3/B2M después del agotamiento de los linfocitos T CD3+.

La figura 89 es un panel de gráficos que muestran la expresión de CD3/B2M el día 11 en linfocitos T con CD19 CAR TD (transducidos)/sometidos a electroporación de CRISPR, agotados en CD3; linfocitos T con CD19 CAR TD/sometidos a electroporación de CRISPR; y linfocitos T con CD19 CAR TD. Se usaron ND463 no transducidos (NOTD) como control negativo. La figura 90 es un panel de gráficos que muestran la expresión de CD19 CAR el día 11 en linfocitos T con CD19 CAR TD (transducidos)/sometidos a electroporación de CRISPR, agotados en CD3; linfocitos T con CD19 CAR TD/sometidos a electroporación de CRISPR; y linfocitos T con CD19 CAR TD. Se usaron ND463 no transducidos (NOTD) como control negativo.

15 La figura 91 es un panel de gráficos que muestran la expresión de CD3/B2M/CAR el día 11 en linfocitos T con CD19 CAR TD (transducidos)/sometidos a electroporación de CRISPR, agotados en CD3; linfocitos T con CD19 CAR TD/sometidos a electroporación de CRISPR; y linfocitos T con CD19 CAR TD. Se usaron ND463 no transducidos (NOTD) como control negativo.

20 La figura 92 es un gráfico que resume la expresión de CD3/B2M/CAR en linfocitos T con CD19 CAR TD (transducidos)/sometidos a electroporación de CRISPR, agotados en CD3; linfocitos T con CD19 CAR TD/sometidos a electroporación de CRISPR; y linfocitos T con CD19 CAR TD.

25 La figura 93 es un panel de gráficos que muestran la regulación positiva de CD107a en linfocitos T con CD19 CAR TD (transducidos)/sometidos a electroporación de CRISPR y agotados en CD3; linfocitos T con CD19 CAR TD/sometidos a electroporación de CRISPR; y linfocitos T con CD19 CAR TD.

La figura 94 es un panel de gráficos que muestran la actividad lítica de los linfocitos T el día 11.

30 La figura 95 es un panel de gráficos que muestran la producción de citocinas de los linfocitos T el día 11.

La figura 96 es un panel de gráficos que muestran la expansión de linfocitos T. No se observó un crecimiento anómalo de linfocitos T.

## 35 Descripción detallada

### Definiciones

40 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque en la práctica se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento para ensayar la presente invención, se describen en el presente documento los materiales y métodos preferentes. Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología.

45 También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante.

50 Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

"Aproximadamente" como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de  $\pm 20\%$  o del  $10\%$ , más preferentemente  $\pm 5\%$ , incluso más preferentemente  $\pm 1\%$ , y aún más preferentemente  $\pm 0,1\%$  del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

60 "Activación", como se usa en el presente documento, se refiere al estado de un linfocito T que ha sido suficientemente estimulado para inducir una proliferación celular detectable. La activación también puede estar asociada con la producción inducida de citocinas y funciones efectoras detectables. La expresión "linfocitos T activados" se refiere, entre otras cosas, a los linfocitos T que están en división celular.

65 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas procedentes de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser partes inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Típicamente, los anticuerpos son tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una diversidad de formas incluyendo, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos

monoclonales, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como anticuerpos monocatenarios (scFv) y anticuerpos humanizados (Harlow *et al.*, 1999, En: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow *et al.*, 1989, En: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426).

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Una "cadena pesada de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones de origen natural.

Una "cadena ligera de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere al más pequeño de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones de origen natural. Las cadenas ligeras  $\alpha$  y  $\beta$  se refieren a los dos isotipos principales de cadenas ligeras de anticuerpos.

Por la expresión "anticuerpo sintético", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago como se describe en el presente documento. El término también debe interpretarse que se refiere a un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido usando tecnología de ADN sintético o de secuencia de aminoácidos que está disponible y se conoce bien en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" o "Ag" se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la técnica comprenderá que cualquier macromolécula, incluyendo prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Asimismo, los antígenos pueden proceder de ADN recombinante o genómico. Un experto en la técnica comprenderá que cualquier ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial codifica una proteína que provoca una respuesta inmunitaria, por lo tanto, codifica un "antígeno" como se usa ese término en el presente documento. Asimismo, un experto en la técnica comprenderá que no es necesario que un antígeno esté codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Resulta fácilmente evidente que la presente divulgación incluye, pero sin limitación, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos se disponen en diversas combinaciones para provocar la respuesta inmunitaria deseada. Además, un experto entenderá que no es necesario que un antígeno esté codificado por un "gen" en absoluto. Es fácilmente evidente que un antígeno se puede generar sintetizado o puede obtenerse de una muestra biológica. Tal muestra biológica puede incluir, pero sin limitación, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "efecto antitumoral" se refiere a un efecto biológico que se puede manifestar por una disminución en el volumen del tumor, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la esperanza de vida, o la mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto antitumoral" también se puede manifestar mediante la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de la invención en la prevención de la aparición de tumores en primer lugar.

El término "autoantígeno" significa, de acuerdo con la presente invención, cualquier autoantígeno que el sistema inmunitario reconozca como extraño. Los autoantígenos comprenden, pero sin limitación, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de la superficie celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glucoproteínas, incluyendo receptores de superficie celular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad autoinmunitaria" se define como un trastorno que es resultado de una respuesta autoinmunitaria. Una enfermedad autoinmunitaria es el resultado de una respuesta excesiva e inapropiada a un autoantígeno. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmunitaria, parotiditis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, diabetes (tipo 1), epidermólisis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitíligo, mixedema, anemia perniciosa, colitis ulcerosa, entre otras.

Como se usa en el presente documento, el término "autólogo" se refiere a cualquier material procedente del mismo individuo al que luego se reintroduce en el individuo.

"Alogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal diferente de la misma especie.

"Xenogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal de una especie diferente.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del organismo. Algunos ejemplos de los diversos cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello del útero, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer medular tiroideo.

- 15 La expresión "receptor de antígeno quimérico" o "CAR", como se usa en el presente documento, se refiere a un receptor de linfocitos T artificial que está genomanipulado para expresarse en una célula efectora inmunitaria y unirse específicamente a un antígeno. Pueden usarse CAR como terapia con transferencia celular adoptiva. Los linfocitos T se extraen de un paciente y se modifican para que expresen los receptores específicos para una forma particular de antígeno. En algunas realizaciones, los CAR se han expresado con especificidad hacia un antígeno asociado a un tumor, por ejemplo. Los CAR también pueden comprender un dominio de activación intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno asociada a un tumor. En algunos aspectos, los CAR comprenden fusiones de anticuerpos monoclonales procedentes de fragmentos variables monocatenarios (scFv), fusionados a la transmembrana CD3-zeta y al dominio intracelular. La especificidad de los diseños de CAR puede obtenerse a partir de ligandos de receptores (por ejemplo, péptidos). En algunas realizaciones, un CAR puede dirigirse a cánceres redirigiendo la especificidad de un linfocito T que expresa el CAR específico para antígenos asociados a tumor.

- 25 El término "escisión" se refiere a la rotura de enlaces covalentes, tales como en la cadena principal de una molécula de ácido nucleico. La escisión se puede iniciar mediante una diversidad de métodos, incluyendo, pero sin limitación, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Son posibles tanto la escisión monocatenaria como la escisión bicatenaria. La escisión de doble cadena puede producirse como resultado de dos eventos de escisión monocatenaria distintos. La escisión del ADN puede dar lugar a la producción de extremos romos o escalonados. En determinadas realizaciones, pueden usarse polipéptidos de fusión para dirigirse al ADN bicatenario escindido.

- Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "modificaciones conservadoras de secuencia" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente a las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y delecciones de aminoácidos. En un anticuerpo de la invención pueden introducirse modificaciones mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Son sustituciones conservadoras de aminoácidos aquellas en las que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más restos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo se pueden reemplazar por otros restos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado se puede ensayar para determinar la capacidad unión de los antígenos usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

- 50 "Ligando coestimulador", como se usa la expresión en el presente documento, incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, célula dendrítica, linfocito B y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora afín en un linfocito T, proporcionando de este modo una señal que, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo, la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, media en una respuesta de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitación, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotoxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une con el receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente a CD83.

- Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando así en una respuesta coestimuladora por el linfocito T, tal como, pero sin limitación, la proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll.

Una "señal coestimuladora", como se usa en el presente documento, se refiere a una señal, que, junto con una señal primaria, tal como la ligadura de TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o la regulación positiva o negativa de moléculas clave.

El término "CRISPR/CAS" "sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas", o "CRISPR" se refiere a locus de ADN que contienen repeticiones cortas de secuencias de bases. Cada repetición va seguida de segmentos cortos de ADN espaciador de exposiciones anteriores a un virus. Las bacterias y las arqueas han desarrollado defensas inmunitarias adaptativas denominadas sistemas CRISPR-asociados a CRISPR (Cas) que usan ARN corto para dirigir la degradación de ácidos nucleicos exógenos. En las bacterias, el sistema CRISPR proporciona inmunidad adquirida contra la invasión de ADN exógeno mediante la escisión del ADN guiada por ARN.

En el sistema CRISPR/Cas de tipo II, los segmentos cortos de ADN exógeno, denominados "espaciadores", se integran dentro de los locus genómicos CRISPR y se transcriben y se procesan en ARN corto de CRISPR (ARNcr). Estos ARNcr se hibridan con ARNcr transactivadores (ARNtracr) y dirigen la escisión específica de secuencia y el silenciamiento del ADN patógeno por parte de las proteínas Cas. Trabajos recientes han demostrado que el reconocimiento de la diana por parte de la proteína Cas9 requiere una secuencia "semilla" dentro del ARNcr y una secuencia de motivo adyacente de protoespaciador (PAM) que contiene dinucleótidos conservados cadena arriba de la región de unión al ARNcr.

Para dirigir Cas9 para que escinda secuencias de interés, se pueden diseñar transcritos de fusión de ARNcr-ARNtracr, denominados en lo sucesivo "ARN guía" o "ARNg", a partir del promotor de la polimerasa III U6 humana. La edición genómica mediada por CRISPR/CAS y la regulación destacaron su potencial transformador para la ciencia básica, la ingeniería celular y los productos terapéuticos.

El término "CRISPRi" se refiere a un sistema CRISPR para la represión génica específica de secuencia o la inhibición de la expresión génica, tal como a nivel transcripcional.

Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal en donde el animal no puede mantener la homeostasis y en donde, si la enfermedad no mejora, la salud del animal continúa deteriorándose. En cambio, un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal puede mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no necesariamente causa una disminución adicional en el estado de salud del animal.

Como se usa en el presente documento, la expresión "regulación negativa" se refiere a la disminución o eliminación de la expresión génica de uno o más genes.

"Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, como se describe en el presente documento, eficaz para lograr un resultado biológico particular o proporcionan un beneficio terapéutico o profiláctico. Dichos resultados pueden incluir, pero sin limitación, actividad antitumoral determinada por cualquier medio adecuado en la técnica.

"Codificante" se refiere a la propiedad intrínseca de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para actuar como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y normalmente se proporciona en los listados de secuencias, como la cadena no codificante, usada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, pueden denominarse codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

Como se usa en el presente documento, "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

Como se usa en el presente documento, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

Como se usa en el presente documento, el término "expandir" se refiere a aumentar en número, como en un aumento en el número de linfocitos T. En una realización, los linfocitos T que se expanden *ex vivo* aumentan en número con respecto al número originalmente presente en el cultivo. En otra realización, los linfocitos T que se expanden *ex vivo* aumentan en número con respecto a otros tipos de células en el cultivo. El término "*ex vivo*", como se usa en el presente documento, se refiere a células que se han extraído de un organismo vivo (por ejemplo, un ser humano) y se han propagado fuera del organismo (por ejemplo, en una placa de cultivo, tubo de ensayo o biorreactor).

Como se usa en el presente documento, el término "expresión" se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigida por su promotor.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción *cis* para la expresión; pueden suministrarse otros elementos para la expresión por la célula hospedadora o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, virus Sendai, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

Como se usa en el presente documento, "homólogo" se refiere a la identidad de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son homólogas al 50 %; si el 90 % de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10) son coincidentes o homólogas, las dos secuencias son homólogas al 90 %.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima procedente de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes. Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o en las secuencias estructurales. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar aún más el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos un, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. De manera óptima, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann *et al.*, Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

"Completamente humana" se refiere a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, donde la molécula completa es de origen humano o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, "identidad" se refiere a la identidad de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, particularmente entre dos moléculas de aminoácidos, tal como, entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando dos secuencias de aminoácidos tienen los mismos restos en las mismas posiciones; por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas polipeptídicas está ocupada por una arginina, entonces son idénticas en esa posición. La identidad o el grado en el que dos secuencias de aminoácidos tienen los mismos restos en las mismas posiciones en una alineación se expresa con frecuencia como un porcentaje. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos es una función directa del número de posiciones coincidentes o idénticas; por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son idénticas, las dos secuencias son idénticas en un 50 %; si el 90 % de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10) son coincidentes o idénticas, las dos secuencias de aminoácidos son idénticas en un 90 %.

El término "inmunoglobulina" o "Ig", como se usa en el presente documento, se define como una clase de proteínas, que actúan como anticuerpos. Los anticuerpos expresados por los linfocitos B a veces se denominan BCR (receptor de linfocitos B) o receptor de antígeno. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. La IgA es el anticuerpo primario que está presente en las secreciones corporales, tales como saliva, lágrimas, leche materna, secreciones gastrointestinales y secreciones de moco de las vías respiratorias y genitourinarias. La IgG es el anticuerpo circulante más común. La IgM es la principal inmunoglobulina producida en la respuesta inmunitaria primaria en la mayoría de los sujetos. Es la inmunoglobulina más eficaz en la aglutinación, la fijación de complemento y otras respuestas de anticuerpos, y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que no tiene una función de anticuerpo conocida, pero puede servir como un receptor de antígeno. La IgE es la inmunoglobulina que media en la hipersensibilidad inmediata al provocar la liberación de mediadores de los mastocitos y basófilos tras la exposición al alérgeno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria" se define como una respuesta celular a

un antígeno que se produce cuando los linfocitos identifican moléculas antigénicas como extrañas e inducen la formación de anticuerpos y/o activan los linfocitos para eliminar el antígeno.

Como se usa en este caso, "célula madre pluripotente inducida" o "célula iPS" se refiere a una célula madre pluripotente que se genera a partir de células adultas, tales como linfocitos T. La expresión de factores de reprogramación, tales como Klf4, Oct3/4 y Sox2, en células adultas convierte a las células en células pluripotentes capaces de propagarse y diferenciarse en múltiples tipos de células.

Como se usa en el presente documento, un "material de formación" incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material de formación del kit divulgado en el presente documento puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición. Como alternativa, el material de formación puede enviarse por separado del recipiente con la intención de que el material de formación y el compuesto se usen cooperativamente por el receptor.

"Aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido naturalmente presente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislados pueden existir en forma sustancialmente purificada o pueden existir en un entorno no natural tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.

Como se usa en el presente documento, el término "atenuación" se refiere a una disminución en la expresión génica de uno o más genes.

Como se usa en el presente documento, el término "inactivación" se refiere a la ablación de la expresión génica de uno o más genes.

Como se usa en el presente documento, un "lentivirus" se refiere a un género de la familia *Retroviridae*. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus al ser capaces de infectar células que no se dividen; pueden suministrar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula hospedadora, por lo que son uno de los métodos más eficientes de un vector de suministro génico. VIH, SIV y FIV son todos ejemplos de lentivirus. Los vectores procedentes de lentivirus ofrecen los medios para lograr niveles significativos de transferencia génica *in vivo*.

Por el término "modificado", como se usa en el presente documento, se entiende un estado o estructura cambiados de una molécula o célula de la invención. Las moléculas pueden modificarse de muchas maneras, incluyendo química, estructural y funcionalmente. Las células pueden modificarse mediante la introducción de ácidos nucleicos.

Por el término "modular", como se usa en el presente documento, se entiende la mediación de un aumento o disminución detectables en el nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto por lo demás idéntico pero sin tratar. El término abarca perturbar y/o afectar a una señal o respuesta natural, por lo tanto, la mediación de una respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, preferentemente, un ser humano.

En el contexto de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos habituales. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a la citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina, y "U" se refiere a uridina.

A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La expresión secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener en alguna versión uno o más intrones.

La expresión "unido operativamente" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente están contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

El término antígeno tumoral "sobrexpresado" o "sobrexpresión" de un antígeno tumoral está destinado a indicar un nivel anómalo de expresión de un antígeno tumoral en una célula de un área de enfermedad como un tumor sólido dentro de un tejido u órgano específico del paciente en relación con el nivel de expresión en una célula normal de ese tejido u órgano. Los pacientes que tienen tumores sólidos o una neoplasia hematológica caracterizada por la

sobreexpresión del antígeno tumoral se pueden determinar mediante ensayos estándar conocidos en la técnica.

La administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, o técnicas de infusión.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se define como una cadena de nucleótidos. Asimismo, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos y polinucleótidos, como se usan en el presente documento, son intercambiables. Un experto en la técnica tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se usan en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen mediante cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una biblioteca recombinante o un genoma celular, usando tecnología de clonación ordinaria y PCR<sup>™</sup>, y similares, y mediante medios sintéticos.

Como se usan en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a un compuesto comprendido por restos de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se limita el número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Como se usa en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica proteínas, de las cuales hay muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y, en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede, por ejemplo, ser una que exprese el producto génico de una manera específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula en la mayoría o en todas las condiciones fisiológicas de la célula.

Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido codificado o especificado por un gen, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo tisular correspondiente al promotor.

Un "virus Sendai" se refiere a un género de la familia *Paramyxoviridae*. Los virus Sendai son virus de ARN monocatenario negativos que no se integran en el genoma del hospedador ni alteran la información genética de la célula hospedadora. Los virus Sendai tienen una gama de hospedadora excepcionalmente amplia y no son patógenos para los seres humanos. Usados como vector vírico recombinante, los virus Sendai son aptos para una expresión genética transitoria pero fuerte.

Una "vía de transducción de señal" se refiere a la relación bioquímica entre una diversidad de moléculas de transducción de señales que desempeñan una función en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. La expresión "receptor de superficie celular" incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitirla a través de la membrana plasmática de una célula.

"Anticuerpos monocatenarios" se refieren a anticuerpos formados mediante técnicas de ADN recombinante en las que fragmentos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina se unen a la región Fv a través de un intervalo de aminoácidos genomanipulado. Se conocen diversos métodos para generar anticuerpos monocatenarios, incluyendo los descritos en la Pat. de EE. UU. N.º 4.694.778; Bird (1988) Science 242:423-442; Huston *et al.* (1988) Proc. Natl.



Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Ward *et al.* (1989) Nature 334:54454; Skerra *et al.* (1988) Science 242:1038-1041.

Por la expresión "se une específicamente", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, se entiende un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas de una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de una o más especies. No obstante, dicha reactividad entre especies no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, dicha reactividad cruzada no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, las expresiones "unión específica" o "se une específicamente", se pueden usar en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para expresar que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante o epítipo antigénico) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de a proteínas en general. En caso de que un anticuerpo sea específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

Por el término "estimulación", se entiende una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo de TCR/CD3) con su ligando afín mediando así en un evento de transducción de señales, tal como, pero sin limitación, transducción de señal a través del complejo de TCR/CD3. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de determinadas moléculas, tales como la regulación negativa de TGF-beta y/o la reorganización de estructuras citoesqueléticas y similares.

Una "molécula estimuladora", como se usa la expresión en el presente documento, significa una molécula en un linfocito T que se une específicamente con un ligando estimulador afín presente en una célula presentadora de antígeno.

Un "ligando estimulador", como se usa en el presente documento, significa un ligando que, cuando está presente en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, un linfocito B y similares) se puede unir específicamente con un compañero de unión afín (denominado en el presente documento "molécula estimuladora") en un linfocito T, mediando de este modo en una respuesta primaria mediante el linfocito T, incluyendo, pero sin limitación, activación, inicio de una respuesta inmunitaria, proliferación y similares. Los ligandos estimuladores se conocen bien en la técnica y abarcan, entre otros, una molécula del MHC de clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti CD3, un anticuerpo superagonista anti CD28 y un anticuerpo superagonista anti CD2.

Se entiende que el término "sujeto" incluye organismos vivos en los que se puede inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, mamíferos). Un "sujeto" o "paciente", como se usa en el presente documento, puede ser un mamífero humano o no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, ganado y animales de compañía, tales como mamíferos ovinos, bovinos, porcinos, cánidos, felinos y murinos. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

Como se usa en el presente documento, una célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que ha sido separada de otros tipos de células con las que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, esta expresión se refiere simplemente a células que han sido separadas de las células con las que están naturalmente asociadas en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan *in vitro*. En otras realizaciones, las células no se cultivan *in vitro*.

Un "sitio diana" o "secuencia diana" se refiere a una secuencia de ácido nucleico genómico que define una porción de un ácido nucleico a la que una molécula de unión puede unirse de manera específica en condiciones suficientes para que se produzca la unión.

Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de linfocitos T" o "TCR" se refiere a un complejo de proteínas de membrana que participan en la activación de linfocitos T en respuesta a la presentación del antígeno. El TCR es responsable de reconocer antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. El TCR está compuesto por un heterodímero de una cadena alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ), aunque en algunas células el TCR consiste en cadenas gamma y delta ( $\gamma/\delta$ ). Los TCR pueden existir en formas alfa/beta y gamma/delta, que son estructuralmente similares pero tienen ubicaciones y funciones anatómicas distintas. Cada cadena está compuesta por dos dominios extracelulares, un dominio variable y uno constante. En algunas realizaciones, el TCR puede modificarse en cualquier célula que comprenda un TCR, incluyendo, por ejemplo, un linfocito T auxiliar, un linfocito T citotóxico, un linfocito T de memoria, un linfocito T regulador, linfocito T citolítico y linfocito T gamma delta.

Como se usa en el presente documento, el término "terapéutico" significa un tratamiento y/o profilaxis. Se obtiene un efecto terapéutico mediante supresión, remisión o erradicación de una patología.

Como se usa en el presente documento, el término "transfectado" o "transformado" o "transducido" se refiere a un

proceso mediante el cual el ácido nucleico exógeno se transfiere o se introduce en la célula hospedadora. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es aquella que se ha transfectado, transformado o transducido con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula del sujeto primaria y su descendencia.

- 5 "Tratar" una enfermedad, como se usa el término en el presente documento, significa reducir la frecuencia o gravedad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto.

La expresión "bajo control transcripcional" o "unido operativamente", como se usa en el presente documento, significa que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede usarse para suministrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. En la técnica se conocen numerosos vectores, que incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término "vector" incluye un plásmido o un virus que se replica de forma autónoma. El término también debe interpretarse para incluir compuestos no plasmídicos y no víricos que faciliten la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores víricos incluyen, pero sin limitación, vectores víricos de Sendai, vectores adenovíricos, vectores adenoasociados, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, y similares.

Intervalos: a lo largo de la presente divulgación, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos, así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo, tal como de 1 a 6, tiene subintervalos específicamente divulgados tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

### 30 Descripción

Los linfocitos T universales que evitan la enfermedad injerto contra hospedador (GVHD) son muy deseadas en el entorno clínico. Sin embargo, el uso de linfocitos T alogénicos es un riesgo debido al rechazo por parte del sistema inmunitario del hospedadora a través del reconocimiento de moléculas HLA-A. Las estrategias de direccionamiento para manipular múltiples genes son complicadas y los esfuerzos han dado como resultado una baja eficiencia en los linfocitos T sin prevenir la GVHD y las reacciones hospedador contra injerto simultáneamente.

La vía de señalización de apoptosis del receptor FAS/ligando FAS (FAS/FASL) regula negativamente la función de los linfocitos T. PD1 y CTLA4 son dos vías de señalización inhibitoras importantes en los linfocitos T. La inmunidad antitumoral mejorada que es resultado del bloqueo mediado por anticuerpos de CTLA-4, PD-1 o PD-L1 sugiere el potencial de mejorar la eficiencia de las inmunoterapias mediante la inhibición de estas vías. La invención incluye la generación de linfocitos T modificados en donde se agota FAS como medio para generar linfocitos T modificados con inmunogenicidad reducida.

La presente invención incluye métodos y composiciones para generar un linfocito T modificado atenuando la expresión génica endógena y expresando un receptor de linfocito T modificado o un receptor de antígeno quimérico. En algunas realizaciones, la invención incluye un método para generar el linfocito T modificado. Tal linfocito T modificado puede incluirse en una composición terapéutica y administrarse a un paciente que lo necesite.

### 50 Atenuación de la expresión génica endógena

La presente invención incluye la regulación negativa de la expresión génica endógena en un linfocito T, que es FAS. En una realización, el linfocito T con expresión génica regulada negativamente tiene una inmunogenicidad reducida en un entorno alogénico. En otra realización, el linfocito T con inmunogenicidad reducida expresa un TCR modificado o un CAR para determinar actividad efectora dirigida.

En un aspecto, la invención incluye un método para generar un linfocito T modificado que comprende introducir un ácido nucleico en un linfocito T capaz de regular negativamente la expresión génica endógena, donde el gen es FAS. La regulación negativa de la expresión de un gen endógeno que participa en la producción de una respuesta inmunitaria a una célula, tal como la cadena  $\alpha$  de TCR, cadena  $\beta$  de TCR, microglobulina beta-2, o una molécula HLA, reduce el rechazo mediado por el sistema inmunitario del linfocito T modificado. Por ejemplo, la regulación negativa de la expresión de genes endógenos de TCR, MHC o microglobulina beta-2 elimina la presentación superficial de aloantígenos en los linfocitos T que podrían provocar el rechazo por parte del sistema inmunitario del hospedador. Además, la regulación negativa de un gen endógeno que regula las vías de señalización inhibitoras en los linfocitos T, tales como CTLA-4, PD1 y/o FAS, mejora la eficacia antitumoral del linfocito T modificado cuando se expone a un microambiente inmunosupresor.

En un aspecto, se introduce un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión génica endógena, tal como mediante electroporación, transfección o transducción lentivírica u otra transducción vírica, en el linfocito T. En otro aspecto, la invención incluye un linfocito T modificado que comprende un ácido nucleico sometido a electroporación capaz de regular negativamente la expresión génica endógena. En otro aspecto más, un linfocito T modificado incluye un ácido nucleico sometido a electroporación capaz de regular negativamente la expresión génica de TCR endógena. En otro aspecto, la composición que comprende el linfocito T modificado se genera de acuerdo con un método descrito en el presente documento. En otro aspecto más, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado o un linfocito T modificado generado de acuerdo con el método descrito en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

El ácido nucleico capaz de regular la expresión génica endógena puede regular negativamente la expresión génica endógena. En una realización, el ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión génica endógena se selecciona del grupo que consiste en un ARN no codificante, antagomiR, ARNip, ARNhc y un sistema CRISPR. La expresión génica endógena puede regularse negativamente, atenuarse, disminuirse y/o inhibirse mediante, por ejemplo, un ARN no codificante, antagomiR, ARNip, ARNhc, un sistema CRISPR, etc.

#### CRISPR/Cas

El sistema CRISPR/Cas es un sistema sencillo y eficaz para inducir alteraciones genéticas dirigidas. El reconocimiento de la diana por parte de la proteína Cas9 requiere una secuencia "semilla" dentro del ARN guía (ARNg) y un dinucleótido conservado que contiene una secuencia del motivo adyacente de protoespaciador (PAM) cadena arriba de la región de unión a ARNg. De este modo, el sistema CRISPR/CAS puede genomanipularse para escindir prácticamente cualquier secuencia de ADN rediseñando el ARNg en líneas celulares (tales como células 293T), células primarias y linfocitos T con CAR. El sistema CRISPR/CAS puede dirigirse simultáneamente a múltiples locus genómicos al coexpresar una única proteína CAS9 con dos o más ARNg, lo que hace que este sistema sea especialmente adecuado para la edición génica múltiple o la activación sinérgica de genes diana.

Un ejemplo de un sistema CRISPR/Cas usado para inhibir la expresión génica, CRISPRi, se describe en la Publicación de EE. UU. N.º: 2014/0068797. CRISPRi induce una alteración génica permanente que utiliza la endonucleasa Cas9 guiada por ARN para introducir roturas bicatenarias de ADN que desencadenan vías de reparación propensas a errores que dan lugar a mutaciones por cambio de marco. Una Cas9 catalíticamente muerta carece de actividad endonucleasa. Cuando se coexpresa con un ARN guía, se genera un complejo de reconocimiento de ADN que interfiere específicamente con el alargamiento transcripcional, la unión de la ARN polimerasa o la unión del factor de transcripción. Este sistema CRISPRi reprime eficientemente la expresión de genes dirigidos.

La alteración génica CRISPR/Cas se produce cuando una secuencia de ácido nucleico guía específica para un gen diana y una endonucleasa Cas se introducen en una célula y forman un complejo que permite a la endonucleasa Cas introducir una rotura bicatenaria en el gen diana. En una realización, el sistema CRISPR comprende un vector de expresión, tal como, pero sin limitación, un vector pAd5F35-CRISPR. En una realización, se genera un linfocito T modificado introduciendo un vector de expresión Cas y una secuencia de ácido nucleico guía específica para un gen en un linfocito T. En otra realización, el vector de expresión Cas induce la expresión de la endonucleasa Cas9. También pueden usarse otras endonucleasas, incluyendo, pero sin limitación, T7, Cas3, Cas8a, Cas8b, Cas10d, Cse1, Csy1, Csn2, Cas4, Cas10, Csm2, Cmr5, Fok1, otras nucleasas conocidas en la técnica, y cualquier combinación de las mismas.

En una realización, inducir el vector de expresión Cas comprende exponer el linfocito T a un agente que activa un promotor inducible en el vector de expresión Cas. En tal realización, el vector de expresión Cas incluye un promotor inducible, tal como uno que es inducible por exposición a un antibiótico (por ejemplo, por tetraciclina o un derivado de tetraciclina, por ejemplo, doxiciclina). Sin embargo, se debe apreciar que se pueden usar otros promotores inducibles. El agente inductor puede ser una condición selectiva (por ejemplo, exposición a un agente, por ejemplo, un antibiótico) que da como resultado la inducción del promotor inducible. Esto da como resultado la expresión del vector de expresión Cas.

La secuencia de ácido nucleico guía es específica para un gen y se dirige a ese gen para determinar roturas bicatenarias inducidas por la endonucleasa Cas. La secuencia de la secuencia de ácido nucleico guía puede estar dentro de un locus del gen. En una realización, la secuencia de ácido nucleico guía tiene al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más nucleótidos de longitud.

La secuencia de ácido nucleico guía puede ser específica para cualquier gen, tal como un gen que reduciría la inmunogenicidad o reduciría la sensibilidad a un microambiente inmunosupresor. En una realización, el gen puede incluir una secuencia específica para una cadena de receptor de linfocitos T (TCR) (tal como una cadena alfa, beta, gamma y/o delta), microglobulina beta-2, FAS, PD1, una proteína del complejo principal de histocompatibilidad (tal como una molécula HLA de clase I y/o una molécula HLA de clase II), CTLA-4 o cualquier combinación de las mismas.

La secuencia de ácido nucleico guía incluye una secuencia de ARN, una secuencia de ADN, una combinación de las

mismas (una secuencia de combinación de ARN-ADN) o una secuencia con nucleótidos sintéticos. La secuencia de ácido nucleico guía puede ser una molécula única o una molécula doble. En una realización, la secuencia de ácido nucleico guía comprende un único ARN guía.

## 5 Receptor de linfocitos T

La inmunoterapia adoptiva con linfocitos T que albergan TCR específicos de antígeno tiene potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer y determinadas infecciones víricas crónicas. La ingeniería genética de los linfocitos T con un TCR específico tiene la ventaja de redirigir los linfocitos T a un antígeno intracelular. Dado que la mayoría de las proteínas oncogénicas son intracelulares, el desarrollo de un panel de TCR específicos para una proteína impulsora oncogénica tiene un gran atractivo.

La presente invención también incluye un linfocito T modificado con expresión génica regulada negativamente como se describe en el presente documento y un receptor de linfocitos T (TCR) exógeno. En un aspecto, la invención incluye un método para generar un linfocito T modificado que comprende introducir un ácido nucleico que codifica un receptor de linfocitos T (TCR) modificado que comprende afinidad por un antígeno de superficie en una célula diana en el linfocito T y un ácido nucleico capaz de regular la expresión génica endógena que es FAS, en donde los linfocitos T son capaces de expresar el TCR modificado.

En otro aspecto, la invención incluye un linfocito T modificado que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica un receptor de linfocitos T (TCR) modificado que comprende afinidad por un antígeno de superficie en una célula diana y un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión génica endógena que es FAS, en donde el linfocito T expresa el TCR modificado y en donde la expresión génica endógena está regulada negativamente en el linfocito T. La invención también incluye una población de células que comprende el linfocito T modificado descrito en el presente documento.

Un receptor de linfocitos T es un complejo de proteínas de membrana que participan en la activación de linfocitos T en respuesta a la presentación del antígeno. La estimulación del TCR es desencadenada por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en las células presentadoras de antígenos que presentan péptidos antigénicos a los linfocitos T y se unen a los complejos de TCR para inducir una serie de cascadas de señalización intracelular.

El TCR generalmente está compuesto por seis cadenas diferentes unidas a membrana que forman el heterodímero de TCR responsable del reconocimiento de ligando. Los TCR existen en formas alfa/beta y gamma/delta, que son estructuralmente similares pero tienen ubicaciones y funciones anatómicas distintas. En una realización, el TCR comprende una cadena alfa de TCR y una cadena beta de TCR, tal como el ácido nucleico que codifica el TCR comprende un ácido nucleico que codifica una cadena alfa de TCR y una cadena beta de TCR. En otra realización, una cadena alfa de TCR o una cadena beta de TCR o ambas cadenas comprenden al menos una N-desglucosilación.

Cada cadena está compuesta por dos dominios extracelulares, un dominio variable y uno constante. En una realización, el TCR comprende al menos una región constante murina. El dominio constante está proximal a la membrana celular, seguido de un dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta. En una realización, el TCR modificado comprende un dominio citoplasmático que incluye un dominio de señalización coestimuladora, tal como un dominio de señalización coestimuladora 4-1BB. El dominio variable contribuye a la determinación del antígeno particular y de la molécula MHC con la que el TCR tiene especificidad de unión. A su vez, la especificidad de un linfocito T por un complejo único antígeno-MHC reside en el TCR particular expresado por el linfocito T.

Cada uno de los dominios constante y variable puede incluir un enlace disulfuro intracatenario. En una realización, TCR comprende al menos un enlace disulfuro. Los dominios variables incluyen bucles altamente polimórficos análogos a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos. La diversidad de secuencias de TCR se genera mediante el reordenamiento somático de genes variables unidos (V), de diversidad (D), unión (J) y constantes.

Los polipéptidos de cadena alfa y gamma funcionales están formados por regiones V-J-C reordenadas, mientras que las cadenas beta y delta consisten en regiones V-D-J-C. El dominio constante extracelular incluye una región proximal a la membrana y una región de inmunoglobulina.

En una realización, el TCR incluye un TCR de tipo natural, un TCR de alta afinidad y un TCR quimérico. Cuando se modifica el TCR, puede tener una mayor afinidad por el antígeno de superficie celular diana que un TCR de tipo natural. En realizaciones donde el TCR es un TCR quimérico, el TCR puede incluir dominios quiméricos, tal como el TCR comprende un dominio de señalización coestimuladora en un extremo C' de al menos una de las cadenas. En otra realización, el TCR puede incluir una cadena modificada, tal como una cadena alfa o beta modificada. Dichas modificaciones pueden incluir, pero sin limitación, N-desglucosilación, dominio alterado (tal como una región variable genomanipulada para dirigirse a un antígeno específico o aumentar la afinidad), adición de uno o más enlaces disulfuro, la totalidad o fragmentos de una cadena procedente de una especie diferente, y cualquier combinación de las mismas.

En una realización, el TCR comprende especificidad hacia un antígeno de célula diana. El antígeno de superficie celular diana puede incluir cualquier tipo de ligando que defina la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el antígeno de superficie celular diana puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana asociadas con una patología determinada. Por lo tanto, se incluyen ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión a antígeno del TCR, incluidos aquellos asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas. En una realización, el antígeno de superficie de la célula diana incluye cualquier antígeno asociado a tumor (TAA) y antígeno vírico, antígeno asociado a células enfermas o cualquier fragmento de los mismos.

El antígeno de la célula diana puede incluir cualquier proteína que pueda procesarse y presentarse mediante complejos principales de histocompatibilidad. Por ejemplo, el antígeno diana puede estar asociado con una patología particular. Por lo tanto, los ejemplos de marcadores celulares que pueden actuar como dianas del TCR incluyen aquellos asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas. En una realización, el antígeno diana incluye cualquiera de los antígenos asociados a tumor (TAA) y antígenos víricos, o cualquier fragmento de los mismos.

En un aspecto, la invención incluye una población de linfocitos T modificados que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de linfocitos T modificado (TCR) que comprende afinidad por un antígeno de superficie en una célula diana y un ácido nucleico capaz de regular negativamente

FAS, en donde los linfocitos T son capaces de expresar el TCR modificado.

Las técnicas para diseñar y expresar receptores de linfocitos T incluyen, pero sin limitación, la producción de heterodímeros de TCR que incluyen el puente disulfuro natural que conecta las subunidades respectivas (Garboczi, *et al.*, (1996), Nature 384(6605): 134-41; Garboczi, *et al.*, (1996), J Immunol 157(12): 5403-10; Chang *et al.*, (1994), PNAS USA 91: 11408-11412; Davodeau *et al.*, (1993), J. Biol. Chem. 268(21): 15455-15460; Golden *et al.*, (1997), J. Imm. Meth. 206: 163-169; Pat. de EE. UU. N.º 6.080.840).

#### Receptor de antígeno quimérico (CAR)

La presente invención también incluye un linfocito T modificado con expresión génica regulada negativamente como se describe en el presente documento y un CAR. Por lo tanto, la presente invención abarca el linfocito T modificado que comprende un CAR o un ácido nucleico que codifica un CAR, en donde el CAR incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular.

En un aspecto, la invención incluye un método para generar un linfocito T modificado que comprende introducir un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión génica endógena que es FAS en un linfocito T y un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) en el linfocito T, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula coestimuladora.

En otro aspecto, la invención incluye un linfocito T modificado que comprende un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión génica endógena y un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde la expresión génica regulada negativamente es FAS, y en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula coestimuladora. En una realización, el linfocito T modificado comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica un TCR modificado que comprende afinidad por un antígeno de superficie en una célula diana como se describe en otra parte del presente documento. La invención también incluye una población de células que comprende el linfocito T modificado descrito en el presente documento.

Uno o más dominios o un fragmento de un dominio del CAR pueden ser humanos. En una realización, la presente invención incluye un CAR completamente humano. Las secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios deseados se pueden obtener usando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cribando bibliotecas de células que expresan el gen, obteniendo el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo, o mediante aislamiento directamente a partir de células y tejidos que contienen el mismo, usando técnicas estándar. Como alternativa, el gen de interés se puede producir de manera sintética, en lugar de como una molécula clonada.

Se describen ejemplos de CAR en las Patente de EE.UU. N.º: 8.911.993, 8.906.682, 8.975.071, 8.916.381, 9.102.760, 9.101.584 y 9.102.761.

#### Dominio de unión a antígeno

En una realización, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno en una célula diana. Los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como un antígeno que se une al dominio de unión a antígeno del CAR incluyen aquellos asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.

La elección del dominio de unión a antígeno depende del tipo y número de antígenos que están presentes en la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede elegirse para reconocer un antígeno que actúa como marcador de superficie celular en una célula diana asociada con una patología particular.

- 5 En una realización, el dominio de unión a antígeno se une a un antígeno tumoral, tal como un antígeno que es específico para un tumor o cáncer de interés. En una realización, el antígeno tumoral de la presente invención comprende uno o más epítopos antigénicos de cáncer.

- 10 El dominio de unión al antígeno puede incluir cualquier dominio que se une al antígeno y puede incluir, pero sin limitación, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo sintético, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo no humano anticuerpo, y cualquier fragmento de los mismos. Por lo tanto, en una realización, la porción del dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo de mamífero o un fragmento del mismo.

- 15 El dominio de unión a antígeno puede unirse a uno o más antígenos, tales como, pero sin limitación, CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (también conocido como subconjunto 1 de CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 y 19A24); molécula 1 similar a lectina de tipo C (CLL-1 o CLECL1); CD33; variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII); gangliósido G2 (GD2); gangliósido GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cεr); maduración de linfocitos B de miembros de la familia del receptor de TNF (BCMA); antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAcα-Ser/Thr)); antígeno de membrana específico de próstata (PSMA); receptor huérfano 1 de tipo tirosina cinasa receptora (ROR1); tirosina cinasa 3 de tipo Fms (FLT3); glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG72); CD38; CD44v6; antígeno carcinoembrionario (CEA); molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13 (IL-13Ra2 o CD213A2); mesotelina; receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de células madre de próstata (PSCA); proteasa serina 21 (Testisin o PRSS21);
- 25 receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); antígeno de Lewis(Y); CD24; receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); antígeno embrionario 4 específico de etapa (SSEA-4); CD20; receptor de folato alfa; proteína tirosina cinasa receptora ERBB2 (Her2/neu); mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); molécula de adhesión de células neurales (NCAM); prostasa; fosfatasa ácida prostática (PAP); factor de elongación 2 mutado (ELF2M); efrina B2; proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP); receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (receptor de IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX); subunidad del proteasoma (prosome, macropaina), tipo beta, 9 (LMP2); glucoproteína 100 (gp100); proteína de fusión de oncogén que consiste en la región de agrupamiento de puntos de ruptura (BCR) y el homólogo 1 del oncogén vírico de la leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl); tirosinasa; receptor 2 de efrina de tipo A (EphA2); fucosil GM1; molécula de adhesión de sialilo de Lewis (sLe); gangliósido GM3 (aNeuSAc(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2); receptor de folato beta; marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/CD248); relacionado con el marcador endotelial tumoral 7 (TEM7R); claudina 6 (CLDN6); receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR); receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPRC5D);
- 30 marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; cinasa de linfoma anaplásico (ALK); ácido polisialílico; específico de placenta 1 (PLAC1); porción de hexasacárido de glucoceramida globoH (GloboH); antígeno de diferenciación de glándula mamaria (NY-BR-1); uroplaquina 2 (UPK2); receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1); adrenoceptor beta 3 (ADRB3); panexina 3 (PANX3); receptor 20 acoplado a proteína G (GPR20); complejo de antígeno 6 de linfocitos, locus K 9 (LY6K); receptor olfativo 51E2 (OR51E2); proteína de marco de lectura alterna TCR Gamma (TARP); proteína del tumor de Wilms (WT1); antígeno 1 de cáncer/testículo (NY-ESO-1); antígeno 2 de cáncer/testículo (LAGE-1a); antígeno 1 asociado a melanoma (MAGE-A1); gen 6 variante de translocación de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML); proteína 17 de espermatozoide (SPA17); familia de antígenos X, miembro 1A (XAGE1); receptor 2 de superficie celular de unión a angiopoyetina (Tie 2); antígeno 1 de cáncer de melanoma y testículo (MAD-CT-1); antígeno 2 de cáncer de melanoma y testículo (MAD-CT-2); antígeno 1 relacionado con Fos; proteína tumoral p53 (p53); p53 mutante; prostateína; survivina; telomerasa; antígeno tumoral 1 del carcinoma de
- 35 próstata (PCTA-1 o Galectina 8); antígeno de melanoma reconocido por los linfocitos T 1 (MelanA o MART1); mutante de sarcoma de rata (Ras); transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT); puntos de ruptura de translocación de sarcoma; inhibidor de melanoma de la apoptosis (ML-IAP); ERG (gen de fusión ETS de proteasa transmembrana, serina 2 (TMPRSS2)); N-acetil glucosaminil-transferasa V (NA17); proteína de caja emparejada Pax-3 (PAX3); receptor de andrógenos; ciclina B1; homólogo derivado del neuroblastoma del oncogén vírico de la mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN); miembro C de la familia de homólogos de Ras (RhoC); proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP-2); citocromo P450 1B1 (CYP1B1); similar al factor de unión a CCCTC (proteína de dedos de cinc) (BORIS o hermano del regulador de sitios impresos), antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por linfocitos T 3 (SART3); proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5); proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1); proteína tirosina cinasa específica de linfocitos (LCK); proteína 4 de anclaje de cinasa A (AKAP-4); sarcoma sinovial, punto de
- 40 ruptura 2 de X (SSX2); receptor para productos finales de glucación avanzada (RAGE-1); renal ubicuo 1 (RU1); renal ubicuo 2 (RU2); legumina; virus del papiloma humano E6 (VPH E6); virus del papiloma humano E7 (VPH E7); carboxil esterasa intestinal; proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; receptor 1 de tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos (LAIR1); fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89); miembro 2 de la subfamilia A del receptor de tipo inmunoglobulina leucocitaria (LILRA2); miembro f de la familia de tipo molécula CD300 (CD300LF); miembro A de la familia 12 de dominios de lectina de tipo C (CLEC 12A); antígeno 2 de células estromales de la médula ósea (BST2); tipo receptor 2 de hormona de tipo mucina que contiene el módulo de tipo EGF (EMR2);
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

antígeno de linfocitos 75 (LY75); glipicano-3 (GPC3); tipo receptor 5 de Fc (FCRL5); y el polipéptido 1 de tipo inmunoglobulina lambda (IGLL1).

5 En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión a antígeno proceda de la misma especie en la que finalmente se usará el CAR. Por ejemplo, para su uso en seres humanos, puede ser beneficioso para el dominio de unión a antígeno del CAR comprender un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado como se describe en otra parte del presente documento, o un fragmento de los mismos.

10 También es beneficioso que el dominio de unión al antígeno esté unido operativamente a otro dominio del CAR, tal como el dominio transmembrana o el dominio intracelular, ambos descritos en otra parte del presente documento, para la expresión en la célula. En una realización, un ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno está unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un dominio transmembrana y un ácido nucleico que codifica un dominio intracelular.

#### 15 Dominio transmembrana

Con respecto al dominio transmembrana, el CAR se puede diseñar para que comprenda un dominio transmembrana que conecta el dominio de unión a antígeno del CAR con el dominio intracelular. En una realización, el dominio transmembrana está asociado de manera natural con uno o más de los dominios en el CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de proteínas de membrana de superficie iguales o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

25 El dominio transmembrana puede proceder de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede proceder de cualquier proteína transmembrana o unida a membrana. Las regiones transmembrana de uso particular en esta invención pueden proceder de (es decir, comprender al menos la una o más regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. En algunos casos, también se pueden emplear una diversidad de bisagras humanas, incluida la bisagra de Ig (inmunoglobulina) humana.

30 En una realización, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá restos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. Preferentemente, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético.

#### 35 Dominio intracelular

El dominio intracelular o, de otro modo, el dominio citoplasmático del CAR, es responsable de la activación de la célula en la que se expresa el CAR. Por o tanto, se pretende que la expresión "dominio intracelular" incluya cualquier porción del dominio intracelular suficiente para transducir la señal de activación. En una realización, el dominio intracelular incluye un dominio responsable de una función efectora. La expresión "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser una actividad citolítica o una actividad auxiliar que incluye la secreción de citocinas.

45 En una realización, el dominio intracelular del CAR incluye un dominio responsable de la activación y/o transducción de señal. El dominio intracelular puede transmitir la activación de señales a través de interacciones proteína-proteína, cambios bioquímicos u otra respuesta para alterar el metabolismo, la forma, la expresión génica de la célula u otra respuesta celular a la activación de la molécula de señalización intracelular química.

50 Los ejemplos de un dominio intracelular para su uso en la invención incluyen, pero sin limitación, la porción citoplásmica del receptor de linfocitos T (TCR) y cualquier molécula coestimuladora que actúa en conjunto para iniciar la transducción de señales después de la participación del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estos elementos y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional. En una realización, el dominio intracelular del CAR comprende dominios de señalización duales. Los dominios de señalización dual pueden incluir un fragmento o dominio de cualquiera de las moléculas descritas en el presente documento.

55 Los ejemplos del dominio intracelular incluyen un fragmento o dominio de una o más moléculas o receptores incluyendo, pero sin limitación, TCR, CD3 zeta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD86, FcR gamma común, FcR beta (Fc épsilon R1b), CD79a, CD79b, Fc gamma RIIa, DAP10, DAP12, receptor de linfocitos T (TCR), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, CD80, ICAM-1, GITR, BAFTR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8alpha, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, otras

moléculas coestimuladoras descritas en el presente documento, cualquier derivado, variante o fragmento de las mismas, cualquier secuencia sintética de una molécula coestimuladora que tenga la misma capacidad funcional, y cualquier combinación de las mismas.

- 5 En una realización, el dominio intracelular del CAR incluye cualquier porción de una molécula coestimuladora, tal como al menos un dominio de señalización de CD3, CD27, CD28, ICOS, 4-1BB, PD-1, receptor de linfocitos T (TCR), cualquier derivado o variante de los mismos, cualquier secuencia sintética de los mismos que tenga la misma capacidad funcional y cualquier combinación de los mismos.
- 10 Entre el dominio de unión a antígeno y el dominio transmembrana del CAR, o entre el dominio intracelular y el dominio transmembrana del CAR, se puede incorporar un dominio espaciador. Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio espaciador" generalmente significa cualquier oligo o polipéptido que sirve para unir el dominio transmembrana al dominio de unión a antígeno o al dominio intracelular en la cadena polipeptídica. En una realización, el dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y lo más
- 15 preferentemente de 25 a 50 aminoácidos. En otra realización, un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio intracelular del CAR. Un ejemplo de enlazador incluye un doblete de glicina-serina.

#### Anticuerpos humanos

- 20 Puede ser preferible usar anticuerpos humanos o fragmentos de los mismos cuando se usan anticuerpos biespecíficos o los dominios de unión a antígeno de un CAR. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica, incluidos métodos de presentación en fagos usando
- 25 bibliotecas de anticuerpos procedentes de secuencias de inmunoglobulinas humanas, incluyendo mejoras en estas técnicas. Véanse, también, las Pat. de EE. UU. N.º 4.444.887 y 4.716.111; y las Publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. El anticuerpo biespecífico también puede incluir un anticuerpo en donde las cadenas pesadas y ligeras están codificadas por una secuencia de nucleótidos procedente de una o más fuentes de ADN humano.

- 30 También se pueden producir anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable
- 35 humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes humanos de cadena pesada y ligera. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de locus de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la línea
- 40 germinal, da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. A continuación, los ratones quiméricos se cruzan para producir una descendencia homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o parte de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos dirigidos contra la diana elegida se pueden obtener a partir
- 45 de ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana hospedados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de los linfocitos B y experimentan posteriormente cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando tal técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles, incluyendo, pero sin limitación, IgG1 (gamma 1) e IgG3. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase, Lonberg y Huszar
- 50 (Int. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)). Para un análisis detallado sobre esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT N.º WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735; y las Pat. de EE. UU. N.º 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; y 5.939.598. Además, empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, California) y Genpharm (San Jose, California) pueden participar para proporcionar
- 55 anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente. Para un análisis específico de la transferencia de una matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en ratones mutantes de línea germinal que dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno, véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immunol., 7:33 (1993); y Duchosal *et al.*, Nature, 355:258 (1992).
- 60

- Los anticuerpos humanos también pueden proceder de bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan *et al.*, Nature Biotech., 14:309 (1996)). La tecnología de presentación en fagos (McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-553 (1990)) puede usarse para
- 65 producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de



dominio V de anticuerpo en el marco de un gen de proteína recubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos puede realizarse en diversos formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos antioxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V procedentes de los bazo de ratones sin inmunizar. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra una serie diversa de antígenos (incluidos autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) o Griffith *et al.*, *EMBO J.*, 12:725-734 (1993). Véase, también, las Pat. de EE. UU. N.º 5.565.332 y 5.573.905.

Los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante linfocitos B activados *in vitro* (véanse las Pat. de EE. UU. N.º 5.567.610 y 5.229.275). También se pueden generar anticuerpos humanos *in vitro* usando técnicas de hibridoma tales como, pero sin limitación, las descritas por Roder *et al.* (*Methods Enzymol.*, 121:140-167 (1986)).

#### Anticuerpos humanizados

Como alternativa, en algunas realizaciones, un anticuerpo no humano se puede humanizar, donde se modifican secuencias o regiones específicas del anticuerpo para aumentar la similitud con un anticuerpo producido naturalmente en un ser humano. Por ejemplo, en la presente invención, el anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender un scFv de mamífero no humano. En una realización, la porción del dominio de unión a antígeno se humaniza.

Un anticuerpo humanizado se puede producir usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, injerto de CDR (véanse, por ejemplo, la Patente Europea N.º EP 239.400; Publicación Internacional N.º WO 91/09967; y Pat. de EE. UU. N.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), chapado o modificación de la superficie (véanse, por ejemplo, las Patentes Europeas N.º EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; y Roguska *et al.*, 1994, *PNAS*, 91:969-973), reordenamiento de cadenas (véase, por ejemplo, Pat. de EE. UU. N.º 5.565.332), y las técnicas divulgadas en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º US2005/0042664, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º US2005/0048617, Pat. de EE. UU. N.º 6.407.213, Pat. de EE. UU. N.º 5.766.886, Publicación Internacional N.º WO 93171105, Tan *et al.*, *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas *et al.*, *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000), Morea *et al.*, *Methods*, 20(3):267-79 (2000), Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84 (1997), Roguska *et al.*, *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996), Couto *et al.*, *Cancer Res.*, 55 (23 Sup):5973s-5977s (1995), Couto *et al.*, *Cancer Res.*, 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994), y Pedersen *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994). Con frecuencia, los restos estructurales de las regiones marco serán sustituidos por el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de los restos de CDR y estructurales para identificar los restos estructurales importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar restos estructurales inusuales en posiciones determinadas. (Véanse, por ejemplo, Queen *et al.*, Pat. de EE. UU. N.º 5.585.089; y Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332:323).

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". Por lo tanto, los anticuerpos humanizados comprenden una o más CDR de moléculas de inmunoglobulina no humana y regiones marco de ser humano. La humanización de anticuerpos se conoce bien en la técnica y esencialmente se puede realizar siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano, es decir, injerto de CDR (documento EP 239.400; Publicación PCT N.º WO 91/09967; y la Pat. de EE. UU. N.º 4.816.567; 6.331.415; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 6.548.640). En tales anticuerpos quiméricos humanizados, se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos estructurales (FR) se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. La humanización de anticuerpos también se puede lograr mediante chapado o modificación de la superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, *Protein Engineering*, 7(6):805-814 (1994); y Roguska *et al.*, *PNAS*, 91:969-973 (1994)) o reordenamiento de cadenas (Pat. de EE. UU. N.º 5.565.332).

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se usarán en la elaboración de los anticuerpos humanizados sirve para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es la más cercana a la del roedor se acepta a

continuación como la región marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro método usa un marco particular procedente de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Se puede usar el mismo marco para diferentes anticuerpos humanizados (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Los anticuerpos se pueden humanizar con conservación de alta afinidad por el antígeno diana y otras propiedades biológicas favorables. De acuerdo con un aspecto de la invención, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite un análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que incluyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse del antígeno diana. De esta manera, los restos estructurales se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal manera que se logra la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el antígeno diana. En general, los restos de CDR están implicados directa y más sustancialmente en la influencia sobre la unión al antígeno.

Un anticuerpo humanizado conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original. Sin embargo, usando determinados métodos de humanización, la afinidad y/o especificidad de la unión del anticuerpo al antígeno diana puede aumentarse usando métodos de "evolución dirigida", como se describe por Wu *et al.*, J. Mol. Biol., 294:151 (1999).

#### Otras moléculas

La presente invención también incluye el linfocito T modificado descrito en el presente documento que comprende además una molécula coestimuladora o un ácido nucleico que codifica la molécula coestimuladora. En una realización, el linfocito T modificado de la invención incluye además un ácido nucleico exógeno que codifica una molécula coestimuladora, de modo que el linfocito T modificado expresa la molécula coestimuladora. El ácido nucleico puede introducirse en el linfocito T transduciendo el linfocito T, transfectando el linfocito T o sometiendo a electroporación el linfocito T. En otra realización, el dominio coestimulador se selecciona de CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 y PD1L. En otra realización, la molécula coestimuladora incluye CD3 y comprende al menos dos cadenas de CD3 diferentes, tales como las cadenas CD3 zeta y CD3 épsilon.

En otra realización, el linfocito T modificado comprende además Klf4, Oct3/4 y/o Sox2 o un ácido nucleico que codifica Klf4, Oct3/4 y/o Sox2 para inducir la pluripotencia del linfocito T. Se puede inducir la pluripotencia de los linfocitos T expresando Klf4, Oct3/4 y Sox2. Klf4, Oct3/4 y Sox2 pueden expresarse a partir de un ácido nucleico, uno o más vectores víricos o una o más moléculas de ARN. En una realización, un vector vírico que codifica Klf4, Oct3/4 y Sox2 se introduce en el linfocito T para inducir pluripotencia. En otra realización, se introduce un vector vírico Sendai en los linfocitos T para inducir pluripotencia, en donde el vector vírico Sendai codifica Klf4, Oct3/4 y Sox2.

#### Introducción de ácidos nucleicos

Los métodos para introducir ácidos nucleicos en una célula incluyen métodos físicos, biológicos y químicos. Los métodos físicos para introducir un polinucleótido, tal como ARN, en una célula hospedadora incluyen la precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. El ARN se puede introducir en las células diana usando métodos disponibles comercialmente que incluyen electroporación (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)) o el Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El ARN también se puede introducir en las células usando transfección mediada por liposomas catiónicos usando lipofección, usando encapsulación de polímeros, usando transfección mediada por péptidos, o usando sistemas de suministro de partículas biolísticas tales como "pistolas de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, *et al.* Hum Gene Ther, 12(8):861-70 (2001)).

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedadora incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores víricos, y especialmente los vectores retrovíricos, se han convertido en el método más ampliamente usado para insertar genes en células de mamífero, por ejemplo, células humanas. Otros vectores víricos pueden proceder de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados, y similares. Véanse, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N.º 5.350.674 y 5.585.362.

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal de ejemplo para su uso como vehículo de suministro *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

Los lípidos adecuados para su uso se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, la dimiristilfosfatidilcolina ("DMPC") puede obtenerse en Sigma, St. Louis, MO; el fosfato de dicetilo ("DCP") se puede obtener en K & K Laboratories (Plainview, NY); el colesterol ("Choi") se puede obtener en Calbiochem-Behring; el dimiristilfosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener en Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a aproximadamente -20 °C. El cloroformo se usa como el único disolvente ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una diversidad de vehículos lipídicos monolaminares y multilaminares formados por la generación de agregados o bicapas lipídicas encerrados. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras vesiculares con una membrana de bicapa fosfolipídica y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se reorganizan antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh *et al.*, 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). Sin embargo, también se incluyen composiciones que tienen diferentes estructuras en solución que la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden adoptar una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas lipídicas. También se contemplan complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independientemente del método usado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedadora o exponer de otro modo una célula al inhibidor de la presente invención, para confirmar la presencia de los ácidos nucleicos en la célula hospedadora, pueden realizarse una diversidad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de "biología molecular" bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los análisis por transferencia de Southern y de Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detectar la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y análisis por transferencia de Western) o por ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que están dentro del alcance de la invención.

En una realización, se introduce en los linfocitos T expandidos un ácido nucleico que codifica un receptor de linfocitos T (TCR) que comprende afinidad por un antígeno de superficie en una célula diana. El ácido nucleico que codifica el TCR puede ser el mismo ácido nucleico o uno separado que sea capaz de regular negativamente la expresión del gen TCR endógeno. El ácido nucleico que codifica el TCR puede introducirse en el linfocito T al mismo tiempo o secuencialmente con el ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen TCR endógeno. En una realización, el ácido nucleico que codifica el TCR se introduce antes que el ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen TCR endógeno.

Además, los ácidos nucleicos pueden introducirse por cualquier medio, tal como transducción de los linfocitos T expandidos, transfección de los linfocitos T expandidos y electroporación de los linfocitos T expandidos. Puede introducirse un ácido nucleico mediante un método y puede introducirse otro ácido nucleico en el linfocito T mediante un método diferente.

#### ARN

En una realización, los ácidos nucleicos introducidos en el linfocito T son ARN. En otra realización, el ARN es ARNm que comprende ARN transcrito *in vitro* o ARN sintético. El ARN es producido por transcripción *in vitro* usando un molde generado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés de cualquier fuente se puede convertir directamente por PCR en un molde para la síntesis de ARNm *in vitro* usando los cebadores apropiados y ARN polimerasa. La fuente del ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN plásmido, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente apropiada de ADN. El molde deseado para la transcripción *in vitro* es una proteína de membrana quimérica. A modo de ejemplo, el molde codifica un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo o una porción de un anticuerpo. A modo de otro ejemplo, el molde comprende un dominio extracelular que comprende un dominio variable monocatenario de un anticuerpo, tal como anti CD3, y un dominio intracelular de una molécula coestimuladora. En una realización, el molde para la proteína de membrana quimérica de ARN codifica una proteína de membrana quimérica que comprende un dominio extracelular que comprende un dominio de unión a antígeno procedente de un anticuerpo contra una molécula coestimuladora, y un dominio intracelular procedente de una porción de un dominio intracelular de CD28 y 4-1BB.

Se puede usar PCR para generar un molde para la transcripción *in vitro* de ARNm que después se introduce en las células. Los métodos para realizar la PCR se conocen bien en la técnica. Los cebadores para su uso en la PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarias a las regiones del ADN que se usará como molde para la PCR. "Sustancialmente complementarias", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos donde la mayoría o todas las bases en la secuencia de cebador son complementarias, o una o más bases no son complementarias o no coinciden. Las secuencias sustancialmente complementarias pueden hibridar o hibridarse con la diana ADN pensada en condiciones de hibridación usadas para la PCR. Los cebadores se pueden diseñar para ser sustancialmente complementarios a cualquier parte del molde de ADN. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar para amplificar la porción de un gen que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluyendo 5' y 3' UTR. Los cebadores también se pueden diseñar para amplificar una porción de un gen que codifica un dominio particular de interés. En una realización, los cebadores están diseñados

para amplificar la región codificante de un ADNc humano, incluyendo todas o partes de las 5' y 3' UTR. Los cebadores útiles para PCR se generan mediante métodos sintéticos que se conocen bien en la técnica. Los "cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a los nucleótidos en el molde de ADN que están cadena arriba de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Cadena arriba" se usa en el presente documento para referirse a una ubicación 5', a la secuencia de ADN que se va a amplificar con respecto a la cadena codificante. Los "cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a un molde de ADN bicatenario que se encuentra cadena abajo de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Cadena abajo" se usa en el presente documento para referirse a una ubicación 3' respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar en relación con la cadena codificante.

También pueden usarse estructuras químicas que tienen la capacidad de promover la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN. El ARN tiene preferentemente 5' y 3' UTR. En una realización, la 5' UTR tiene entre cero y 3000 nucleótidos de longitud. La longitud de las secuencias 5' y 3' UTR que se añadirán a la región codificante se puede alterar mediante diferentes métodos, incluyendo, pero sin limitación, diseñar cebadores para PCR que hibridan con diferentes regiones de las UTR. Usando este enfoque, un experto en la técnica puede modificar las longitudes de 5' y 3' UTR requeridas para lograr una eficacia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.

Las 5' y 3' UTR pueden ser las que se dan de forma natural, las 5' y 3' UTR endógenas para el gen de interés. Como alternativa, las secuencias UTR que no son endógenas al gen de interés se pueden añadir incorporando las secuencias UTR en los cebadores directo e inverso o mediante cualquier otra modificación del molde. El uso de secuencias UTR que no son endógenas para el gen de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en secuencias 3' UTR pueden reducir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, las 3' UTR se pueden seleccionar o diseñar para aumentar la estabilidad del ARN transcrito en función de las propiedades de las UTR que son bien conocidas en la técnica.

En una realización, la 5' UTR puede contener la secuencia Kozak del gen endógeno. Como alternativa, cuando la PCR añade una 5' UTR que no es endógena al gen de interés como se describe anteriormente, se puede rediseñar una secuencia de Kozak consensuada añadiendo la secuencia 5' UTR. Las secuencias de Kozak pueden aumentar la eficacia de la traducción de algunas transcripciones de ARN, pero no parece ser necesario para todos los ARN para permitir una traducción eficaz. La necesidad de las secuencias de Kozak para muchos ARNm es conocido en la técnica. En otras realizaciones, la 5' UTR puede provenir de un virus de ARN cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otras realizaciones, se pueden usar diversos análogos de nucleótidos en las 3' o 5' UTR para impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.

Para permitir la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN sin la necesidad de clonar genes, un promotor de transcripción debe estar unido al molde de ADN cadena arriba de la secuencia a transcribir. Cuando se añade una secuencia que funciona como un promotor para una ARN polimerasa al extremo 5' del cebador directo, el promotor de la ARN polimerasa se incorpora al producto de PCR cadena arriba del marco de lectura abierto a transcribir. En una realización, el promotor es un promotor de polimerasa T7, tal como se describe en otra parte del presente documento. Otros promotores útiles incluyen, pero sin limitación, los promotores de ARN polimerasa T3 y SP6. Se conocen en la técnica secuencias de nucleótidos consenso para los promotores T7, T3 y SP6.

En una realización, el ARNm tiene tanto una caperuza en el extremo 5' como una cola de poli(A) en 3' que determinan la unión al ribosoma, el inicio de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En un molde de ADN circular, por ejemplo, ADN plásmido, la ARN polimerasa produce un producto concatamérico largo que no es adecuado para la expresión en células eucariotas. La transcripción del ADN plasmídico linealizado al final de la 3' UTR da como resultado un ARNm de tamaño normal que no es eficaz en la transfección eucariota, ni siquiera si se poliadenila después de la transcripción.

En un molde de ADN lineal, la ARN polimerasa del fago T7 puede prolongar el extremo 3' del transcrito más allá de la última base del molde (Schenborn y Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva y Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003)).

El método convencional de integración de tramos de poli(A)/T en un molde de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia de poli(A)/T integrada en el ADN plasmídico puede causar inestabilidad plasmídica, es por eso que los moldes de ADN plasmídico obtenidos de células bacterianas a menudo están altamente contaminados con deleciones y otras anomalías. Esto hace que los procedimientos de clonación no solo sean laboriosos y lentos, sino que con frecuencia no sean fiables. Esta es la causa por la que un método que permita la construcción de moldes de ADN con tramos de poli(A)/T 3' sin clonación sea muy deseable.

El segmento de poli(A)/T del molde de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR mediante el uso de un cebador inverso que contiene una cola de poli(T), tal como la cola de 100T (el tamaño puede ser 50-5000 T), o después de la PCR mediante cualquier otro método, incluyendo, pero sin limitación, ligadura de ADN o recombinación *in vitro*. Las colas de poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. Generalmente, la longitud de una cola de poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una realización, la cola de poli(A) tiene entre 100 y 5000 adenosinas.

Las colas de poli(A) de los ARN pueden prolongarse aún más después de la transcripción *in vitro* con el uso de una poli(A) polimerasa, tal como poliA polimerasa de *E. coli* (E-PAP). En una realización, aumentar la longitud de una cola de poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos da como resultado un aumento de aproximadamente el

5 doble en la eficacia de traducción del ARN. Adicionalmente, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Tal fijación puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, los análogos de ATP se pueden incorporar en la cola de poli(A) usando la poli(A) polimerasa. Los análogos de ATP pueden aumentar aún más la estabilidad del ARN.

10 Las caperuzas 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En una realización preferida, los ARN producidos por los métodos divulgados en el presente documento incluyen una caperuza 5'. La caperuza 5' se proporciona usando técnicas conocidas en la técnica y descritas en el presente documento (Cougot, *et al.*, Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, *et al.*, RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, *et al.*, Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

15 Los ARN producidos mediante los métodos divulgados en el presente documento también pueden contener una secuencia de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés). La secuencia IRES puede ser cualquier secuencia vírica, cromosómica o diseñada artificialmente que inicie la unión del ribosoma independiente de la caperuza al ARNm y facilite el inicio de la traducción. Puede incluirse cualquier soluto adecuado para la

20 electroporación celular, que pueda contener factores que faciliten la permeabilidad y viabilidad celular, tales como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y tensioactivos.

#### Transfección de ARN

25 En algunas realizaciones, el ARN que codifica un TCR se somete a electroporación en las células. En una realización, el ARN que codifica el TCR es ARN transcrito *in vitro*.

Los métodos divulgados se pueden aplicar a la modulación de la actividad de los linfocitos T en investigación básica y terapia, en los campos del cáncer, células madre, infecciones agudas y crónicas, y enfermedades autoinmunitarias, incluida la evaluación de la capacidad de los linfocitos T genéticamente modificados para destruir una célula cancerosa

30 diana.

Los métodos también proporcionan la capacidad de controlar el nivel de expresión en un amplio intervalo cambiando, por ejemplo, el promotor o la cantidad de ARN de entrada, haciendo posible regular individualmente el nivel de

35 expresión. Asimismo, la técnica de la producción de ARNm basada en PCR facilita enormemente el diseño de los ARNm con diferentes estructuras y la combinación de sus dominios.

Una ventaja de los métodos de transfección de ARN de la invención es que la transfección de ARN es esencialmente transitoria y sin vectores. Un transgén de ARN se puede suministrar a un linfocito y se puede expresar en el mismo

40 después de una breve activación celular *in vitro*, como un casete de expresión mínimo sin la necesidad de secuencias víricas adicionales. En estas condiciones, la integración del transgén en el genoma de la célula hospedadora es improbable. La clonación de células no es necesaria debido a la eficacia de la transfección del ARN y a su capacidad para modificar uniformemente toda la población de linfocitos.

45 La modificación genética de linfocitos T con ARN transcrito *in vitro* (IVT-ARN) utiliza dos estrategias diferentes, las cuales han sido probadas sucesivamente en diversos modelos animales. Las células se transfectan con ARN transcrito *in vitro* mediante lipofección o electroporación. Es deseable estabilizar el IVT-ARN usando diversas modificaciones para lograr una expresión prolongada del IVT-ARN transferido.

50 Se conoce en la bibliografía que algunos vectores IVT se utilizan de manera convencional como molde para la transcripción *in vitro* y que se han modificado genéticamente de tal manera que se producen transcritos de ARN estabilizados. Actualmente, los protocolos usados en la técnica se basan en un vector plasmídico con la siguiente estructura: un promotor de ARN polimerasa 5' que permite la transcripción de ARN, seguido de un gen de interés que está flanqueado en 3' y/o 5' por regiones no traducidas (UTR), y un casete de poliadenilo 3' que contiene nucleótidos

55 50-70 A. Antes de la transcripción *in vitro*, el plásmido circular se linealiza cadena abajo del casete de poliadenilo mediante enzimas de restricción de tipo II (la secuencia de reconocimiento se corresponde con el sitio de escisión). El casete de poliadenilo se corresponde, por lo tanto, con la secuencia posterior de poli(A) en el transcrito. Como resultado de este procedimiento, algunos nucleótidos permanecen como parte del sitio de escisión enzimática después de la linealización y extienden o enmascaran la secuencia de poli(A) en el extremo 3'. No está claro si este saliente no

60 fisiológico afecta a la cantidad de proteína producida intracelularmente a partir de tal construcción.

El ARN tiene varias ventajas sobre las estrategias víricas o plasmídicas más tradicionales. La expresión génica de una fuente de ARN no requiere transcripción y el producto proteico se produce rápidamente después de la transfección. Además, debido a que el ARN solo tiene que acceder al citoplasma, en lugar del núcleo, por lo tanto, los métodos de

65 transfección típicos dan como resultado una tasa de transfección extremadamente alta. Además, las estrategias basadas en plásmidos requieren que el promotor que dirige la expresión del gen de interés esté activo en las células

en estudio.

En otro aspecto, la construcción de ARN se suministra a las células por electroporación. Véanse, por ejemplo, las formulaciones y la metodología de electroporación de construcciones de ácido nucleico en células de mamíferos tal como se enseña en los documentos US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1, US 2004/0092907A1. Los diversos parámetros que incluyen la intensidad del campo eléctrico requerida para la electroporación de cualquier tipo de célula conocida se conocen generalmente en la bibliografía de investigación relevante, así como en numerosas patentes y solicitudes en el campo. Véanse, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. N.º 6.678.556, Pat. de EE. UU. N.º 7.171.264 y Pat. de EE. UU. N.º 7.173.116. Los equipos para la aplicación terapéutica de electroporación están disponibles comercialmente, por ejemplo, el sistema de terapia de electroporación de ADN MedPulser™ (Inovio/Genetronics, San Diego, California), y se describen en patentes tales como la Pat. de EE. UU. N.º 6.567.694; Pat. de EE. UU. N.º 6.516.223, Pat. de EE. UU. N.º 5.993.434, Pat. de EE. UU. N.º 6.181.964, Pat. de EE. UU. N.º 6.241.701 y Pat. de EE. UU. N.º 6.233.482; también puede usarse electroporación para la transfección de células *in vitro* como se describe, por ejemplo, en el documento US20070128708A1. La electroporación también se puede usar para suministrar ácidos nucleicos a las células *in vitro*. Por consiguiente, la administración mediada por electroporación en células de ácidos nucleicos, incluidas las construcciones de expresión que utilizan cualquiera de los muchos dispositivos disponibles y sistemas de electroporación conocidos por los expertos en la técnica, presenta un nuevo y emocionante medio para suministrar un ARN de interés a una célula diana.

En una realización, el método incluye la electroporación de un ARN que codifica una cadena alfa y beta de TCR. Las cadenas alfa y beta de TCR se pueden codificar en el mismo ARN o en ARN separados. Cuando alfa y beta están codificados por ARN separados, el ARN puede someterse a coelectroporación.

En otra realización, el método puede incluir además someter a electroporación un ácido nucleico que codifica una molécula coestimuladora. La molécula de ácido nucleico coestimuladora puede someterse a coelectroporación con el ARN de TCR.

#### Fuentes de linfocitos T

Antes de la expansión, se obtiene una fuente de linfocitos T de un sujeto. Los ejemplos no limitantes de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Los linfocitos T se pueden obtener de diversas fuentes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, tejido de bazo, cordón umbilical y tumores. En determinadas realizaciones, puede usarse cualquier número de líneas de linfocitos T disponibles en la técnica. En determinadas realizaciones, los linfocitos T se pueden obtener a partir de una unidad de sangre extraída de un sujeto usando cualquier número de técnicas conocidas por el experto, tal como separación de Ficoll. En una realización, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen mediante aféresis o leucoféresis. El producto de aféresis típicamente contiene linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. Las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio adecuado, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, los cationes divalentes, para etapas de procesamiento posteriores. Tras el lavado, las células pueden resuspenderse en una diversidad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS sin Ca y sin Mg. Como alternativa, los componentes no deseados de la muestra de aféresis pueden eliminarse y las células pueden resuspenderse directamente en medios de cultivo.

En otra realización, los linfocitos T se aíslan de la sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, por centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Como alternativa, los linfocitos T se pueden aislar del cordón umbilical. En cualquier caso, una subpoblación específica de linfocitos T se puede aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa.

Las células mononucleares de la sangre del cordón umbilical aisladas de este modo pueden carecer de células que expresan determinados antígenos, incluyendo, pero sin limitación, CD34, CD8, CD14, CD19 y CD56. El agotamiento de estas células se puede lograr usando un anticuerpo aislado, una muestra biológica que comprende un anticuerpo, tal como ascitis, un anticuerpo unido a un soporte físico y un anticuerpo unido a una célula.

El enriquecimiento de una población de linfocitos T por selección negativa se puede lograr usando una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método preferido es la clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que usa una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4<sup>+</sup> por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8.

Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y la superficie (por ejemplo, partículas tales como perlas). En determinadas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (es decir,

aumentar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de células y perlas. Por ejemplo, en una realización, se usa una concentración de 2 mil millones de células/ml. En una realización, se usa una concentración de mil millones de células/ml. En una realización adicional, se usan más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. Aún en otra realización, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden usar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un aumento del rendimiento celular, la activación celular y la expansión celular.

Los linfocitos T también se pueden congelar después de la etapa de lavado, que no requiere la etapa de eliminación de monocitos. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la etapa de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien en la técnica se conocen muchas soluciones y parámetros de congelación y serán útiles en este contexto, en un ejemplo no limitante, un método implica el uso de PBS que contiene DMSO al 20 % y albúmina de suero humano al 8 %, u otros medios de congelación celular adecuados. A continuación, las células se congelan a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Pueden usarse otros métodos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido.

En una realización, la población de linfocitos T está comprendida en células tales como células mononucleares de sangre periférica, células sanguíneas de cordón umbilical, una población purificada de linfocitos T y una línea de linfocitos T. En otra realización, las células mononucleares de sangre periférica comprenden la población de linfocitos T. Aún en otra realización, los linfocitos T purificados comprenden la población de linfocitos T.

#### Proteína de membrana quimérica

Generalmente, los linfocitos T se expanden por contacto con una superficie que tiene unido a la misma un agente que estimula una señal asociada al complejo de CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T. La presente invención comprende un método novedoso para expandir una población de linfocitos T que comprende someter a electroporación los linfocitos T con ARN que codifica una proteína de membrana quimérica y cultivar los linfocitos T sometidos a electroporación, en donde los linfocitos T sometidos a electroporación dentro de la población se expanden al menos 10 veces. La proteína de membrana quimérica de la invención comprende un dominio extracelular e intracelular. El dominio extracelular comprende un elemento de unión específico a la diana, tal como un anticuerpo. En una realización, la proteína de membrana quimérica comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) contra CD3 y un dominio intracelular procedente de una porción de un dominio intracelular de CD28 y 4-1BB.

La expresión de la proteína de membrana quimérica permite la interacción con otras células de la población, tales como células que expresan CD3, para estimular y activar la expansión de los linfocitos T sometidos a electroporación. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, las células que expresan CD3 pueden entrar en contacto y unirse con la proteína de membrana quimérica que se expresa en la superficie de los linfocitos T sometidos a electroporación. Al menos un linfocito T que expresa la proteína de membrana quimérica interactúa con otra célula que expresa CD3. Esta interacción estimula la expansión de los linfocitos T sometidos a electroporación.

En una realización, los linfocitos T se expanden antes de la regulación negativa de un gen endógeno. En otra realización, los linfocitos T modificados se expanden.

#### Dominio extracelular

La presente invención incluye un dominio extracelular que comprende un dominio de unión a antígeno procedente de un anticuerpo dirigido contra una molécula coestimuladora. La molécula coestimuladora puede incluir cualquier molécula que coestime los linfocitos T, tales como, pero sin limitación, CD3, CD28 o una combinación de los mismos. En una realización, el dominio extracelular puede incluir un dominio de unión a antígeno procedente de anti CD3, anti CD28 o una combinación de los mismos. En otra realización, el dominio extracelular comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) contra CD3.

En otra realización, el dominio extracelular puede incluir cualquier porción de un anticuerpo que se une al antígeno, incluyendo, pero sin limitación, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo sintético, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo de dominio único, fragmentos variables monocatenarios y fragmentos de los mismos. En algunos casos, es beneficioso que el dominio extracelular proceda de la misma especie en la que finalmente se usará la proteína de membrana quimérica. Por ejemplo, para su uso en seres humanos, puede ser beneficioso que el dominio extracelular de la membrana quimérica proteína comprenda un anticuerpo humano o fragmento del mismo. Por lo tanto, en una realización, la porción del dominio extracelular comprende un anticuerpo humano o un fragmento del mismo como se describe en otra parte del presente documento. Como alternativa, en algunas realizaciones, la porción del dominio extracelular comprende un anticuerpo no humano que está humanizado

como se describe en otra parte del presente documento.

#### Dominio intracelular

- 5 El dominio intracelular o dominio citoplasmático comprende una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a un dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígeno o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficaz de los linfocitos al antígeno.
- 10 El dominio citoplasmático o el dominio de señalización intracelular de la proteína de membrana quimérica es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras del linfocito T. Si bien normalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar toda la cadena. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede usarse en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de la función efectora. El dominio de señalización intracelular incluye cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

Los ejemplos no limitantes de dominios de señalización intracelular para su uso en la proteína de membrana quimérica incluyen cualquier porción del dominio intracelular de CD28, 4-1BB, receptor de linfocitos T (TCR), moléculas coestimuladoras, cualquier derivado o variante de estas secuencias, cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional y cualquier combinación de los mismos. En una realización, el dominio intracelular comprende una porción de un dominio intracelular de CD28 y 4-1BB.

#### Otros dominios de la proteína de membrana quimérica

- 25 Entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana de la proteína de membrana quimérica, o entre el dominio citoplasmático y el dominio transmembrana de la proteína de membrana quimérica, puede incorporarse un dominio espaciador, tal como un oligo o polipéptido que funciona para unir el dominio transmembrana tanto al dominio extracelular como al dominio citoplasmático en la cadena polipeptídica. El dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y lo más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos.

En algunas realizaciones, la proteína de membrana quimérica comprende además un dominio transmembrana. En alguna realización, la proteína de membrana quimérica comprende además un dominio bisagra. En una realización, el ARN que codifica la proteína de membrana quimérica comprende además un dominio transmembrana y bisagra, tal como un dominio transmembrana CD28 y un dominio bisagra CD8-alfa.

#### Expansión de linfocitos T

- 40 Como lo demuestran los datos divulgados en el presente documento, la expansión de los linfocitos T mediante los métodos divulgados en el presente documento se puede multiplicar por aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 2000 veces, 3000 veces, 4000 veces, 5000 veces, 6000 veces, 7000 veces, 8000 veces, 9000 veces, 10.000 veces, 100.000 veces, 1.000.000 veces, 10.000.000 veces, o más, y todos y cada uno de los números enteros completos o parciales entre los mismos. En una realización, los linfocitos T se expanden en el intervalo de aproximadamente 20 veces a aproximadamente 50 veces.

Después del cultivo, los linfocitos T se pueden incubar en medio celular en un aparato de cultivo durante un período de tiempo o hasta que las células alcancen la confluencia o alta densidad celular para un pase óptimo antes de pasar las células a otro aparato de cultivo. El aparato de cultivo puede ser cualquier aparato de cultivo comúnmente usado para cultivar células *in vitro*. Preferentemente, el nivel de confluencia es del 70 % o más antes de pasar las células a otro aparato de cultivo. Más preferentemente, el nivel de confluencia es del 90 % o más. Un período de tiempo puede ser cualquier tiempo adecuado para el cultivo de células *in vitro*. El medio de linfocitos T puede reemplazarse durante el cultivo de los linfocitos T en cualquier momento. Preferentemente, el medio de linfocitos T se reemplaza aproximadamente cada 2 a 3 días. A continuación, los linfocitos T se recogen del aparato de cultivo, después de lo cual los linfocitos T se pueden usar inmediatamente o se criopreservan para almacenarlos para su uso en un momento posterior. En una realización, la invención incluye la criopreservación de los linfocitos T expandidos. Los linfocitos T criopreservados se descongelan antes de introducir ácidos nucleicos en el linfocito T.

En otra realización, el método comprende aislar linfocitos T y expandir los linfocitos T. En otra realización, la invención comprende además criopreservar los linfocitos T antes de la expansión. Aún en otra realización, los linfocitos T criopreservados se descongelan para la electroporación con el ARN que codifica la proteína de membrana quimérica.

Se describe otro procedimiento para células de expansión *ex vivo* en la Pat. de EE. UU. N.º 5.199.942. La expansión, tal como se describe en la Pat. de EE. UU. N.º 5.199.942, puede ser una alternativa o sumarse a otros métodos de expansión descritos en el presente documento. Brevemente, el cultivo y expansión *ex vivo* de los linfocitos T comprende la adición a los factores de crecimiento celular, tales como los descritos en la Pat. de EE. UU.



N.º 5.199.942, u otros factores, tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit. En una realización, expandir los linfocitos T comprende cultivar los linfocitos T con un factor seleccionado del grupo que consiste en flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit.

La etapa de cultivo como se describe en el presente documento (contacto con agentes como se describe en el presente documento o después de la electroporación) puede ser muy corta, por ejemplo, menos de 24 horas, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 horas. La etapa de cultivo como se describe adicionalmente en el presente documento (contacto con agentes como se describe en el presente documento) puede ser larga, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días.

Se usan diversos términos para describir las células en cultivo. Cultivo celular se refiere generalmente a células tomadas de un organismo vivo y cultivadas en condiciones controladas. Un cultivo celular primario es un cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo y antes del primer subcultivo. Las células se expanden en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celular, dando como resultado una mayor población de células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular típicamente se mide por la cantidad de tiempo necesario para que las células se dupliquen en número, también conocido como tiempo de duplicación.

Cada ronda de subcultivo se denomina pase. Cuando las células se subcultivan, se dice que se han sometido a pases. Una población específica de células, o una línea celular, a veces se hace referencia o se caracteriza por la cantidad de veces que se ha sometido a pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que se ha sometido a diez pases puede denominarse cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo después del aislamiento de las células del tejido, se denomina P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o pase 2), y así sucesivamente. Los expertos en la técnica entenderán que puede haber muchas duplicaciones de la población durante el período de pase; por lo tanto, el número de duplicaciones de población de un cultivo es mayor que el número de pase. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el período entre pases depende de muchos factores, incluyendo, pero sin limitación, la densidad de siembra, sustrato, medio y tiempo entre pases.

En una realización, las células se pueden cultivar durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero de horas intermedio. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-gamma, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF-beta y TNF-α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la técnica. Otros aditivos para el crecimiento de las células incluyen, pero sin limitación, tensioactivo, plasmanato, y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α-MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o complementados con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de una o más citocinas suficiente para el crecimiento y la expansión de los linfocitos T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomycin, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para apoyar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (por ejemplo, 37 °C) y una atmósfera (por ejemplo, aire más CO<sub>2</sub> al 5 %) apropiadas.

El medio usado para cultivar los linfocitos T puede incluir un agente que pueda coestimular los linfocitos T. Por ejemplo, un agente que puede estimular CD3 es un anticuerpo contra CD3, y un agente que puede estimular CD28 es un anticuerpo contra CD28. Esto se debe a que, como lo demuestran los datos divulgados en el presente documento, una célula aislada por los métodos divulgados en el presente documento se puede expandir aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 2000 veces, 3000 veces, 4000 veces, 5000 veces, 6000 veces, 7000 veces, 8000 veces, 9000 veces, 10.000 veces, 100.000 veces, 1.000.000 veces, 10.000.000 veces, o más. En una realización, los linfocitos T se expanden en el intervalo de aproximadamente 20 veces a aproximadamente 50 veces, o más, cultivando la población sometida a electroporación.

En una realización, el método incluye introducir un ácido nucleico que codifica un receptor de linfocitos T (TCR) que comprende afinidad por un antígeno de superficie en una célula diana en los linfocitos T expandidos, y someter a electroporación un ARN que codifica una molécula coestimuladora en los linfocitos T, en donde los linfocitos T sometidos a electroporación son capaces de expresar el TCR y la molécula coestimuladora.

En otra realización, el método comprende además estimular los linfocitos T expandidos con al menos una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 y PD1L. La estimulación puede incluir coelectroporación con ARN que codifica la molécula coestimuladora. En tal realización, los linfocitos T expandidos se someten a electroporación o coelectroporación adicionalmente con un ARN que codifica CD3. El CD3 incluye al menos dos cadenas de CD3 diferentes, tales como las cadenas CD3 zeta y CD3 épsilon.

En otra realización, el método para expandir los linfocitos T puede comprender además aislar los linfocitos T expandidos para otras aplicaciones. Aún en otra realización, el método de expansión puede comprender además una electroporación posterior de los linfocitos T expandidos seguida de un cultivo. La electroporación posterior puede incluir introducir un ácido nucleico que codifica un agente, tal como una transducción de los linfocitos T expandidos, transfección de los linfocitos T expandidos o electroporación de los linfocitos T expandidos con un ácido nucleico que codifica un TCR, en la población expandida de linfocitos T, en donde el agente estimula además los linfocitos T. El agente puede estimular los linfocitos T, tal como, estimulando una mayor expansión, función efectora u otra función de los linfocitos T. En una realización, el ácido nucleico del agente se somete a coelectroporación con el ARN de la proteína de membrana quimérica. En otra realización, el ácido nucleico del agente, tal como un ARN de TCR, se somete a electroporación después de cultivar la población sometida a electroporación. En una realización adicional, el ácido nucleico del agente, tal como un ARN de TCR, se somete a electroporación en linfocitos T expandidos que se criopreservaron.

## 15 Terapia

Los linfocitos T modificados descritos en el presente documento pueden incluirse en una composición para terapia. La composición puede incluir una composición farmacéutica e incluir además un portador farmacéuticamente aceptable. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende los linfocitos T modificados.

En un aspecto, la invención incluye un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en una célula o tejido diana en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un linfocito T modificado. En la presente realización, el linfocito T se modifica como se describe en otra parte del presente documento. Los linfocitos T modificados pueden administrarse para inducir la lisis de la célula o tejido diana, tal como cuando la lisis inducida es una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

En otro aspecto, la invención incluye un método para la terapia de transferencia celular adoptiva que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado descrito en el presente documento a un sujeto que lo necesite para prevenir o tratar una reacción inmunitaria que sea adversa para el sujeto.

Aún en otra realización, un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una inmunidad mejorada en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado descrito en el presente documento a un sujeto que lo necesite.

Los linfocitos T modificados generados como se describe en el presente documento pueden ser uniformes y poseer función de linfocitos T. Además, los linfocitos T modificados se pueden administrar a un animal, preferentemente un mamífero, incluso más preferentemente un ser humano, para suprimir una reacción inmunitaria, tal como las comunes a las enfermedades autoinmunitarias como la diabetes, psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, GVHD, potenciación de la inducción de tolerancia del aloinjerto, rechazo de trasplantes y similares. Además, las células de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de cualquier afección en la que sea deseable una respuesta inmunitaria disminuida o inhibida de otro modo, especialmente una respuesta inmunitaria mediada por células, para tratar o aliviar la enfermedad. En un aspecto, la invención incluye tratar una afección, tal como una enfermedad autoinmunitaria, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el linfocito T modificado descrito en el presente documento.

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA, que es una enfermedad vírica con un componente autoinmunitario), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad de Behcet, miocardiopatía, esprúe celíaco-dermatitis herpetiforme; síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), penfigoide cicatricial, enfermedad de las crioglobulinas, síndrome de crest, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis-juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía de IgA, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artropatía psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (PSS), también conocida como esclerosis sistémica (SS)), síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

Los linfocitos T generados como se describe en el presente documento también se pueden modificar y usar para tratar

trastornos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero sin limitación, trastornos inflamatorios crónicos y agudos. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen enfermedad de Alzheimer, asma, alergia atópica, alergia, aterosclerosis, asma bronquial, eccema, glomerulonefritis, enfermedad de injerto contra hospedador, anemias hemolíticas, artrosis, septicemia, accidente cerebrovascular, trasplante de tejidos y órganos, vasculitis, retinopatía diabética y lesión pulmonar inducida por ventilador.

En otra realización, el linfocito T modificado descrito en el presente documento puede usarse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite.

Las células de la invención se pueden administrar en dosificaciones y vías y en momentos que se determinarán en experimentos y ensayos preclínicos y clínicos apropiados. Las composiciones de células se pueden administrar varias veces en dosis dentro de estos intervalos. La administración de las células de la invención puede combinarse con otros métodos útiles para tratar la enfermedad o afección deseadas según lo determinen los expertos en la técnica.

Las células de la invención a administrar pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas con respecto al sujeto sometido a terapia.

La administración de las células de la invención puede realizarse de cualquier manera conveniente conocida por los expertos en la técnica. Las células de la presente invención pueden administrarse a un sujeto por inhalación mediante aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodular, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.), o por vía intraperitoneal. En otros casos, las células de la invención se inyectan directamente en un sitio de inflamación en el sujeto, un sitio de enfermedad local en el sujeto, un ganglio linfático, un órgano, un tumor y similares.

Las células descritas en el presente documento también se pueden administrar usando cualquier número de matrices. La presente invención utiliza tales matrices dentro del contexto novedoso de actuar como un órgano linfóide artificial para apoyar, mantener o modular el sistema inmunitario, típicamente a través de la modulación de los linfocitos T. Por consiguiente, la presente invención puede utilizar aquellas composiciones y formulaciones de matriz que han demostrado utilidad en la ingeniería de tejidos. Por consiguiente, el tipo de matriz que puede usarse en las composiciones, los dispositivos y métodos de la invención son prácticamente ilimitados y pueden incluir matrices tanto biológicas como sintéticas. En un ejemplo particular, se utilizan las composiciones y dispositivos expuestos en las Pat. de EE. UU. N.º 5.980.889; 5.913.998; 5.902.745; 5.843.069; 5.787.900; o 5.626.561. Las matrices comprenden características comúnmente asociadas con ser biocompatibles cuando se administran a un hospedador mamífero. Las matrices se pueden formar a partir de materiales naturales y/o sintéticos. Las matrices pueden no ser biodegradables en los casos en que sea deseable dejar estructuras permanentes o estructuras removibles en el organismo de un animal, tal como un implante; o ser biodegradables. Las matrices pueden adoptar la forma de esponjas, implantes, tubos, almohadillas telfa, fibras, fibras huecas, componentes liofilizados, geles, polvos, composiciones porosas o nanopartículas. Además, las matrices pueden diseñarse para permitir la liberación sostenida de células sembradas o de citocinas producidas u otro agente activo. En determinadas realizaciones, la matriz de la presente invención es flexible y elástica, y puede describirse como un almacén semisólido que es permeable a sustancias tales como sales inorgánicas, fluidos acuosos y agentes gaseosos disueltos, incluido el oxígeno.

En el presente documento se usa una matriz como ejemplo de una sustancia biocompatible. Sin embargo, la invención actual no se limita a matrices y, por lo tanto, dondequiera que aparezca el término matriz o matrices, se entenderá que estos términos incluyen dispositivos y otras sustancias que permiten la retención celular o el traspaso celular, son biocompatibles y son capaces de permitir el traspaso de macromoléculas directamente a través de la sustancia, de modo que la propia sustancia es una membrana semipermeable, o se usan junto con una sustancia semipermeable particular.

#### Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender el linfocito T modificado como se describe en el presente documento, junto con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferentemente para administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de una manera apropiada para la enfermedad a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de la administración estarán determinadas por factores tales como la afección del paciente y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosis apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad eficaz para la respuesta autoinmunitaria",

"una cantidad eficaz para la inhibición de la respuesta inmunitaria" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar puede determinarse por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, respuesta inmunitaria y afección del paciente (sujeto). En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos T modificados descritos en el presente documento puede administrarse en una dosis de  $10^4$  a  $10^9$  células/kg de peso corporal, preferentemente de  $10^5$  a  $10^6$  células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de linfocitos T también pueden administrarse múltiples veces a estas dosis. Las células se pueden administrar usando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg *et al.*, New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). Un experto en la técnica de la medicina puede determinar fácilmente la dosis y el régimen de tratamiento óptimos para un paciente particular monitorizando al paciente para detectar signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

En determinadas realizaciones, se puede desear administrar linfocitos T activados a un sujeto y a continuación volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar los linfocitos T de la misma de acuerdo con la presente invención, y reinfundir al paciente con estos linfocitos T activados y expandidos. Este proceso se puede realizar varias veces cada pocas semanas. En determinadas realizaciones, los linfocitos T se pueden activar a partir de extracciones de sangre de 10 ml a 400 ml. En determinadas realizaciones, los linfocitos T se activan a partir de extracciones de sangre de 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml o 100 ml. Sin desear quedar ligado a la teoría, el uso de este protocolo de extracción de sangre múltiple/reinfusión múltiple puede descartar determinadas poblaciones de linfocitos T.

En determinadas realizaciones de la presente invención, las células expandidas y modificadas usando los métodos descritos en el presente documento, u otros métodos conocidos en la técnica, donde los linfocitos T se expanden a niveles terapéuticos, se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento con agentes tales como terapia antivírica, cidofovir e interleucina-2, tratamiento con citarabina (también conocido como ARA-C) o natalizumab para pacientes con EM o el tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. En realizaciones adicionales, los linfocitos T de la invención pueden usarse junto con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes immunoablativos tales como CAM PATH, anticuerpos anti CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la cinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina). (Liu *et al.*, Cell 66:807-815, 1991; Henderson *et al.*, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer *et al.*, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En una realización adicional, las composiciones celulares de la presente invención se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) un trasplante de médula ósea, terapia ablativa de linfocitos T usando agentes de quimioterapia, tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de una terapia ablativa de linfocitos B, tal como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos se pueden someter a un tratamiento convencional con altas dosis de quimioterapia seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas realizaciones, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

La dosis de los tratamientos anteriores a administrar a un paciente variará según la naturaleza precisa de la afección que se esté tratando y el receptor del tratamiento. El ajuste de dosis para administración humana se puede realizar según prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, estará generalmente en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, generalmente administrada diariamente durante un período de entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg al día aunque en algunos casos pueden usarse dosis mayores de hasta 40 mg al día (descrito en la Patente de EE. UU. N.º 6.120.766).

Debe entenderse que el método y las composiciones que serían útiles en la presente invención no se limitan a las formulaciones particulares expuestas en los ejemplos. Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo producir y usar las células, los métodos de expansión y cultivo y los métodos terapéuticos de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

La puesta en práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de las competencias del experto. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tales como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", cuarta edición (Sambrook, 2012); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Culture of Animal Cells" (Freshney, 2010); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1997); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 2002); "Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting", (Babar, 2011); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 2002). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos

y polipéptidos de la invención y, como tal, pueden tenerse en cuenta en la fabricación y puesta en práctica de la invención. Las técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares se analizarán en las secciones que aparecen a continuación.

## 5 EJEMPLOS EXPERIMENTALES

La invención se describe adicionalmente en detalle por referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes, salvo que se indique lo contrario.

10 Sin más descripción, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, producir y utilizar los compuestos de la presente invención y poner en práctica los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, por lo tanto, señalan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera el resto de la divulgación.

15 Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen a continuación.

*Linfocitos humanos primarios.* Los linfocitos primarios se estimularon con microperlas recubiertas con anticuerpos estimuladores CD3 y CD28 (Life Technologies, Grand Island, NY, Catálogo) como se describe (Human gene therapy 2011, 22(12):1575-1586). Los linfocitos T se criopreservaron el día 10 en una solución de suero fetal de ternera al 20 90 % y dimetilsulfóxido al 10 % (DMSO) a razón de  $1 \times 10^8$  células/vial.

Se adquirió NALM-6 de la colección de células DSMZ alemana (código de catálogo DSMZ: ACC 128). K562 y PC3 se adquirieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo. La línea de melanoma 624mel se obtuvo de la Surgery Branch (NCI/NIH). Todas las líneas celulares se cultivaron según las instrucciones y se ensayaron de forma rutinaria para 25 determinar la contaminación por micoplasma y se confirmó que eran negativas.

*Generación de construcciones de TCR para electroporación de ARNm y transducción lentivírica.* Se sintetizaron y/o se amplificaron mediante PCR 1G4 NY-ESO-1 TCR con diferentes mutaciones (1G4 y 8F) y CAR (PSCA o CD19), basándose en la información de secuenciación proporcionada por las publicaciones relevantes (The Journal of 30 experimental medicine 2005, 201(8):1243-1255; J Immunol 2008, 180(9):6116-6131), y se subclonaron en un vector basado en ARN de pGEM.64A o vectores lentivíricos pTRPE.

*Preparación de linfocitos T humanos primarios.* Se aislaron linfocitos T CD4 y CD8 humanos primarios de donantes voluntarios sanos después de leucoféresis mediante selección negativa usando kits RosetteSep (Stem Cell 35 Technologies, Vancouver BC, Canadá). Todas las muestras se recogieron según un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada donante.

*Diseño y construcción de CRISPR.* El ADN de Cas9 se sintetizó mediante PCR y a continuación se insertó en el vector PGEM. Los ARNg se seleccionaron por GN19 con un sitio NGG PAM, y algunos se seleccionaron de N20 con un sitio 40 NGG PAM. Todos los ARNg contenían secuencias complementarias compuestas por más de 13 pares erróneos de pares de bases, excluyéndose los posibles sitios de ARNm inespecífico (Tabla 1). Se diseñaron ARNg, como se muestra en la figura 1A, y se sintetizaron mediante PCR superpuesta. Todos los productos de PCR de ARNg se ligaron al vector MSGV. CAS9 transcrito *in vitro* y ARNg dirigido a regiones constantes de las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  de TCR y microglobina beta-2. Los ARNg se diseñaron para dirigirse a una secuencia dentro del exón 1 de la región constante 45 de TCR  $\alpha$ , una secuencia consenso común al exón 1 de las regiones constantes de TCR  $\beta$  1 y 2, microglobulina beta-2 o PD1. Las secuencias que codificaban los ARNg se ensamblaron mediante PCR superpuesta y se clonaron en el vector MSGV que contenía un promotor T7. Estos plásmidos se linealizaron con EcoRI. El ARNg se transcribió *in vitro*. El ARNm de Cas9 se transcribió *in vitro* usando el kit mMACHINE T7 ULTRA (Life Technologies, Carlsbad, CA). El ARNm se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  en viales sin nucleasa para un solo uso. Las secuencias dirigidas a 50 ARNg usadas para el estudio en animales fueron las siguientes:

TRAC-ARNg: TGTGCTAGACATGAGGTCTA, SEQ ID NO:1  
 TRBC-ARNg: GCAGTATCTGGAGTCATTGA, SEQ ID NO:2  
 B2M-ARNg: CGCGAGCACAGCTAAGGCCA, SEQ ID NO:3  
 55 PD1-ARNg: GGCGCCCTGGCCAGTCGTCT, SEQ ID NO:4  
 FAS-ARNg: GAGGGTCCAGATGCCAGCA, SEQ ID NO:5

*Citometría de flujo.* Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales y reactivos con la especificidad indicada y los controles de isotipo apropiados. De BD Biosciences (San Jose, CA): anti CD3 conjugado con APC (555335), FITC- 60 anti CD8(555366), PE-anti CD8(555635), FITC-anti CD27 (555440), PE-anti CD107(555801), PE-anti microglobina beta-2 (551337), FITC-anti HLA(555552); Biolegend (San Diego, CA): FITC-anti CD45RO(304204), APC-anti CD62L(304814), APC-anti CCR7(353214); y Beckman Coulter (Pasadena, CA): PE-anti Vb13.1(IM2021U). Los datos se adquirieron en un FACS Accuri (BD Biosciences, San Jose, CA.) usando CellQuest versión 3.3 (BD Biosciences, San Jose, CA) y se analizaron mediante FCS Express versión 3.00 (De Novo Software, Los Angeles, CA) o FlowJo 65 versión 7.6.1 (Tree Star, Inc. Ashland, OR).

*Propagación de linfocitos T primarios.* Se cultivaron linfocitos T humanos primarios en RPMI 1640 complementado con FCS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de sulfato de estreptomicina, Hepes 10 mM y se estimularon con perlas magnéticas recubiertas con anti CD3/anti CD28 a una relación de 1:3 de células con respecto a perlas. Las células se contaron y se alimentaron cada 2 días y una vez que los linfocitos T parecían estar en reposo, según lo determinado por la reducción en la cinética de crecimiento y el tamaño celular, los linfocitos T se usaron para ensayos funcionales o se criopreservaron.

*Generación de linfocitos T CD3<sup>neg</sup>.* Los plásmidos superenrollados de ADN se linealizaron mediante Spel y EcoRI, respectivamente. El ARNg se transcribió *in vitro* mediante el sistema de producción de ARNm estándar T7 mScript™ (Cambio, C-MSC100625, Cambridge, Inglaterra). Todo el ARNm (Cas9, TCR  $\alpha$ , TCR  $\beta$  y CAR) se transcribió *in vitro* usando el kit mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA (Life Technologies, AM1345, Carlsbad, CA). Los linfocitos T se estimularon por dynabeads CD3/CD28 durante tres días antes de la electroporación. Se retiraron las perlas de diez millones de linfocitos T primarios antes de la electrotransferencia de 20  $\mu$ g de Cas9 y 10  $\mu$ g de especies de ARNg a las células con un parámetro de 360 V, 1 ms mediante BTX830, después de una segunda y/o tercera electrotransferencia de 10  $\mu$ g de ARNg. Además, los linfocitos T se lavaron tres veces con OPTI-MEM y se resuspendieron en OPTI-MEM (Invitrogen) a una concentración final de  $1-3 \times 10^8$  células/ml. Posteriormente, se mezclaron 0,1 ml de las células con 10  $\mu$ g de ARN IVT (o según se indique) y se sometieron a electroporación en una cubeta de 2 mm. Se retiraron las perlas de diez millones de linfocitos T primarios antes de la electrotransferencia de 20  $\mu$ g de Cas9 y 10  $\mu$ g de especies de ARNg a las células usando un BTX830 (Harvard Apparatus BTX) a 360 V y 1 ms; este proceso vino seguido de una segunda y una tercera electrotransferencia de 5  $\mu$ g de ARNg de 12 a 24 horas después.

Después de la electroporación, las células se colocaron inmediatamente en 2 ml de medio de cultivo precalentado y se cultivaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, o 32 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 1 día y a continuación se devolvieron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %.

*Doble alteración de TCR  $\alpha$  y  $\beta$  o triple alteración de TRAC, TRBC y B2M.* Para generar linfocitos T con inactivación doble de TCR  $\alpha$  y  $\beta$ , el ARNm de Cas9 se sometió a coelectroporación con dos ARNg diferentes dirigidos a la cadena  $\alpha$  de TCR (TRAC) y a la cadena  $\beta$  de TCR (TRBC). Los linfocitos T con inactivación doble de TCR  $\alpha$  y  $\beta$  podrían purificarse en 2 etapas: 1) agotamiento de las células positivas para TCR y con inactivación única de cadena  $\alpha$  con microperlas anti CD3 después de la electroporación del ARN de cadena  $\alpha$  de 1G4 TCR, y 2) agotamiento de las células con inactivación única de la cadena  $\beta$  de TCR con microperlas anti CD3 después de la electroporación del ARN de cadena  $\beta$  de TCR. Para la triple alteración de TRAC, TRBC y B2M, los linfocitos T se sometieron a electroporación con ARNm de Cas9 y ARNg dirigidos a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR y microglobulina beta-2 3 días después de la estimulación con perlas anti CD3/CD28. La población de células negativas para HLA-I se enriqueció el día 9 y se sometió a electroporación con ARN de cadena  $\alpha$  de TCR. La población negativa para TCR se enriqueció el día 10. Cinco días después, estas células se sometieron a electroporación con ARN de cadena  $\beta$  de TCR y la población de células negativas para TCR se clasificó al día siguiente para obtener linfocitos T universales. El día 18, el ARN de TCR o CAR se sometió a electroporación en los linfocitos T universales para generar células efectoras universales. La expresión de las moléculas TCR y HLA-I se confirmó en cada etapa.

*Generación de linfocitos T con CAR universales.* Los linfocitos T con CAR universales se generaron combinando la transducción lentivírica de CD19 o PSCA CAR con la electroporación de ARN de CRISPR/ARNg. 1 día después de la estimulación con perlas anti CD3/CD28, los linfocitos T se transdujeron con lentivírico-CD19 o PSCA CAR. 2 días después, Cas9 y los ARNg dirigidos a la cadena  $\alpha$ ,  $\beta$  de TCR, B2M, PD1 se transfirieron a linfocitos T mediante electroporación. 6 días después del suministro de CRISPR, los linfocitos T negativos para CD3, HLA-I, y PD1 se clasificaron mediante agotamiento de microperlas.

*Enriquecimiento de linfocitos T CD3<sup>neg</sup>.* Las células lavadas con tampón Auto MACS se incubaron durante 30 minutos con microperlas CD3 (Miltenyi Biotec, 130-050-101, Auburn, CA) a 4 °C. Después de dos lavados, las células se pasaron a través de una columna LD (MiltenyiBiotec, 130-042-901, Auburn, CA), y la fracción de circulación se recogió para su uso posterior. La expresión de CD3 de los linfocitos T CD3<sup>neg</sup> se restableció mediante coelectroporación de ARNm de  $\alpha$  y  $\beta$  de 1G4TCR, y las células se expandieron usando un único protocolo de expansión rápida (REP), Dynabeads CD3/CD28 o aAPC a base de K562.

*Generación y propagación de linfocitos T CD3<sup>neg</sup>.* En los linfocitos T CD3<sup>neg</sup> se restauró la expresión de CD3 mediante electrotransferencia de ARNm transcrito *in vitro* de la cadena alfa de 1G4TCR exógeno y de la cadena beta de TCR (5  $\mu$ g para cada cadena). Estas células se expandieron usando un único protocolo de expansión rápida (REP). PBMC de tres donantes diferentes: ND052  $105 \times 10^6$ , ND405  $83 \times 10^6$ , ND410  $136 \times 10^6$ , se irradiaron, a continuación se mezclaron, para obtener un total de  $324 \times 10^6$  PBMC. Las PBMC se resuspendieron en un volumen final de 90 ml, a continuación se añadió R10 a 300 ml, se mezclaron y se dividieron en dos matraces T de 150 ml. Se añadió OKT hasta una concentración final de 30 ng/ml. El día 2, se añadió IL-2 a 50 CU/ml. A partir del día 5, las células se contaron y se alimentaron cada 2 días y una vez que los linfocitos T parecían estar en reposo, según lo determinado por la reducción en la cinética de crecimiento y el tamaño celular, se usaron para ensayos funcionales o se criopreservaron.

*Secuenciación de Sanger.* El nivel de alteración genómica de la cadena  $\alpha$  de TCR (TRAC), la cadena  $\beta$  de TCR 1

(TRBC1) y la cadena  $\beta$  de TCR 2 (TRBC2) en linfocitos T se determinó mediante el ensayo de nucleasa Surveyor (Transgenomics, Omaha, NE). El porcentaje de alteración diana se cuantificó mediante densitometría. Los cebadores de PCR usados para la amplificación del locus diana fueron:

5 TRAC directo, 5'-TCATGTCCTAACCTGATCCTCTT-3' SEQ ID NO:6

TRAC inverso, 5'-TTGGACTTTTCCCAGCTGACAGA-3' SEQ ID NO:7

TRBC directo total, 5'-TACCAGGACCAGACAGCTCTTAGA-3' SEQ ID NO:8

10 TRBC inverso total, 5'-TCTCACCTAATCTCCTCCAGGCAT-3' SEQ ID NO:9

Los productos de la PCR se purificaron y se ligaron al vector de clonación TOPO (Invitrogen) y a continuación se transformaron en *E. coli*. Se seleccionó y se secuenció un solo clon para calcular los índices.

15 *Generación de ARNip y CRISPRi para electroporación.* Se diseñaron dúplex de ARN dirigidos a regiones constantes de TCR para alfa (5'-rArGrArGrArGrArUrUrCrGrGrArArCrCrArArUrCrArCrUrGrArC-3' SEQ ID NO:10 y 5'-rCrArGrUrGrArUrUrGrGrUrUrCrGrArArUrCrCrUrCCT-3' SEQ ID NO:11) o beta (5'-rArCrCrUrCrUrUrCrCrArUrUrCrArCrCrArCrCrArGrCrUrC-3' SEQ ID NO:12 y 5'-rGrCrUrGrGrUrGrGrUrGrArArUrGrGrArArGrGrArGGT-3' SEQ ID NO:13) usando una herramienta de diseño de ARNi personalizada (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) y el ARNip se sintetizó (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Se mezcló ARNip para TCR alfa y beta y se sometió a electroporación en linfocitos T estimulados para la atenuación endógena de TCR.

25 *Transcripción in vitro de ARNm y electroporación de linfocitos T.* Se utilizó el kit de sistemas T7 mscript (CellScript) para generar ARN transcrito *in vitro* (IVT). Los linfocitos T estimulados con perlas CD3/CD28 se sometieron a electroporación con ARN IVT usando BTX EM830 (Harvard Apparatus BTX) como se ha descrito previamente (Cancer research 2010, 70(22):9053-9061). Brevemente, los linfocitos T se lavaron tres veces y se resuspendieron en OPTI-MEM (Invitrogen) a una concentración final de  $1-3 \times 10^5$  células/ml. Posteriormente, se mezclaron 0,1 ml de células con 10  $\mu$ g de ARN IVT (o según se indique) y se sometieron a electroporación en una cubeta de 2 mm.

35 *Ensayos ELISA.* Las células diana, diferentes líneas de células tumorales que expresan CD19, se lavaron y se suspendieron a razón de  $1 \times 10^5$  células/ml en medio R10 (RPMI 1640 complementado con suero fetal de ternera al 10 %; Invitrogen). Se añadieron 100  $\mu$ l de cada tipo de célula diana por duplicado a una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Corning). Los linfocitos T efectores se lavaron y se resuspendieron a razón de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio R10 y a continuación se combinaron 100  $\mu$ l de linfocitos T con las células diana en los pocillos indicados. Además, se prepararon pocillos que contenían linfocitos T solos como control. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 a 20 horas. Después de la incubación, el sobrenadante se recogió y se sometió a un ensayo ELISA (eBioscience).

40 *Tinción con CD107a* Las células se colocaron en placas a una relación de células efectoras:linfocitos T de 1:1 ( $1 \times 10^5$  efectoras con respecto a  $1 \times 10^5$  dianas) en 160  $\mu$ l de medio RPMI completo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 20  $\mu$ l de anticuerpo anti CD107a marcado con ficoeritrina (BD Biosciences, 555801) y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora antes de añadir Golgi Stop (2  $\mu$ l de Golgi Stop en 3 ml de medio RPMI, 20  $\mu$ l/pocillo; BD Biosciences, 51-2092KZ) e incubar la placa durante 2,5 horas más. A continuación, se añadieron 5  $\mu$ l de FTTC-anti CD8 y 5  $\mu$ l de APC-anti CD3 y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Después de la incubación, las muestras se lavaron con tampón FACS y se analizaron mediante citometría de flujo.

50 *Ensayo de CTL basado en luciferasa.* Se generaron células tumorales NamI6-CBG y se emplearon en una versión modificada de un ensayo de linfocitos T citotóxicos basado en luciferasa. Brevemente, se clonó luciferasa de escarabajo clic verde (CBG) en el vector pELNS, se empaquetó en lentivirus, se transdujo en células tumorales NamI6 y se clasificó para determinar la expresión de CBG. Las células NamI6-CBG resultantes se lavaron y se resuspendieron a razón de  $1 \times 10^5$  células/ml en medio R10, y se incubaron 100  $\mu$ l de células marcadas con CBG con diferentes relaciones de linfocitos T (por ejemplo, 30:1, 15:1, etc.) durante una noche a 37 °C. Se transfirieron 100  $\mu$ l de la mezcla a una placa luminométrica de color blanco de 96 pocillos. Se añadieron 100  $\mu$ l de sustrato a las células y se determinó inmediatamente la luminiscencia. Los resultados se informan como porcentaje de destrucción en función de la actividad de luciferasa en los pocillos con células tumorales pero sin linfocitos T (% de destrucción =  $100 - ((\text{URL del pocillo con cocultivo de células efectoras y diana})/(\text{URL del pocillo con células diana}) \times 100)$ ).

60 *Estudios de xenoinjerto de ratón.* Los estudios se realizaron como se ha descrito previamente con determinadas modificaciones (Human gene therapy 2011, 22(12):1575-1586; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009, 106(9):3360-3365). Brevemente, a ratones NOD/SCID gamma (NSG) de 6-10 semanas de edad se les inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células tumorales PC3-CBG en el costado derecho el día 0 y a los mismos ratones se le administraron células tumorales SK-OV3-CBG ( $5 \times 10^6$  células/ratón, por vía subcutánea) en el costado izquierdo el día 5. Los ratones se trataron con linfocitos T a través de la vena de la cola el día 23 después de la inoculación del tumor PC3-CBG, de modo que ambos tumores tenían un volumen de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>. Se administraron linfocitos T transducidos por lentivirus a razón de  $1 \times 10^7$  células/ratón

(10 M) o  $3 \times 10^6$  células/ratón (3 M). Brevemente, para el modelo de tumor Nalm6, a ratones NOD/SCID gamma (NSG) de 6 a 10 semanas de edad se les inyectaron  $1 \times 10^6$  células Nalm6 (Nalm6-CBG) transducidas con escarabajo clic verde (CBG) a través de la vena de la cola el día 0. El tratamiento con linfocitos T comenzó el día 7 después de la inoculación del tumor. Para el modelo de tumor sólido PC3-PDL1, a ratones NOD/SCID gamma (NSG) de 6 a 10 semanas de edad se les inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células tumorales PC3 transducidas con PSCA, PD-L1 y CBG (PC3-PSCA-PDL1-CBG) en el costado derecho el día 0. Los ratones se trataron con linfocitos T a través de la vena de la cola el día 22 después de la inoculación del tumor PC3-PDL1-CBG, de modo que los tumores tenían un volumen de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>. Los linfocitos T se administraron a razón de  $2 \times 10^6$  células/ratón (2 M). Los animales se asignaron al azar y se agruparon según el tamaño inicial del tumor. Todos los animales se incluyeron en los experimentos y se realizó una evaluación enmascarada del tumor en todos los experimentos con animales realizados.

*Procedimiento de estimulación, transducción lentivírica y procedimiento de electroporación de CRISPR de linfocitos T.*

La figura 84 muestra el procedimiento usado para estimular, transducir con lentivirus y someter a electroporación de CRISPR los linfocitos T. El día 0, se obtuvieron linfocitos T de 3 donantes ( $100 \times 10^6$  células/donante). Las células se estimularon con perlas anti CD3/anti CD28 en una relación de linfocitos T:perlas de 1:3. La concentración de células se ajustó a  $0,5 \times 10^6$ /ml con 1,00 ml/matraz. El día 1, los linfocitos T estimulados se transdujeron con lentivirus CD19 CAR con una multiplicidad de infección (MOI) de 2. Se reservaron 50 ml ( $25 \times 10^6$  células) de linfocitos T como linfocitos T no modificados (Grupo 9). El día 3, se retiraron las perlas, las células se lavaron 2 veces en medio Opti-MEM y los linfocitos T transducidos de cada donante se separaron en dos grupos, CART/simulado EP (10 ml,  $50 \times 10^6$ /ml) y CART/CRISPR (10 ml,  $50 \times 10^6$ /ml). A continuación, las células se sometieron a electroporación con ARN de CAS9 (1.<sup>a</sup> EP) a 500 V/1 ms con 120 µg de ARN de CAS9/400 µl de linfocitos T. Después de la electroporación, las células de los grupos 1, 3, 5 y 7 se dividieron a continuación cultivando linfocitos T en medio seminuevo y medio semicultivado. El día 4, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en Opti-MEM a razón de  $50 \times 10^6$ /ml. 20 µg de ARNg de TRBC4 y B2M se sometieron a electroporación en 400 µl de linfocitos T. Después de la electroporación, las células se cultivaron a razón de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio semifresco y medio semicultivado. Los días 5 y 7, las células se dividieron y se resuspendieron en medio semifresco y medio semicultivado. El día 8, las células CD3+ se eliminaron de los grupos 2, 4 y 6 mediante una columna de baja densidad. Los linfocitos T CD3 se resuspendieron a razón de  $0,5-1 \times 10^6$  células/ml en medio semifresco y medio semicultivado y se cultivaron para expandir las células. El día 11, los linfocitos T se recogieron y se enviaron  $25 \times 10^5$  células de los tres donantes para realizar un cariotipo. Las células restantes se dividieron en alícuotas y se congelaron.

Los resultados de los experimentos se describen a continuación.

Ejemplo 1: Interrupción del complejo de TCR-CD3 en linfocitos T usando CRISPR.

Se desarrollaron y se ensayaron en células 293T trece ARNg dirigidos a las regiones constantes de la cadena α de TCR, 10 ARNg dirigidos a las regiones constantes de la cadena β de TCR y 10 ARN dirigidos al gen de microglobina beta-2 (figuras 1A-1C y figuras 9A-9D). Los linfocitos T humanos primarios se propagaron *ex vivo* durante tres días con dynabeads anti CD3/anti CD28 durante tres días. Dado que la expresión transitoria de CRISPR es suficiente para mediar en la inactivación génica, se desarrolló una estrategia de suministro de "hit-and-run" para expresar de manera transitoria las CRISPR mediante la utilización de electrotransferencia de ARN transcrito *in vitro* que codificaba CAS9 y ARNg (figura 2C).

Para medir la expresión de TCR, se usó un mAb específico para CD3, que sólo está presente en la superficie celular cuando se expresa el anticuerpo de TCR. Seis días después de la electrotransferencia, el análisis de citometría de flujo reveló que las CRISPR dirigidas a TRBC eliminaron la expresión de CD3 en los linfocitos T primarios a niveles de 13,7 (figura 2D) en el donante ND147. La eficiencia de la inactivación de TCR se correlacionó con la cantidad de ARNm electrotransferido (figura 2D). Aunque la electrotransferencia de ARN en los linfocitos T primarios fue bien tolerada, se observó una ligera reducción en la viabilidad celular que se correlacionaba con cantidades crecientes de ARN introducido. Se ha informado que la alteración génica mediada por ZFN y TALEN es más eficiente cuando las células se exponen de manera transitoria a una hipotermia leve. El mismo fenómeno se observó con este sistema CRISPR.

Los linfocitos T se cultivaron durante 1 día a 32 °C después de la electrotransferencia. La alteración de CD3 mediada por CRISPR fue hasta 2,5 veces mejor cuando los linfocitos T sometidos a electroporación se cultivaron a 32 °C frente a 37 °C. Con este enfoque, el 5,43 % y el 16,7 % de los linfocitos T sometidos a electroporación perdieron la expresión de CD3 usando las CRISPR dirigidas a TRAC y TRBC, respectivamente, (figura 2D, panel inferior). No se observaron cambios en los niveles de células negativas para CD3 en las muestras CAS9 SIMULADO ni una disminución apreciable en la viabilidad (medida con azul de tripán).

Cuando los ARNg se electrotransfirieron por segunda y tercera vez, la eficacia de eliminar la expresión de CD3 en linfocitos T primarios a los niveles mejoró enormemente.

- Direccionamiento a TRAC: A niveles que alcanzan el 77 % después de tres veces la electrotransferencia de ARNg (figura 4A),



- Direccionamiento a TRAC o TRBC a niveles que alcanzan el 64,5 % o el 57,5 %, respectivamente, después de una segunda electrotransferencia de ARNg con una viabilidad ligeramente disminuida (figura 4C).

Para confirmar que los linfocitos T sometidos a electroporación se habían modificado genéticamente en los sitios diana de ARNg previstos (locus  $\alpha$  o  $\beta$  de TCR), se realizó la secuenciación de Sanger usando cebadores oligonucleotídicos específicos que flanqueaban los sitios diana en TRAC, TRBC1 o TRBC2. Múltiples picos en los productos de PCR indicados a partir de los sitios diana estuvieron presentes solo después de la electrotransferencia de CRISPR y el porcentaje de alteración se correlacionó con la pérdida de expresión de CD3 en la superficie celular (figura 1C y 3B). Estos experimentos en linfocitos T primarios confirmaron que las CRISPR diseñadas para dirigirse a TRAC o TRBC condujeron a una alteración permanente de la expresión de  $\alpha\beta$  TCR, según lo evaluado mediante secuenciación de Sanger y confirmado mediante análisis de citometría de flujo de CD3.

Ejemplo 2: Enriquecimiento de linfocitos T negativos para TCR  $\alpha\beta$ .

Para futuras aplicaciones clínicas, se pueden utilizar métodos rápidos y sólidos para aislar fuentes de poblaciones alteradas de TCR. Para comenzar a abordar este asunto, la población TCR/CD3<sup>neg</sup> se enriqueció mediante selección negativa usando perlas paramagnéticas clínicamente aprobadas y una columna de agotamiento. Con una sola etapa de agotamiento, la población CD3<sup>neg</sup> aumentó a más del 99 % (figura 3A). No se pudo enriquecer una población CD3<sup>neg</sup> a partir de células de control no transfectadas. Las etapas de agotamiento consecutivas dieron como resultado un enriquecimiento >99 %, sin sesgar los subconjuntos de linfocitos T CD4 o CDS (figura 3C). Los resultados de la secuenciación también mostraron que se introdujeron deleciones e inserciones en los locus alfa y beta de TCR después de la modificación con CRISPR (figura 3D).

Ejemplo 3: Generación de linfocitos T HLA-CLASE I<sup>neg</sup> por CRISPR.

Para ensayar la capacidad de CRISPR para inactivar la expresión de HLA-CLASE I de linfocitos T alogénicos, se diseñaron ARNg dirigidos a la microglobina beta-2. El locus de la microglobina beta-2 podría manipularse mediante CRISPR en los linfocitos T 293 (figura 9A). La evidencia mostró que la alteración de la microglobina beta-2 abolió la expresión de HLA-CLASE I en la superficie de los linfocitos T (figura 9B).

El IFN-gamma mejoró enormemente, aproximadamente 10 veces, la eficacia de direccionamiento de la microglobina beta-2 en los linfocitos T (figura 9C). Múltiples electrotransferencias de ARNg de microglobina beta-2 dieron una población negativa para microglobina beta-2 del 66 % (figura 11A).

Para futuras aplicaciones clínicas de trasplante de aloinjerto, se necesitarán métodos rápidos y sólidos para aislar fuentes de poblaciones nulas de HLA-CLASE I. Para comenzar a abordar este asunto, las células se marcaron con anticuerpo PE-anti microglobina beta-2 y se enriquecieron en una población HLA-CLASE I<sup>neg</sup> mediante selección negativa usando microperlas anti PE paramagnéticas clínicamente aprobadas y una columna de agotamiento. Con una sola etapa de agotamiento, la población HLA-CLASE I<sup>neg</sup> aumentó a más del 99 %. No se pudo enriquecer una población HLA-CLASE I<sup>neg</sup> a partir de células de control no transfectadas. Un análisis del repertorio de HLA-CLASE I en linfocitos T HLA-CLASE I<sup>neg</sup> enriquecidos mediante citometría de flujo validó la eliminación de la expresión de HLA-CLASE I de la superficie celular (figura 9D).

Ejemplo 4: Los linfocitos T CD3<sup>neg</sup> se pueden propagar mediante diferentes métodos.

Los linfocitos T CD3<sup>neg</sup> restauraron la expresión de CD3 después de la electrotransferencia de ARNm transcrito *in vitro* de la cadena alfa y beta de 1G4-TCR exógeno (5  $\mu$ g cada vez). Estas células se expandieron mediante: (1) un único protocolo de expansión rápida (REP), a continuación se ensayaron para determinar su actividad y especificidad. Las PBMC se obtuvieron de tres donantes diferentes: ND052 105 x 10<sup>6</sup>, ND405 83 x 10<sup>6</sup>, ND410 136 x 10<sup>6</sup>. Después de irradiar las células, se mezclaron a continuación y se obtuvo un total de 324 x 10<sup>6</sup> PBMC. 2 x 10<sup>6</sup> células se electrotransfirieron con ARN. Se resuspendieron linfocitos T CD3<sup>neg</sup> en un volumen final de 90 ml y se añadió medio R10 hasta un volumen total de 300 ml. Las células se dividieron en 2 matraces T de 150 ml. Se añadió OKT a una concentración final de 30 ng/ml. El día 2, se añadió IL-2 a 50 CU/ml. A partir del día 5, las células se contaron y se alimentaron cada 2 días y una vez que los linfocitos T parecían estar en reposo, según lo determinado por la reducción en la cinética de crecimiento y el tamaño celular, se usaron para ensayos funcionales o se criopreservaron.

Después de un único REP, los linfocitos T CD3<sup>neg</sup> se expandieron para un aumento de 500 veces en número. Estas células se expandieron mediante: (2) estimulación con perlas magnéticas recubiertas con anti CD3/anti CD28 a una relación de 1:3 de células con respecto a perlas.

Después de un único REP, los linfocitos T CD3<sup>neg</sup> se expandieron para un aumento de 500 veces en número. Estas células se expandieron mediante: (3) cocultivo con K562-CD19 irradiadas y K562/86/64/A2(2D11) en una mezcla equivalente a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup>/ml.

Después de un único REP, los linfocitos T CD3<sup>neg</sup> se expandieron para un aumento de 500 veces en número. Estas células se expandieron mediante: (4) cocultivo con K562-CD19 irradiadas y K562/86/64/A2(2D11) en una mezcla

equivalente a una concentración de  $1 \times 10^6$ /ml con 30 ng/ml de OKT

Después de un único REP, los linfocitos T CD3<sup>neg</sup> se expandieron para un aumento de 500 veces en número. Estas células se expandieron mediante: (5) cocultivo con K562-CD19 irradiadas y K562/86/64/A2(2D11) en una mezcla equivalente a una concentración de  $1 \times 10^6$ /ml con 1 mg/ml de péptido NY-ESO.

Ejemplo 5: Redirección de linfocitos T TCR<sup>neg</sup> mediante electrotransferencia de TCR.

Para ensayar la función de los linfocitos T TCR<sup>neg</sup>, estas células se redirigieron mediante electrotransferencia de TCR. Al introducir la cadena alfa de TCR y la cadena beta de TCR, estas células expresaron altos niveles de TCR. La expresión de Vb13.1 fue mucho mayor en los linfocitos T TCR<sup>neg</sup> electrotransferidos en comparación con el control CAS9 SIMULADO (figura 7A). Cuando las células se cocultivaron con la línea celular de leucemia Nahn-6 NY-ESO, positiva tanto para HLA-A2 como para NY-ESO, las células mostraron niveles altos de 107a, lo que indica una actividad de desgranulación elevada (figura 7B). El ensayo de destrucción también mostró una potente toxicidad hacia esta línea celular (figura 7C). Esto indicó que estas células son potencialmente más seguras que los ensayos clínicos tradicionales con linfocitos T que expresan CAR y TCR, ya que estas células no desencadenarían GVHD y tendrían menos toxicidad por pares perdidos que los linfocitos T normales con tratamiento con TCR.

Algunos informes han demostrado que los linfocitos T se pueden editar genéticamente mediante ZFN o TALEN para eliminar la expresión del TCR  $\alpha\beta$  endógeno. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento para agotar selectivamente los linfocitos T que expresan TCR  $\alpha\beta$  no deseado también incluyen la inactivación incompleta del TCR endógeno para tratar la GVHD e inhibir que el TCR endógeno afecte negativamente a la función de CAR (por ejemplo, a través de la competencia por factores de transcripción). Por lo tanto, se diseñó un enfoque genético usando ZFN de diseño para alterar permanentemente las secuencias de región constante de  $\alpha$  y  $\beta$  en los linfocitos T, eliminando así la expresión de TCR.

Las ZFN y TALEN son enzimas de restricción artificiales generadas mediante la fusión de un dominio de unión a ADN con un dominio de escisión de ADN. Cuando las ZFN y TALEN no funcionan de manera eficiente, suele ser difícil determinar la causa. El fallo podría reflejar un problema con el diseño, con la accesibilidad de la secuencia diana, o un problema de suministro. Al mismo tiempo, la eficiencia de direccionamiento de ZFN suele ser baja en los linfocitos T, lo que dificulta la manipulación de múltiples genes al mismo tiempo.

A diferencia de ZFN y TALEN, el sistema CRISPR/Cas ha surgido recientemente como una alternativa potencialmente fácil y eficiente a las ZFN y TALEN para inducir alteraciones genéticas específicas. Trabajos recientes han demostrado que el reconocimiento de la diana por parte de la proteína Cas9 requiere una secuencia "semilla" dentro del ARNcr y una secuencia de motivo adyacente de protoespaciador (PAM) que contiene dinucleótidos conservados cadena arriba de la región de unión al ARNcr. De este modo, el sistema CRISPR/CAS puede redirigirse para escindir prácticamente cualquier secuencia de ADN mediante el rediseño del ARNcr. Los datos divulgados en el presente documento muestran el potencial de edición génica mediante CRISPR/CAS en células 293T y linfocitos T primarios. El sistema CRISPR/CAS puede dirigirse simultáneamente a múltiples locus genómicos al coexpresar una única proteína CAS9 con dos o más ARNg, lo que hace que este sistema sea especialmente adecuado para la edición génica múltiple o la activación sinérgica de genes diana. Al administrar diferentes ARNg junto con CAS9, se pueden alterar simultáneamente múltiples genes en los linfocitos T.

Ejemplo 6: Triple inactivación de HLA CLASE I y TCR  $\alpha$ ,  $\beta$  por CRISPR.

Para trabajar en terapias alogénicas de linfocitos T "existentes" para neoplasias malignas y enfermedades infecciosas, se diseñó la terapia celular mediante infusión de linfocitos T para reconstituir la inmunidad contra patógenos y neoplasias malignas. La cantidad de tiempo requerida para fabricar linfocitos T con las propiedades deseadas y en cantidades suficientes *ex vivo* es a menudo incompatible con la ventana de tratamiento para los pacientes. Asimismo, los linfocitos T autólogos de pacientes con enfermedad avanzada pueden tener una función comprometida y ser tolerantes a los antígenos deseados.

Para abordar esto, a los pacientes se les pueden infundir linfocitos T alogénicos para evitar el rechazo mediado por el sistema inmunitario causado por linfocitos T hospedadores que reconocen antígenos de histocompatibilidad mayor o menor dispares en las células infundidas. Para ampliar la aplicación de la terapia con linfocitos T, y para futuros trasplantes de aloinjertos, se pueden generar métodos rápidos y sólidos para aislar fuentes de poblaciones alteradas de TCR y HLA-CLASE I.

ZFN y TALEN comprenden un dominio de unión a ADN con dedos de cinc diseñado para unir una secuencia de ADN específica fusionada al dominio de escisión de la endonucleasa FokI. El diseño y la construcción de ZFN y TALEN son muy complicados y requieren mucho tiempo si hay que manipular más de un gen, porque los genes deben dirigirse individualmente. Con el sistema CRISPR descrito en el presente documento, se puede obtener la eficiencia y acortar el tiempo de la alteración génica.

Para abordar este asunto, se electrotransfirió CAS9 con tres ARNg diferentes dirigidos a TRAC, TRBC y microglobina

beta-2. Las células se marcaron con anticuerpo PE-anti microglobina beta-2 y se enriquecieron en una población HLA-CLASE I<sup>neg</sup> mediante selección negativa usando microperlas anti PE paramagnéticas clínicamente aprobadas y una columna de agotamiento. Con una sola etapa de agotamiento, la población HLA-CLASE I<sup>neg</sup> aumentó a más del 99 % (figura 9D). A continuación, las células se reintrodujeron con la cadena alfa de TCR y la población HLA-CLASE I<sup>neg</sup> CD3<sup>neg</sup> se enriqueció con microperlas (figura 11). Cinco días después, se reintrodujo la cadena beta de TCR en las células y se enriqueció de nuevo con microperlas una población HLA-CLASE I<sup>neg</sup> CD3<sup>neg</sup>. Dos días después, el TCR se electrotransfirió a estas células de triple inactivación. El día después de la electrotransformación, las células se estimularon con dynabeads CD3/CD28. A continuación, las células se sometieron a un suministro lentivírico de TCR específico de antígeno al día siguiente y a una expansión del cultivo.

Ejemplo 7: Inactivación de FAS, PD1, CTLA4, PPP2R2D por CRISPR.

La vía de señalización de apoptosis del receptor FAS/ligando FAS (FAS/FASL) se ha estudiado ampliamente y está bien caracterizada en linfocitos T. PD1 y CTLA4 son dos vías de señalización inhibitoras importantes en los linfocitos T que también se han estudiado ampliamente. La evidencia directa del posible impacto terapéutico de dirigirse a estas vías provino de estudios en modelos preclínicos de tumores murinos que demostraron una inmunidad antitumoral mejorada después del bloqueo mediado por anticuerpos de CTIA-4, PD-1 o PD-L1. Se han desarrollado anticuerpos similares para su uso en seres humanos y los primeros datos clínicos mostraron resultados prometedores. La inactivación de Ppp2r2d también puede inhibir la apoptosis de los linfocitos T y mejorar la proliferación de los linfocitos T, así como la producción de citocinas. Ppp2r2d tiene potencial como diana para mejorar la función de los linfocitos T humanos.

Para abordar este asunto, se electrotransfirieron CAS9 y tres ARNg diferentes dirigidos a FAS, PD1, CTLA4, PPP2r2d a los linfocitos T. Los datos de secuenciación de Sanger mostraron que el locus indicado de FAS, PD1, CTLA4, PPP2r2d se había modificado mediante CRISPR. FAS también se reemplazó por GFP con recombinación homóloga desencadenada por CRISPR. Los datos de FACS mostraron que se abolió la expresión superficial de FAS y PD1.

Ejemplo 8: Generación de células IPS con células primarias modificadas genéticamente y linfocitos T.

El progreso en la terapia adoptiva de linfocitos T para el cáncer y las enfermedades infecciosas se ve obstaculizado por la falta de linfocitos T humanos fácilmente disponibles y específicos de antígeno. Las células madre pluripotentes podrían proporcionar una fuente ilimitada de linfocitos T. Para abordar este asunto, la expresión de FAS, PD1, CTLA4, PPP2r2d se interrumpió en las células primarias y los linfocitos T.

Se usó el virus Sendai para reprogramar células primarias y linfocitos T. Existen múltiples métodos para generar iPSC, incluyendo la transducción génica mediada por virus y la inducción química. Mientras que los vectores lentivíricos y retrovíricos requieren integración en los cromosomas del hospedador para expresar genes de reprogramación, los vectores basados en ADN, tales como adenovirus, virus adenoasociados y vectores plásmidos, existen episomalmente y no requieren integración. Sin embargo, todavía pueden integrarse en los cromosomas del hospedador en determinadas frecuencias, y la eficiencia de la reprogramación es relativamente baja. Asimismo, la reprogramación basada en ARNm es complicada y ha demostrado ser extremadamente ineficiente.

A diferencia de estos métodos, el virus Sendai no se integra en el genoma del hospedador ni altera la información genética de la célula hospedadora. El virus Sendai también tiene un potencial de reprogramación comparable a la transducción génica basada en lentivirus y retrovirus.

Cada pocillo de una placa de 24 pocillos se sembró con 0,1 millones de linfocitos T con inactivación de la cadena alfa de TCR y la cadena beta de TCR FAS<sup>neg</sup>, CD3<sup>neg</sup> de tipo natural. Las células se estimularon con perlas CD3/CD28. El día 3 después de la estimulación, se retiraron las perlas, las células se resuspendieron en 1 ml de medio completo de linfocitos T precalentado y a continuación se incubaron con un volumen calculado de virus Sendai CytoTune que comprendía un vector policistrónico para la expresión de hKlf4, hOct3/4 y hSox2 en las células (Life technologies, Carlsbad, CA). Se sembraron linfocitos T tratados en placas de 24 pocillos y se centrifugaron a 2250 rpm durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 1 ml más de medio de linfocitos T completo a cada pocillo y la placa se incubó durante una noche a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 %.

El día después de la transducción, el virus Sendai se eliminó lavando los linfocitos T con medio completo nuevo y cultivando las células durante 2 días. Los medios se cambiaron a medias cada día. El día 3 después de la infección, las células se transfirieron a placas alimentadoras de MEF y se cultivaron en medio de linfocitos T sin citocinas. Cuatro días después de la infección, las células se cultivaron en medio hES estándar. Los medios se cambiaron todos los días. Se observaron colonias de tipo ES aproximadamente el día 7. Las células se cultivaron en medio hES acondicionado a partir del día 15 y los cultivos continuaron durante 10 días más. Las colonias se recogieron entre 25 y 30 días después de la transducción.

Aproximadamente el día 4, se formaron grupos de células en las células alimentadoras, lo que indica el inicio del proceso de reprogramación. Los linfocitos T pasaron por cambios morfológicos drásticos durante el proceso de reprogramación en iPSC. Aproximadamente el día 12, comenzaron a emerger grandes grupos de células con bordes

mal definidos. Aproximadamente el día 18, los linfocitos T se transformaron en colonias típicas de tipo ES con bordes bien definidos. Se observó una morfología típica de células madre embrionarias, lo que indica que los linfocitos T con inactivación de la cadena alfa de TCR y la cadena beta de TCR FAS<sup>neg</sup>, CD3<sup>neg</sup> se indujeron a un estado pluripotente en condiciones de reprogramación definidas (figuras 17A y 18A).

Los linfocitos T FAS<sup>neg</sup> fueron más fáciles de reprogramar en iPSC, con una eficiencia de aproximadamente 5 veces la de sus homólogos de tipo natural (figura 17B). Asimismo, la reprogramación de linfocitos T CD3<sup>neg</sup> fue aproximadamente 5 veces más eficiente que la de los homólogos de tipo natural (figura 18B). Se ha informado que las líneas celulares con deficiencia de p53 son más fáciles de reprogramar ya que la vía de la apoptosis está obstaculizada. La inactivación de FAS induce aún más la resistencia a la apoptosis. Si bien la pérdida de expresión de TCR hace que los linfocitos T sean menos sanos, esto es una indicación de que la apoptosis desempeña una función importante en el proceso de reprogramación.

Ejemplo 9: Atenuación de TCR en los linfocitos T con ARNip.

La figura 19 es un gráfico que muestra la producción de IFN-gamma de TCR NY-ESO-1 de tipo natural (wt) o TCR NY-ESO-1 modificado con un segundo enlace disulfuro y des-N-glucosilación con respecto a la cadena beta (S/SD). El ARN se sometió a electroporación en linfocitos T con receptores de linfocitos T endógenos (TCR) atenuados con ARNip. IFN-gamma se detectó mediante ELISA después de que los linfocitos T se estimularon con una línea celular positiva para HLA-A2 pulsada con el péptido específico NY-ESO-1, p156-165, durante 18 h.

La figura 20, que comprende las figuras 20A y 20B, muestra la atenuación de TCR alfa mediante coelectroporación de ARN de CAS9 y ARNg. Seis días después de la electroporación, se analizó la expresión de TCR en las células mediante la evaluación de CD3.

La figura 21 muestra la secuenciación de Sanger. Los resultados muestran múltiples picos en linfocitos T enriquecidos con CD3 negativo, con ARNm de CAS9 y ARNg sometidos a electroporación para atenuar TCR alfa (TRAC-5) o TCR beta (TRBC-7).

La figura 22 es un panel de gráficos que muestran linfocitos T negativos para CD3 con CD3 reexpresado por atenuación de TCR beta (TRB-7) endógeno cuatro horas después de la electroporación de ARN de NY-ESO-1 TCR alfa y beta (1G4LY95 TCR). Se usaron linfocitos T normales (perlas ND424) como control, que mostraron casi un 100 % de CD3 positivo con una expresión de TCR vb13.1 endógeno al 5,25 %.

La figura 23, que comprende las figuras 23A-23D, es un panel de gráficos que muestran que la atenuación del TCR endógeno mejoró tanto con la expresión transgénica como con la función de los linfocitos T sometidos a electroporación con ARN de TCR. La figura 23A muestra la expresión de TCR de linfocitos T sometidos a electroporación con ARNip de TCR (histograma de color blanco con línea continua), ARNip de control (histograma de color blanco con línea discontinua) y linfocitos T sin ningún ARNip (histograma con relleno). La figura 23B muestra la expresión del transgén (TCR vb13.1) de linfocitos T sometidos a electroporación con ARN de NY-ESO-1 TCR de tipo natural (wt) o TCR modificado (SD) con ARNip de TCR, ARNip de control o sin ARNip. La figura 23C muestra la tinción del tetrámero NY-ESO-1 de linfocitos T sometidos a electroporación con ARN de NY-ESO-1 TCR de tipo natural (wt) o ARN de TCR (SD) modificado con ARNip de TCR, ARNip de control o sin ARNip. La figura 23D muestra la lisis específica de una línea tumoral positiva para HLA-A2/NY-ESO-1 mediante la atenuación de ARNip de TCR, linfocitos T sometidos a electroporación con ARN de NY-ESO-1 TCR de tipo natural.

La figura 24 es un gráfico que muestra la fluorescencia de células tumorales después de la inyección de linfocitos T en un modelo de ratón. Se inyectaron por vía intravenosa diez millones de células tumorales Nalm6-CBG-ESO-GFP (escarabajo clic verde) que expresaban tanto NY-ESO-1 como GFP en ratones NOD/SCID. Cinco días después de la inoculación del tumor, se inyectaron linfocitos T transducidos con CBR (escarabajo clic verde) y sometidos a electroporación con ARN como se indica en los diferentes grupos y el crecimiento del tumor se controló mediante imagen bioluminiscente (BLI).

La figura 25 muestra imágenes bioluminiscentes de los ratones de dos grupos que habían sido tratados con linfocitos T de ARN de CD19BBZ CAR o ARN de TCR NY-ESO-1 modificado en diferentes puntos temporales.

Ejemplo 10: Linfocitos T con CAR19 universales generados mediante combinación de transducción lentivírica y alteración del complejo de TCR-CD3 en linfocitos T usando CRISPR.

Como se muestra en la figura 26, los linfocitos T primarios se estimularon con perlas anti CD3/anti CD28 el día 0 y a continuación se transdujeron con lenti-CAR19. Más del 70 % de las células fueron positivas para CAR19, según se detectó mediante citometría de flujo. Dado que la expresión transitoria de CRISPR es suficiente para mediar en la inactivación génica, se desarrolló una estrategia de suministro de "hit-and-run" para expresar CRISPR de manera transitoria mediante la utilización de electrotransferencia de ARN transcrito *in vitro* que codifica CAS9 y ARNg dirigidos a las regiones constantes de la cadena  $\alpha$  de TCR, la cadena  $\beta$  de TCR y gen de microglobulina beta-2 el día 3. Los linfocitos T se cultivaron durante 24 horas a 32 °C después de la electrotransferencia, a continuación regresaron a su

condición normal.

Para medir la expresión de TCR, se usó un anticuerpo monoclonal específico para CD3. Se eligió CD3 porque CD3 solo está presente en la superficie celular cuando se expresan los TCR. Construcciones de CRISPR se sometieron a electroporación en linfocitos T primarios (figura 26). Las células únicamente negativas para TCR y doblemente negativas para TCR/HLA-A se expandieron mediante exposición a células K562 presentadoras de CD19, lo que dio como resultado una expansión >100 veces (figura 27).

Después de la expansión, las células permanecieron únicamente negativas para TCR o doblemente negativas para TCR/HLA-A, y la población positiva para CAR19 se enriqueció. La expresión de TCR endógeno permaneció negativa en células únicamente negativas para TCR, mientras que la expresión de TCR y HLA-A permaneció negativa en linfocitos T doblemente negativos para TCR/HLA-A después de la expansión estimulada por K562-CD19 (figura 28A). Las células positivas para CAR19 se enriquecieron mediante expansión estimulada por K562-CD19 (figura 28B).

La mayoría de los linfocitos T universales expandidos fueron positivos para CD45RO (figura 29A) y conservaron niveles altos de expresión de CD62L (figura 29B), niveles medios de expresión de CD28 (figura 29A) y niveles bajos de expresión de CCR7 (figura 29B).

La edición génica CRISPR no afectó a la actividad antitumoral de los linfocitos T con CAR19 universales *in vitro* (figura 30A). El agotamiento de TCR o TCR/HLA-A tuvo un efecto mínimo sobre la expresión de CAR 19 y la actividad antitumoral (figuras 30B y 30C). Los linfocitos T con CAR19 únicamente negativos para TCR y doblemente negativos para TCR/HLA-A mostraron una capacidad lítica fuerte cuando se expusieron a células tumorales Nalm6 (figura 30B). La liberación de CD107a y la secreción de citocinas también mostraron una potente actividad antitumoral en las células universales (figura 30C). Los linfocitos T con CAR19 con ablación única de TCR o ablación doble de TCR y HLA-A exhibieron una cinética de proliferación similar después de la exposición con células que expresan CD19 (figura 30D).

Para ensayar la actividad antitumoral de linfocitos T con CAR19 editados con CRISPR/CAS9, se infundieron linfocitos T con CAR 19 únicamente negativos para TCR y doblemente negativos para TCR y HLA-A en ratones NSG que portaban células tumorales Nalm6. Todos los ratones que recibieron linfocitos T no manipulados y los ratones infundidos con linfocitos T de tipo natural transducidos con GFP lentivíricos murieron en las 3 semanas posteriores a la infusión de células tumorales. Se observó una regresión tumoral objetiva en ratones que recibieron linfocitos T con CAR19 (figura 6). Se encontró que CRISPR/CAS9 no afecta a la actividad de destrucción de tumores *in vivo* de los linfocitos T con CAR19, por lo tanto, confirmando la ventaja de combinar la transferencia génica lentivírica y CRISPR/CAS9 para la terapia con linfocitos T.

La ablación completa de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR y de la molécula HLA-A en linfocitos T anuló por completo la destrucción no específica cuando las células se expusieron a líneas celulares tumorales HLA no coincidentes (figura 32A). La eliminación de las moléculas HLA-A activó los linfocitos NK después de un largo período de cocultivo (5 días). No se observó actividad inespecífica cuando estas células se expusieron a PBMC de sangre completa alogénica después de 24 horas en un ensayo IFN $\gamma$  Elispot. La falta de actividad inespecífica sugiere que los linfocitos T pueden desempeñar una función dominante en las respuestas inmunitarias agudas después de encontrarse con células alogénicas. Todos los resultados sugieren que las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR editadas con CRISPR/CAS9 y los linfocitos T de moléculas HLA-A (triplemente negativos) podrían servir como fuente de células donantes efectoras universales.

Se electrotransfirieron CAS9 y diferentes ARNg dirigidos a FAS a los linfocitos T. Las células FASneg se clasificaron y a continuación se transdujeron con CAR19 lentivírico. Los datos de citometría de flujo y secuenciación de Sanger mostraron que los CRISPR habían modificado FAS (figura 33). La expresión del gen CAR19 de los linfocitos T FAS<sup>neg</sup> fue comparable a la del tipo natural. Incluso después de un breve período de incubación con células tumorales Nalm6, la expresión de CD107a mejoró enormemente en los linfocitos T con CAR19 FASneg en comparación con las células homólogas de tipo natural, incluso en las 4 horas posteriores al cocultivo.

Algunos informes mostraron que incluso estímulos antigénicos débiles pueden desencadenar la activación de FAS para promover la proliferación de linfocitos T (Rethi, *et al.*, Blood, vol. 112(4):1195-1204, 2008). De forma interesante, los linfocitos T con CAR19 FASneg se expandieron mucho más rápido que los linfocitos T con CAR19 de tipo natural cuando las células se estimularon por altos niveles de células CD19<sup>+</sup> K562. Esto sugiere que FAS/FASL desencadenó la apoptosis en lugar de la activación en condiciones antigénicas de alto nivel (figura 34A). Los linfocitos T con CAR19 FASneg mostraron además niveles reducidos de apoptosis según lo medido mediante tinción con Anexina V (figura 34B).

Como se había observado *in vitro*, el linfocito T FASneg mostró una proliferación mejorada en comparación con los linfocitos T de tipo natural. Se observaron resultados de proliferación similares cuando se realizó un ensayo True Count de linfocitos T con CAR19 después de la infusión de las células en ratones portadores de Nalm6. El grupo FASneg CAR19 mostró una actividad antitumoral superior en comparación con el grupo de tipo natural (figura 35B). Esta diferencia se ilustra en el gráfico de la figura 35C que muestra los datos de bioluminiscencia entre esos dos grupos. Estos datos indican que la ablación de FAS en linfocitos T con CAR mejoró su actividad antitumoral.

CAS9 y diferentes ARNg dirigidos a PD1 se electrotransfirieron a linfocitos T después de la transducción lentivírica con PSCA-CAR. Las células inactivadas de PD1 se confirmaron mediante la expresión de PD1 superficial después de la estimulación con perlas CD3/CD28 (figura 36). Las células negativas para PD1 se enriquecieron mediante agotamiento con microperlas y a continuación se estimularon con células tumorales PC3 presentadoras de antígeno PSCA. Las células positivas para PSCA-CAR se enriquecieron tanto en el grupo de tipo natural como en el grupo negativo para PD1. Después de la incubación con células tumorales PC3-PSCA-PDL1, la expresión de PD1 rápidamente se reguló positivamente en la superficie de linfocitos T PSCA-CAR de tipo natural, detectándose niveles muy bajos de expresión de PD1 en linfocitos T con PSCA-CAR negativos para PD1 (figura 37). Los linfocitos T con PSCA-CAR negativos para PD1 también mostraron niveles elevados muy mejorados y sostenidos de expresión de CD137 (figura 37), un marcador de activación de linfocitos T, lo que indica que la vía de señalización inhibitoria de PD1/PDL1 estaba bloqueada.

Cuando se ensayó en un modelo PC3-PSCA-PDL1 NSG *in vivo*, se detectó una actividad antitumoral significativamente mejorada en el grupo de linfocitos T con PSCA-CAR negativos para PD1 en comparación con el grupo de tipo natural (figuras 38A y 38B), lo que sugiere un valor terapéutico de la ablación de PD1 para la terapia con linfocitos T con CAR.

Para ensayar el efecto de la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) de linfocitos T con CAR universales diseñados con CRISPR, se administró una dosis alta de linfocitos T a ratones NSG con leucemia Nalm6. Los ratones se trataron con linfocitos T con CAR con inactivación doble o triple y no mostraron ningún signo de desarrollo de GVHD. Por el contrario, 3 de cada 4 ratones del grupo CD19 CART de tipo natural desarrollaron GVHD para el día 65, lo que se confirmó mediante examen histológico de diferentes órganos (figura 39).

En otro experimento, las células se resuspendieron en PBS y se infundieron por vía intravenosa en ratones después de una irradiación subletal. La GVHD clínica se controló de 2 a 3 veces por semana. Cuatro de cada cinco ratones que recibieron linfocitos T de tipo natural murieron durante el estudio de 60 días, mientras que los grupos tratados con linfocitos T tratados con PBS, con ablación única de TCR y con ablación doble de TCR/HLA-I no mostraron ningún signo de GVHD. Los ratones que recibieron linfocitos T de tipo natural experimentaron una pérdida de peso corporal. Sin embargo, los grupos tratados con linfocitos T tratados con PBS, con ablación única de TCR y con ablación doble de TCR/HLA-I ganaron peso ligeramente durante el estudio (figuras 40A y 40B).

Los linfocitos T se trataron con Cas9 y ARNg dirigidos a CD3, B2M y PD1 o Fas después de la transducción lentivírica de CD19-CAR. Se inyectaron linfocitos T con CAR universales con triple inactivación en ratones con tumores Nalm6-PDL1. Se observó una actividad antitumoral superior en ratones que recibieron células con triple inactivación de PD1/CD3/HLA-I en comparación con células con inactivación doble de CD3/HLA-I, lo que indica además el valor terapéutico de bloquear la vía de señalización de PD1 (figuras 41A y 41B). Estos datos proporcionan una forma de mejorar el tratamiento de linfocitos T con CAR universales con CRISPR/Cas9.

Dado que los ARNg son propensos a degradarse, se desarrolló un método one-shot simplificado para generar linfocitos T con CAR universales. Los ARNg se expresaron constitutivamente junto con los CAR en un único vector lentivírico. Los linfocitos T no tratados se transdujeron mediante lentivirus que codificaban ARNg y CAR un día después de la estimulación con Dynabeads CD3/CD28. Las células se sometieron a electroporación con ARNm de Cas9 el día 3 (figura 42). Este sistema permite la manipulación de varios genes con un solo vector (figura 42). La expresión de CD3 se confirmó mediante citometría de flujo el día 6. Los linfocitos T tratados con el sistema one-shot mostraron una ablación génica consistente de hasta el 90 % en cada uno de los diferentes grupos de ARNm de Cas9 (figura 43).

El progreso en la terapia adoptiva de linfocitos T para el cáncer y las enfermedades infecciosas se ha visto obstaculizado por la falta de linfocitos T humanos específicos de antígeno fácilmente disponibles. Las células madre pluripotentes podrían proporcionar una fuente ilimitada de linfocitos T. Para abordar este asunto, la expresión de FAS, PD1, CTLA4 y PPP2r2d se alteró en las células primarias y los linfocitos T.

Se usó el virus Sendai para reprogramar células primarias y linfocitos T. Existen varios métodos disponibles para la generación de iPSC, incluyendo la transducción génica mediada por virus y la inducción química. Mientras que los vectores lentivíricos y retrovíricos requieren integración en los cromosomas del hospedador para expresar genes de reprogramación, los vectores basados en ADN, tales como adenovirus, virus adenoasociados y vectores plásmidos, existen episomalmente y no requieren integración, sin embargo, todavía pueden integrarse en los cromosomas del hospedador en determinadas frecuencias, y la eficiencia de la reprogramación es relativamente baja. Asimismo, la reprogramación basada en ARNm es complicada y ha demostrado ser extremadamente ineficiente.

En cambio, el virus Sendai no se integra en el genoma del hospedador ni altera la información genética de la célula hospedadora. El virus Sendai también tiene un potencial de reprogramación comparable a la transducción génica basada en lentivirus y retrovirus.

Cada pocillo de una placa de 24 pocillos se sembró con 0,1 millones de linfocitos T con inactivación de la cadena alfa y beta de TCR FASneg, CD3neg de tipo natural. Las células se estimularon con perlas CD3/CD28. El día 3 después de la estimulación, se retiraron las perlas, las células se resuspendieron en 1 ml de medio completo de linfocitos T

precalentado y a continuación se incubaron con un volumen calculado de virus Sendai CytoTune que comprendía un vector policistrónico para la expresión de hKlf4, hOct3/4 y hSox2 en las células (Life technologies, Carlsbad, CA). Se sembraron linfocitos T tratados en placas de 24 pocillos y se centrifugaron a 2250 rpm durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 1 ml más de medio de linfocitos T completo a cada pocillo y la placa se incubó durante una noche a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 %.

El día después de la transducción, el virus Sendai se eliminó lavando los linfocitos T con medio completo nuevo y cultivando las células durante 2 días. Los medios se cambiaron a medias cada día. El día 3 después de la infección, las células se transfirieron a placas alimentadoras de MEF y se cultivaron en medio de linfocitos T sin citocinas. Cuatro días después de la infección, las células se cultivaron en medio hES estándar. Los medios se cambiaron todos los días. Se observaron colonias de tipo ES aproximadamente el día 7. Las células se cultivaron en medio hES acondicionado a partir del día 15 y los cultivos continuaron durante 10 días más. Las colonias se recogieron entre 25 y 30 días después de la transducción.

Aproximadamente el día 4, se formaron grupos de células en las células alimentadoras, lo que indica el inicio del proceso de reprogramación. Los linfocitos T pasaron por cambios morfológicos drásticos durante el proceso de reprogramación a iPSC (figura 44A). Aproximadamente el día 12, comenzaron a emerger grandes grupos de células con bordes mal definidos. Aproximadamente el día 18, los linfocitos T se transformaron en colonias típicas de tipo ES con bordes bien definidos. Los linfocitos T FASneg se reprogramaron en iPSC con una eficiencia de aproximadamente 5 veces la de sus homólogos de tipo natural (figura 44B). Se ha informado que las líneas celulares deficientes en p53 son más fáciles de reprogramar debido al obstáculo de la vía de la apoptosis. La inactivación de FAS puede facilitar el proceso de reprogramación usando un mecanismo similar.

Se observó una morfología de tipo ES de iPSC reprogramadas a partir de linfocitos T con inactivación de la cadena alfa o beta de TCR CD3neg (figura 45A). La morfología permaneció constante después de varios pases. La reprogramación de linfocitos T CD3neg fue aproximadamente 5 veces menos eficiente que la de los homólogos de tipo natural (figura 45B), lo que sugiere que la inactivación de TCR puede desempeñar una función en el proceso de reprogramación de linfocitos T o afectar a la viabilidad celular después de la infección por el virus Sendai. La figura 45C es un panel de imágenes que muestran la tinción con fosfatasa de células CD3<sup>neg</sup> iPSC.

Se observó una morfología típica de células madre embrionarias, lo que indica que los linfocitos T con inactivación de la cadena alfa y beta de TCR FASneg, CD3neg se indujeron a un estado pluripotente en condiciones de reprogramación definidas. Si bien la pérdida de expresión de TCR hace que los linfocitos T sean menos sanos, los datos descritos en el presente documento sugieren que la apoptosis desempeña una función importante en el proceso de reprogramación.

También se detectó la inducción de genes de células madre pluripotentes endógenas en las diferentes líneas celulares T-iPSC (figura 46). Las inmunotinciones para determinar la expresión de Tra-1-60 y SSEA4 indicaron además el fenotipo de células madre de las células T-iPSC (figura 47A). La inactivación de Fas se confirmó en las T-iPSC mediante secuenciación de Sanger (figura 47B).

Se informó que dCas9 y FokI-Cas9 tenían menos actividad inespecífica. Se evaluó si los linfocitos T podían editarse mediante una versión modificada del sistema CRISPR/dCAS9 y (CRISPR/FokI-CAS9 (figura 48A). Los datos de citometría de flujo mostraron que los linfocitos T primarios se editaron tanto por CRISPR/dCAS9 como por CRISPR/FokI-CAS9 (figura 48B). El sistema de inactivación génica CRISPR/dCAS9 mostró una especificidad mejorada con al menos un par de ARNg, lo que hace que el evento de inactivación sea más preciso y específico.

Para ensayar los eventos inespecíficos de CRISPR/CAS9 en linfocitos T, se realizó un ensayo de Surveyor en sitios inespecíficos. Para los genes ensayados, no se observó ninguna escisión obvia en los locus genómicos (figura 48C).

Ejemplo 11: Edición genoma múltiple.

Se generaron linfocitos T con CAR usando un sistema CRISPR/Cas9 para alterar simultáneamente múltiples locus genómicos. Los linfocitos T con CAR eran deficientes en la expresión de moléculas endógenas de TCR y HLA de clase I (HLA-I) para su uso como linfocitos T con CAR universales alogénicos. Los genes de la cadena  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR), la cadena  $\beta$  de TCR y la microglobulina beta-2 (B2M) se alteraron con alta eficiencia mediante la coelectroporación del ARNm que codifica Cas9 con ARNg dirigidos a estos genes. Se generaron linfocitos T TCR o con CAR universales combinando el suministro lentivírico (LV) de electroporación de ARN de CAR y CRISPR para alterar los genes endógenos TCR y B2M simultáneamente. Además, la alteración de la PD1 endógena mejoró la eficacia de la terapia con CAR en un modelo de tumor sólido.

**Los suministros múltiples de ARNg alteran genes en linfocitos T humanos primarios con alta eficiencia sin afectar a la función efectora**

Se requiere una edición genómica múltiple eficiente para generar linfocitos T universales que sean deficientes en TCR, HLA y otros genes. La electroporación de ARN de CRISPR/ARNg se optimizó para lograr una alteración génica

eficiente en los linfocitos T. En primer lugar, Cas9 y ARNg se sometieron a coelectroporación con ARN generado usando un sistema de transcripción *in vitro* (figura 49, izquierda), y se desarrolló una estrategia de suministro de "*hit-and-run*" para suministrar transitoriamente el ARNm de Cas9 y los ARNg a los linfocitos T mediante electroporación (figura 49, derecha).

5 Un experimento inicial dirigido a la región constante  $\alpha$  (TRAC) o región constante  $\beta$  (TRBC) de TCR con electroporación única dio como resultado linfocitos T negativos para CD3 (CD3<sup>neg</sup>) del 1 % a 3 %, respectivamente, (figura 50A, gráficos superiores). Para determinar si la exposición transitoria a una hipotermia leve permitía una alteración génica más eficiente, las células se editaron a 37 °C o 32 °C. La alteración de TRAC y TRB mediada por CRISPR aumentó hasta 4 veces cuando los linfocitos T se cultivaron durante 24 h a 32 °C después de la coelectroporación de Cas9/ARNg (figura 50A, gráficos inferiores). La relación molecular óptima de Cas9:ARNg para una máxima eficiencia de alteración fue de 1:1 a 2:1, y la eficiencia de alteración génica se correlacionó con la cantidad de ARNm electrotransferido (figura 51A).

15 En comparación con el ARNm, los ARNg son más propensos a una degradación rápida, lo que potencialmente limita la eficacia del direccionamiento. Por lo tanto, se ensayaron múltiples electroporaciones secuenciales de ARNg después de la electroporación inicial de Cas9/ARNg. Hubo un marcado aumento en la frecuencia de alteración a nivel de proteína, ya que el 82,4 % de las células eran CD3<sup>neg</sup> después de la tercera electroporación de ARNg (figura 50B). La secuenciación clonal mostró que la eficiencia de direccionamiento genómico alcanzó el 89,4 % después de la tercera electroporación de ARNg (figura 51B). Un ensayo de Surveyor confirmó una tasa de escisión del 81,7 % y el 49,3 % en los locus genómicos de TRAC y TRBC, respectivamente, después de una tercera electroporación de ARNg (figura 52). Múltiples picos en los datos de secuenciación de Sanger que flanquean los sitios diana de TRAC y TRBC confirmaron que el marco de lectura genómica se desplazó cadena abajo de los sitios diana (figura 53A). La aparición de inserciones o deleciones (indeles) causadas por la NHEJ mediada por CRISPR/Cas9 se confirmó mediante secuenciación clonal (figura 53B). La población TCR/CD3<sup>neg</sup> alterada con TCR se enriqueció hasta más del 99 % (99,70  $\pm$  0,20 %) mediante una única etapa de selección negativa para CD3 (figura 54).

30 Para desarrollar métodos para expandir los linfocitos T TCR/CD3<sup>neg</sup>, linfocitos T TCR/CD3<sup>neg</sup> se sometieron a coelectroporación con los ARN de 1G4 NY-ESO-1 TCR ( $\alpha\beta$ ) restringidos por HLA-A2 para restaurar la expresión de CD3 (figura 55, panel izquierdo). Siguiendo los métodos de estimulación/expansión de linfocitos T, se compararon los siguientes: 1) un protocolo de expansión rápida (REP) de linfocitos T usando PBMC como células alimentadoras, 2) Dynabeads (Perlas) anti CD3/CD28, o 3) células presentadoras de antígeno artificial a base de K562 cargadas con OKT3 que expresan ligandos para CD28 y 4-1BB (K562 aAPC). Los linfocitos T TCR/CD3<sup>neg</sup> también se sometieron a electroporación con ARN de CD19 CAR (figura 55, panel derecho) y a continuación se estimularon mediante irradiación de aAPC K562 que expresaba CD19 (K562-CD19). Se lograron valores del factor de expansión de 751,0  $\pm$  217,1, 35,7  $\pm$  9,3, 46,3  $\pm$  8,5 y 57,5  $\pm$  5,0 para el REP, Perlas, K562 aAPC y K562-CD19, respectivamente, después de una única estimulación durante 10 días (figura 56).

40 Para ensayar si la edición génica CRISPR/Cas9 afectaría al fenotipo y la función de los linfocitos T, se examinó el fenotipo de los linfocitos T TCR/CD3<sup>neg</sup> expandidos mediante los diferentes métodos y se mostró que todas las células expandidas permanecían negativas para CD3 y la mayoría conservó un nivel alto de CD27 (del 79,8 % al 93,4 %), consistente con un fenotipo de célula de memoria central (figura 57). Los linfocitos T TCR/CD3<sup>neg</sup> expandidos se sometieron a electroporación por segunda vez con ARNm de CD19 CAR para ensayar sus actividades antitumorales. La expresión de CAR superficial de los linfocitos T TCR/CD3<sup>neg</sup> fue equivalente a la del grupo de control (figura 58). Cuando los linfocitos T con CD19 CAR TCR/CD3<sup>neg</sup> se estimularon con células de leucemia CD19<sup>+</sup> Nalm6, la regulación positiva de CD107a (figura 59A), la secreción de citocinas (figura 59C) y la actividad de destrucción (figura 59B) de los linfocitos T con CD19 CAR<sup>+</sup> TCR/CD3<sup>neg</sup> fueron equivalentes a las de las células de control de tipo natural. Los linfocitos T con CD19 CAR TCR/CD3<sup>neg</sup> se infundieron en ratones NSG portadores de Nalm6 para ensayar su actividad antitumoral *in vivo*. La regresión tumoral fue evidente con una eficacia equivalente a la de las células homólogas de tipo natural CART19 (figuras 59D y 59E). Los resultados indican que la edición CRISPR/Cas9 del TCR endógeno no afectó negativamente a la función de los linfocitos T primarios para la inmunoterapia adoptiva.

#### **Alorreactividad reducida de los linfocitos T con alteración triple de TCR $\alpha$ , $\beta$ y B2M.**

55 Se requiere alterar las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR para prevenir la toxicidad asociada al emparejamiento erróneo de TCR para la inmunoterapia adoptiva de linfocitos T redirigidos por TCR y B2M es esencial para el ensamblaje y la expresión del complejo HLA-I. En vista de esto, se desarrolló la triple alteración de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR y B2M para generar linfocitos T universales. En primer lugar, se ensayó la capacidad de eliminar la expresión de HLA-I en los linfocitos T alterando B2M. Los linfocitos T se sometieron a electroporación con ARN de Cas9/ARNg dirigido a B2M. Esto dio como resultado una población doblemente negativa para B2M y HLA-I del 79,9 %. La población HLA-I<sup>neg</sup> podría enriquecerse aún más mediante selección negativa (figura 60).

65 Para generar linfocitos T con inactivación triple que carecen de las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  de TCR y B2M, se sometió a coelectroporación ARNm de Cas9 con tres ARNg diferentes dirigidos a TRAC, TRBC y B2M. Como resultado, la población de células doblemente negativas para CD3 y HLA-I fue del 65,4 % (figura 61). Después del enriquecimiento de las células con inactivación doble y triple, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR y los linfocitos T con inactivación triple de B2M



anularon la destrucción no específica de líneas celulares tumorales HLA no coincidentes (figura 62). No se observó respuesta cuando estas células se expusieron a PBMC alogénicas irradiadas con sangre completa en un ensayo IFN $\gamma$  Elispot (figura 63, panel izquierdo). La ablación de moléculas HLA-I también redujo drásticamente la alorreactividad, según lo confirmado por cocultivo de PBMC alogénicas con células irradiadas con alteración de B2M (figura 63, panel derecho). Los resultados anteriores sugieren que los linfocitos T triplemente negativos que carecen de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR y de B2M podrían servir como fuente de linfocitos T universales para la inmunoterapia adoptiva, resistiendo el rechazo por parte del sistema inmunitario del hospedador pero sin poder causar la enfermedad de injerto contra hospedador.

#### 10 **Actividad antitumoral mejorada de los linfocitos T redirigidos con TCR y alterados por TCR endógeno.**

Los linfocitos T con alteración CRISPR/Cas9 de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR mostraron una expresión elevada de TCR transgénico en la superficie celular después de redirigirse con TCR NY-ESO-1 (1G4). La expresión de TCR transgénico fue del 67,6 %, 78,8 % o 94,3 % para la inactivación única de la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  de TCR o la inactivación doble  $\alpha/\beta$ , respectivamente, en comparación con el 46,8 % para los linfocitos T de tipo natural. La expresión mejorada de TCR transgénico condujo a una función mejorada de los linfocitos T, como lo demuestra el aumento de la expresión de CD107a específica del antígeno (figura 65A) y la citotoxicidad mejorada (figura 65B), especialmente para los linfocitos T con inactivación doble de  $\alpha/\beta$ .

En un experimento distinto, se transfectaron linfocitos T con inactivación doble de  $\alpha/\beta$  con un TCR NY-ESO-1 diferente (8F). En relación con TCR 1G4, este 8F TCR exhibió mejoras significativas mayores tanto en la expresión como en la función (expresión de CD107a en la figura 67A y producción de citocinas en la figura 67B) de TCR transgénicos (figura 66; 60,1 % para TCR/CD3<sup>neg</sup> frente al 44,7 % (con ~5 % de fondo de TCR V $\beta$ 8 endógeno) para linfocitos T de tipo natural (linfocitos T Cas9 Simulado)). Estos resultados resaltan la influencia diferencial del TCR endógeno en la expresión y función del TCR transgénico.

#### **Los linfocitos T con CAR universales conservan su eficacia antitumoral y no causan GVHD.**

Se generaron linfocitos T con CD19 CAR universales combinando la transducción LV de CD19 CAR con electroporación de ARN de Cas9/ARNg (figura 68). Las células se expandieron y las células CD3<sup>neg</sup> restantes tenían altos niveles de expresión de CD19 CAR (figura 69). La mayoría de los linfocitos T expandidos fueron positivas para CD45RO y conservaron un nivel alto de expresión de CD62L y un nivel medio de expresión de CD28, consistente con un estado de células de memoria central (figura 70). La CD19 CART doblemente negativa para TCR/HLA-I expandida mostró fuertes actividades antitumorales *in vitro*, tal como la liberación de CD107a (figura 71), la secreción de citocinas (figura 72), la capacidad lítica (figura 73) y la proliferación (figura 74), que eran tan potentes como las de las células CD19 CART de tipo natural.

Los linfocitos T se infundieron en ratones NSG que padecían leucemia Nalm6 diseminada. Los ratones tratados con linfocitos T con CAR con un TCR endógeno alterado (LV-CD19 CAR TCR<sup>neg</sup>) o con una alteración simultánea de TCR y HLA-I (LV-CD19 CAR TCR/HLA-I<sup>neg</sup>) exhibieron una regresión tumoral similar a la de los ratones tratados con linfocitos T con CD19 CAR de tipo natural (LV-CD19 CAR) (figuras 75A y 75B), lo que sugiere que la alteración de TCR solo o junto con B2M no afectó a la actividad antitumoral de los linfocitos T con CAR.

Para ensayar el efecto en la GVHD de los linfocitos T modificados genéticamente, se administró una dosis alta de linfocitos T (20 x 10<sup>6</sup>/ratón) a ratones NSG con leucemia Nalm6. Como se muestra en la figura 76, los ratones tratados con linfocitos T con CD19 CAR con alteración de TCR solo (LV-CD 19 CAR TCR/CD3<sup>neg</sup>) o la alteración simultánea de TCR y B2M (LV-CD 19 CAR TCR/HLA-ID<sup>neg</sup>) exhibieron una regresión tumoral similar en comparación con la de los linfocitos T con CD19 CAR de tipo natural (LV-CD 19 CAR). Los ratones tratados con linfocitos T con CAR con inactivación doble o triple no desarrollaron ningún signo de GVHD. Por el contrario, 3 de cada 4 ratones del grupo CD19 CART de tipo natural (LV-CD19 CAR) desarrollaron GVHD el día 65, lo que se confirmó mediante examen histológico de diferentes órganos. Por lo tanto, la alteración del TCR solo o junto con HLA-I no afectó a la actividad antitumoral *in vivo* de los linfocitos T con CAR y eliminó la alorreactividad.

#### **Suministro de CRISPR adenovírico en linfocitos T primarios.**

El sistema CRISPR/Cas9 se está aprovechando rápidamente para fines de regulación y edición génica en organismos modelo y líneas celulares. Los vectores víricos pueden ser particularmente adecuados para ampliar la aplicabilidad de CRISPR a otros tipos de células, incluyendo las células primarias en división y latentes. Se usaron adenovirus, es decir, adenovirus modificados con fibra de segunda generación que codifican Cas9 y moléculas de ARN guía (ARNg) único, para llevar la nucleasa Cas9 a los locus PD1, Fas y TRAC (figura 77). La transducción de CRISPR mediada por adenovirus en células tumorales (figura 78) produjo altas tasas de mutagénesis dirigida de hasta aproximadamente el 71 % (figuras 79A y 79B). El adenovirus parece constituir una plataforma valiosa para introducir CRISPR en linfocitos T humanos independientemente de su estado latente. Este enfoque ayudará a investigar el potencial de la regulación y edición génica CRISPR en numerosos entornos experimentales.

#### **Optimización de la electroporación.**

Se evaluó la eficiencia de inactivación de CD3 y B2M y la expansión de linfocitos T después de electroporación (EP) de Cas9 y ARNg en cubetas de 4 mm y cubetas de 2 mm. Las condiciones de EP estándar con una cubeta de 2 mm (360 v/1 ms, 1.<sup>a</sup> EP - 20 µg de ARN de Cas9 + 10 µg de ARNg/100 µl de linfocitos T, 2.<sup>a</sup> EP - 5 µg de ARNg/linfocitos T 100 µl) mostraron los porcentajes más altos de inactivación de CD3 y B2M, 81,8 % y 88,6 %, respectivamente, con una expansión de linfocitos T de aproximadamente 2,7 veces (EP n.º 1), en comparación con un factor de expansión de aproximadamente 18,8 veces de los linfocitos T EP de control (EP n.º 12). La disminución de la dosis de ARNg (EP n.º 2-5) aumentó drásticamente la expansión de los linfocitos T, pero solo afectó ligeramente a la eficiencia de inactivación de CD3 y B2M. Véase la figura 80. Las condiciones de EP estándar con una cubeta de 4 mm dieron como resultado una eficiencia de inactivación de CD3 y B2M drásticamente reducida (EP n.º 8), lo que sugiere que las condiciones de EP (voltaje o longitud del pulso) deben optimizarse aún más para su uso con cubetas de 4 mm.

En comparación con las condiciones de electroporación (EP) estándar en una cubeta de 2 mm (EP n.º 10-13) o una cubeta de 4 mm. Se observó una alta eficiencia de inactivación de CD3/B2M con un factor de expansión de linfocitos T mejorado (EP n.º 1 y 5). Véase la figura 81.

Para optimizar aún más las condiciones de EP para lograr el máximo factor de expansión de linfocitos T con una eficiencia de inactivación de CD3/B2M superior al 60 %, se ensayaron diferentes condiciones de EP y cantidades de ARN. Los resultados mostraron que el factor de expansión mejoró con una eficiencia de inactivación de CD3/B2M relativamente alta (63,5 % para CD3 y 84,8 % para B2M) para la EP n.º 4 (400 v/2 ms/120 µg de ARN de CAS9) para la EP n.º 1 y (500 v/1 ms/20 µg de ARNg) para la EP n.º 2. Véase la figura 82.

Se realizaron experimentos adicionales para optimizar las condiciones de EP. Los resultados mostraron que, en comparación con la condición más favorable ensayada (EP n.º 1 en la figura 82), el uso de 500 v/1 ms/120 µg de ARN de CAS9 (EP n.º 1) y 500 v/1 ms/20 µg de ARNg (EP n.º 2) produjo una mayor eficiencia de inactivación de CD3/B2M y expansión de linfocitos T (EP n.º 3). Véase la figura 83.

#### Electroporación y expansión a gran escala.

Se realizaron experimentos para determinar si las electroporaciones a gran escala podían producir altas eficiencias de inactivación y expansión. El día 0, se usaron perlas anti CD3/anti CD28 para estimular los linfocitos T obtenidos de 3 donantes (100 x 10<sup>6</sup> células/donante, concentrados a 0,5 x 10<sup>6</sup>/ml). El día 1, los linfocitos T estimulados se transdujeron con lentivirus CD19 CAR. Se reservaron 50 ml (25 x 10<sup>6</sup> células) de linfocitos T como linfocitos T no modificados (Grupo 9). El día 3, se retiraron las perlas y los linfocitos T transducidos de cada donante se separaron en dos grupos, CART/simulado EP (10 ml, 5 x 10<sup>6</sup>) y CART/CRISPR (10 ml, 50 x 10<sup>6</sup>). A continuación, las células se sometieron a electroporación con ARN de CAS9 (1.<sup>a</sup> EP) y se dividieron las células de los Grupos 1, 3, 5 y 7. El día 4, el ARNg se sometió a electroporación en los linfocitos T y las células se cultivaron a razón de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml. Los días 5 y 7, las células se dividieron. El día 8, se eliminaron las células CD3+ de los Grupos 2, 4 y 6. El día 11, los linfocitos T se recogieron y se enviaron 25 x 10<sup>5</sup> células de los tres donantes para realizar un cariotipo.

Tabla 1: Grupos experimentales.

N.º de grupo	Donante	Linfocitos T
1	ND391	CART/SIMULADO EP
2	ND391	CART/CRISPR
3	ND463	CART/SIMULADO EP
4	ND463	CART/CRISPR
5	ND463	NOMOD
6	ND469	CART/SIMULADO EP
7	ND469	CART/CRISPR

Se evaluó el número de linfocitos T (gráfico superior de la figura 85) y el factor de expansión (gráfico inferior de la figura 85) después del procedimiento de electroporación y cultivo. En el gráfico de la izquierda de la figura 86 se muestra el factor de expansión de los linfocitos T transducidos con CD19 CAR solo (TD solo) o transducidos con CD19 CAR y editados con CRISPR (TD/KO) y en el gráfico de la derecha de la figura 86 se muestra el factor de expansión de los linfocitos T el día 10. Al optimizar las condiciones de electroporación y las dosis de CAS9/ARNg, se observó aprox. el 60-70 % de eficiencia de atenuación de CD3/B2M y una expansión de linfocitos T de aprox. 30 veces después de 10 días (la figura 87 muestra la expresión de CD3B2M/CAR el día 10).

Ocho días después de la estimulación con perlas CD3/CD28 y la electroporación con ARN de CRISPR, se eliminaron los linfocitos T positivos para CD3. La figura 88 muestra la expresión de CD3/B2M en las tres poblaciones de donantes

el día 8. El día 11, los linfocitos T se sometieron a tinción FACS para detectar la expresión de CD3, B2M y CAR. Se usaron ND463 no transducidos (NOTD) como control negativo. La figura 89 muestra la expresión de CD3 y B2M en linfocitos T con CD19 CAR TD (transducidos)/sometidos a electroporación de CRISPR, agotados en CD3; linfocitos T con CD19 CAR TD/sometidos a electroporación de CRISPR; y linfocitos T con CD19 CAR TD. La figura 90 muestra la expresión de CAR en linfocitos T con CD19 CAR TD/sometidos a electroporación de CRISPR, agotados en CD3; linfocitos T con CD19 CAR TD/sometidos a electroporación de CRISPR; y linfocitos T con CD19 CAR TD. La figura 91 muestra la expresión de CD3B2M/CAR el día 11 en linfocitos T con CD19 CAR TD (transducidos)/sometidos a electroporación de CRISPR, agotados en CD3; linfocitos T con CD19 CAR TD/sometidos a electroporación de CRISPR; y linfocitos T con CD19 CAR TD. La figura 92 resume la expresión de CD3B2M/CAR en los diferentes grupos de linfocitos T.

El día 11, los diferentes grupos de linfocitos T, como se indica en la figura 93, se estimularon por líneas celulares positivas para CD19, Raji o Nalm6. Se usó K562 como control negativo de CD19. Después de 4 h de cocultivo, se detectó una regulación positiva de CD107a en cada uno de los grupos de linfocitos T, excepto en los controles negativos.

El día 11, se ensayó la capacidad de destrucción de los linfocitos T, como se indica en la figura 94, usando un ensayo de linfocitos citotóxicos luminiscentes (CTL) después de cocultivar los linfocitos T con células diana positivas para CD19, Nalm6-CBG. Además, el día 11, se analizó la producción de citocinas de los linfocitos T estimulando los grupos de linfocitos T con células diana Nalm6, véase la figura 95.

Los linfocitos T se cultivaron en medio que contenía 100 U/ml de IL-2 durante hasta 26 días. Los resultados mostrados en la figura 96 indican que no se observó un crecimiento anómalo de linfocitos T para los linfocitos T editados con CRISPR de los tres donantes.

Como una de las aplicaciones más atractivas del sistema CRISPR/Cas9, la edición genómica múltiple es muy prometedora para avanzar en la inmunoterapia adoptiva basada en linfocitos T. Sin embargo, la baja eficacia de direccionamiento de la transfección de ADN limita el uso de la ingeniería genómica múltiple en los linfocitos T primarios. Se desarrolló una estrategia de suministro de "hit-and-run" para introducir CRISPR en los linfocitos T mediante la coelectroporación de ARNm de Cas9 y ARNg. Mediante una combinación de hasta tres rondas de electroporación de ARNg con exposición transitoria a hipotermia leve, se logró de forma rutinaria una eficiencia de direccionamiento de >80 % a nivel de proteína para la alteración de un solo gen. De manera más alentadora, la triple alteración génica de TRAC, TRBC y B2M produjo CD3 y HLA-I doblemente negativos en aproximadamente un 65 % sin ninguna purificación ni selección. Los resultados también demuestran que el enriquecimiento a >99 % de pureza de los linfocitos T con genes alterados se logró fácilmente usando perlas paramagnéticas clínicamente aprobadas y que los linfocitos T purificados se expandieron hasta 500 veces en 10 días. Los linfocitos T expandidos mantuvieron su fenotipo de alteración génica y mostraron características consistentes con los linfocitos T de memoria central. Los linfocitos T alterados no causaron GVHD, lo que sugiere que pueden usarse como linfocitos T con CAR alogénicos. Es importante destacar que los linfocitos T editados genéticamente mostraron actividades antitumorales tanto *in vitro* como en diferentes modelos de ratones con tumores que eran tan potentes o más potentes que los linfocitos T no editados genéticamente. Por lo tanto, el proceso descrito en el presente documento para generar células sintéticas podría traducirse fácilmente a los procedimientos de fabricación actuales conformes a las GMP.

Los datos descritos en el presente documento demuestran que CRISPR/Cas9 es una potente herramienta de edición genómica múltiple en linfocitos T humanos primarios. Informes anteriores han demostrado que los linfocitos T pueden ser editados genéticamente mediante ZFN o TALEN para eliminar la expresión de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR endógeno para evitar la GVHD. Debido a la complejidad de las estrategias de direccionamiento para la manipulación de múltiples genes mediante las nucleasas con dedos de cinc (ZFN) y la nucleasa efectora TALEN en linfocitos T, estudios anteriores no han podido prevenir la GVHD y la reacción hospedador contra injerto simultáneamente en modelos animales preclínicos. La activación de los linfocitos NK también puede interrumpirse mediante la ablación de ligandos NK estimuladores mediante CRISPR/Cas9 o mediante la expresión de moléculas HLA de clase I no clásicas, tales como HLA-E, que potencialmente podrían proteger a los linfocitos T universales del rechazo mediado por linfocitos NK.

En resumen, los linfocitos T con CAR universales a escala clínica, con potente actividad antitumoral y una alorreactividad reducida, se pueden generar eficientemente usando tecnología CRISPR múltiple. Este enfoque se puede incorporar a los procedimientos de fabricación actuales acordes a las GMP y tiene un alto potencial de traducción, dada la traducción exitosa de la terapia de transferencia adoptiva con ZFN para el VIH/SIDA. Es posible que los linfocitos T con CAR y TCR universales proporcionen una alternativa a los linfocitos T autólogos. De hecho, es concebible que los linfocitos T con CAR y TCR universales con moléculas de puntos de control desactivadas puedan ser más eficaces y tener un uso más amplio que la terapia CART actual que usa linfocitos T autólogos contra cánceres y enfermedades infecciosas.

#### Otras realizaciones

La mención de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en el presente documento incluye

definiciones de esa variable como cualquier elemento individual o combinación (o subcombinación) de elementos enumerados. La mención de una realización en el presente documento incluye esa realización como cualquier realización individual o junto con cualquier otra realización o parte de la misma.

## REIVINDICACIONES

1. Un linfocito T con CAR modificado que comprende:

(a) un ácido nucleico capaz de disminuir o eliminar la expresión de un gen FAS endógeno; y

(b) un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula coestimuladora;

en donde la expresión del gen FAS endógeno disminuye o se elimina en el linfocito T con CAR modificado.

2. El linfocito T con CAR modificado de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión génica se selecciona del grupo que consiste en un ARN no codificante, antagomiR, ARNip, ARNhc y un sistema CRISPR, en donde el sistema CRISPR comprende preferentemente un vector pAd5/F35-CRISPR.

3. El linfocito T con CAR modificado de la reivindicación 1, en donde el dominio de unión a antígeno del CAR comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo sintético, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo de dominio único, fragmento variable monocatenario y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

4. El linfocito T con CAR modificado de la reivindicación 1, en donde el dominio de unión a antígeno del CAR se une específicamente a un antígeno en una célula diana.

5. El linfocito T con CAR modificado de la reivindicación 1, en donde el dominio intracelular del CAR comprende dominios de señalización duales.

6. El linfocito T con CAR modificado de la reivindicación 1, que comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una molécula coestimuladora, en donde dicha molécula coestimuladora se selecciona preferentemente del grupo que consiste en CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 y PD1L, preferentemente, en donde además dicha molécula coestimuladora CD3 comprende al menos dos cadenas CD3 diferentes, preferentemente cadenas CD3 zeta y CD3 épsilon.

7. Un método para generar un linfocito T con CAR modificado que comprende:

introducir en un linfocito T

(a) un ácido nucleico capaz de disminuir o eliminar la expresión de un gen FAS endógeno; y

(b) un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula coestimuladora; en donde la expresión del gen FAS endógeno disminuye o se elimina en el linfocito T con CAR modificado.

8. El método de la reivindicación 7, en donde el ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión génica se selecciona del grupo que consiste en un ARN no codificante, antagomiR, ARNip, ARNhc y un sistema CRISPR, en donde el sistema CRISPR comprende preferentemente un vector pAd5/F35-CRISPR.

9. El método de la reivindicación 7, en donde el dominio de unión a antígeno del CAR comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo sintético, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo de dominio único, fragmento variable monocatenario y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

10. El método de la reivindicación 7, en donde el dominio de unión a antígeno del CAR se une específicamente a un antígeno en una célula diana.

11. El método de la reivindicación 7, en donde el dominio intracelular del CAR comprende dominios de señalización duales.

12. El método de la reivindicación 7, en donde el linfocito T se obtiene del grupo que consiste en células mononucleares de sangre periférica, células sanguíneas de cordón umbilical, una población purificada de linfocitos T y una línea de linfocitos T.

13. El método de la reivindicación 7, en donde el método comprende además

(a) expandir el linfocito T, que comprende preferentemente cultivar el linfocito T con un factor seleccionado del grupo que consiste en flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit;

(b) criopreservar el linfocito T, que comprende preferentemente además descongelar dicho linfocito T criopreservado antes de introducir el ácido nucleico en dicho linfocito T;

(c) someter a electroporación un ARN que codifica una molécula coestimuladora en el linfocito T, en donde la

molécula coestimuladora se selecciona preferentemente del grupo que consiste en CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 y PD1L; o

(d) expresar Klf4, Oct3/4 y Sox2 en los linfocitos T para inducir la pluripotencia del linfocito T.

- 5 14. El método de la reivindicación 7, en donde la introducción del ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en transducir los linfocitos T expandidos, transfectar los linfocitos T expandidos y someter a electroporación los linfocitos T expandidos.
- 10 15. Una composición farmacéutica que comprende el linfocito T con CAR modificado de la reivindicación 1 para su uso como medicamento.
16. Una composición farmacéutica que comprende el linfocito T con CAR modificado de la reivindicación 1 para su uso en un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una inmunidad mejorada en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de dicha composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite.
- 15 17. Una composición farmacéutica que comprende el linfocito T con CAR modificado de la reivindicación 1 para su uso en un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéutica, en donde dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona preferentemente del grupo que consiste en síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad de Behcet, miocardiopatía, esprúe celíaco-dermatitis herpetiforme, síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), penfigoide cicatricial, enfermedad de las crioglobulinas, síndrome de crest, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degas, dermatomiositis-juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía de IgA, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artropatía psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (PSS), también conocida como esclerosis sistémica (SS)), síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo, granulomatosis de Wegener y cualquier combinación de las mismas.
- 20 18. Una composición farmacéutica que comprende el linfocito T con CAR modificado de la reivindicación 1 para su uso en un método para tratar un cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéutica, en donde el cáncer se selecciona preferentemente del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello del útero, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y cualquier combinación de los mismos.
- 25 19. Una composición farmacéutica que comprende el linfocito T con CAR modificado de la reivindicación 1 para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en una célula o tejido diana en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto una cantidad eficaz de dicha composición farmacéutica, en donde dicho método comprende preferentemente inducir la lisis de la célula o tejido diana, en donde dicha lisis inducida es preferentemente citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).
- 30 20. Una composición farmacéutica que comprende el linfocito T con CAR modificado de la reivindicación 1 para su uso en un método para terapia de transferencia celular adoptiva, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de dicha composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite para prevenir o tratar una reacción inmunitaria que sea adversa para el sujeto.
- 35 21. Una composición que comprende el linfocito T con CAR modificado generado de acuerdo con el método de la reivindicación 7.
- 40 22. Una composición farmacéutica que comprende el linfocito T con CAR modificado generado de acuerdo con el método de la reivindicación 7 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 50 55 60

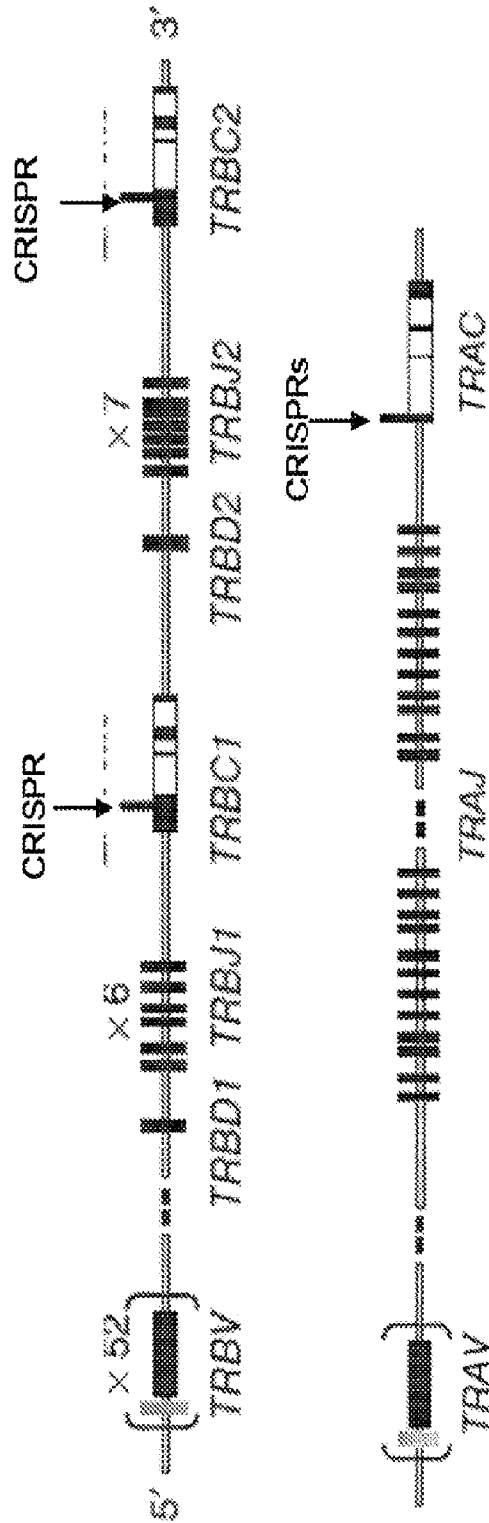


Figura 1A

Promotor T7 + ARN diana + armazón de ARN guía

TTAATACGACTCACTATAGCGCACCAAGCTGCCCTTACC

GTTTGTAGAGCTAGAAATACCAAGCTTAAATAAGGCTAGT

CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGGCTT

TTTTT

Figura 1B

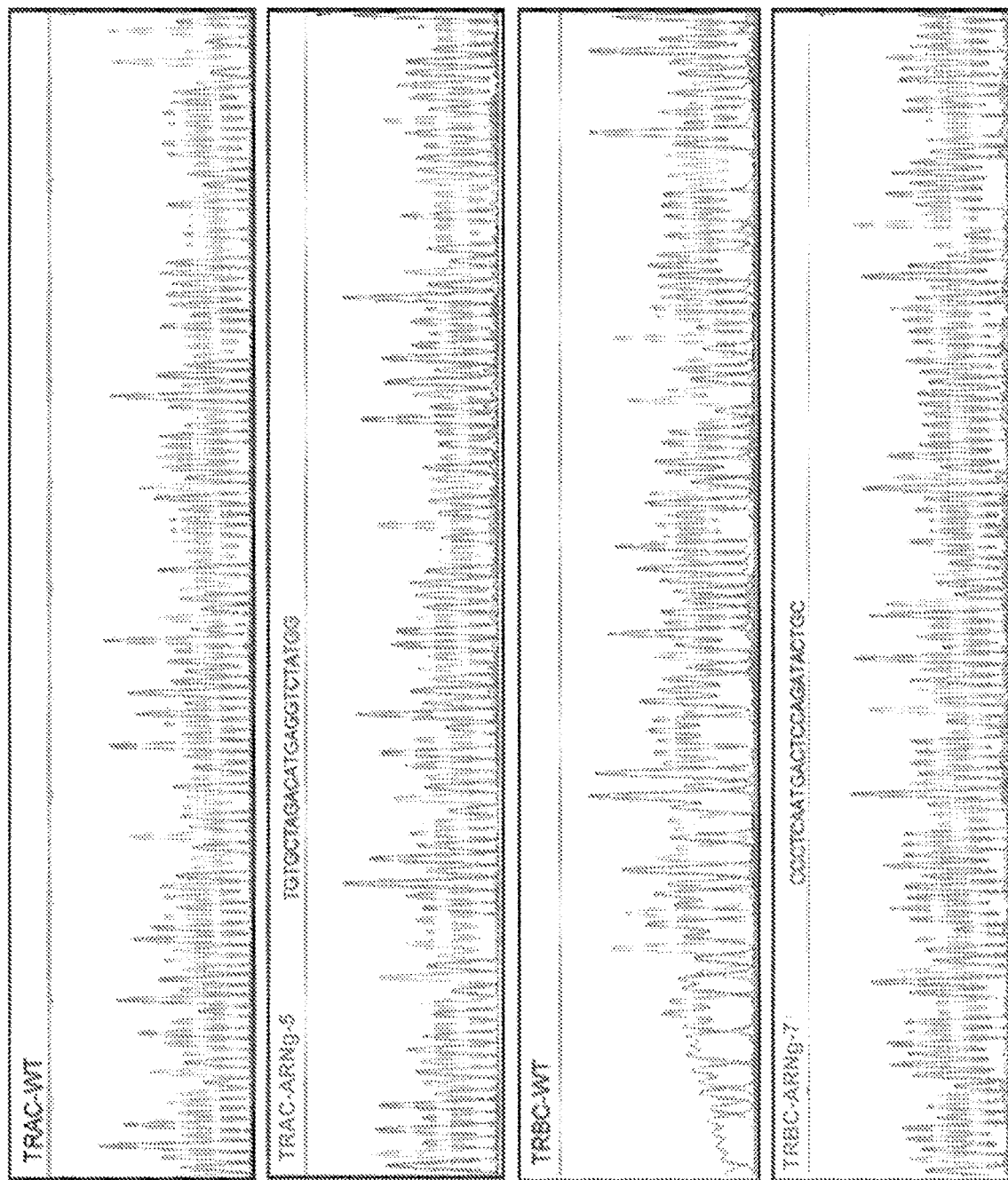


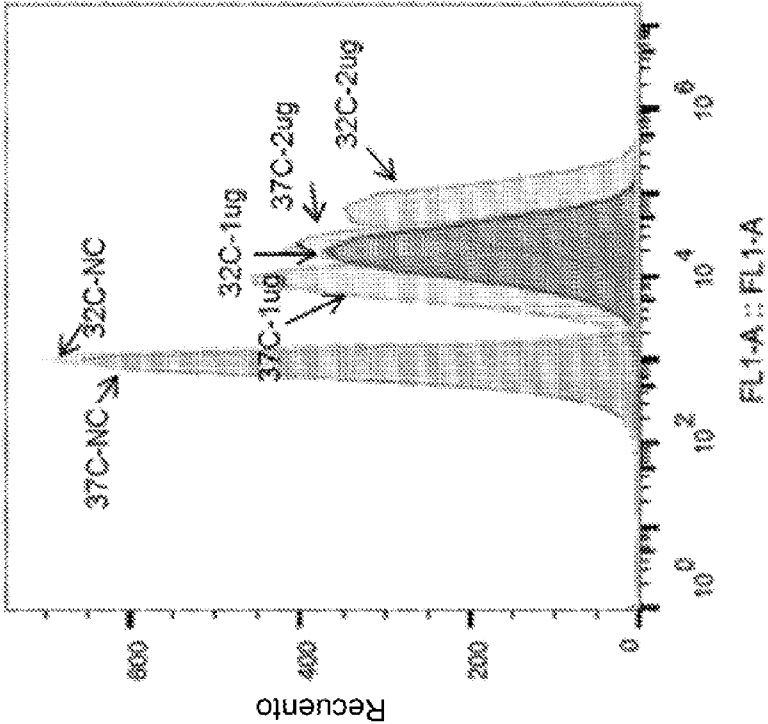
Figure 1C



	% de GFP	IFM	% de viabilidad	um3
200V/20ms	61,4	151806	31	300
200V/10ms	87,7	165419	37	280
300V/10ms	95,4	168023	23	250
360V/5ms	65,5	76453	40	320
360V/1ms	98,3	100755	82	600
400V/0,7ms	97,5	81368	87	610
500V/0,7ms	97,8	89314	80	600

Figura 2A

Nombre de la muestra	Nombre del subconjunto	Recuento
E07 32C-NC day2 fcs	Linfocitos	10349
E08 32C-1 ug day2 fcs	Linfocitos	10487
E09 32C-2 ug day2 fcs	Linfocitos	10527
D07 37C-NC day2 fcs	Linfocitos	10608
D08 37C-1 ug day2 fcs	Linfocitos	10414
D09 37C-2 ug day2 fcs	Linfocitos	10509



Nombre de la muestra	Nombre del subconjunto	Recuento
E01 32C-NC day1 fcs	Linfocitos	10216
E02 32C-1 ug day1 fcs	Linfocitos	10196
E03 32C-2 ug day1 fcs	Linfocitos	10182
D01 37C-NC day1 fcs	Linfocitos	10439
D02 37C-1 ug day1 fcs	Linfocitos	10331
D03 37C-2 ug day1 fcs	Linfocitos	10336

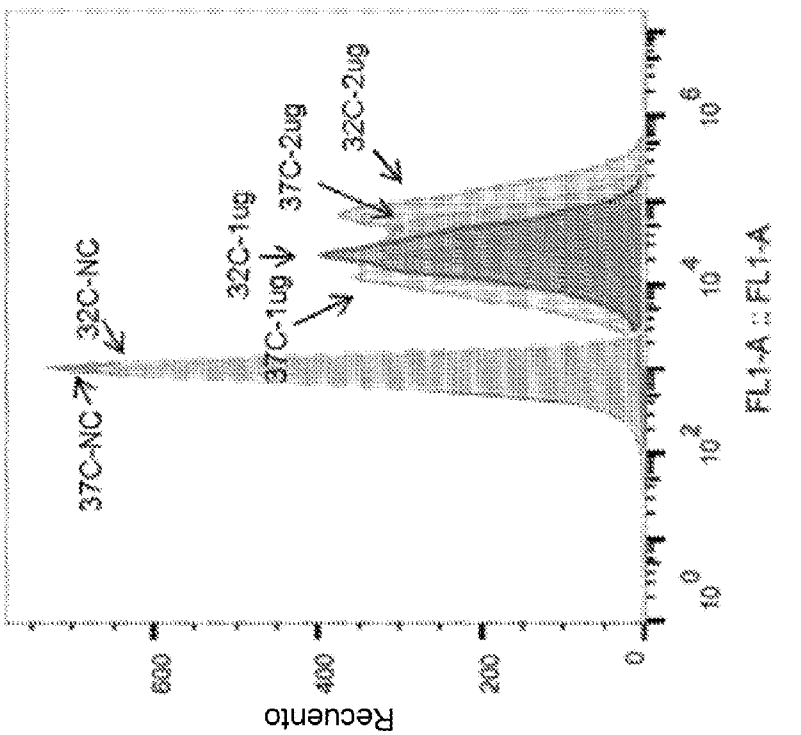


Figura 2B

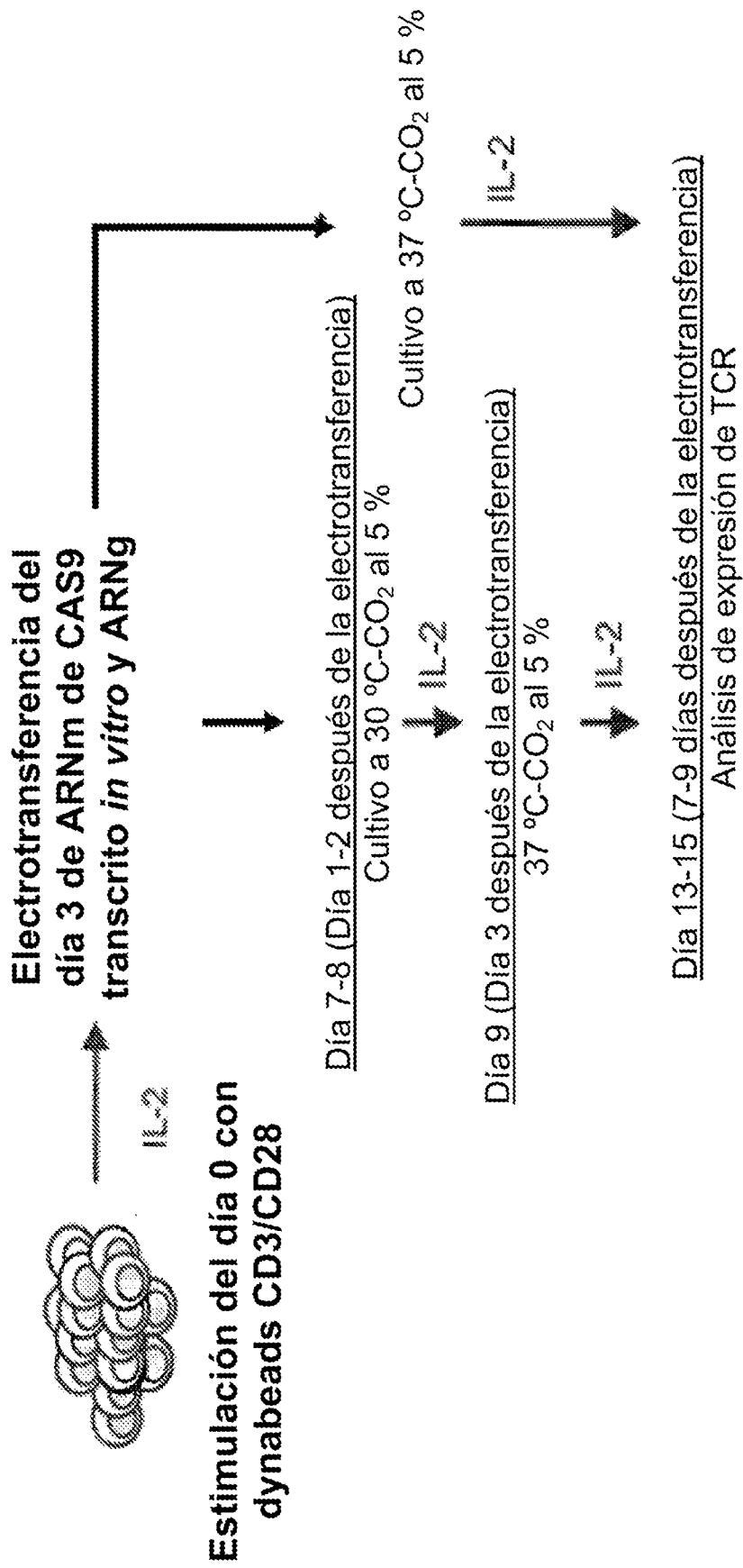


Figura 2C

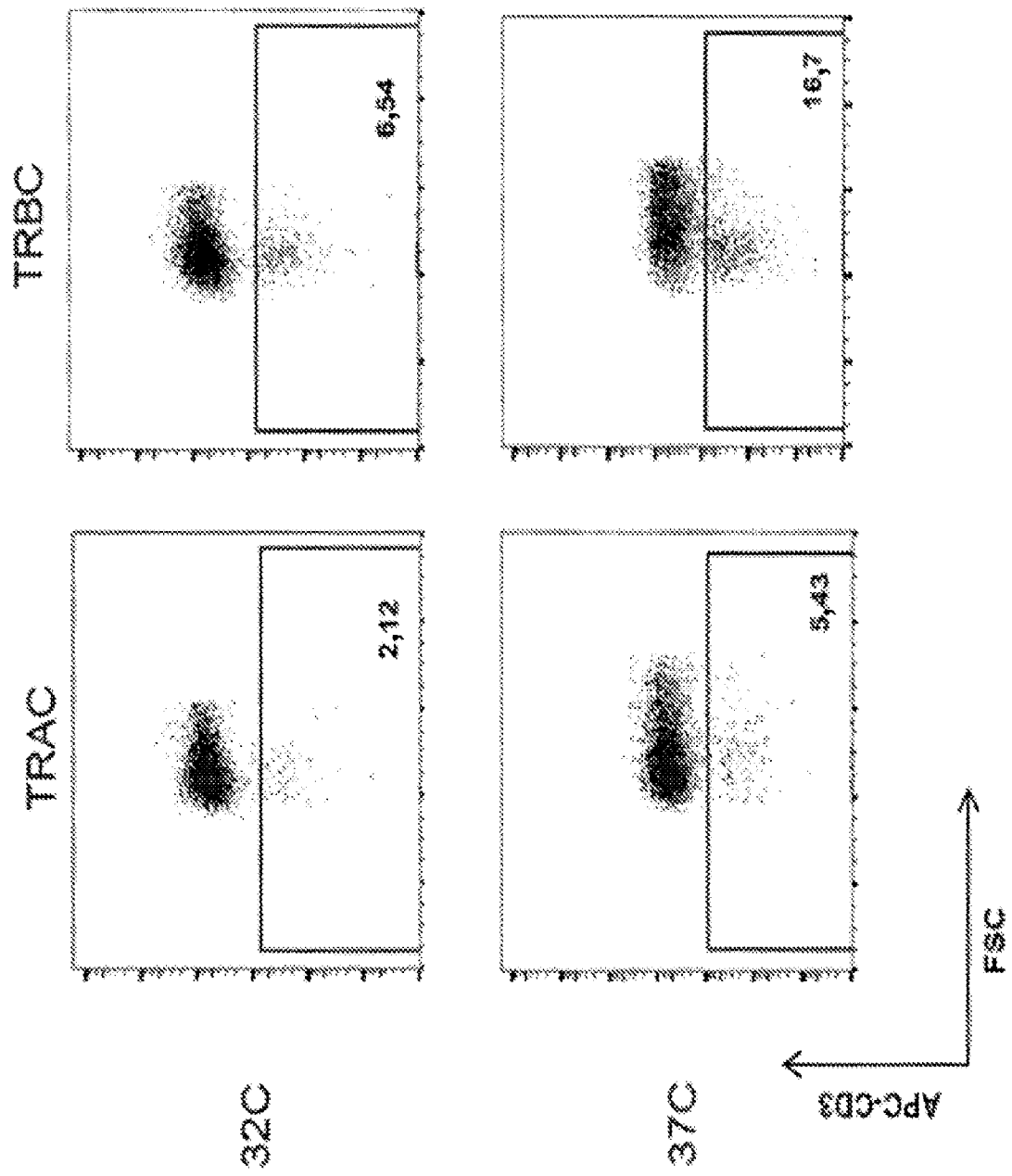


Figura 2D

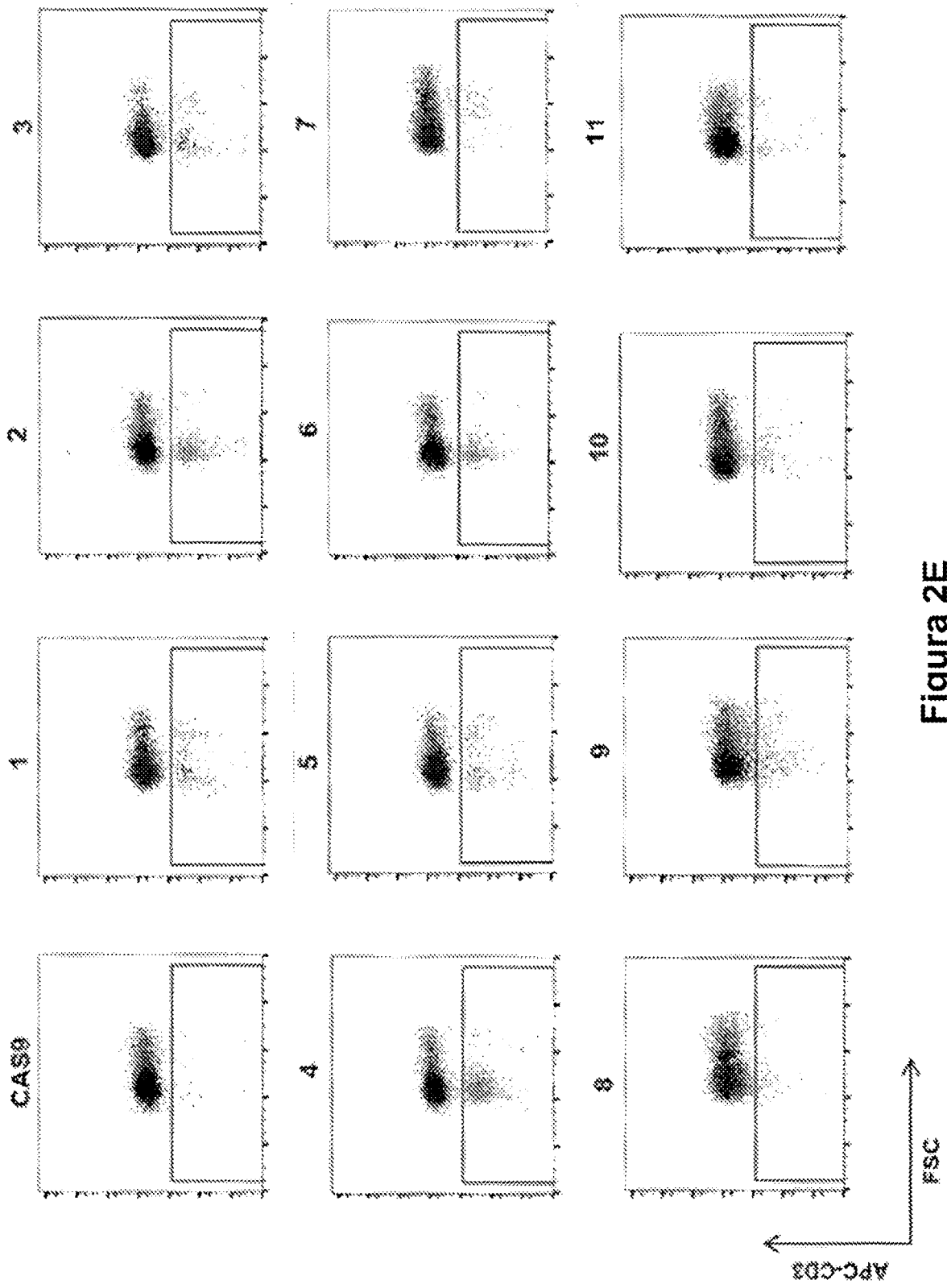


Figure 2E

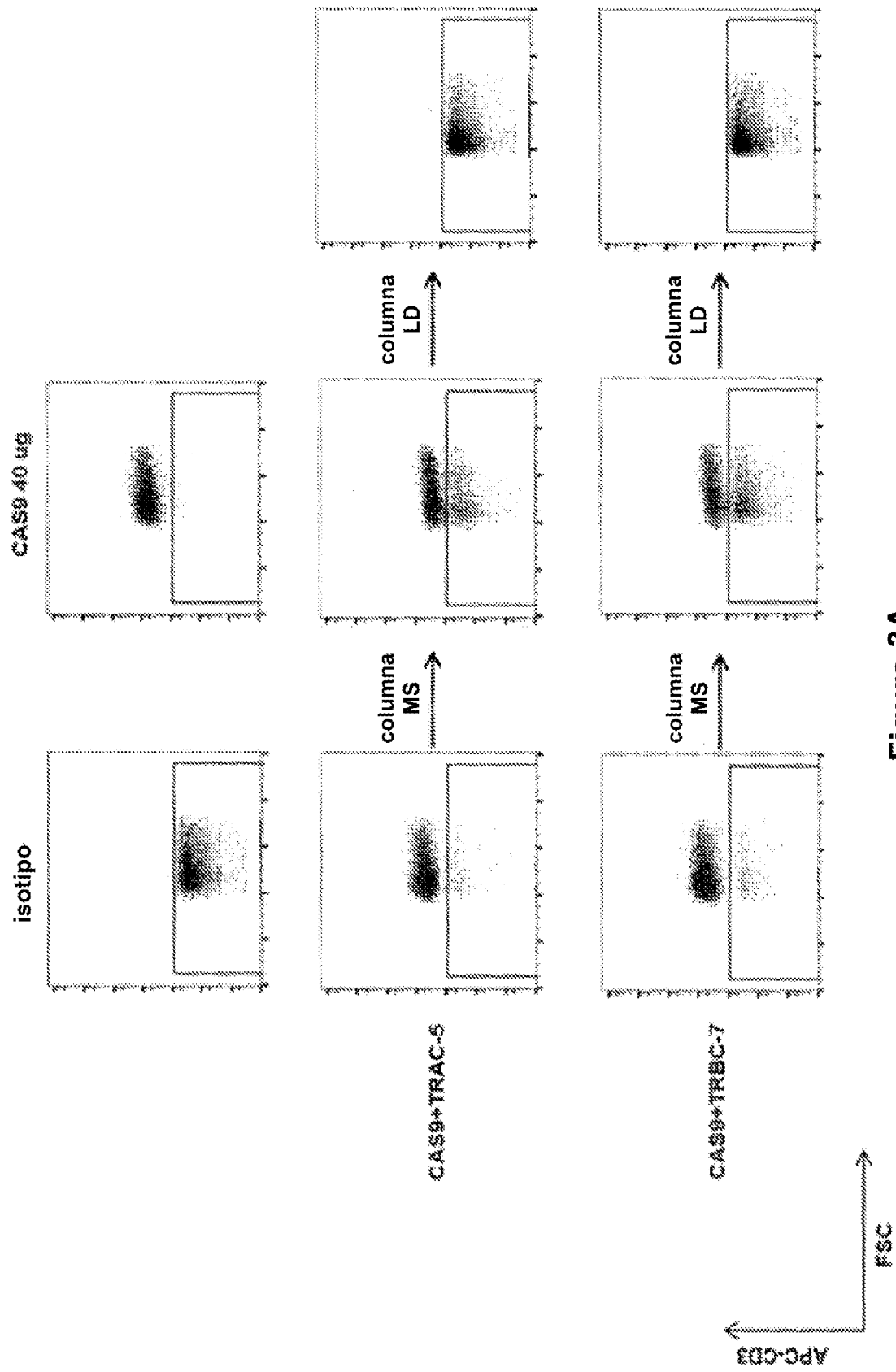


Figura 3A

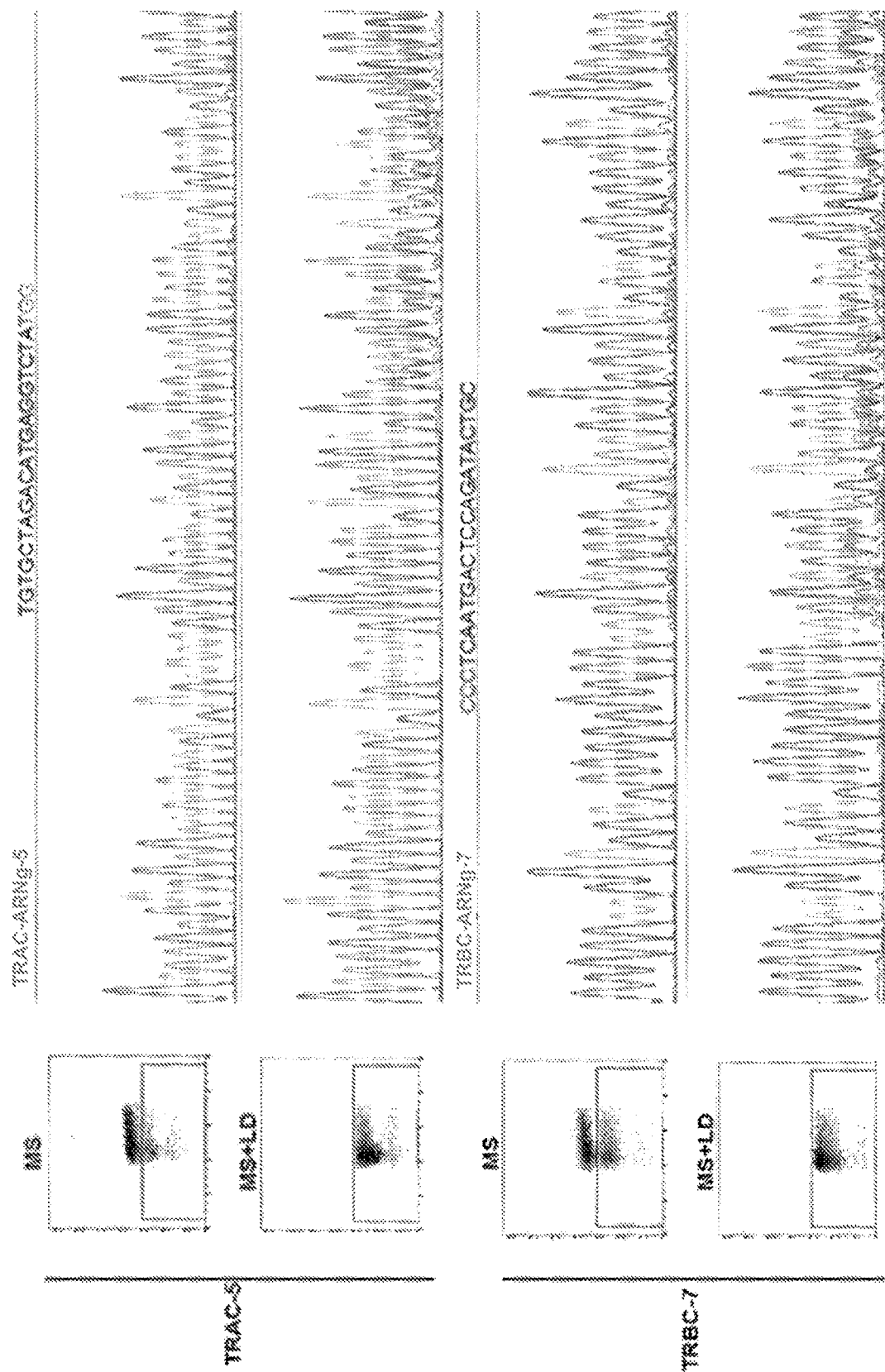


Figura 3B

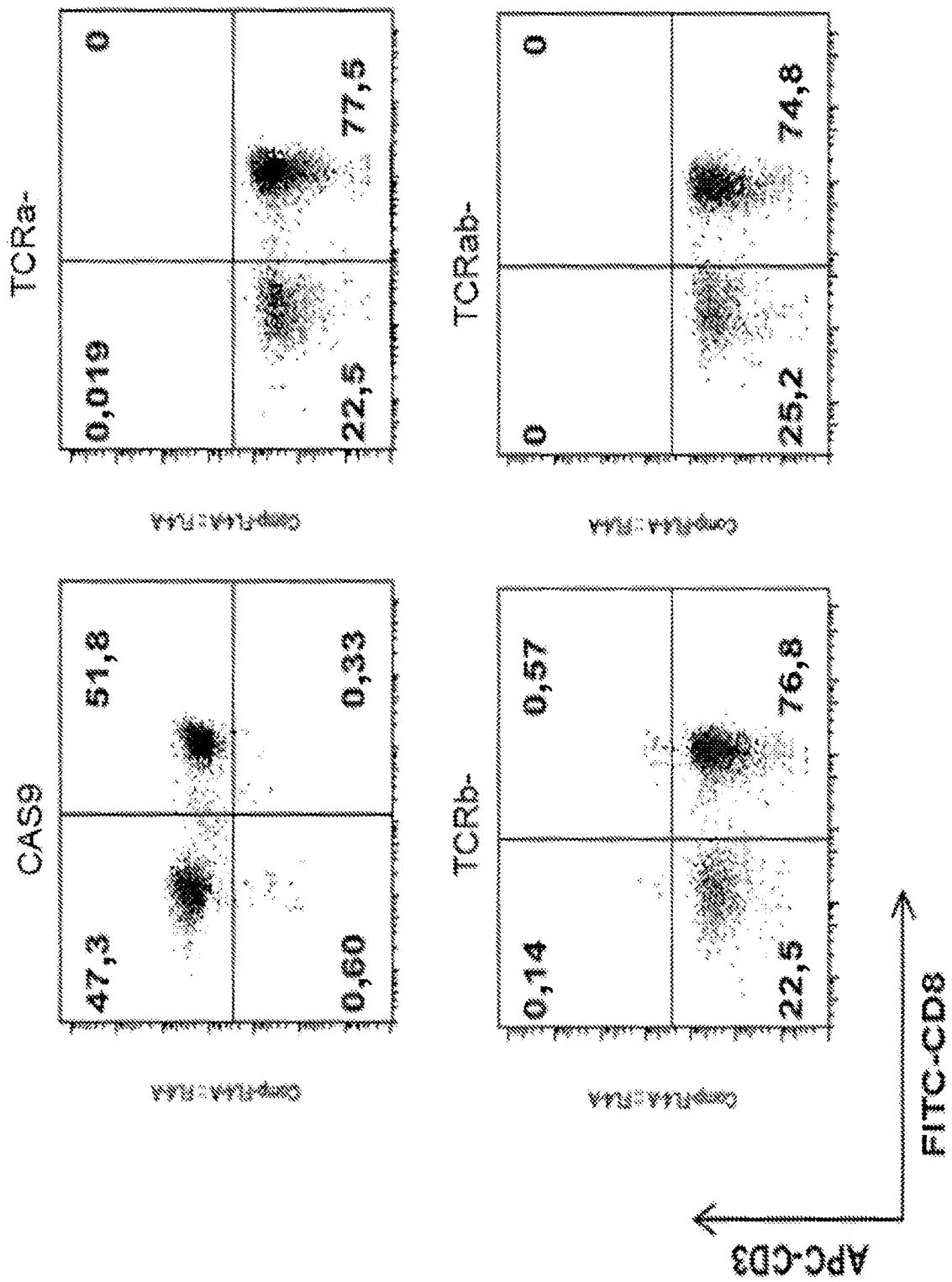


Figura 3C



TRAC WT TATATCACAGACAAACTGTGGCTAGACATGAGGTCTATGGACCTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT  
 (X4) TATATCACAGACAAAACTGTGGCTAGACATGAGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT  
 (X3) TATATCACAGACAAAACTGTGGCTAGACATG---GTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT  
 (X1) TATATCACAGACAAAACTGTGGCTAGACATGA-GTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT  
 (X1) TATATCACAGACAAAACTGTGGCTAGACATG---TCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT  
 (X1) TATATCACAGACAAAACTGTGGTAGAC-TGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT  
 (X1) TATATCACAGACAAAACTGTGGCTAG---TGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT  
 (X1) TATATCACAGACAAAACTGTGGT-----TGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT  
 (X1) TATATCACAGACAAAACTGTGGTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT  
 (X1) TATATCACAGACAAAACTGTGGTAGACATGAGGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT  
 TRBC1 WT AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X2) AGCAGCCCGCCCTC-ATGACTCCAGATACCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X2) AGCAGCCCGCC-TCAATGACTCCAGATACCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTC-AGATACCTGCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACT--AGATACCTGCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X1) AGCAGCCCGCC-----GACTCCAGATACCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 TRBC2 WT AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X3) AGCAGCCCGCCCTCAATGACT--AGATACCTGCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X2) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTC-AGATACCTGCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCA-----ACTGCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCA-TGACT-AGATACCTG-CTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X1) AGCAGCC-----ACTG-----C-G-----TGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG  
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTG

Figura 3D

	0 h	18 h	24h	36h
1	CAS9 20 ug, ARNg 10 ug			
2	CAS9 20 ug, ARNg 20 ug			
3	CAS9 20 ug, ARNg 40 ug			
4	CAS9 20 ug, ARNg 10 ug			
5	CAS9 20 ug, ARNg 10 ug	ARNg 10 ug		
6	CAS9 20 ug, ARNg 10 ug	ARNg 10 ug	ARNg 10 ug	
7	CAS9 20 ug, ARNg 10 ug		ARNg 10 ug	ARNg 10 ug
8	CAS9 20 ug, ARNg 10 ug	ARNg 10 ug	ARNg 10 ug	ARNg 10 ug

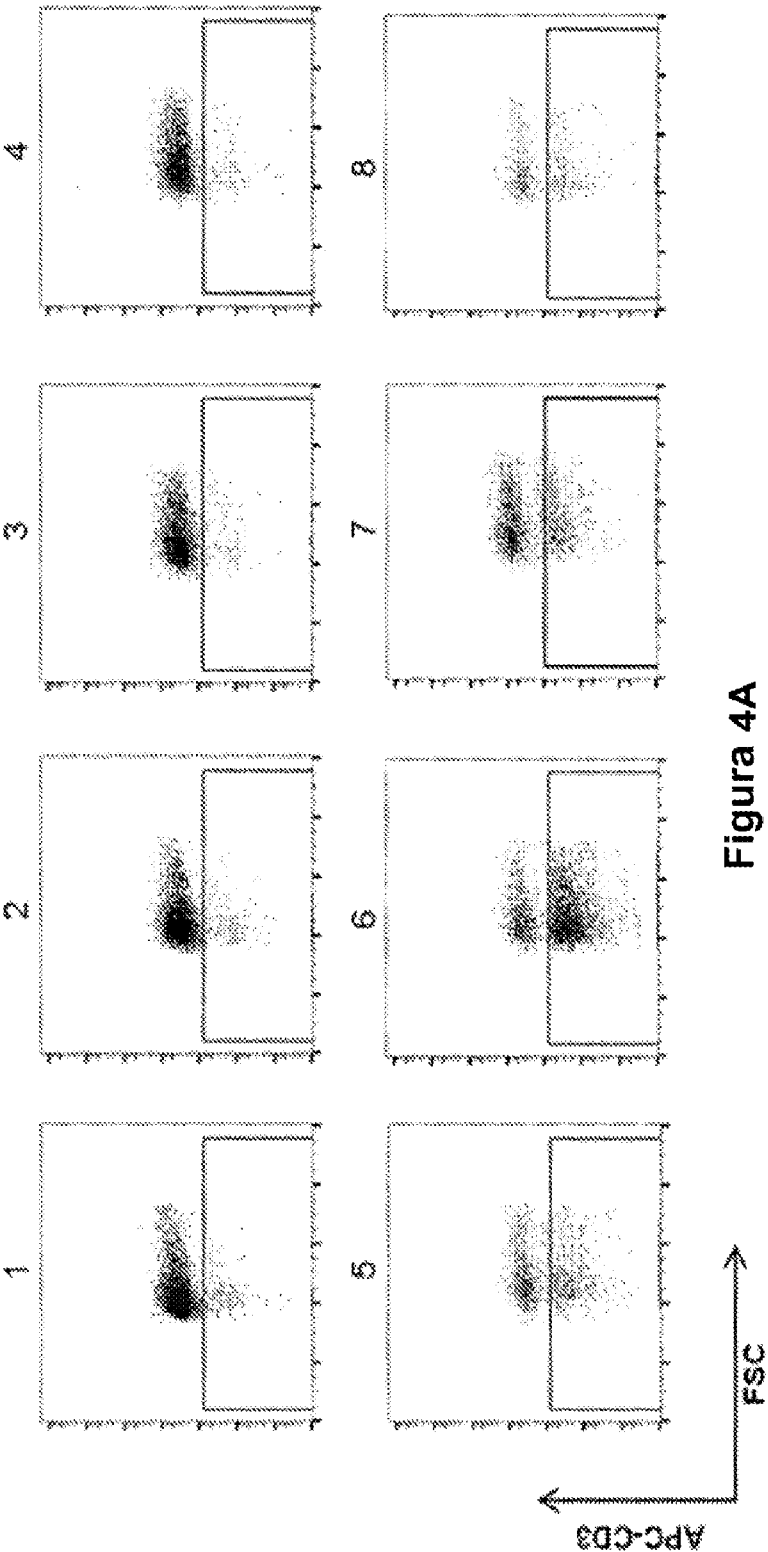


Figura 4A

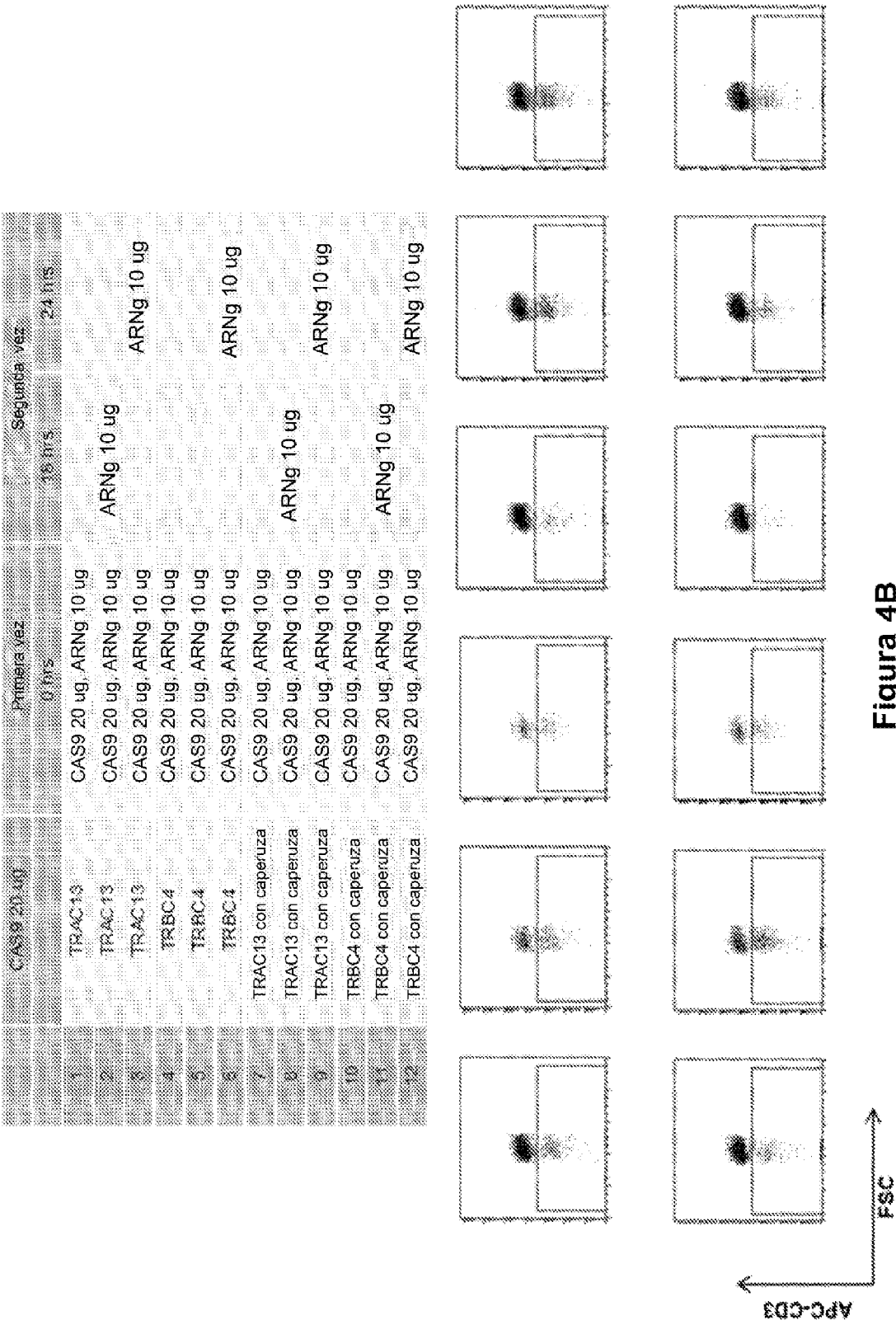


Figura 4B

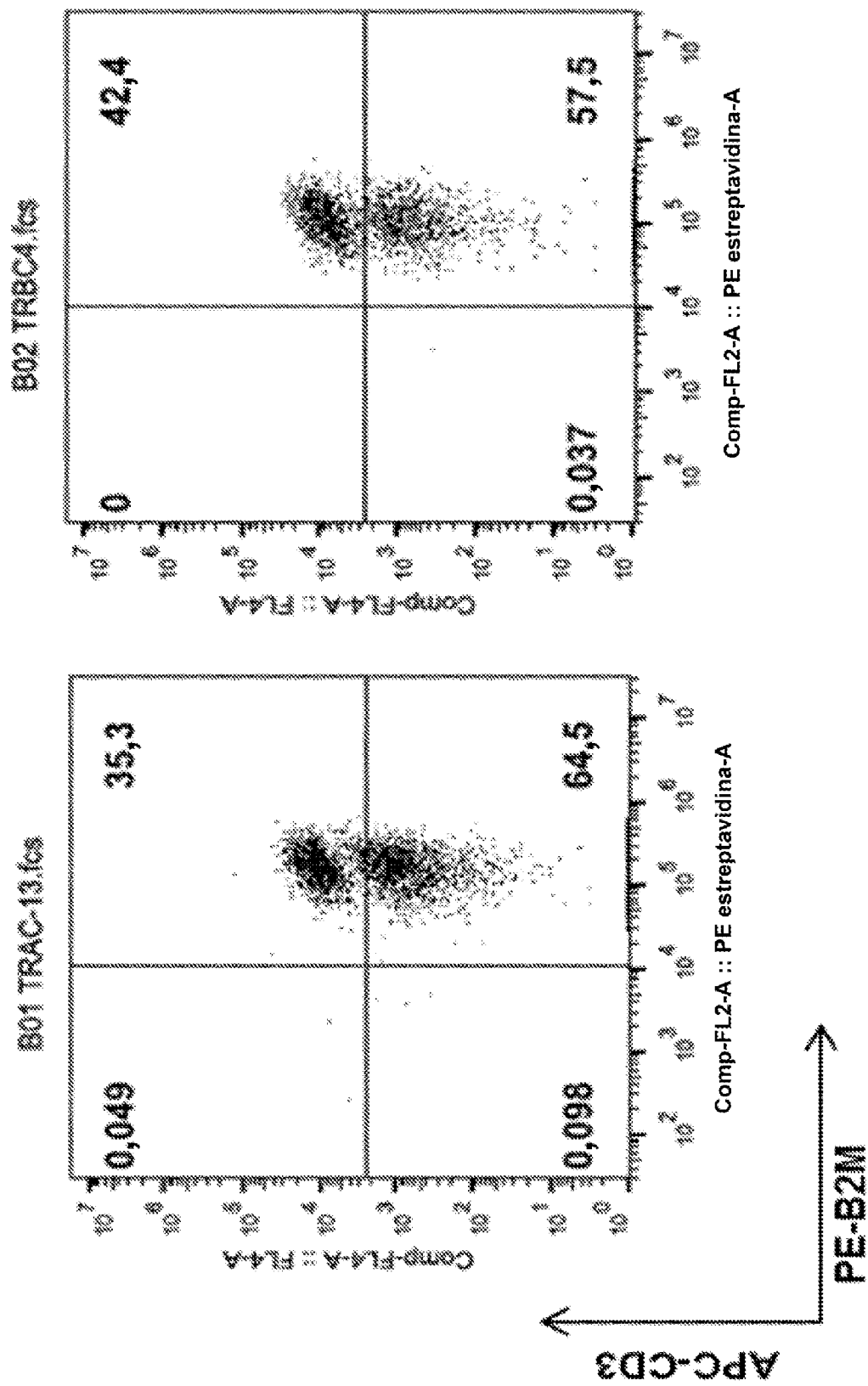


Figura 4C

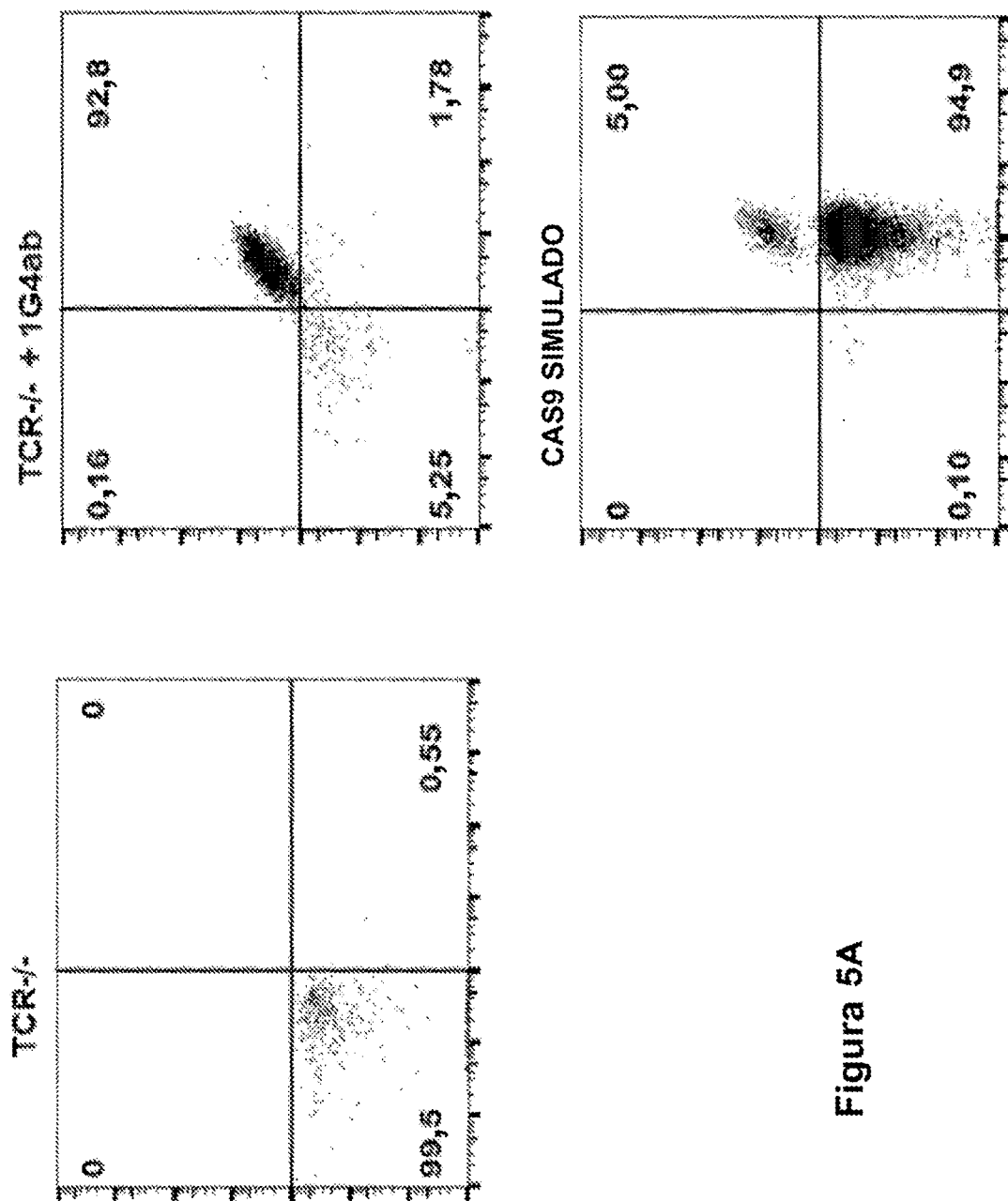


Figura 5A

Factor de expansión		Día 0		Día 3		Día 5		Día 7		Día 9		Día 11	
Grupos		Día 0		Día 3		Día 5		Día 7		Día 9		Día 11	
REP		1		15		100		198		335		507	
Perlas de CD3/CD28		1		2		7		14		17		25	
KT/OKT3		1		2		5		18		29		40	
KT/K19		1		3		7		24		36		52	
KT/K19/TCR-CLEAR		1		3		8		25		42		58	

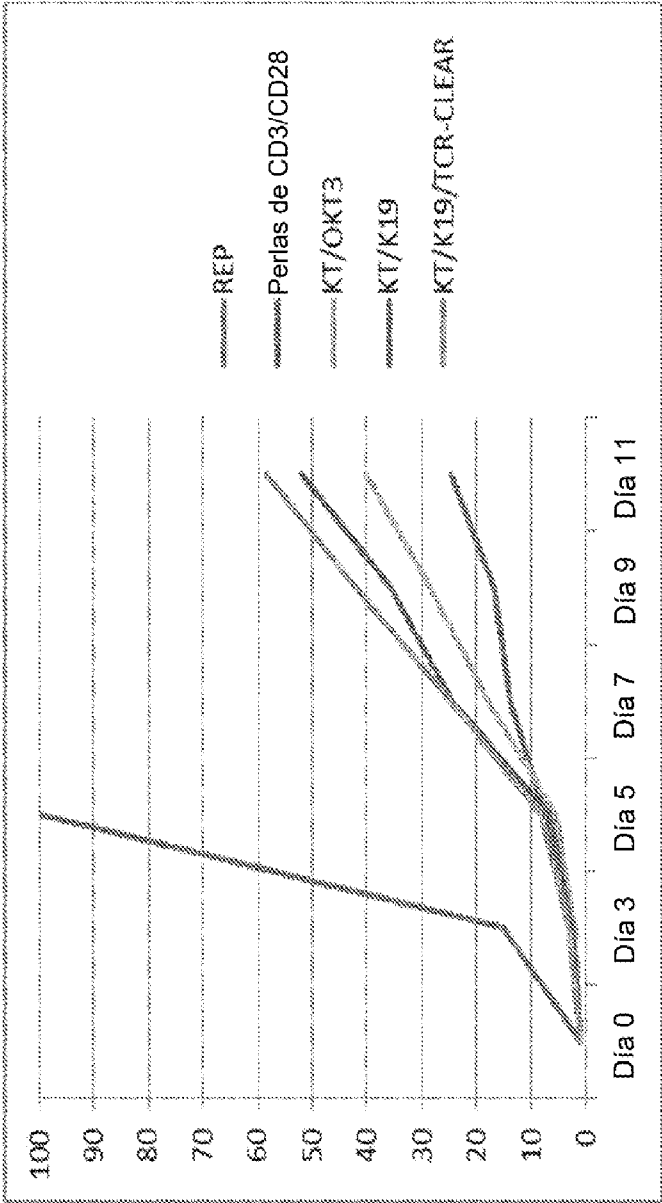


Figura 5B

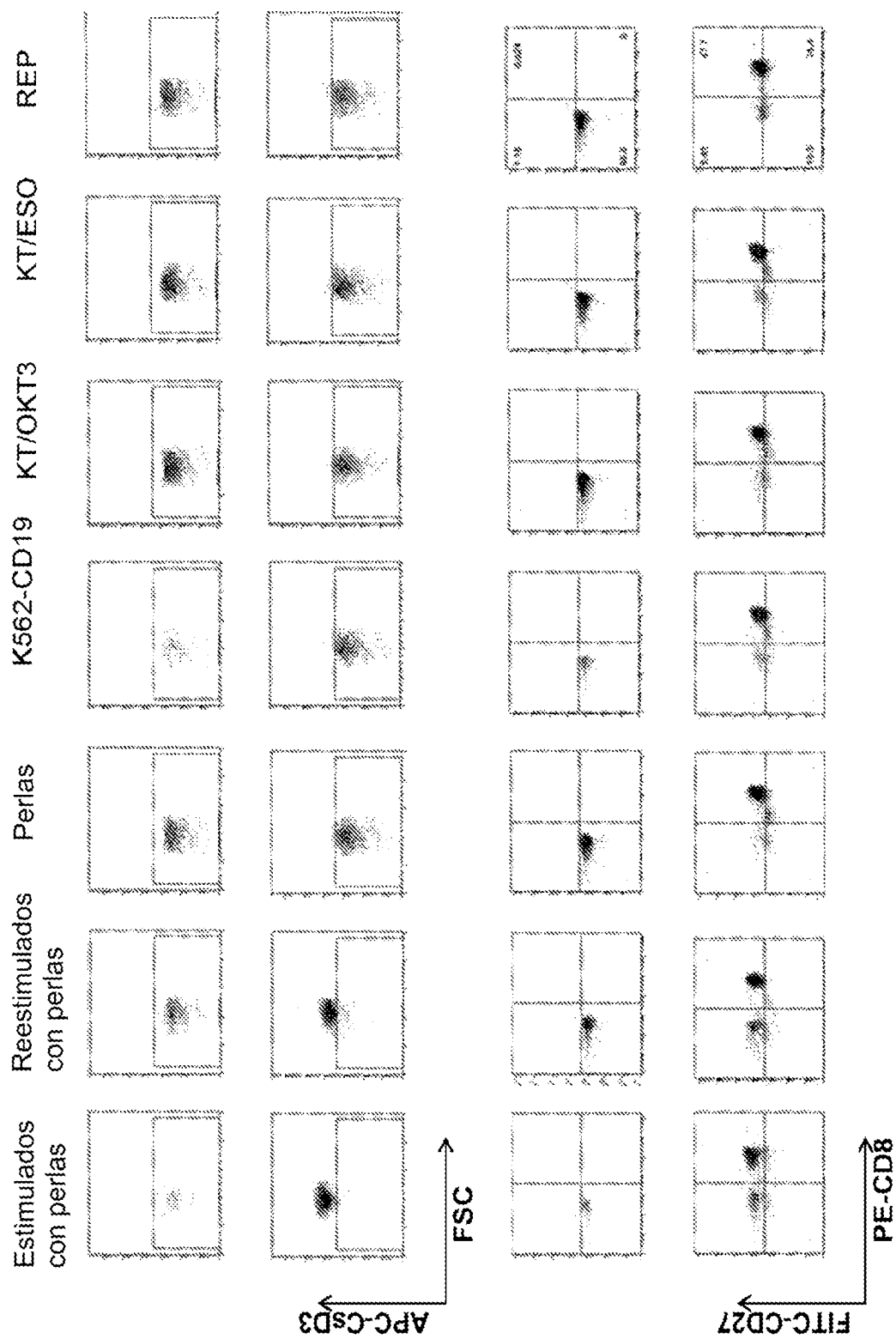


Figura 6A

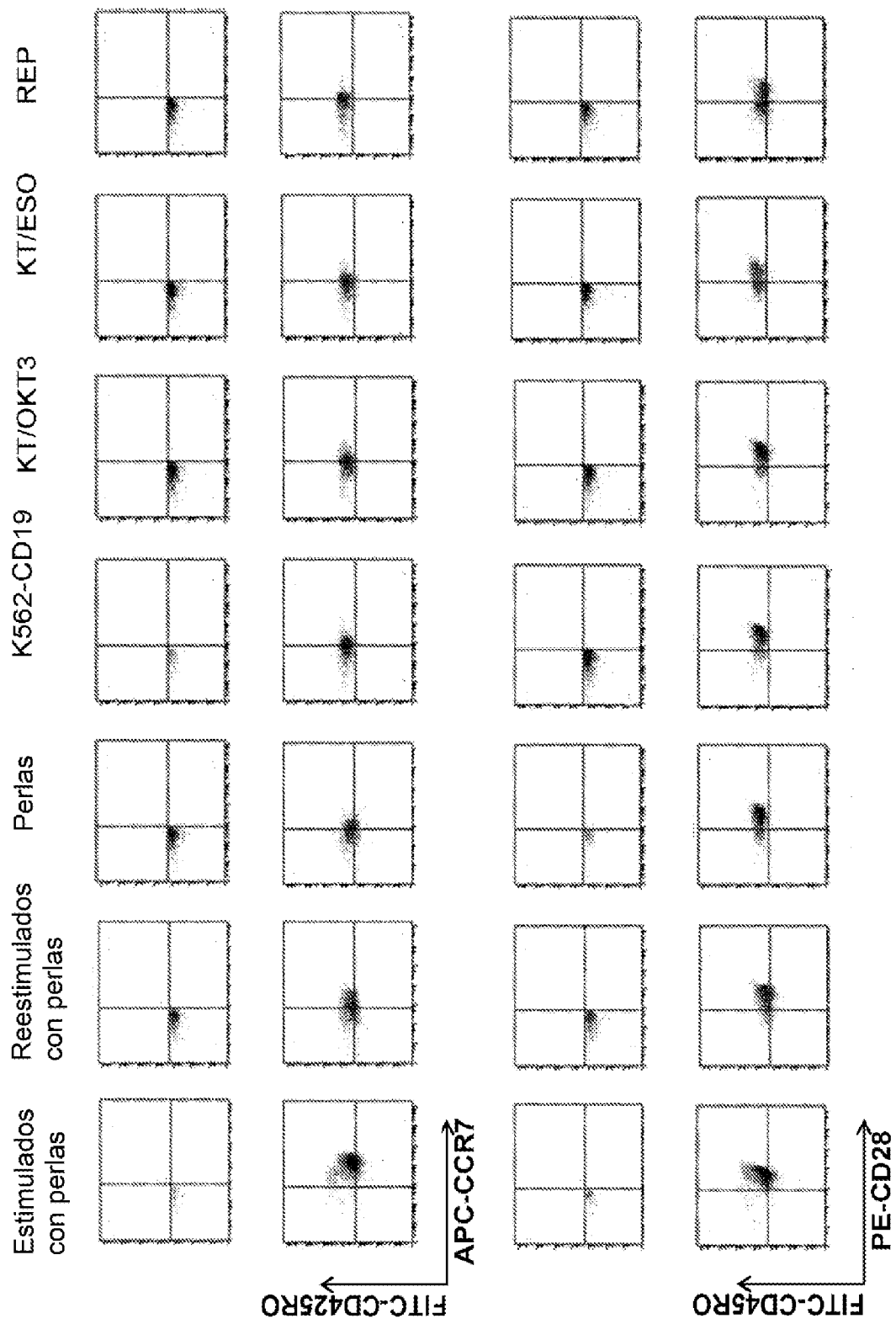


Figura 6B



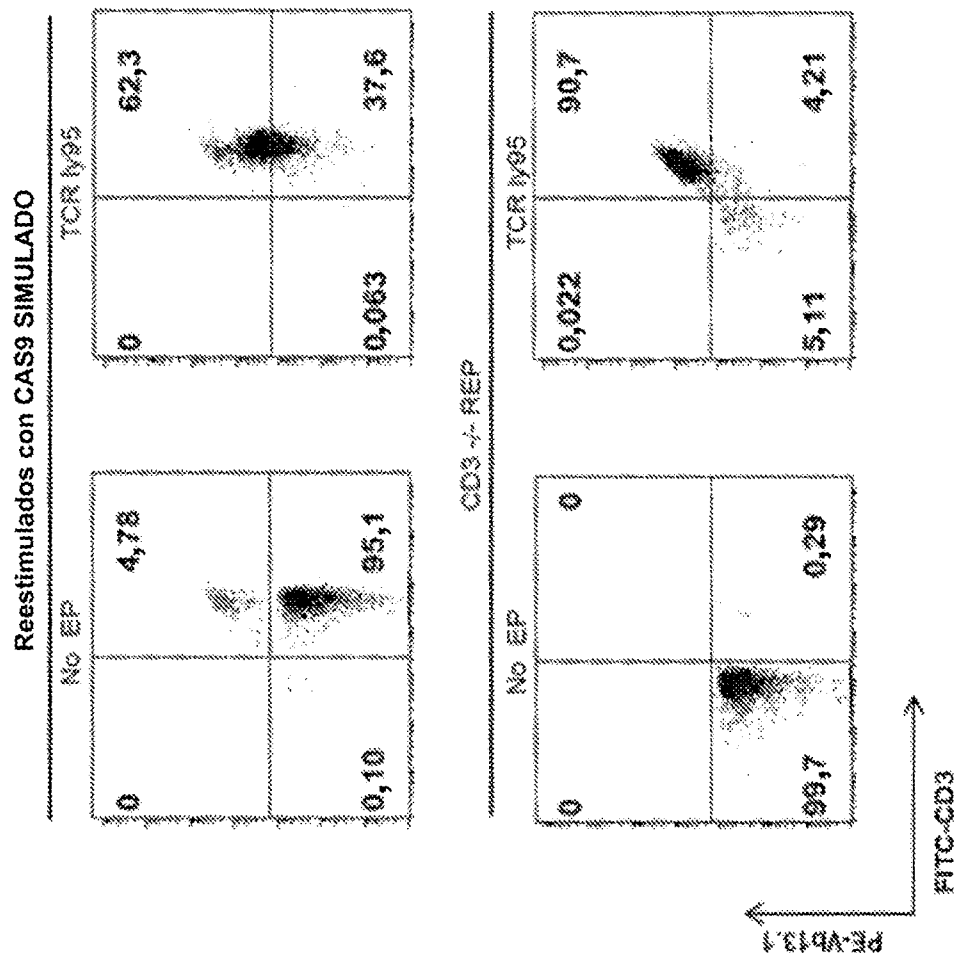


Figura 7A

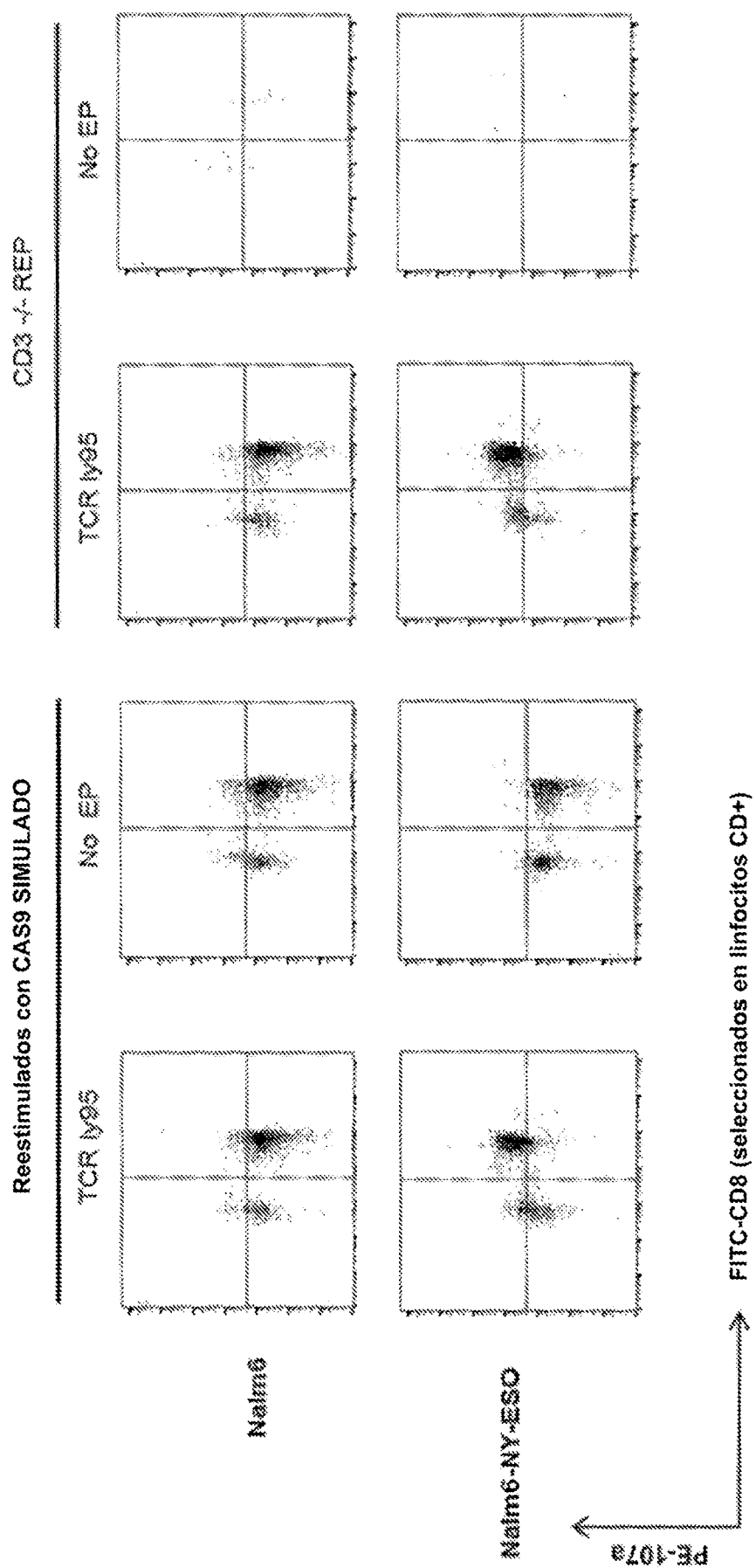


Figura 7B

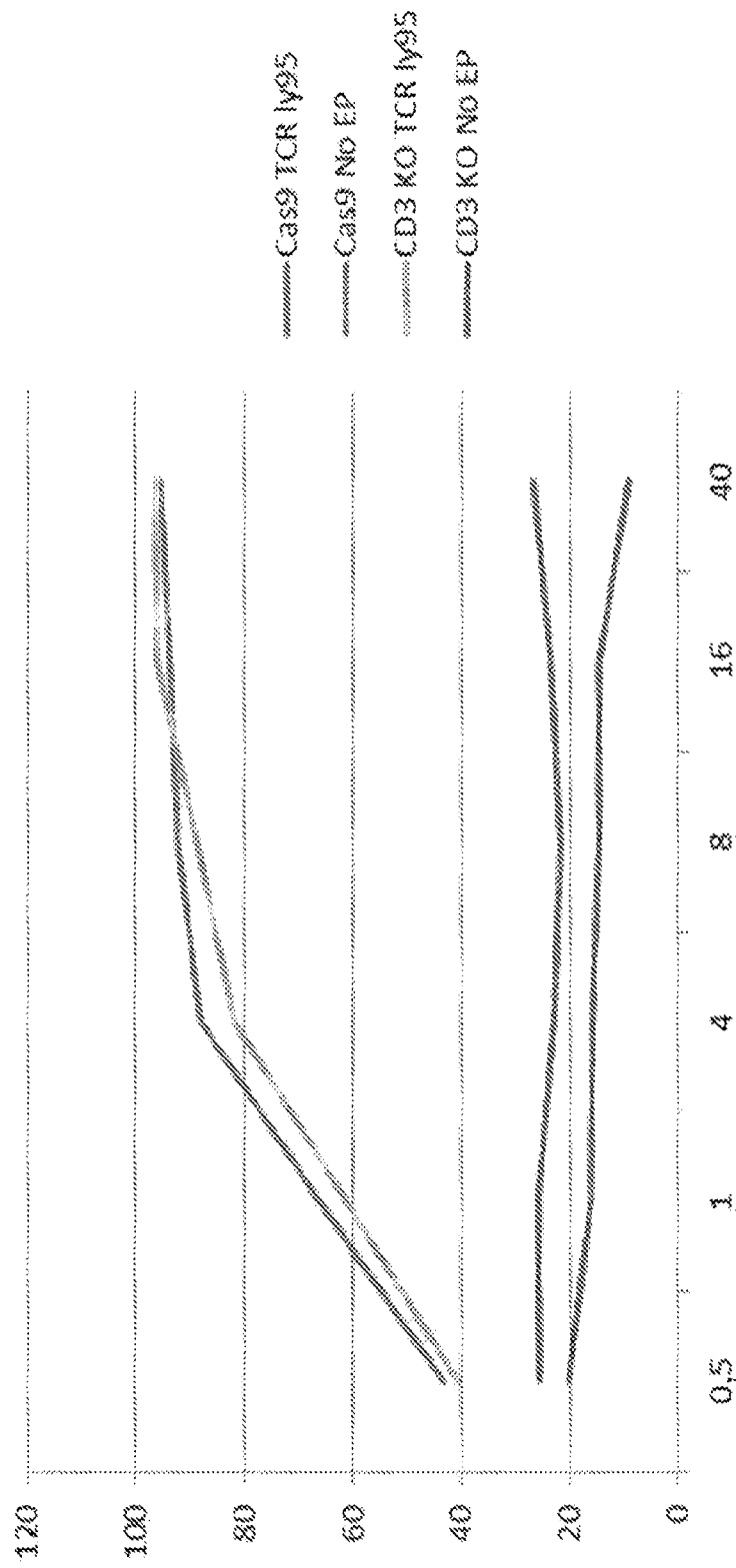


Figura 7C

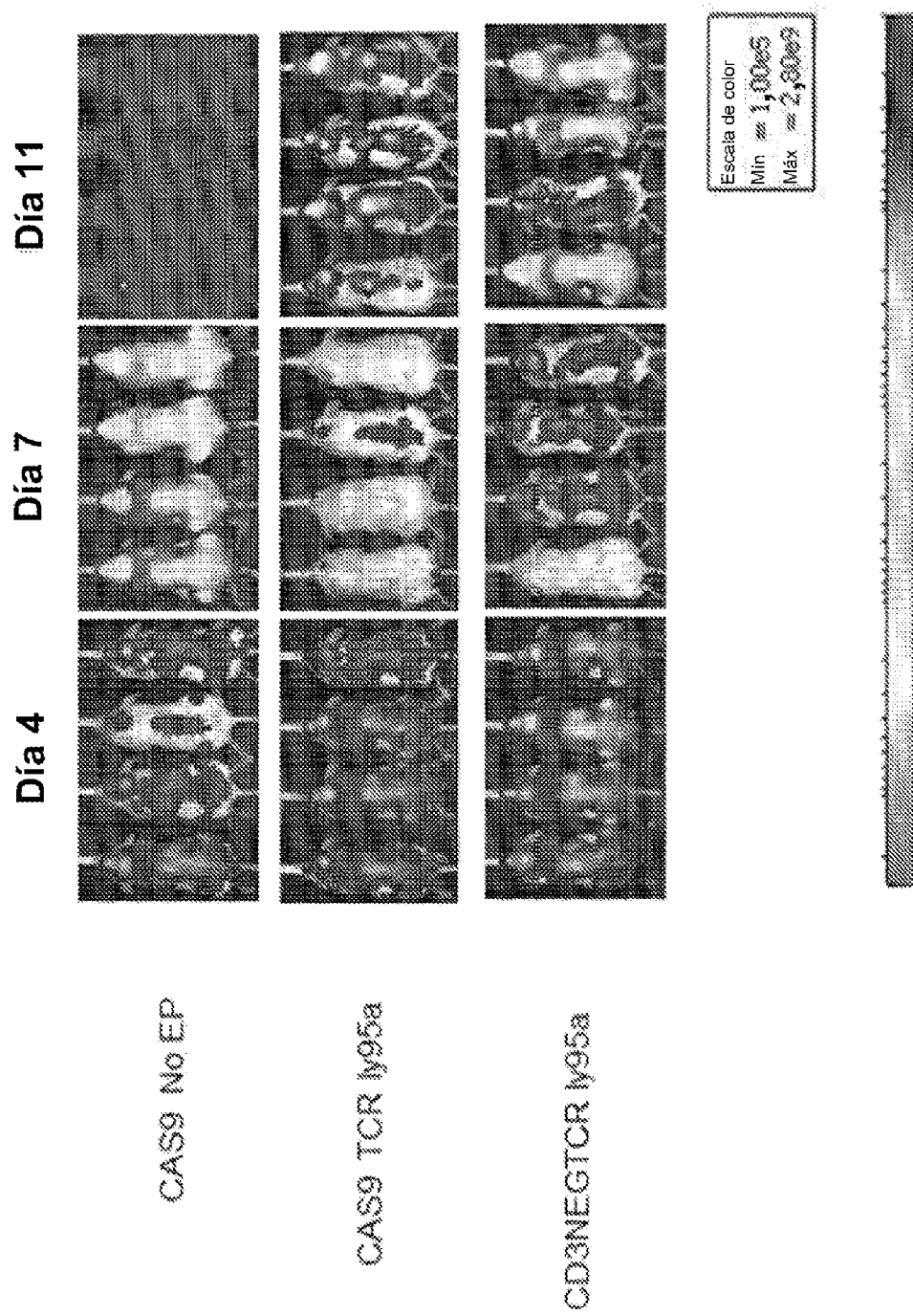


Figura 8

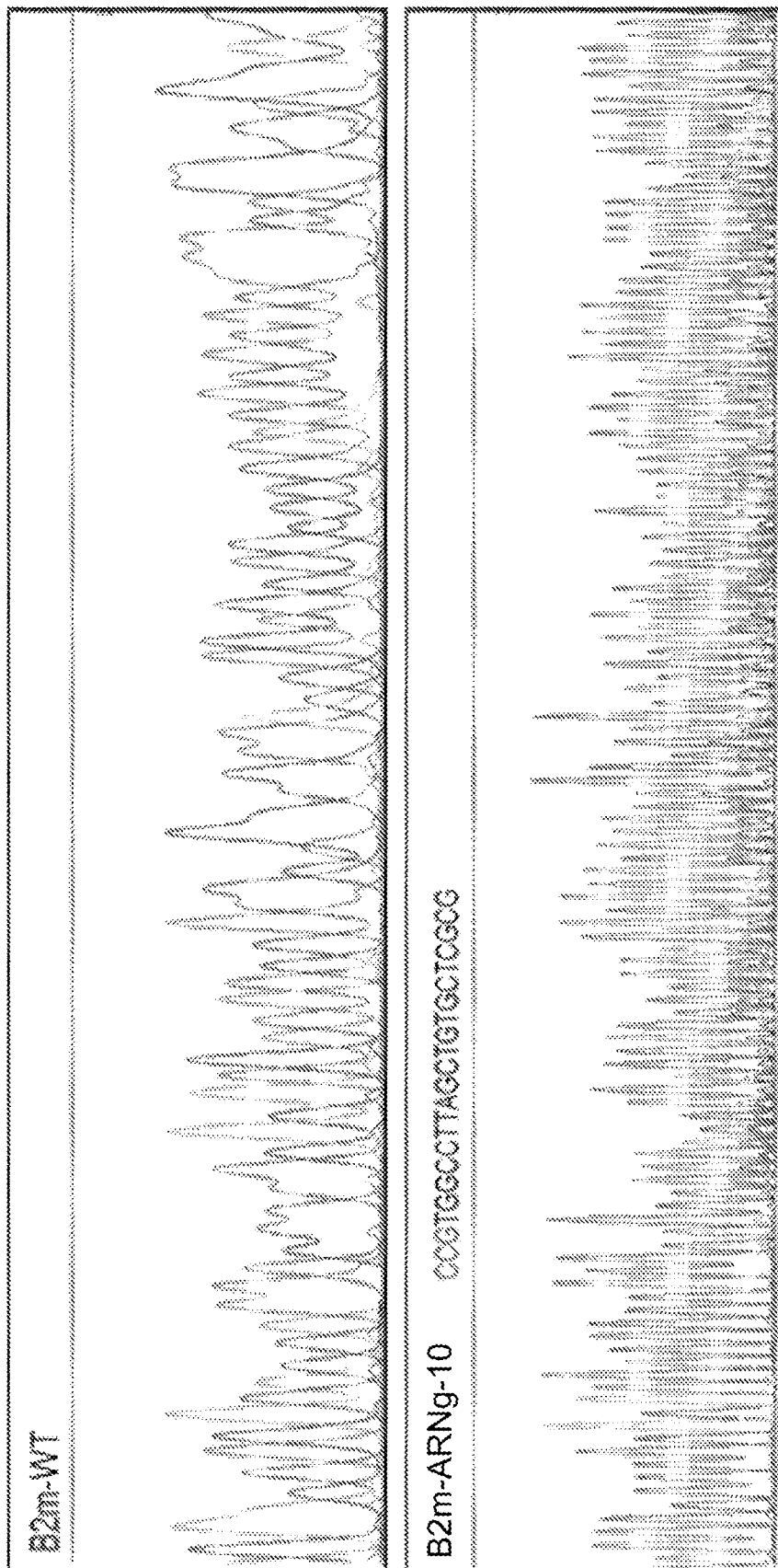
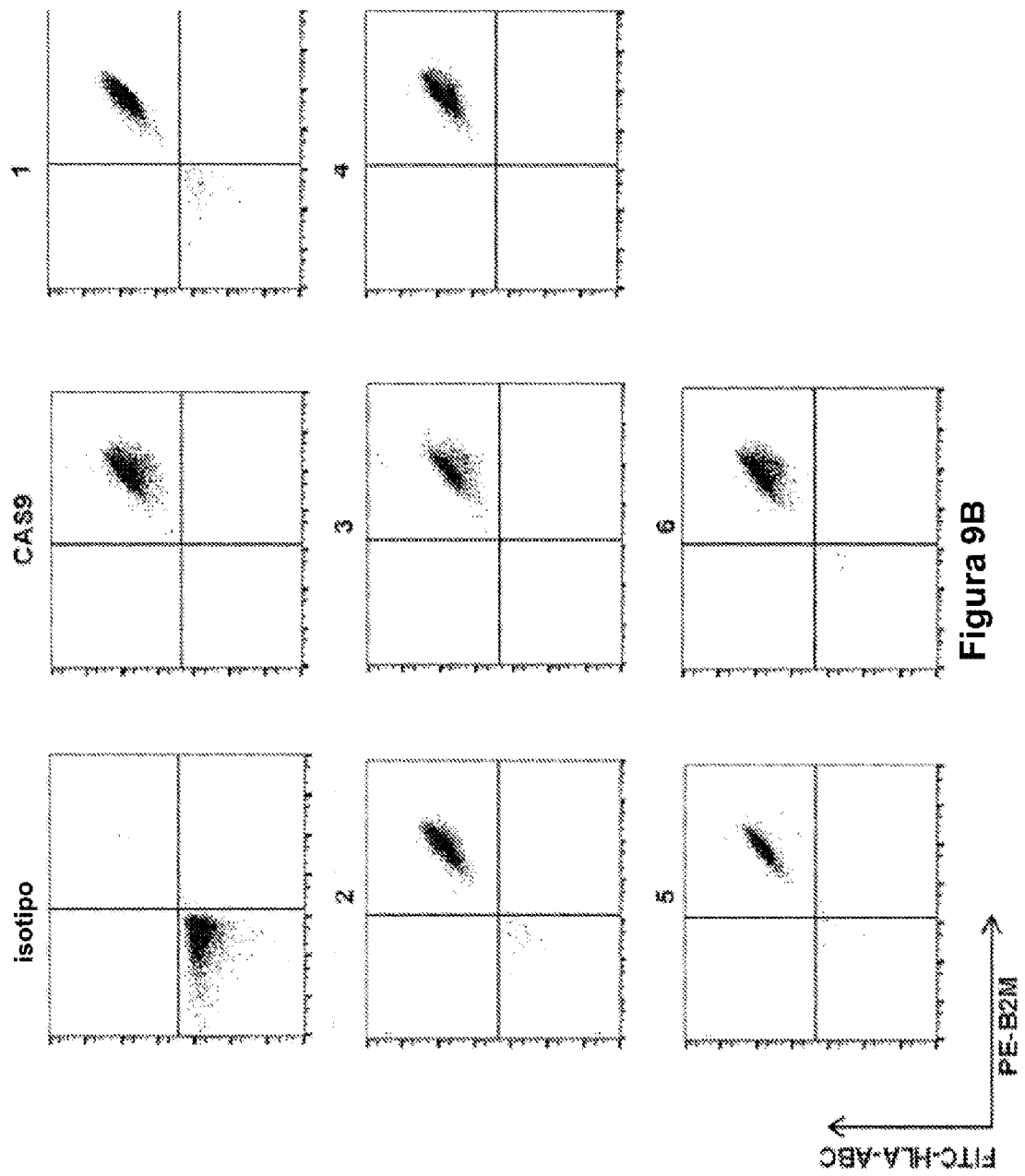


Figura 9A



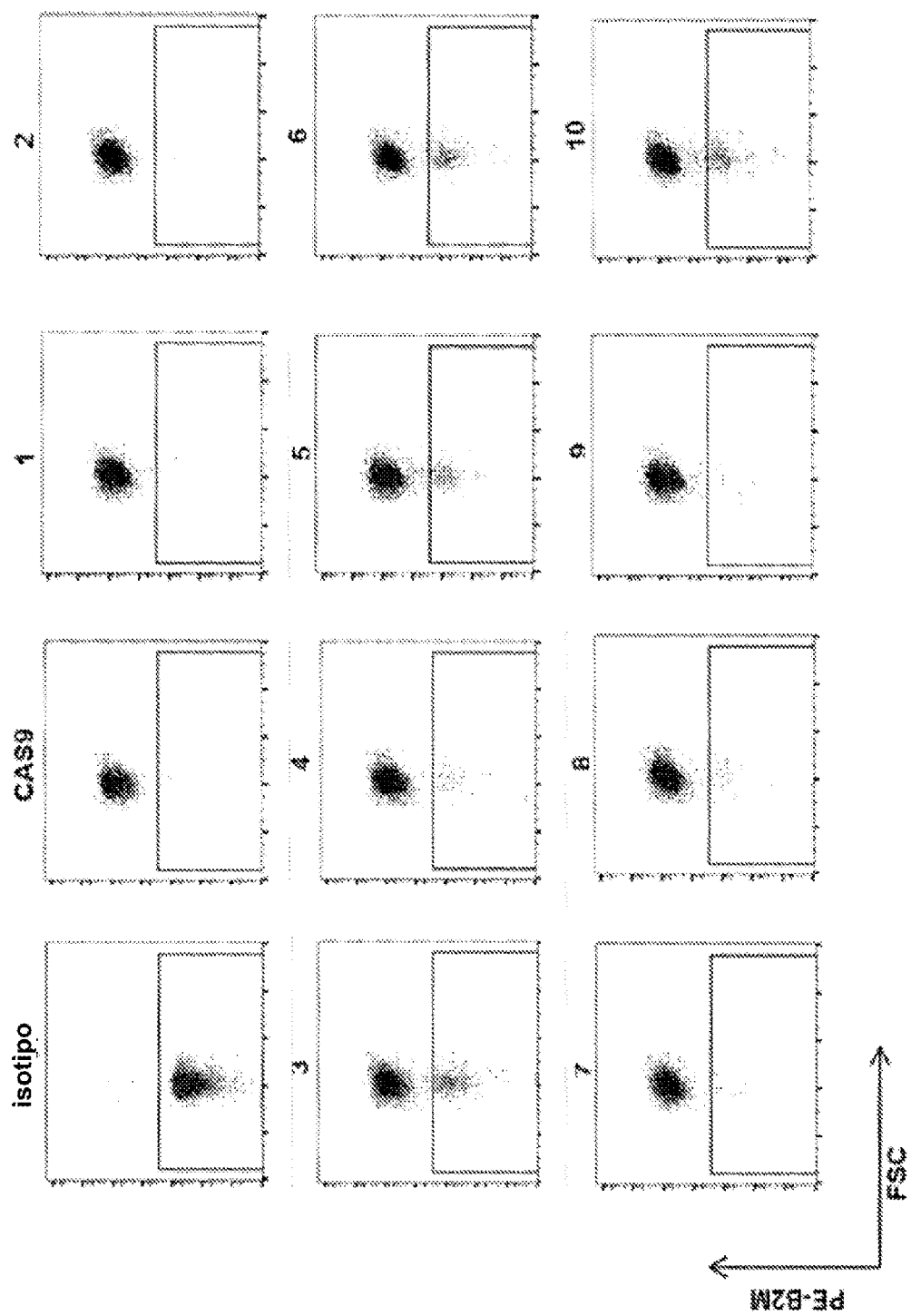


Figura 9C

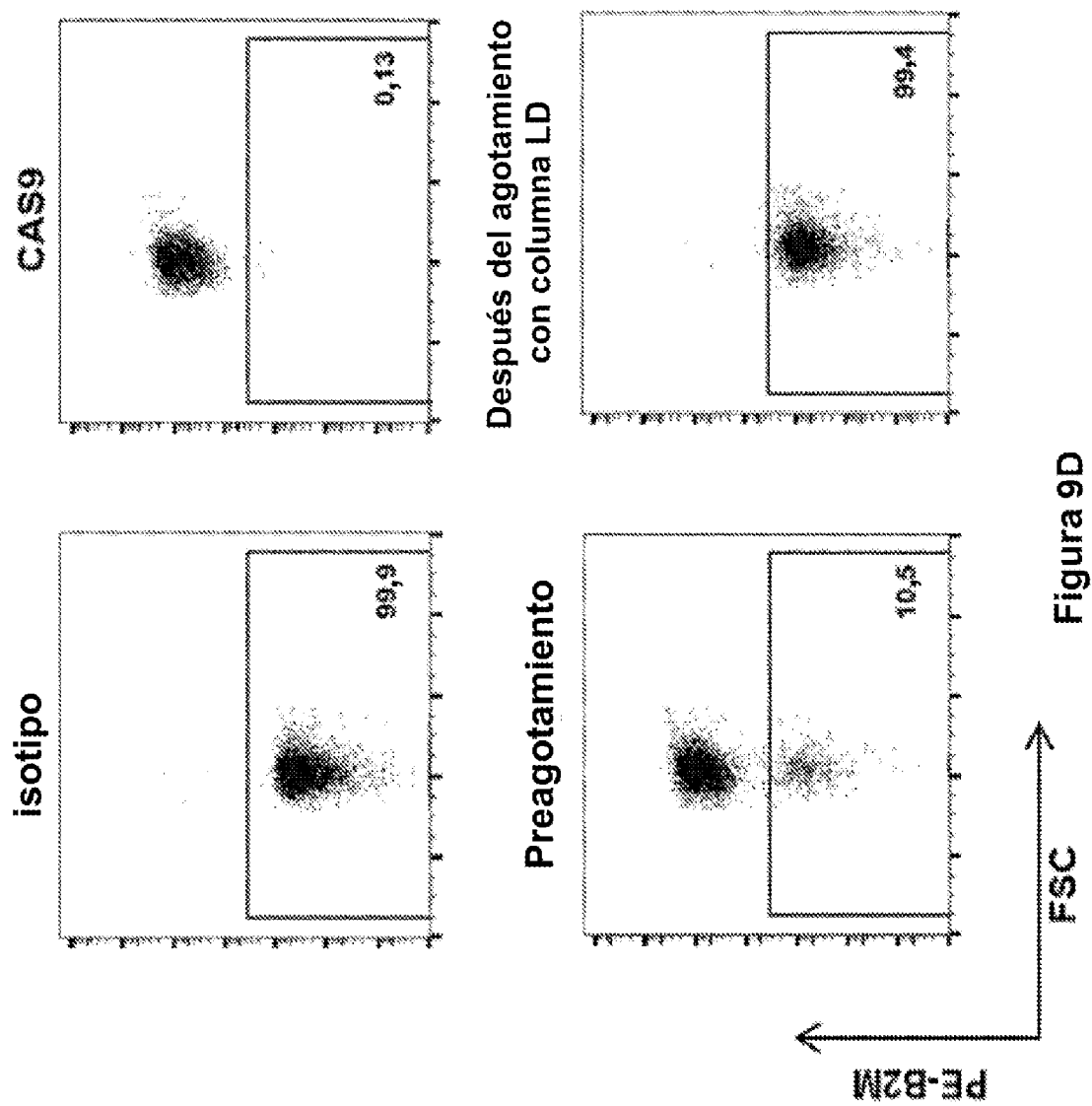


Figura 9D



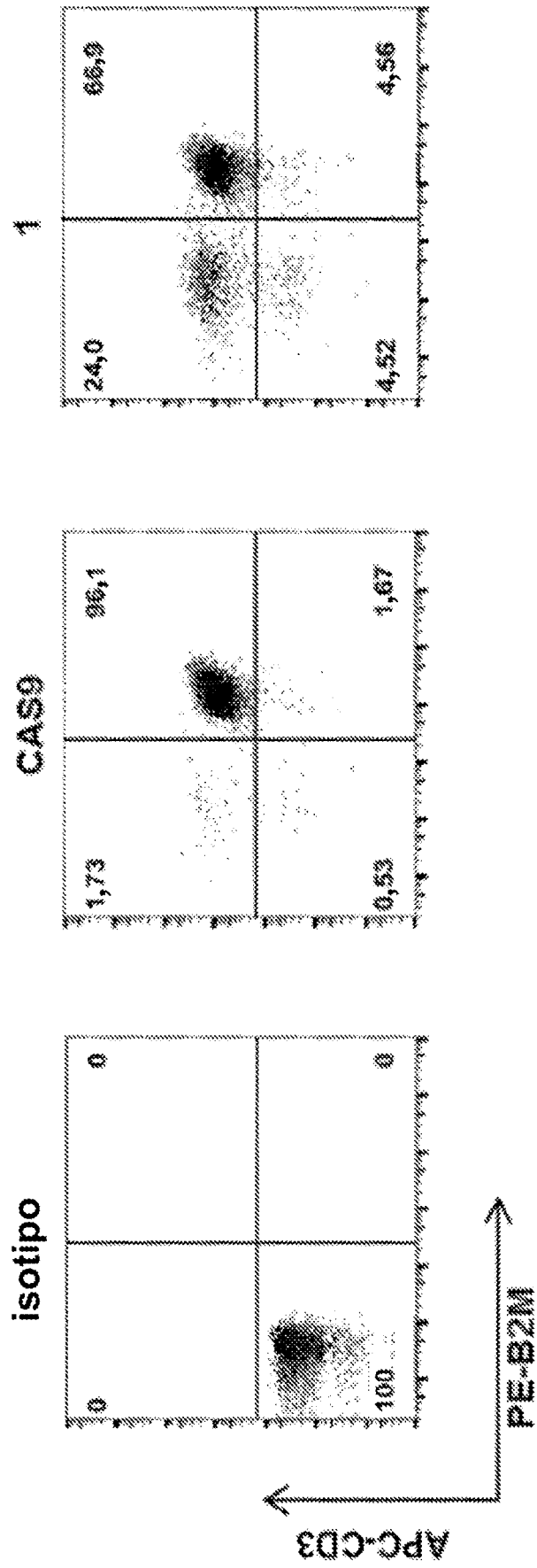


Figura 10

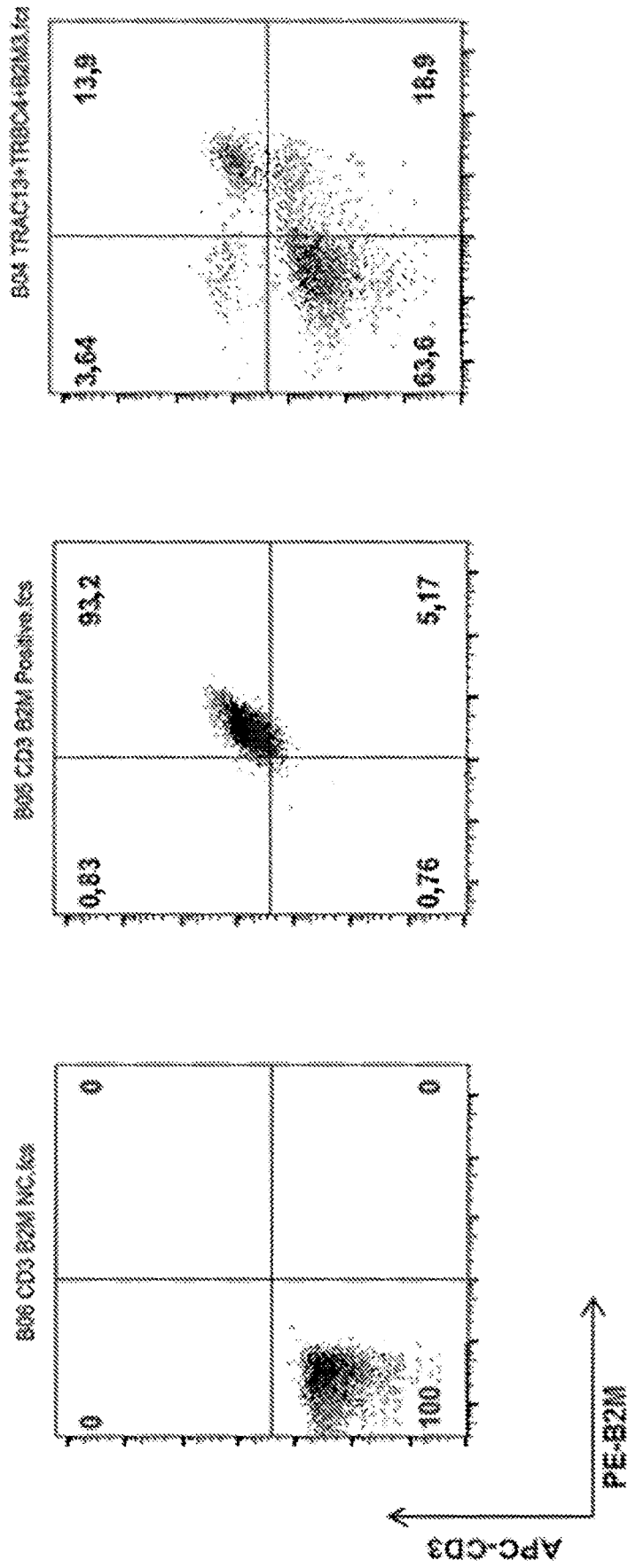
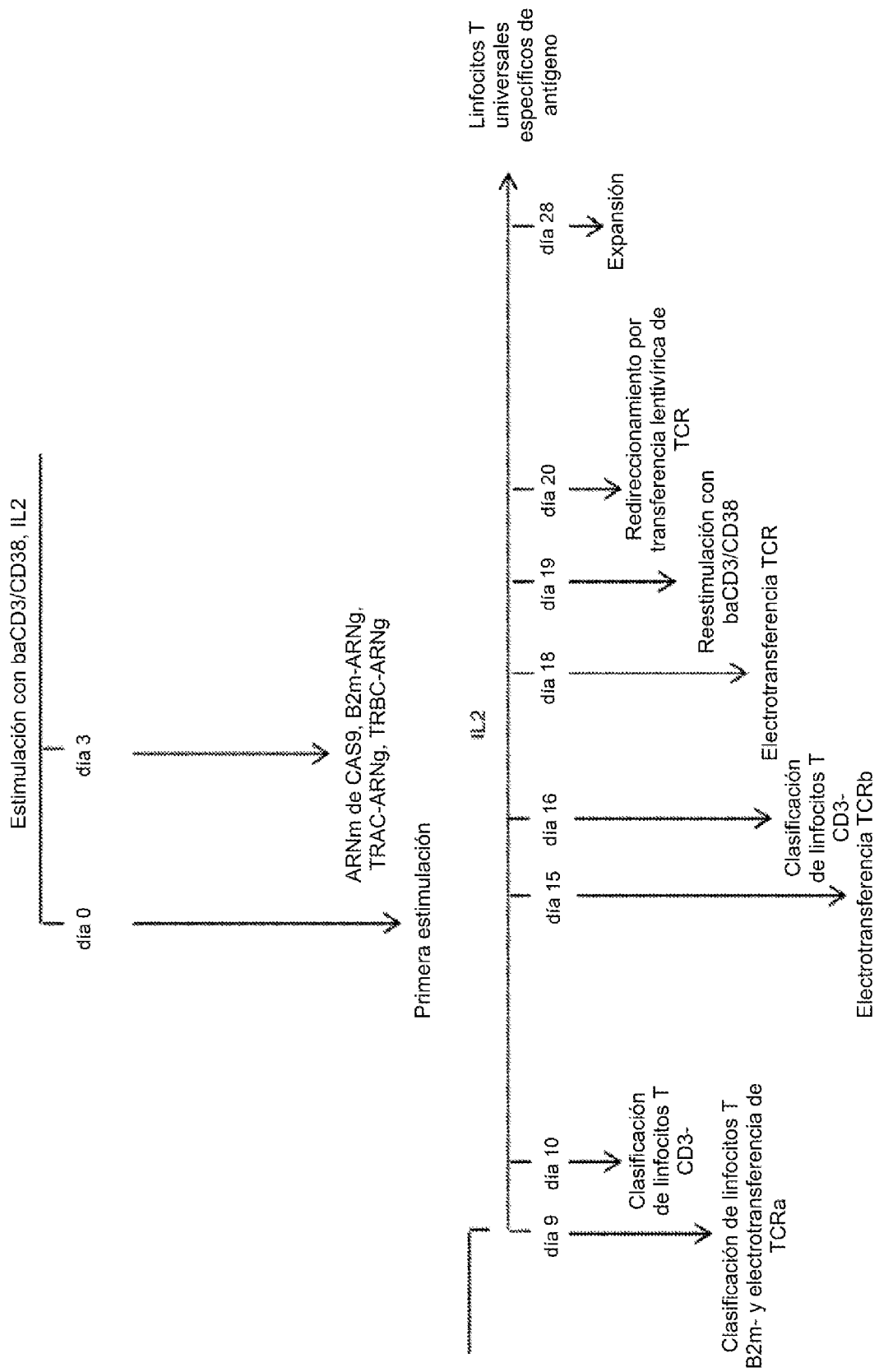
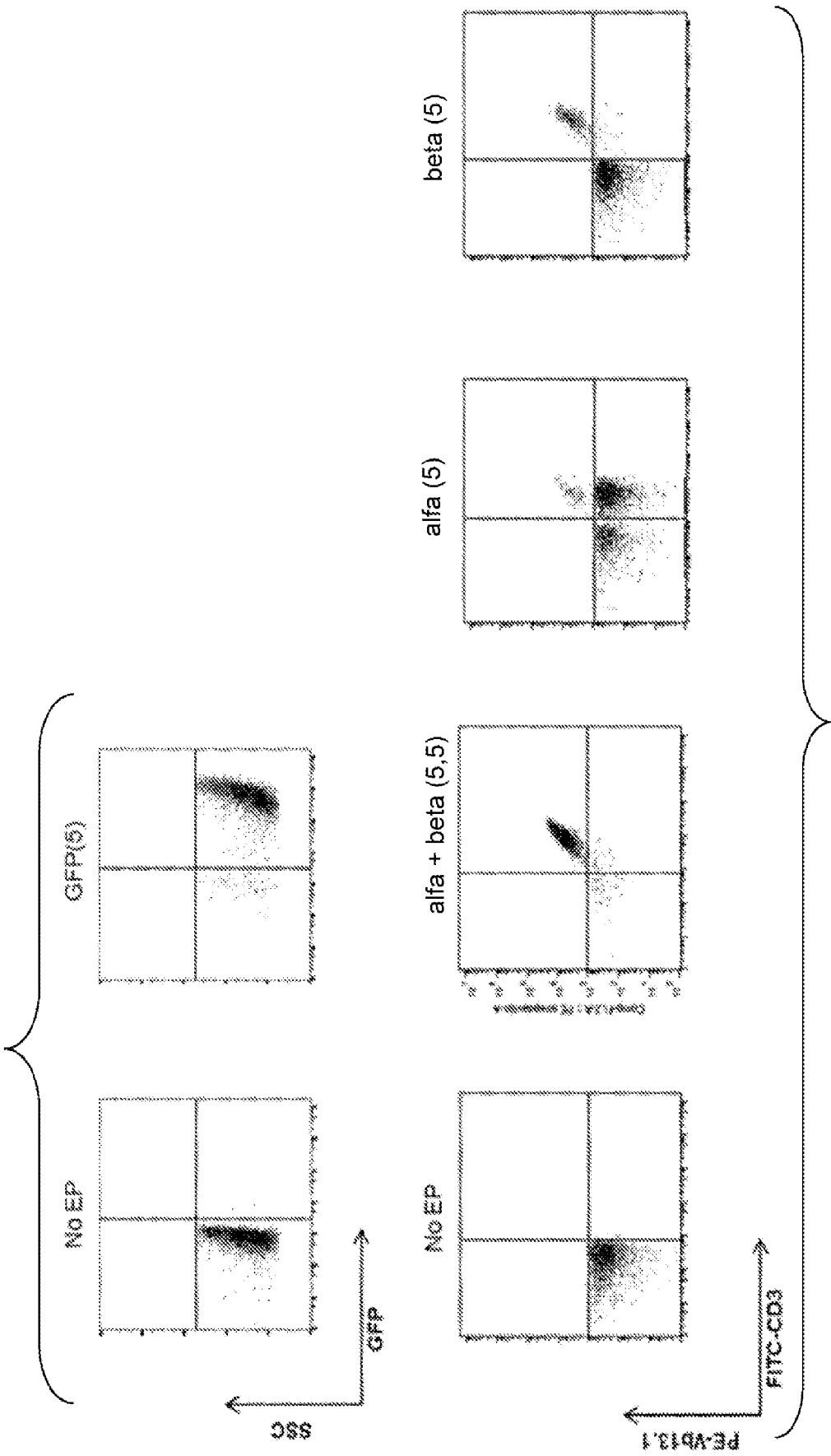


Figura 11A



**Figura 11B**

Figura 11C



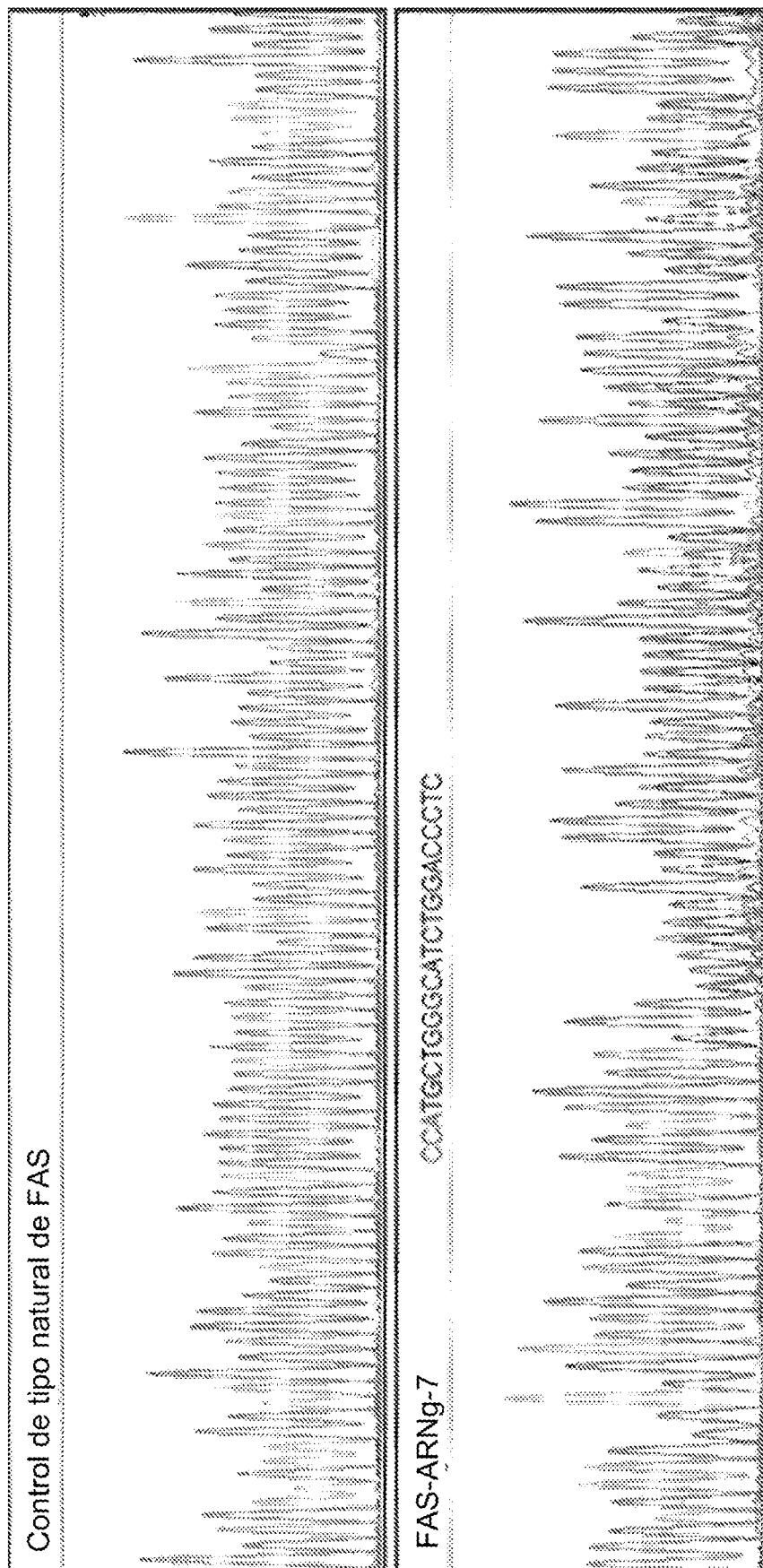


Figura 12A

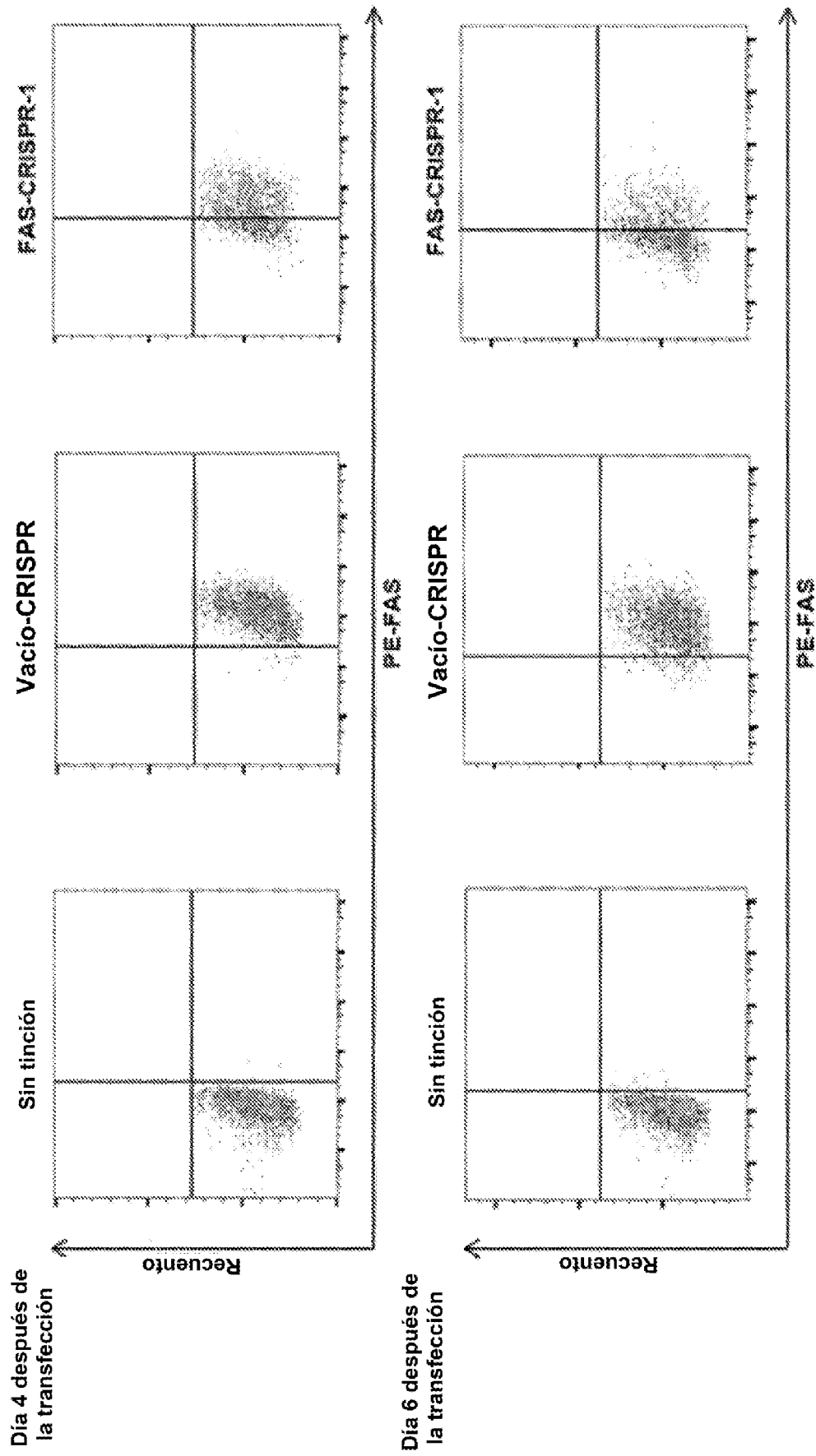


Figura 12B

Día 7 después de la selección



Vector de direccionamiento FAS

Vector de direccionamiento solo, 4x

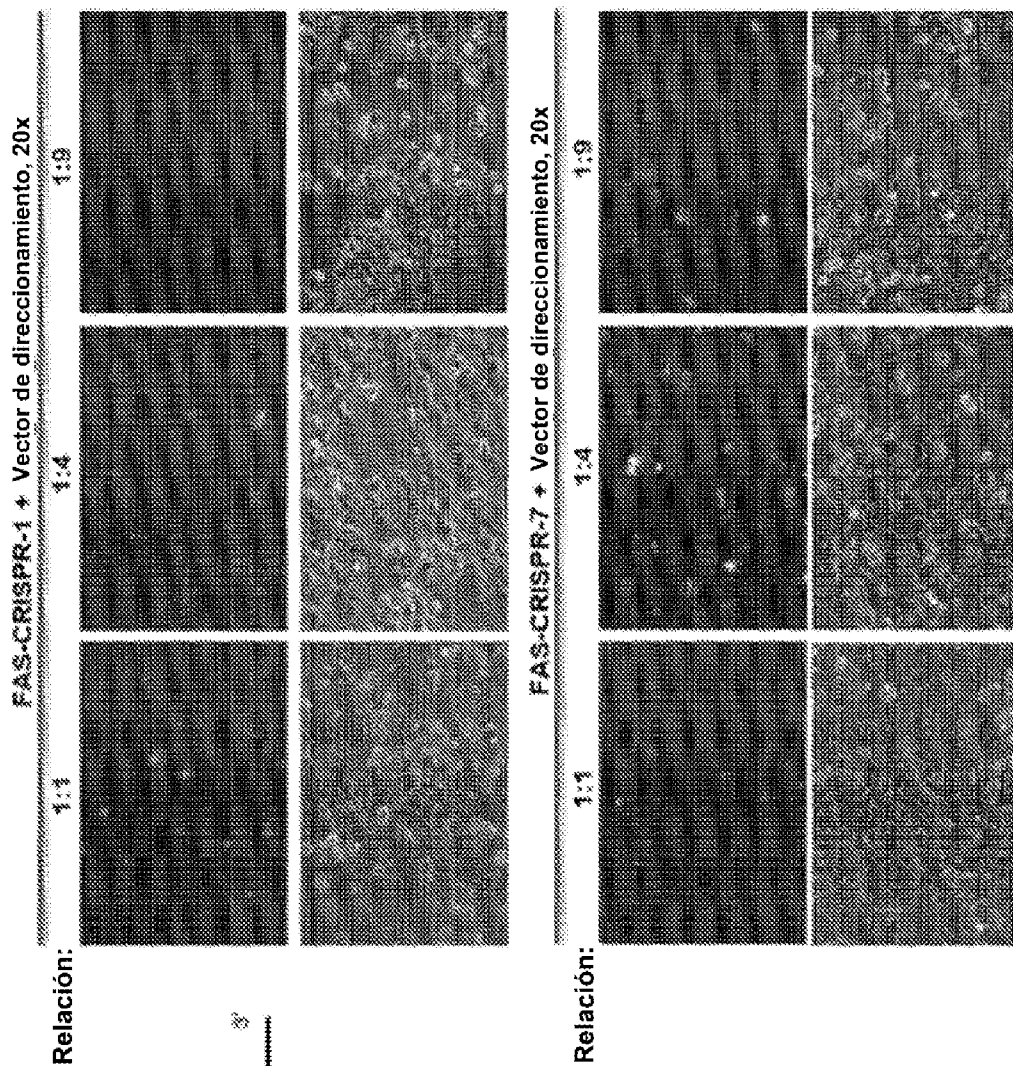
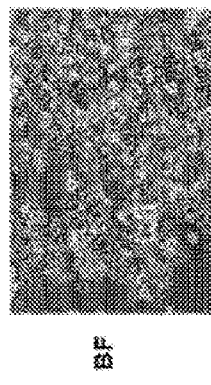
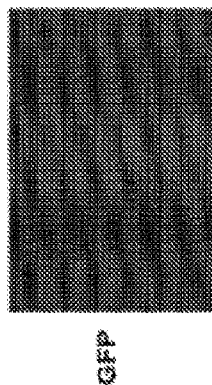
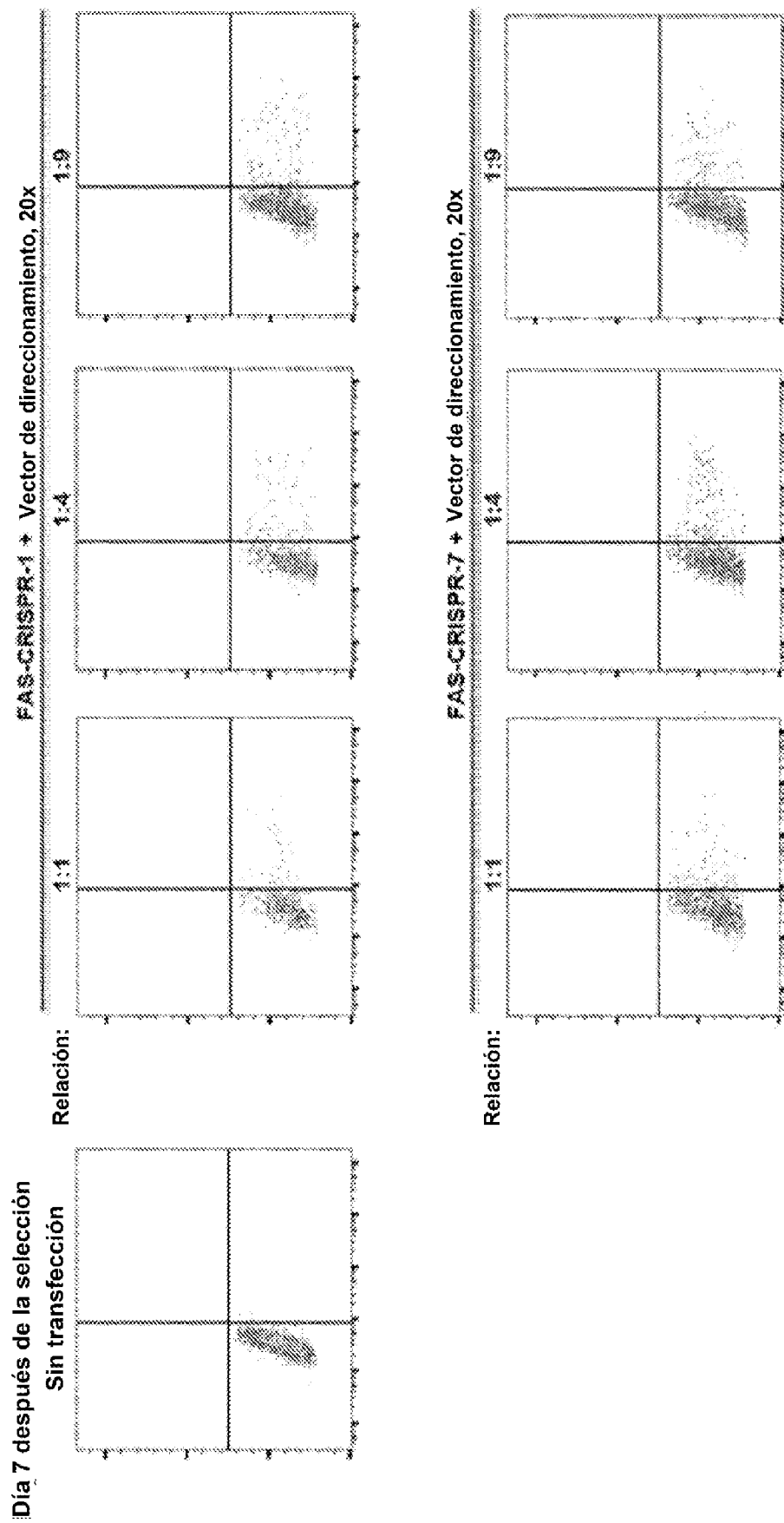


Figura 12C



**Figura 12D**



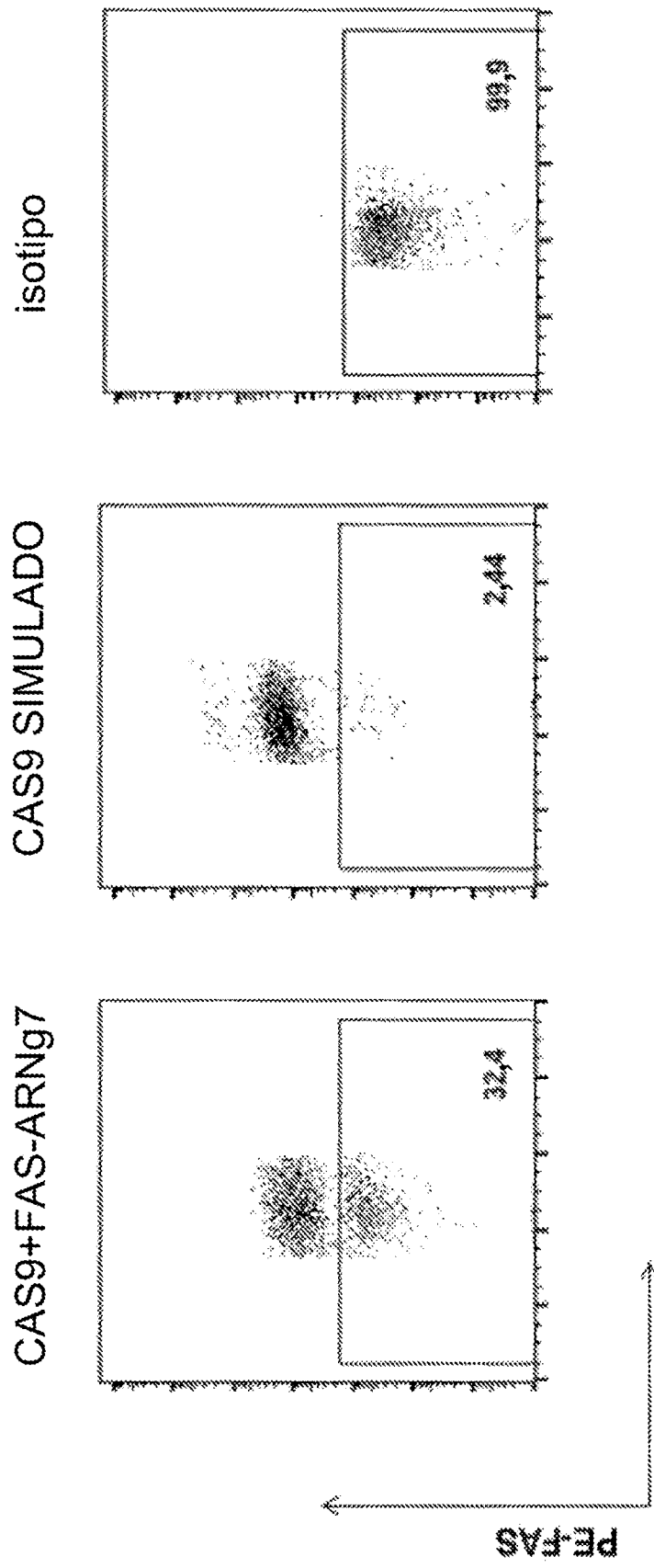


Figura 13

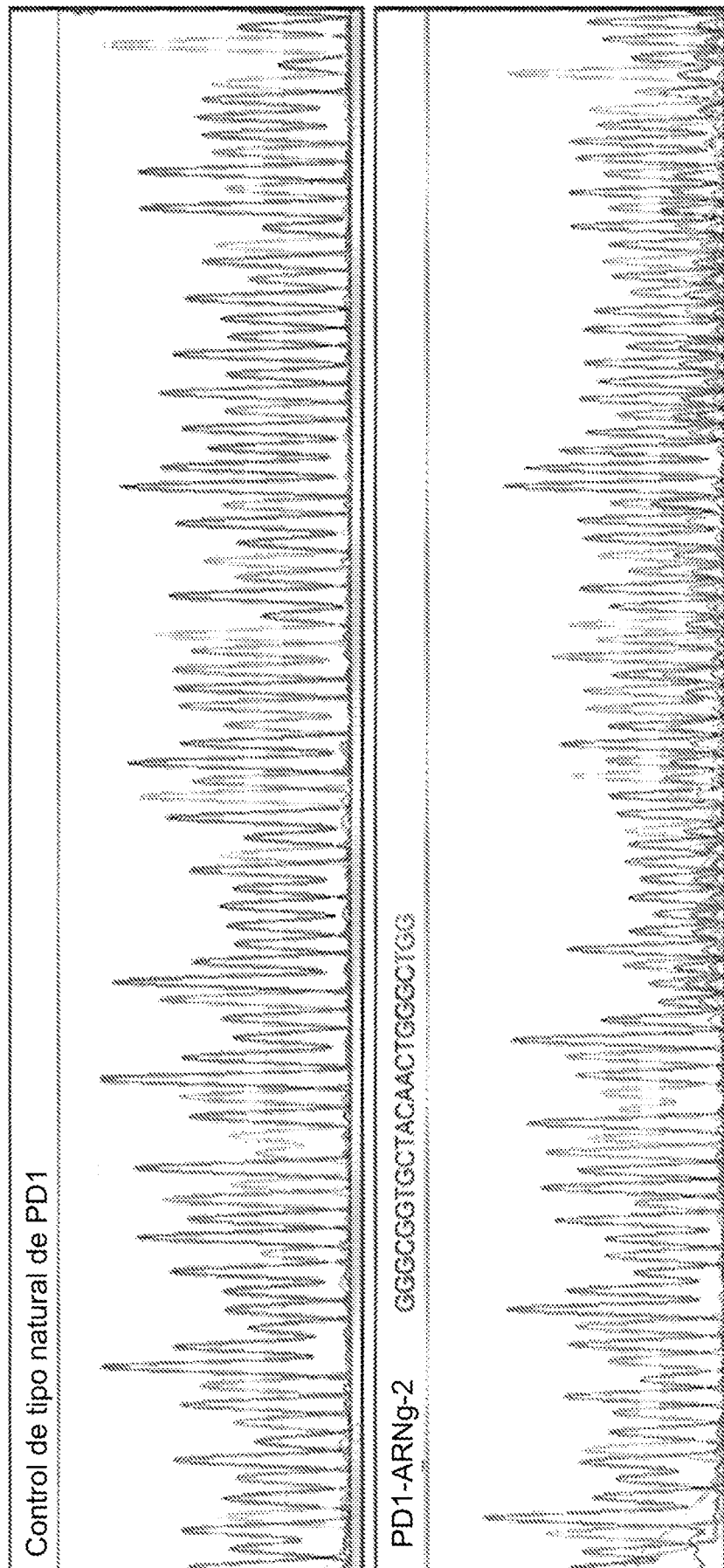
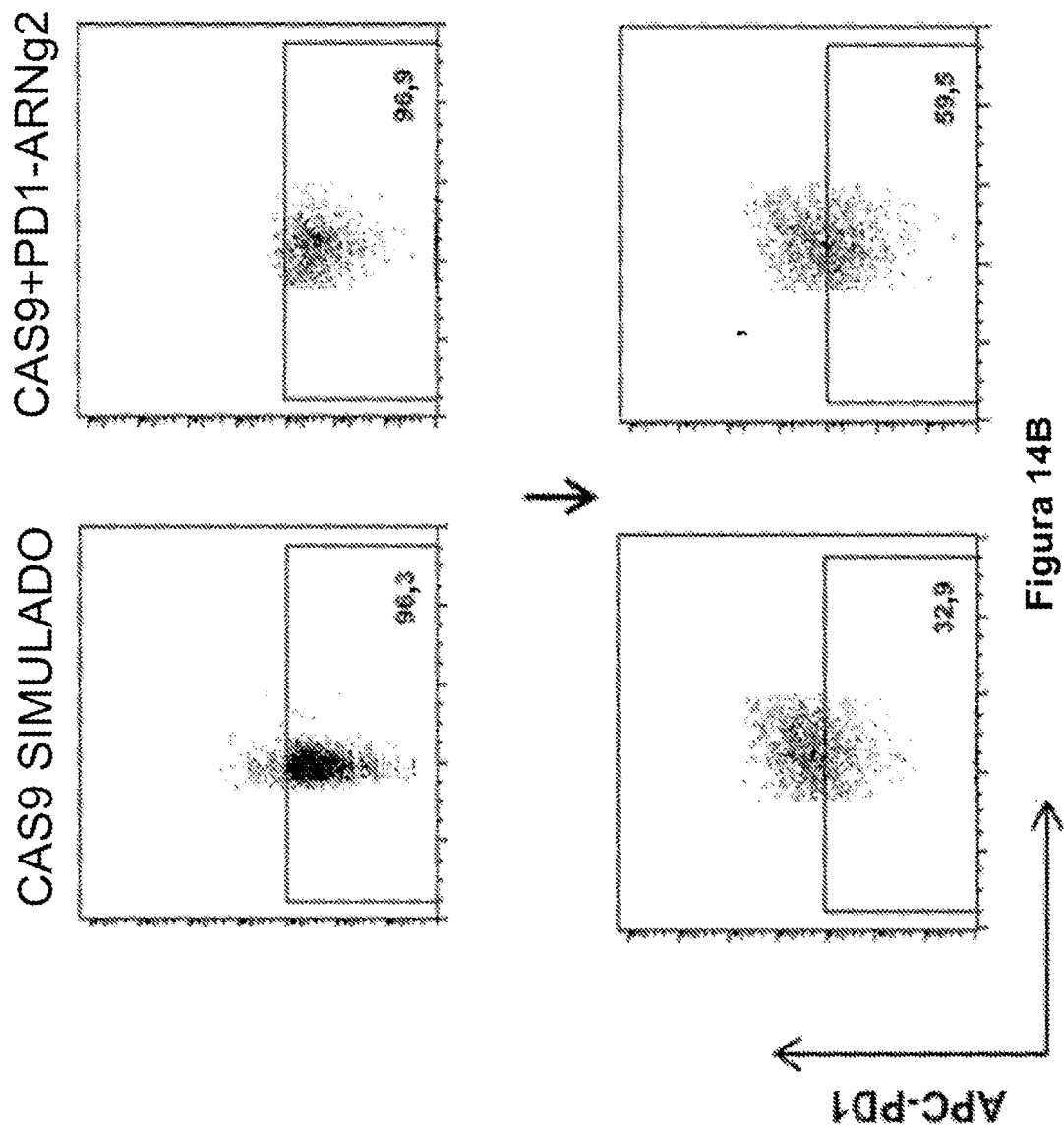


Figura 14A



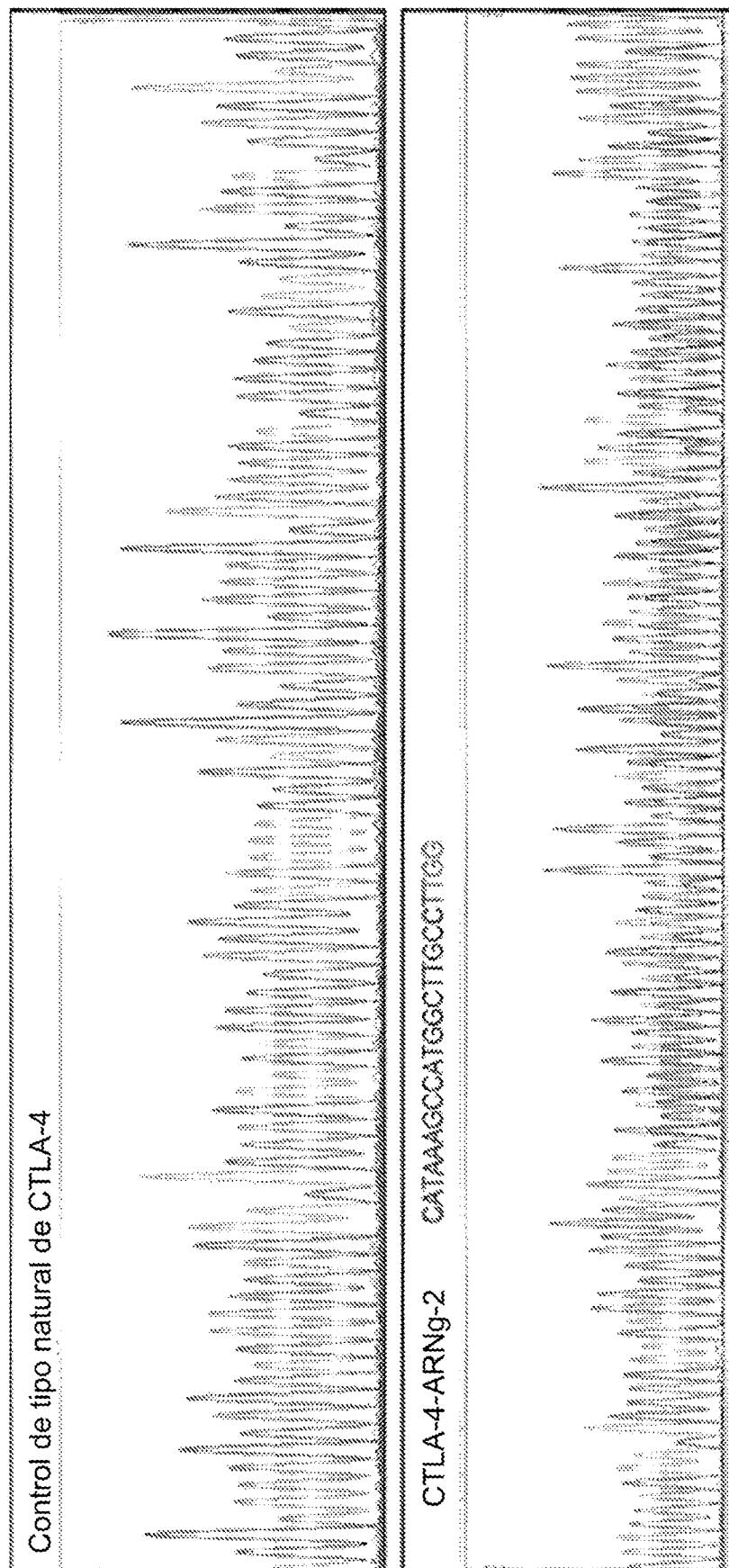


Figura 15A

```

WT   AACACCGGCTCCCATAAAGCCATGGCTTGCCCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
1   -5 AACACCGGCTCCCATAA-----TGGCTTGGCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
1   -2 AACACCGGCTCCCATAA--CCAATGGCTTGCCCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
2   -2 AACACCGGCTCCCATAA--CCAATGGCTTGCCCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
2   +1 AACACCGGCTCCCATAAAGTCCATGGCTTGCCCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
3   -1 AACACCGGCTCCCATAA--CCAATGGCTTGCCCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
3   -14 AACACCGGCTCCCATAAAG-----GGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
-7   -5 AACACCGGCTCCCATAA-----TGGCTTGGCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
-7   -5 AACACCGGCTCCCATAA-----TGGCTTGCCCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
10  -1 AACACCGGCTCCCATAA--CCAATGGCTTGCCCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
10  -3 AACACCGGCTCCCATAA-----CCAATGGCTTGCCCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
11  -5 AACACCGGCTCCCATAA-----TGGCTTGGCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT
11  -0 AACACCGGCTCCCATAAAGCCATGGCTTGCCCTTGGATTTCAGCGGCACAAAGGCTCAGCTGAAACCT

```

Figura 15B

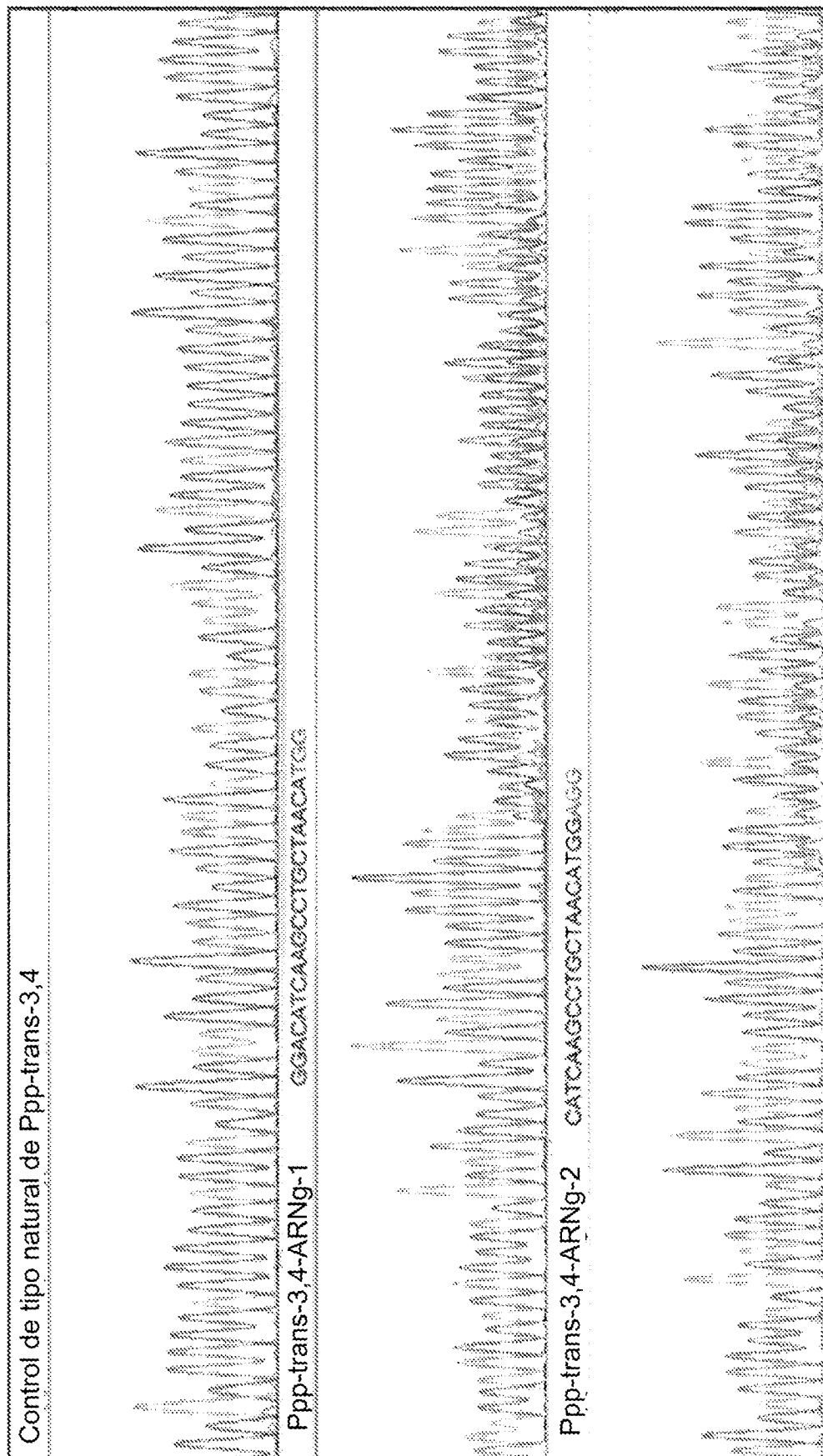
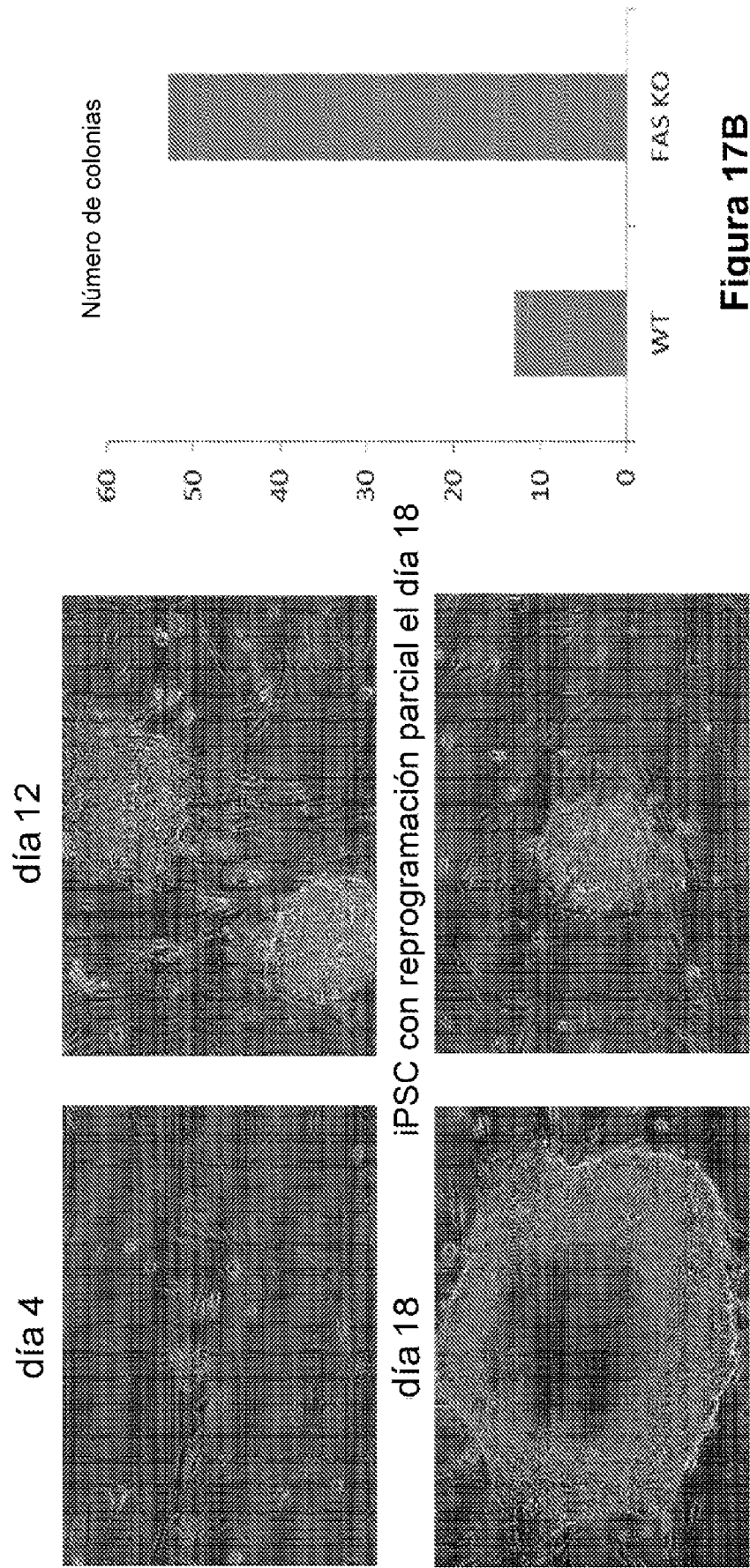
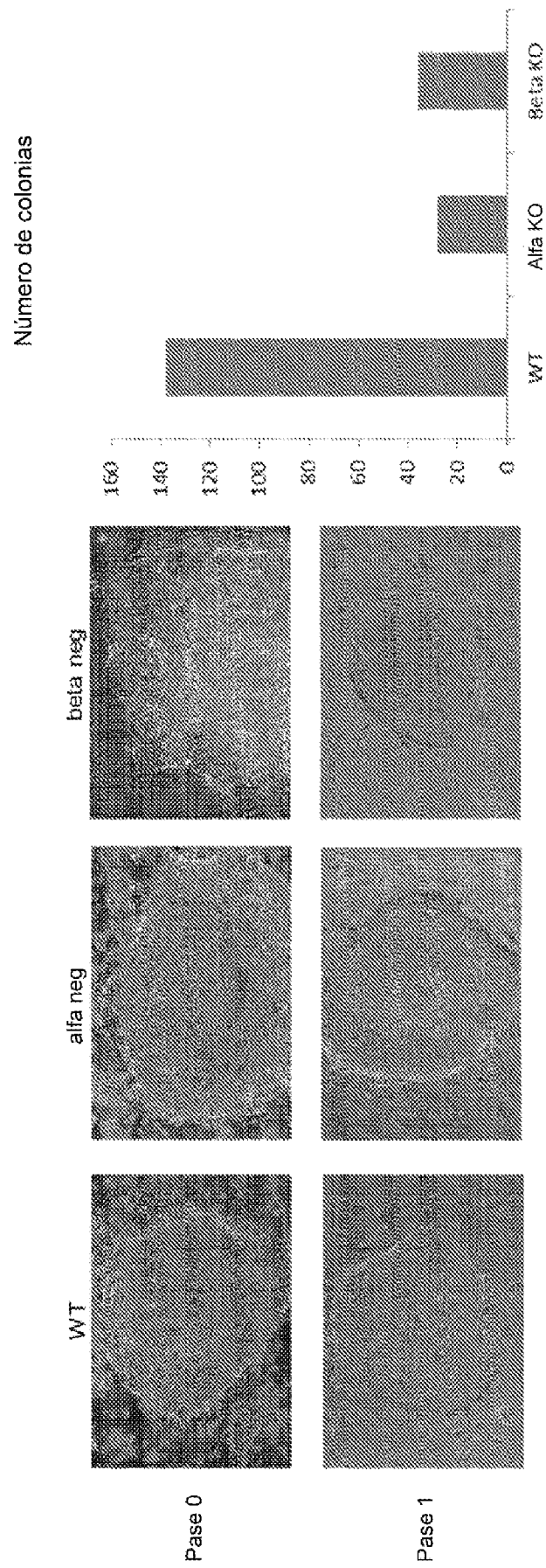
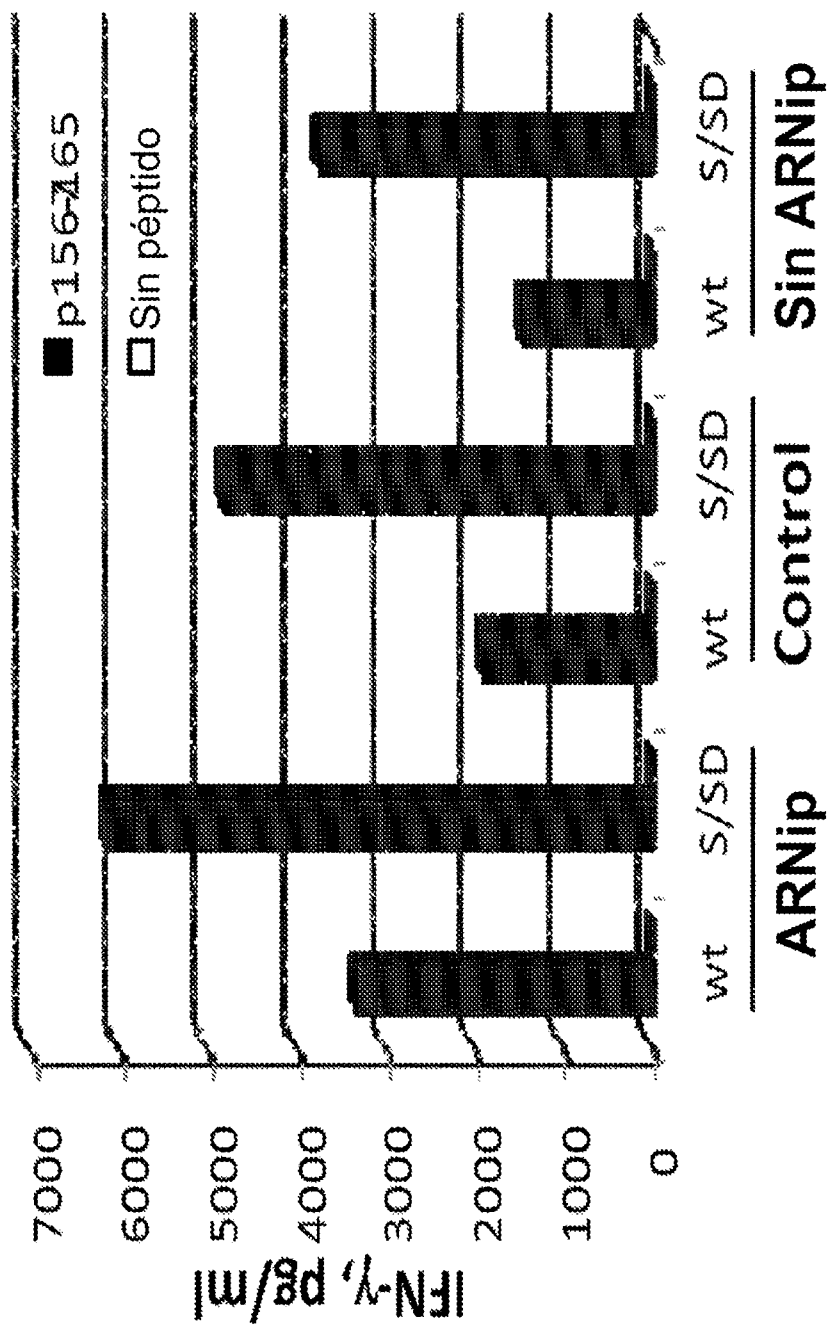


Figura 16









Wt: TCR de tipo natural

S/SD: Segundo enlace disulfuro alfa/Segundo enlace disulfuro+Des-N-glucosilación beta

Figura 19

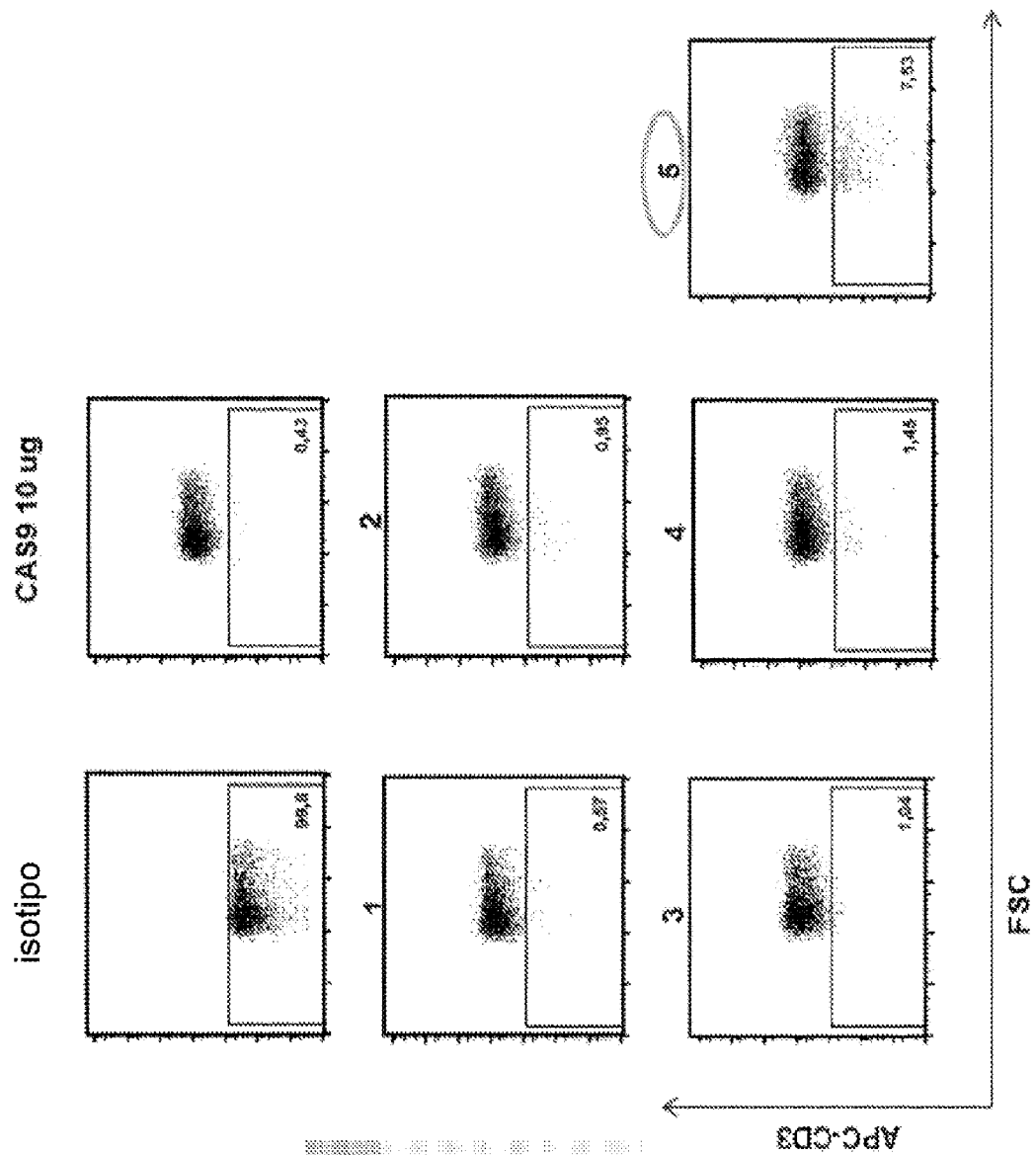


Figura 20B

	CAS9	Dosis	ARNq	Dosis
1	CAS9	2 ug	TRAC7	1 ug
2	CAS9	4 ug	TRAC7	2 ug
3	CAS9	8 ug	TRAC7	4 ug
4	CAS9	10 ug	TRAC7	5 ug
5	CAS9	20 ug	TRAC7	10 ug

Figura 20A

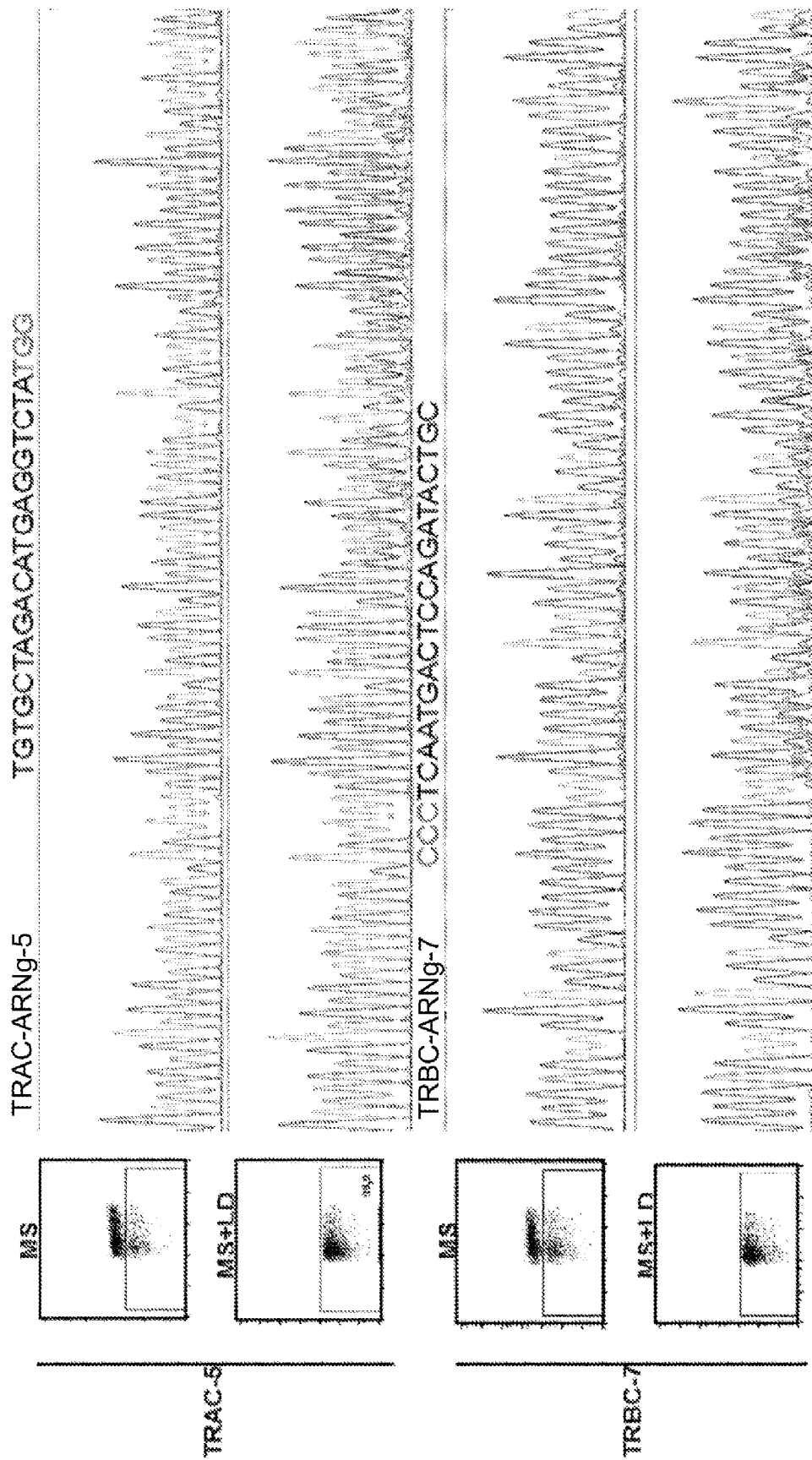


Figura 21

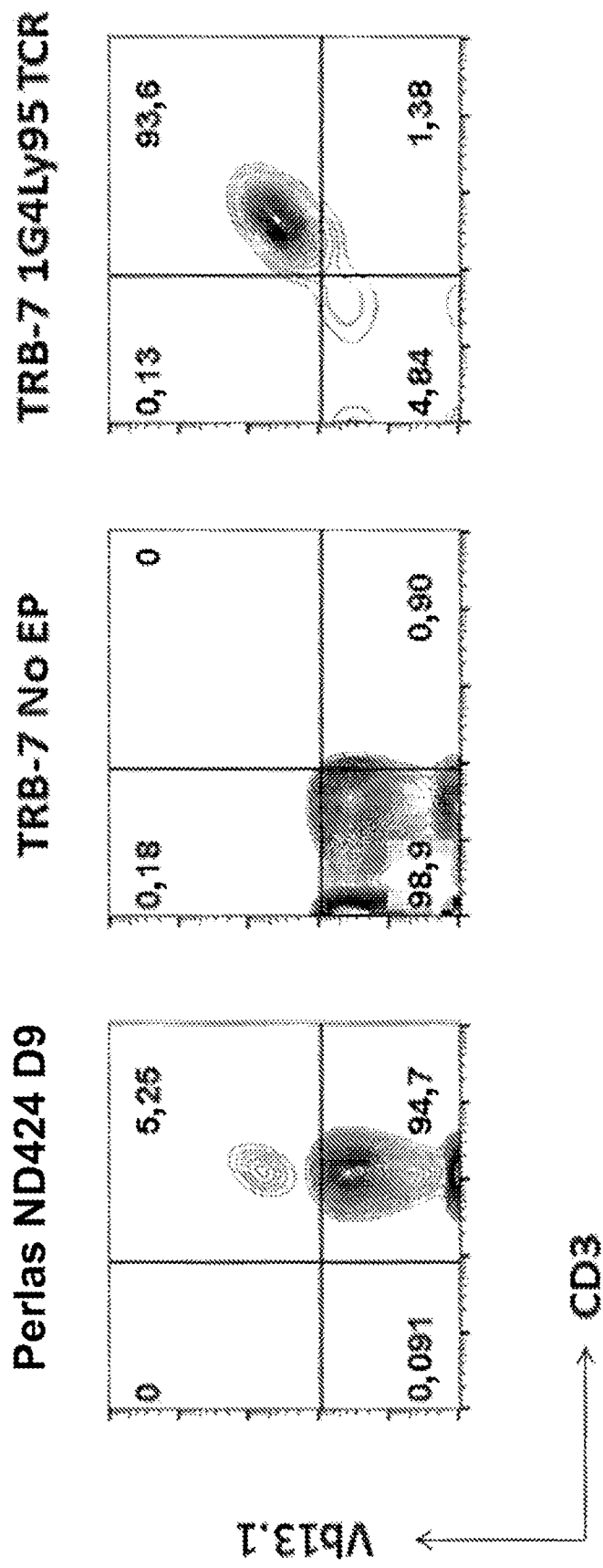
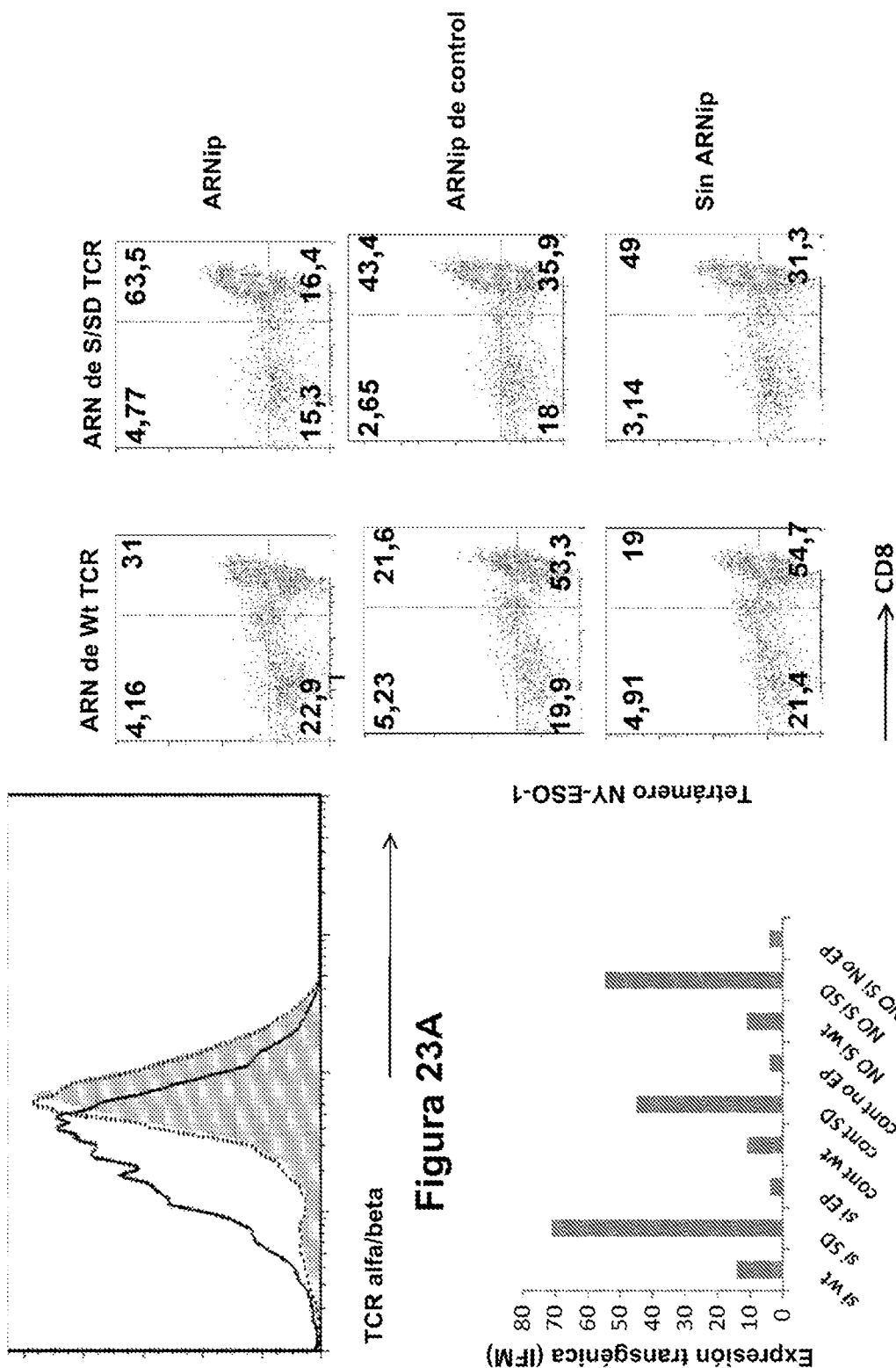


Figura 22



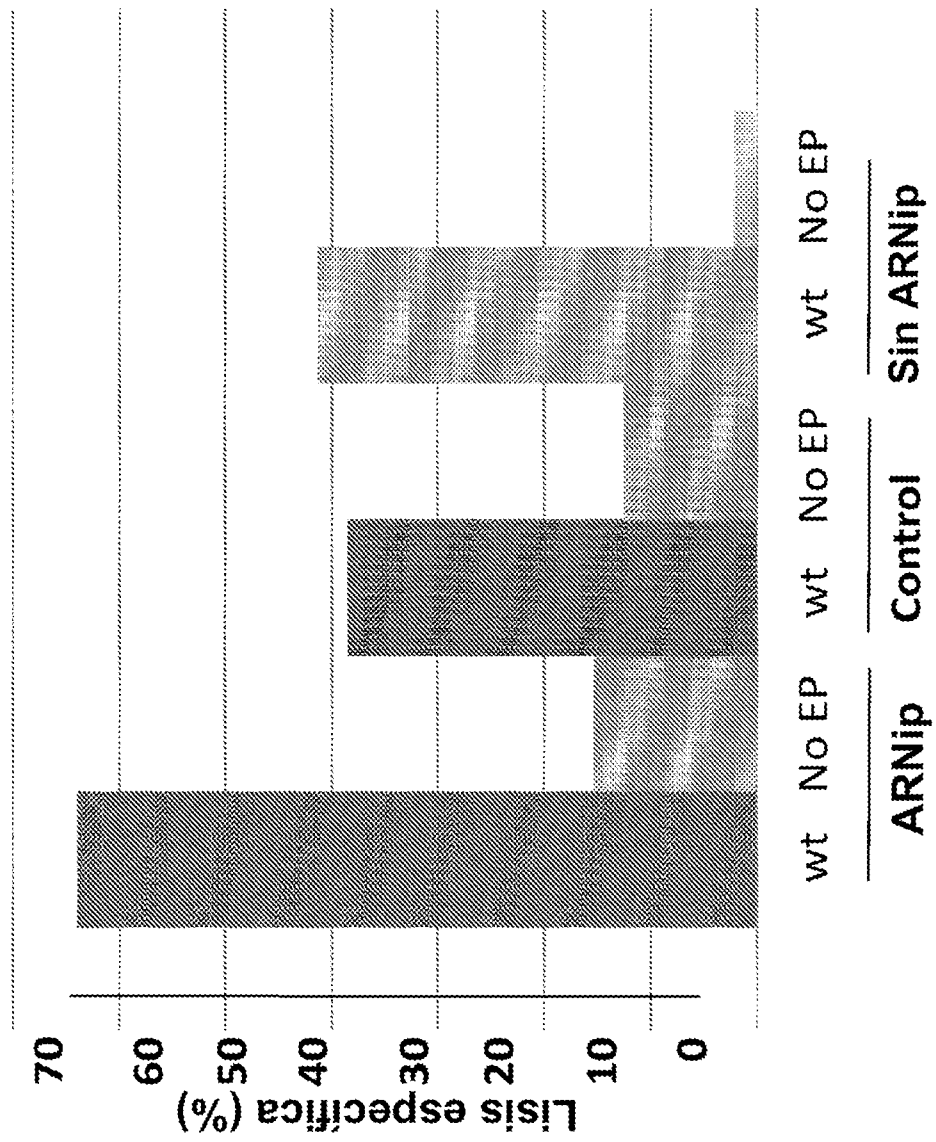


Figura 23D

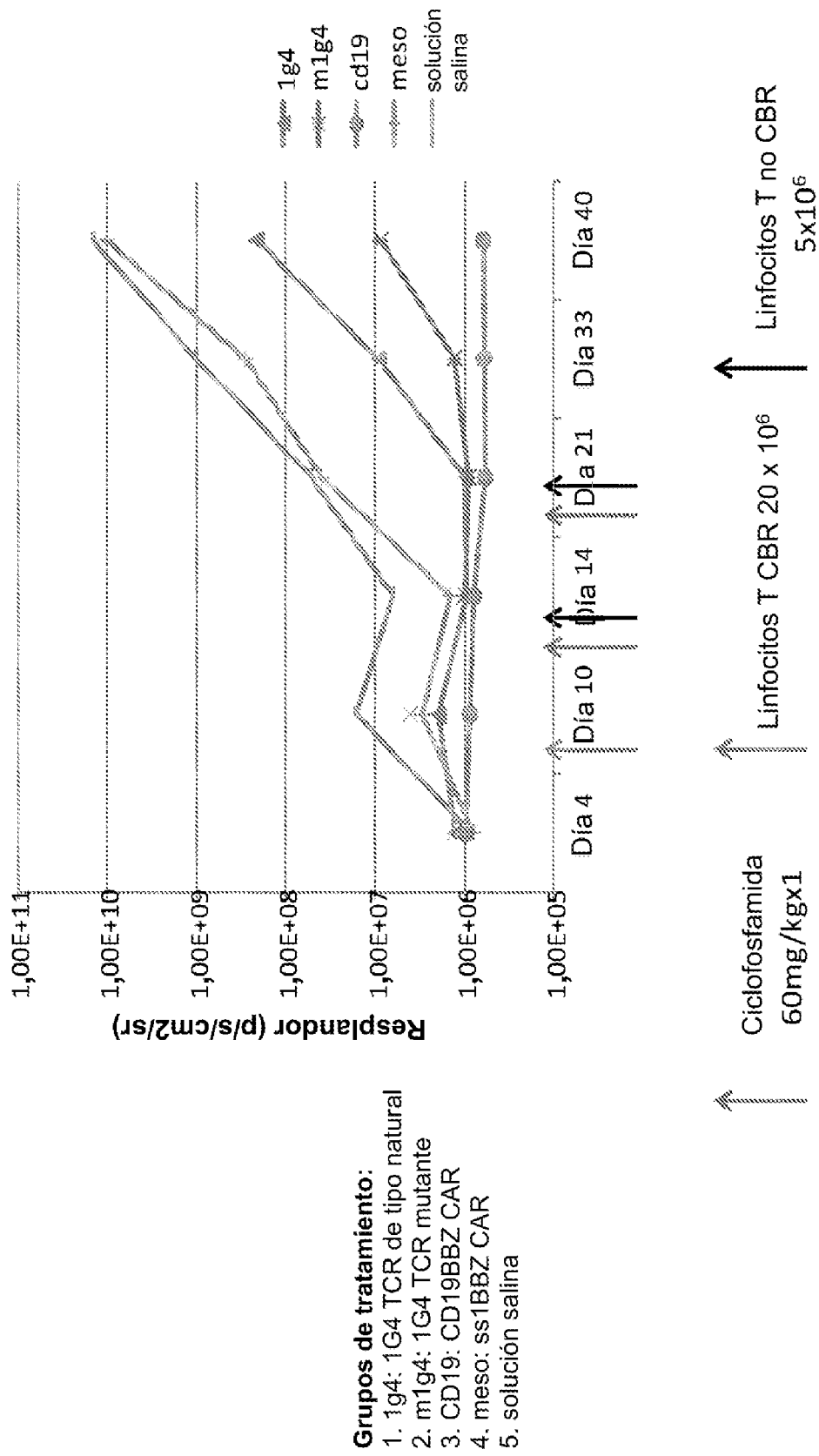
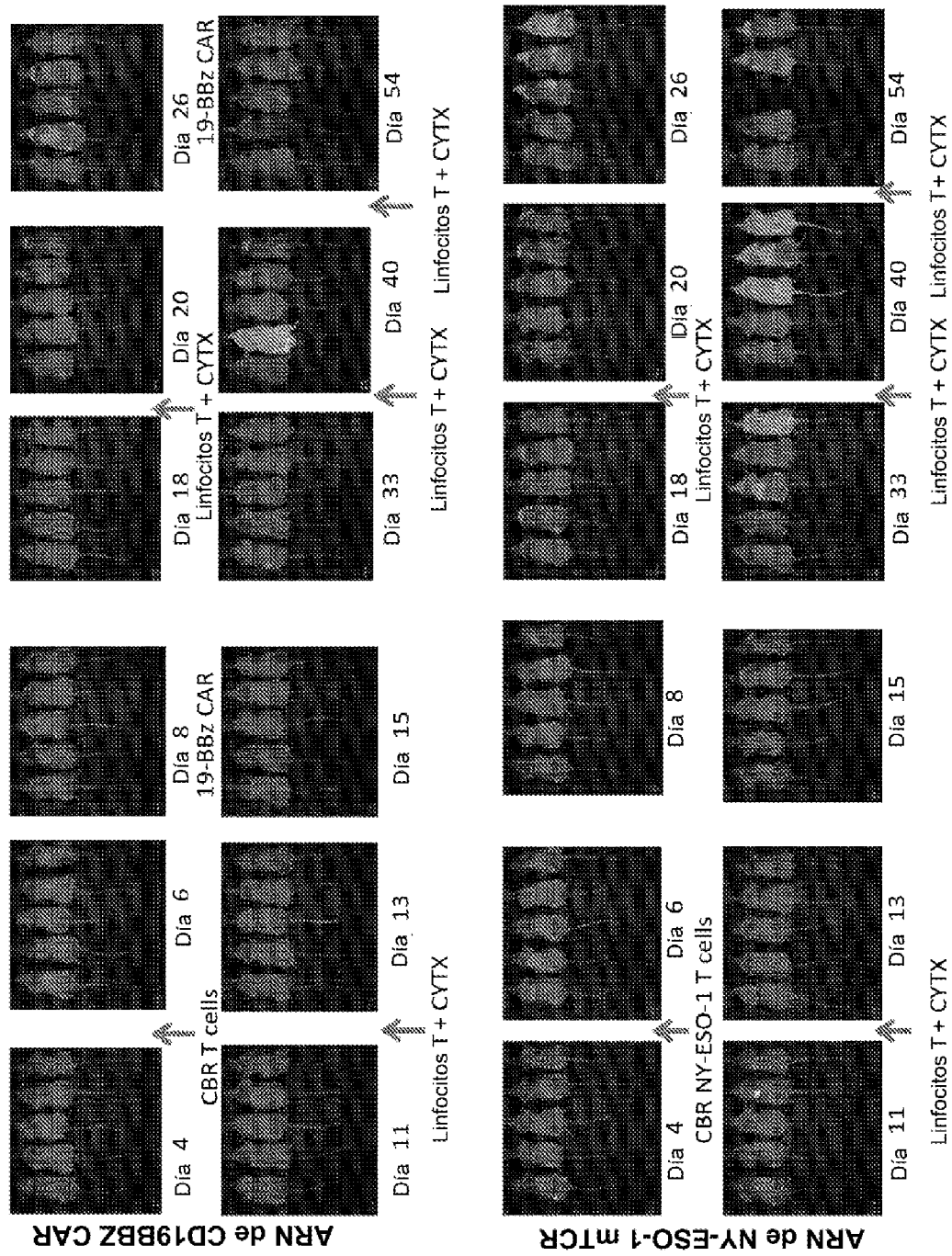


Figura 24



**Figura 25**



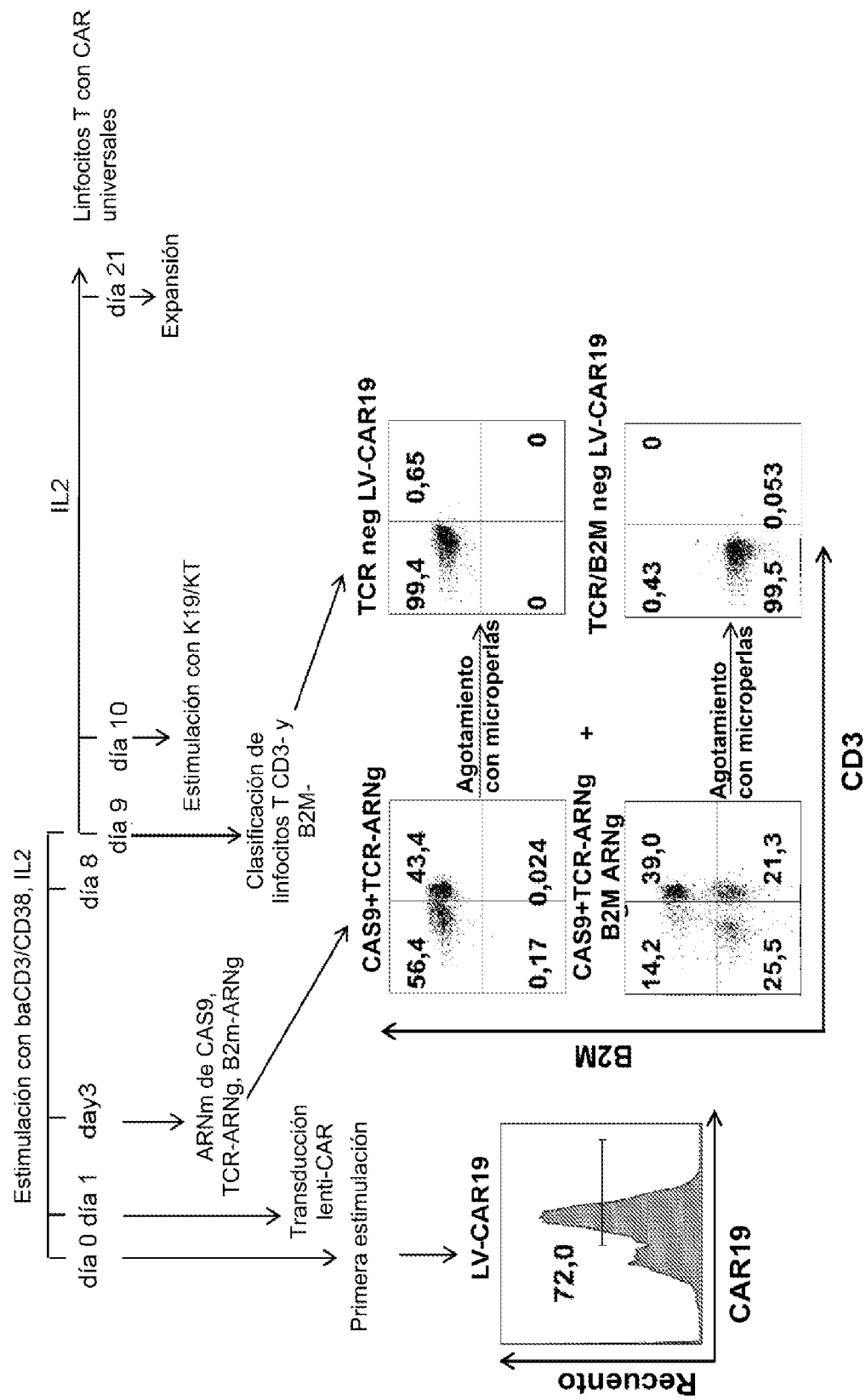


Figura 26

Factor de aumento	día 0	día 3	día 5	día 7	día 9	día 11	N.º final
NT	1	2	6	17	38	64	320
LV-GFP	1	3	6	16	38	66	330
LV-CAR19	1	3	8	23	45	113	1700
TCR neg LV-CAR19	1	4	6	16	38	77	2300
TCR/B2M LV-CAR19	1	3	6	19	39	99	1680

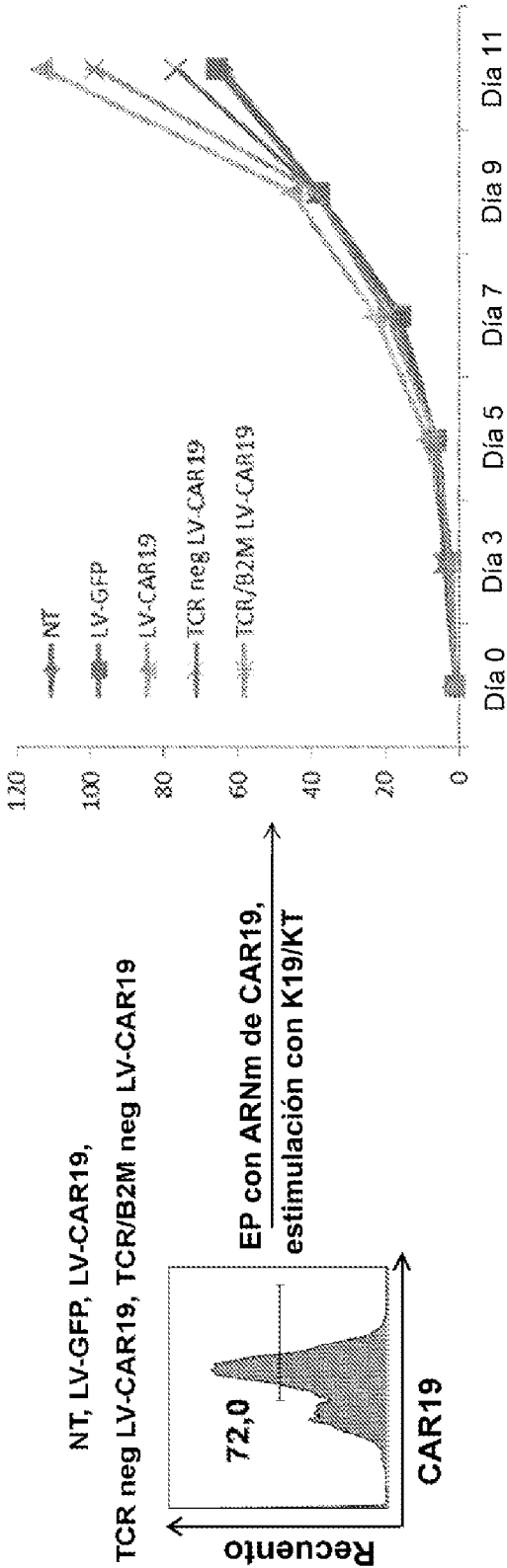
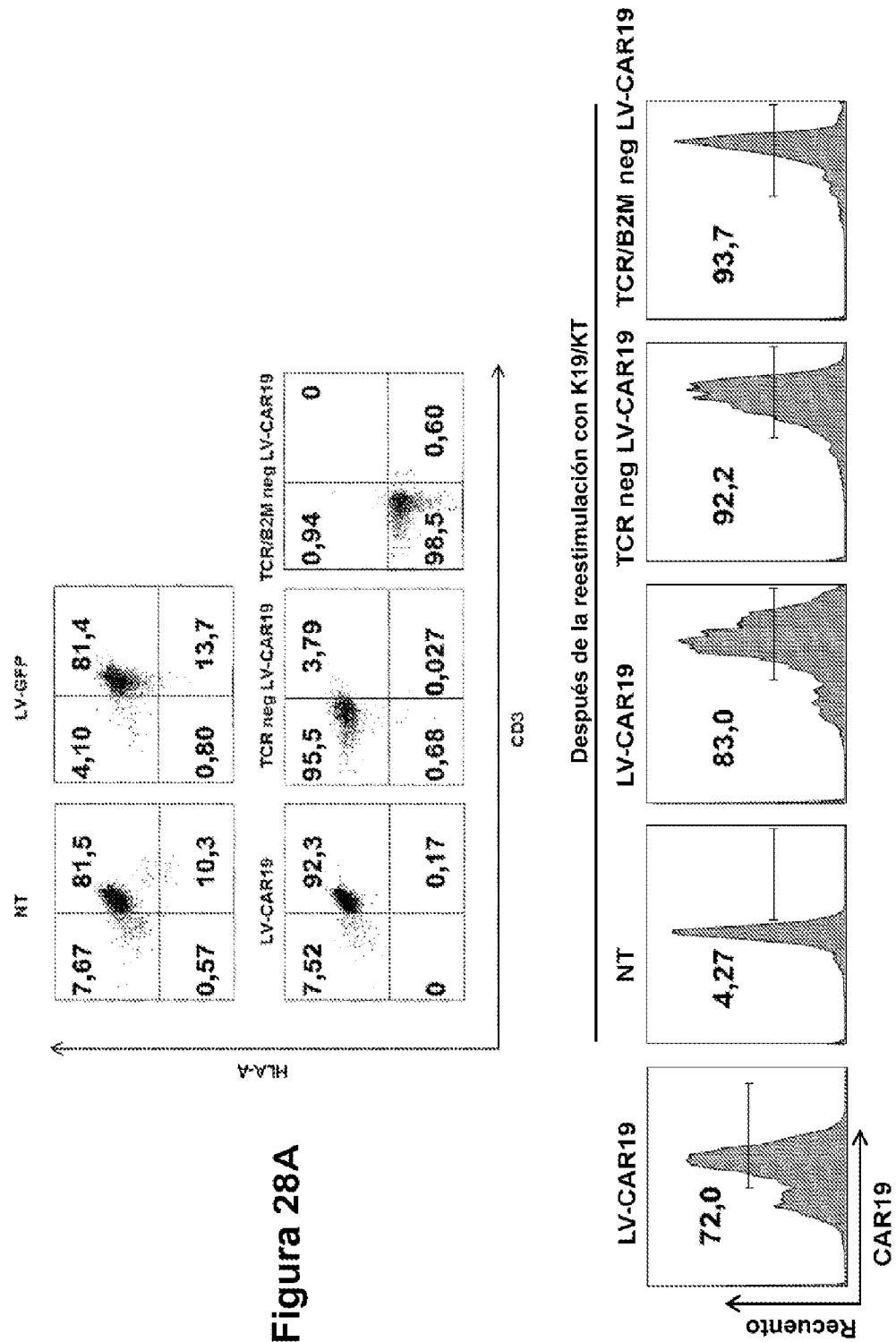


Figura 27



**Figura 28B**

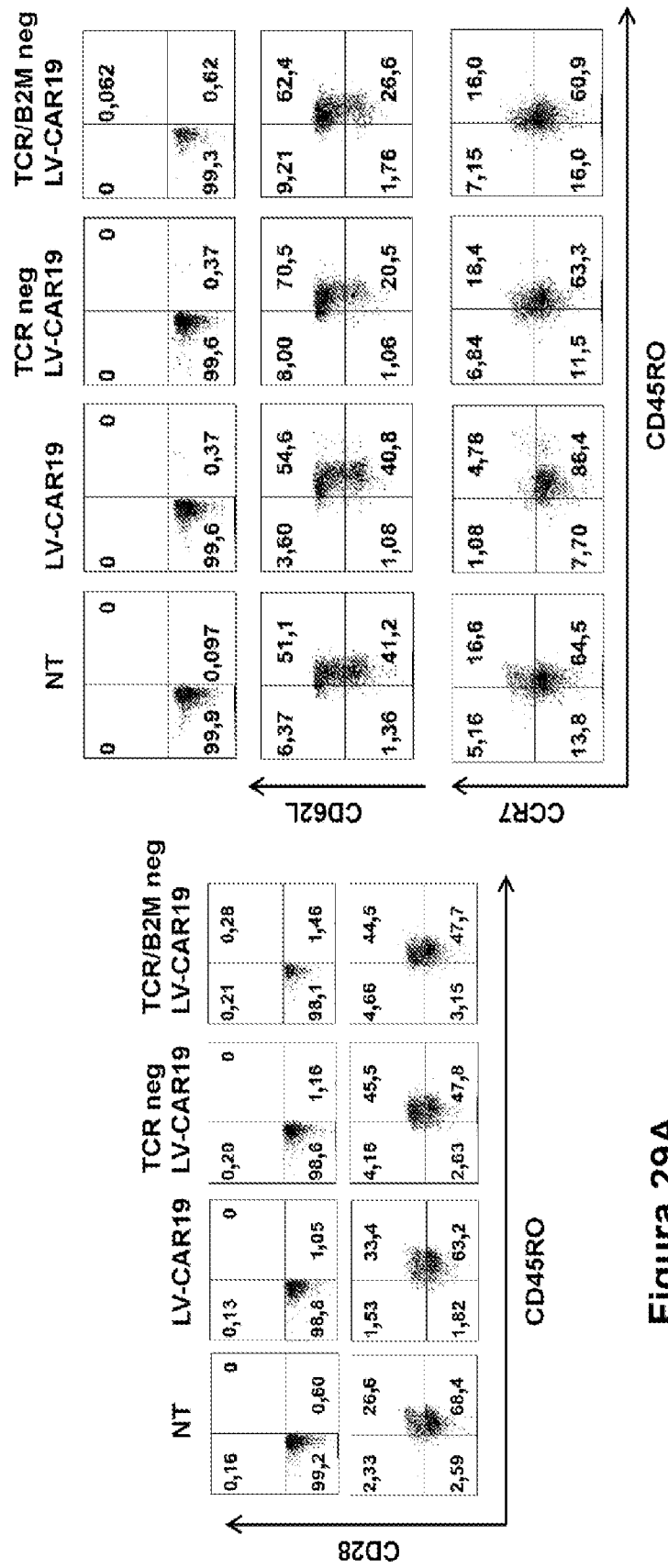
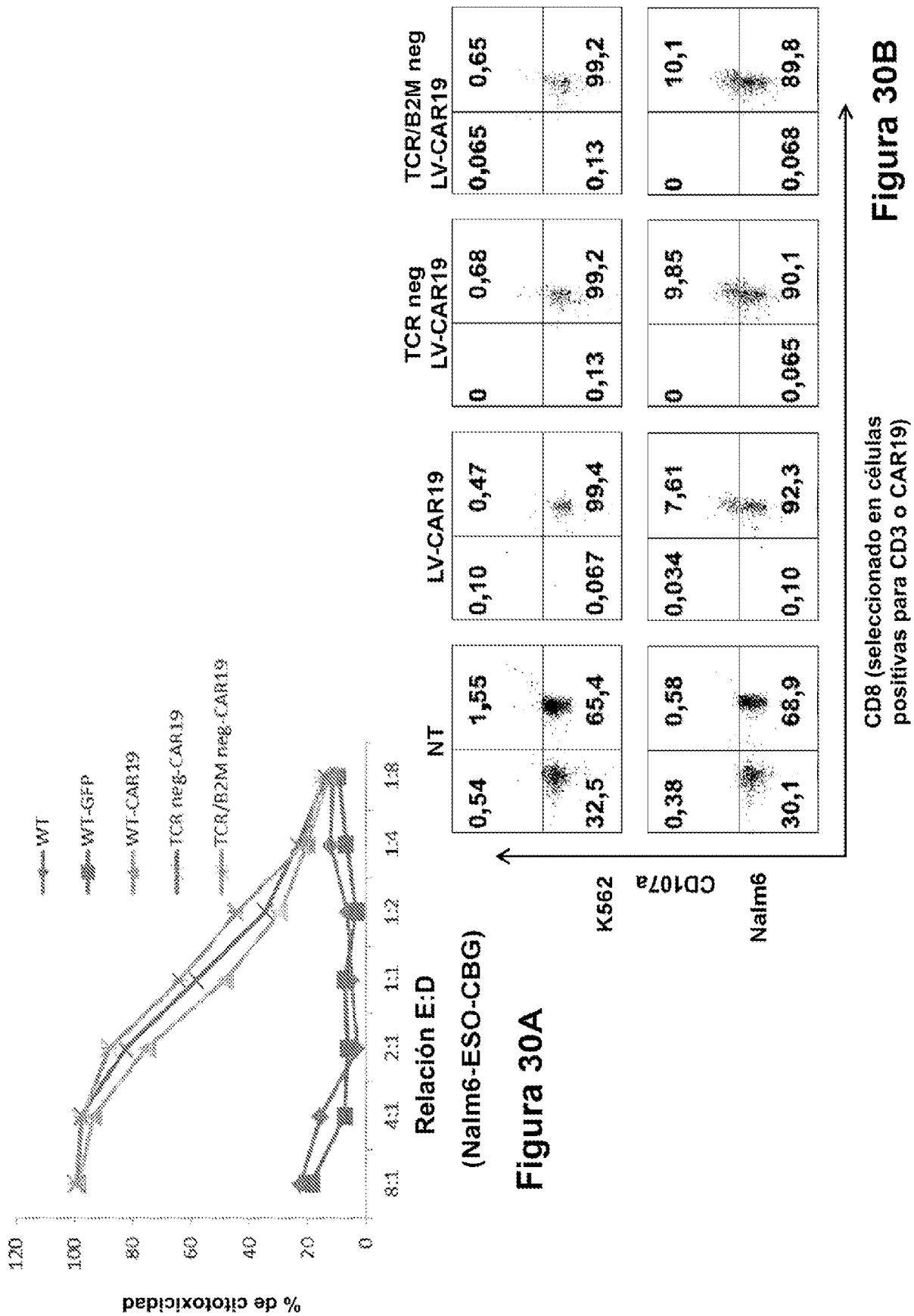


Figura 29A

Figura 29B



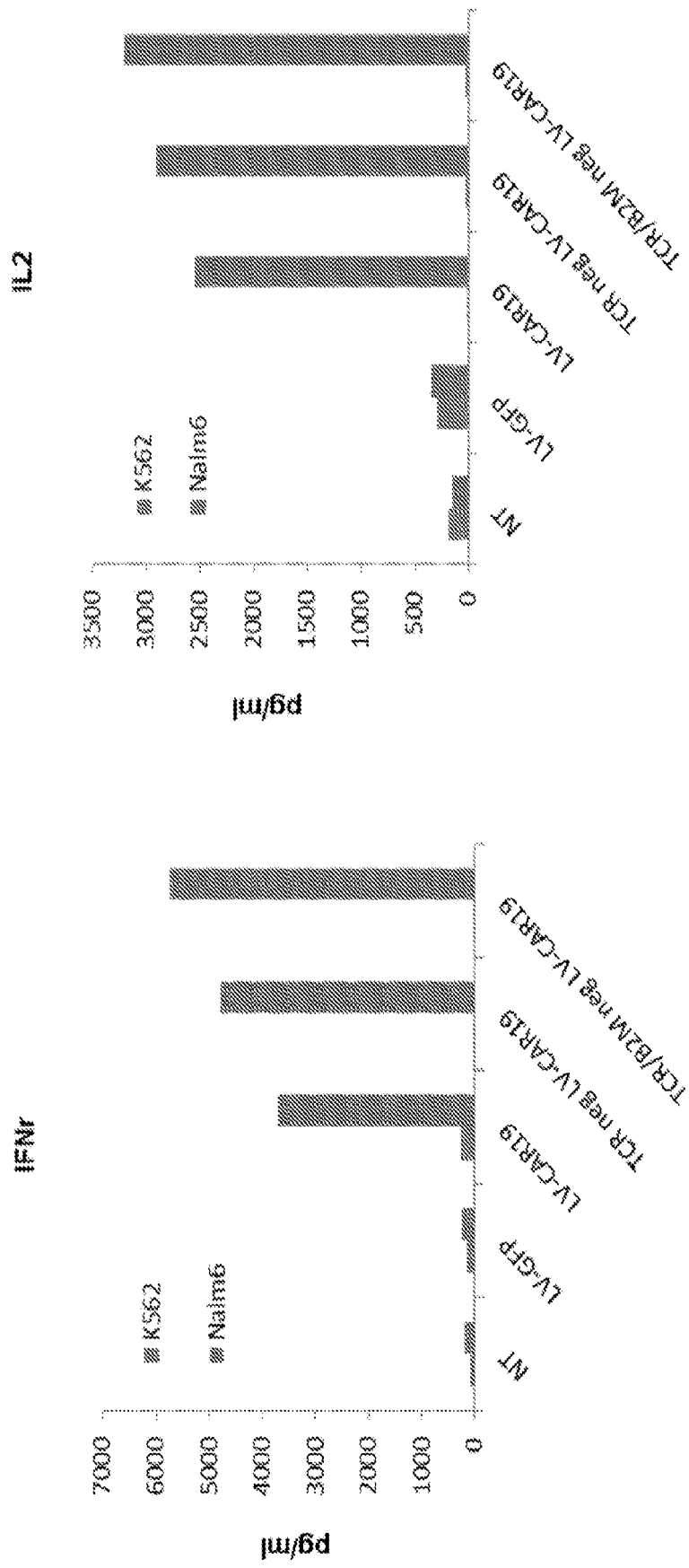
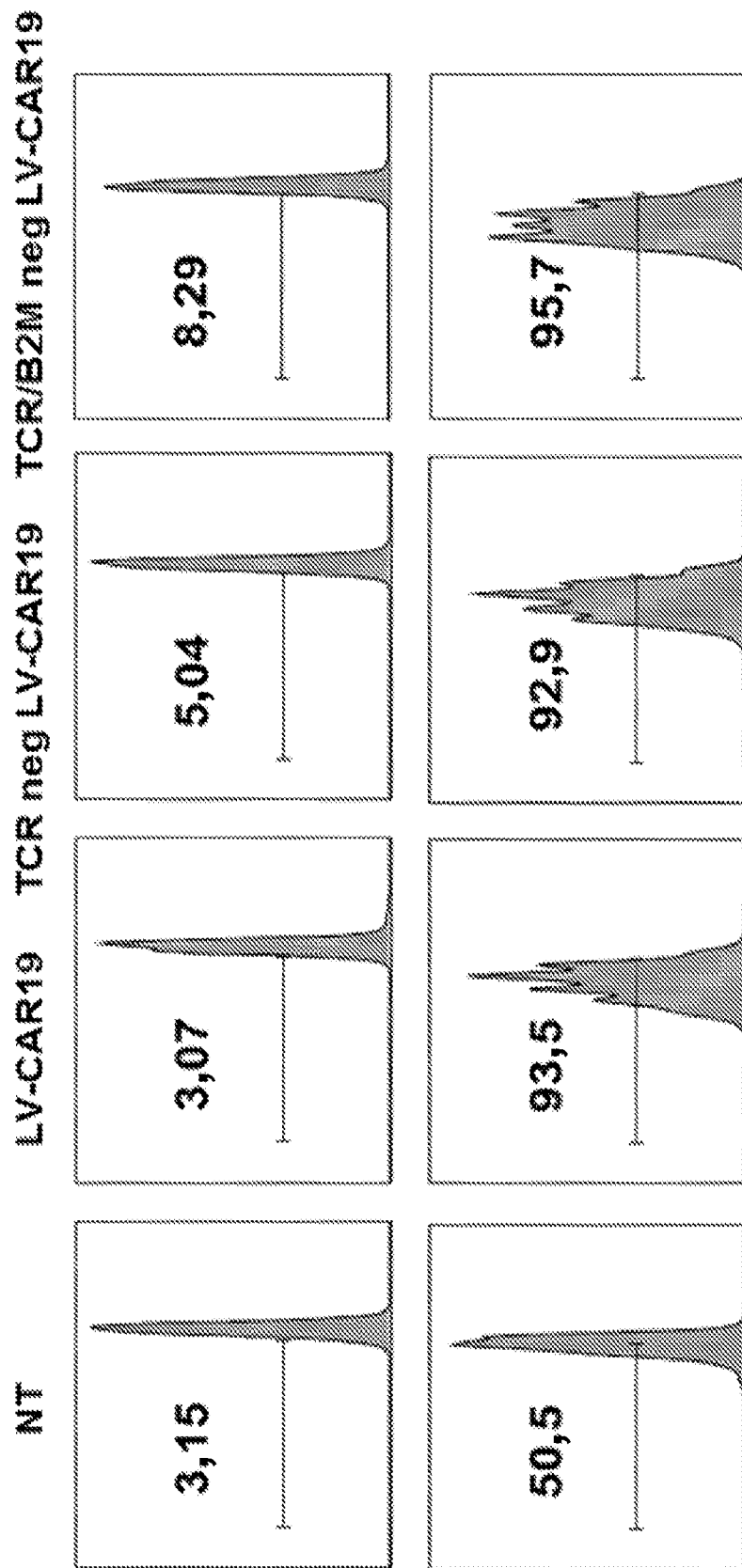


Figura 30C



La relación E:D es 1:2

**Figura 30D**

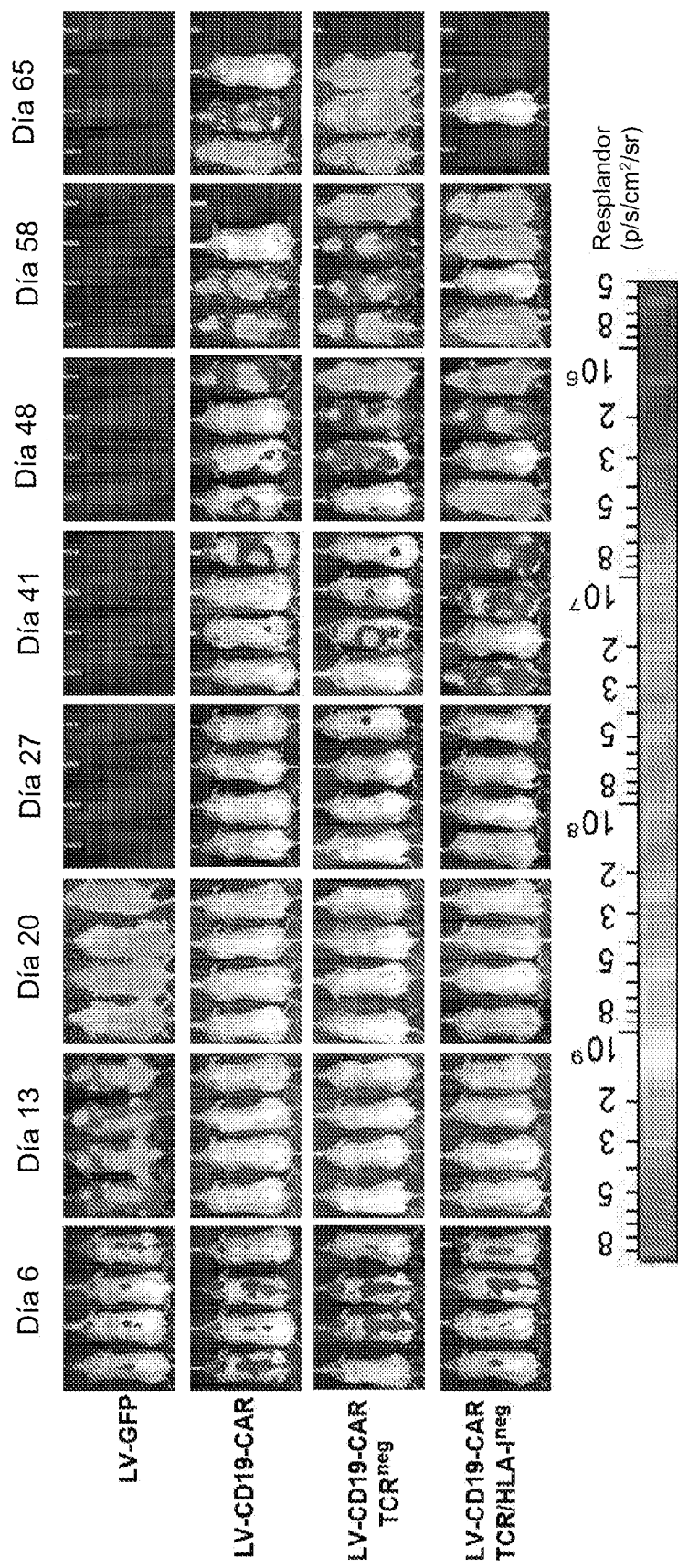


Figura 31



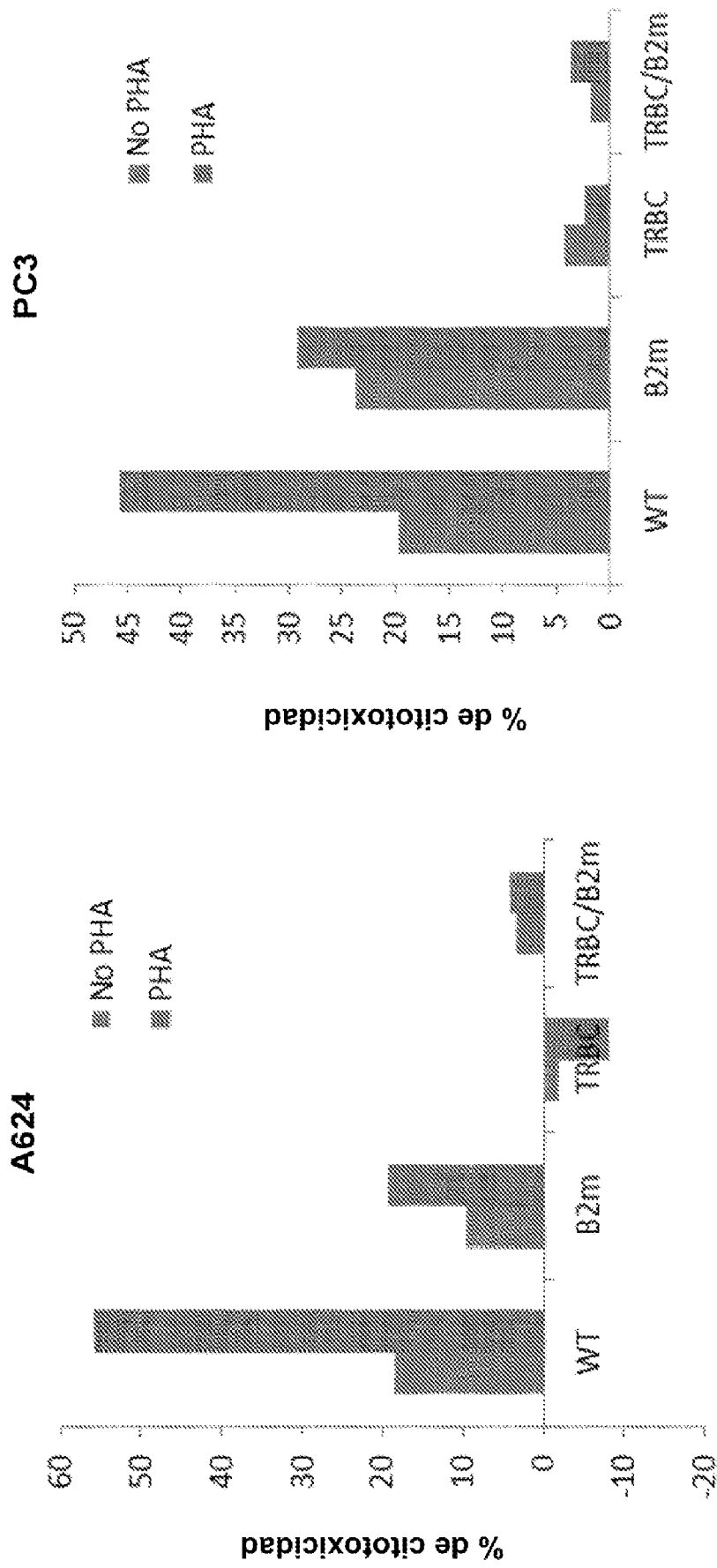


Figura 32A

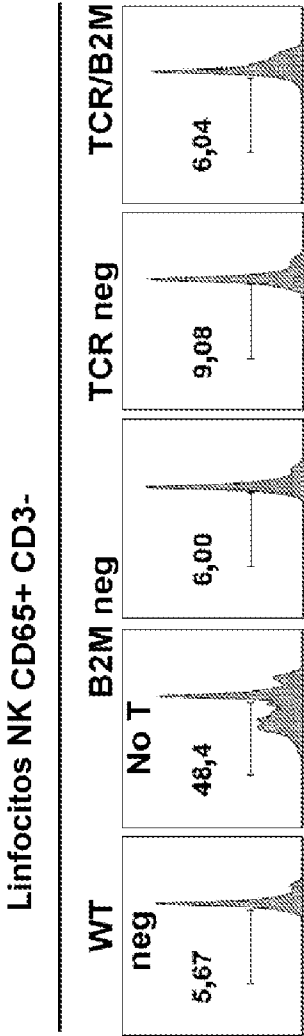


Figura 32B

PBMC diana:alógenas

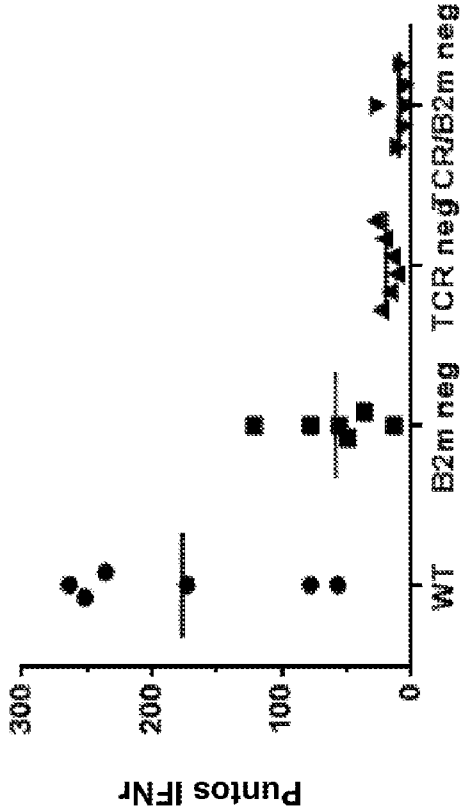


Figura 32C

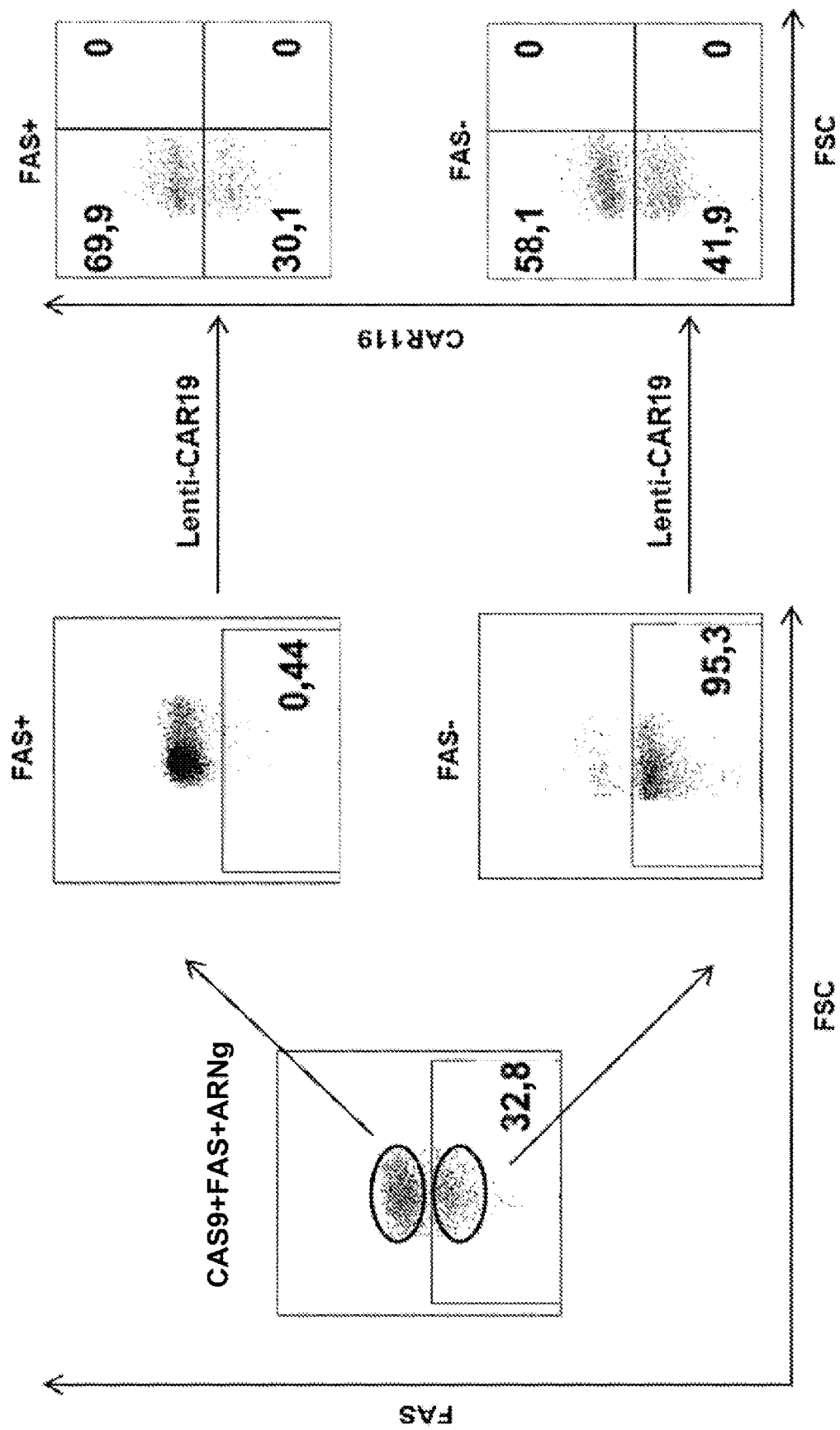


Figura 33

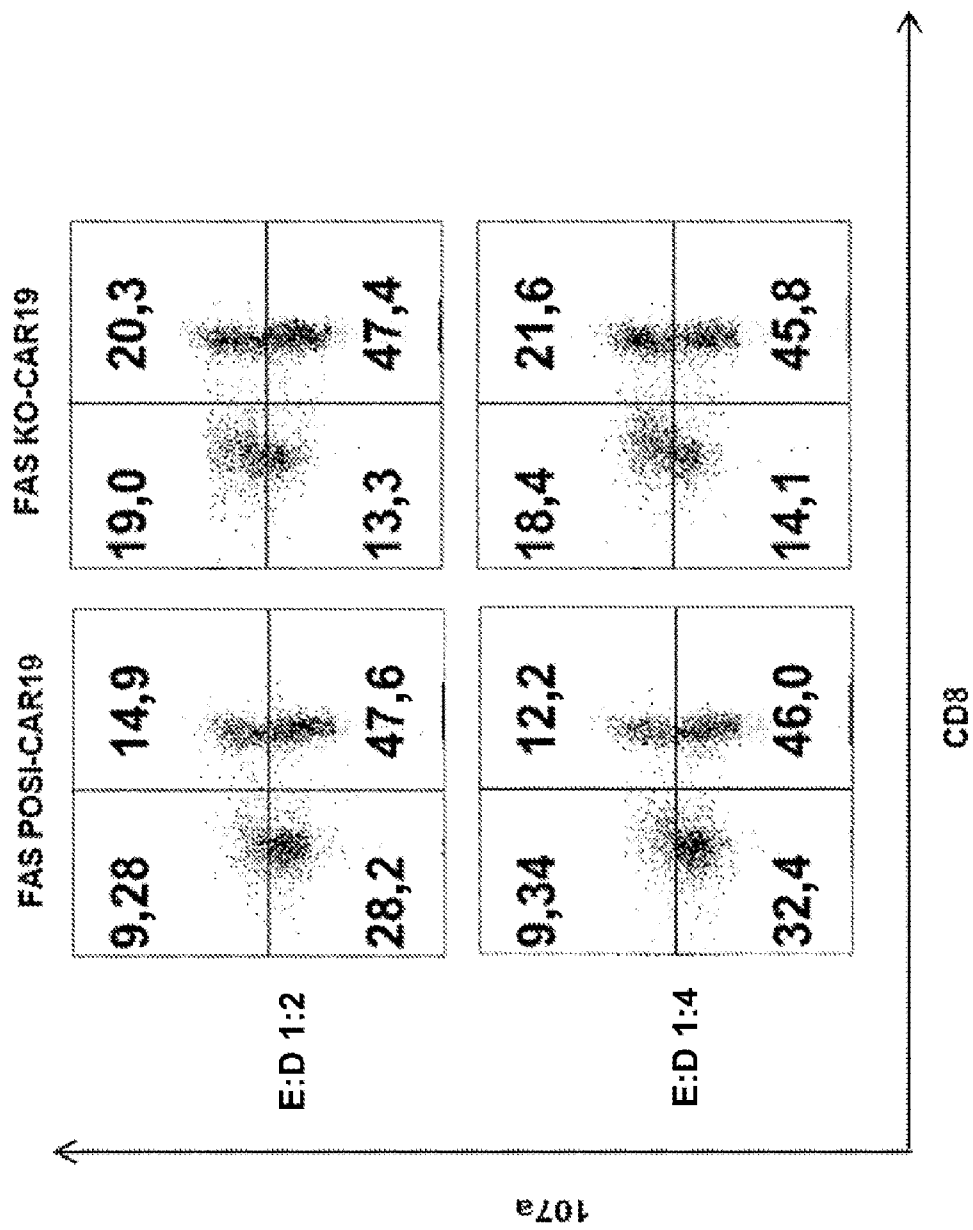
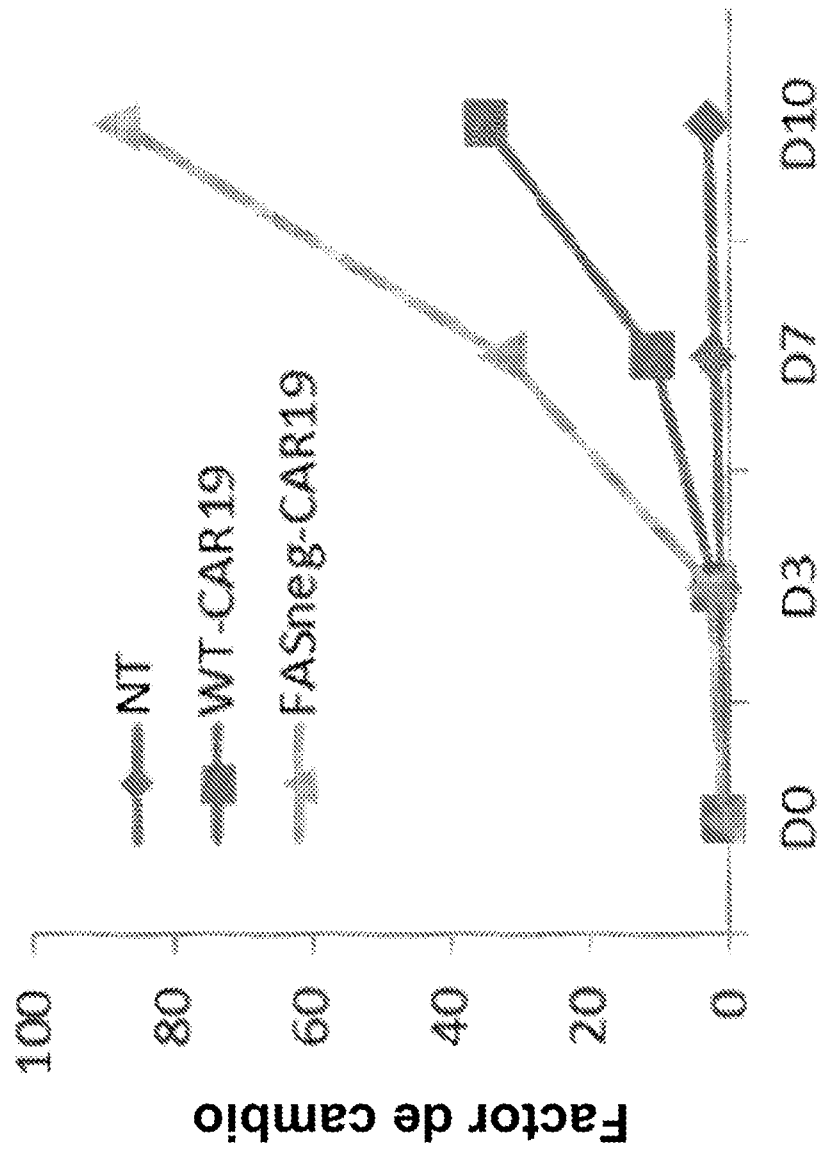
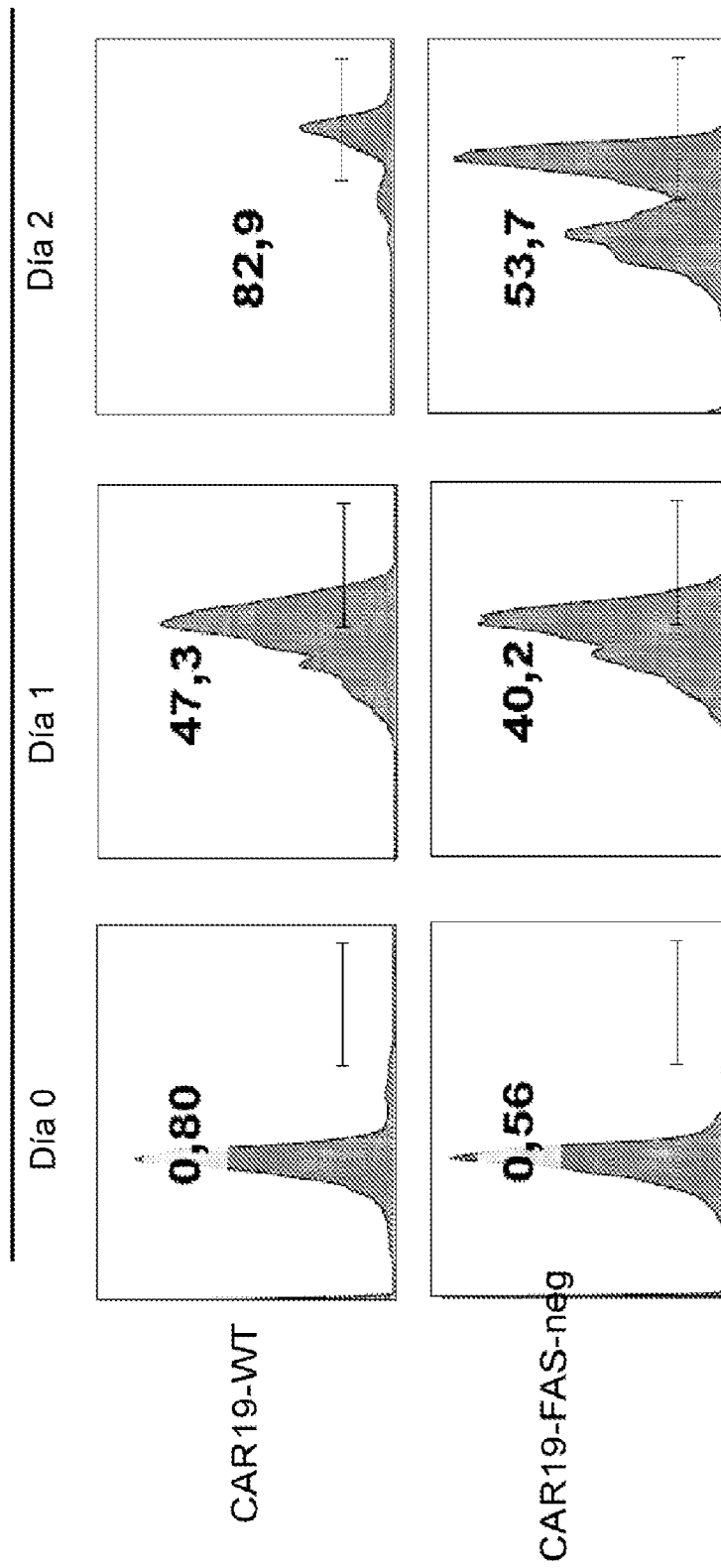


Figura 33 Continuación

**Cocultivo con K562-CD19****Figura 34A**

**Anexina V**



**Figura 34B**

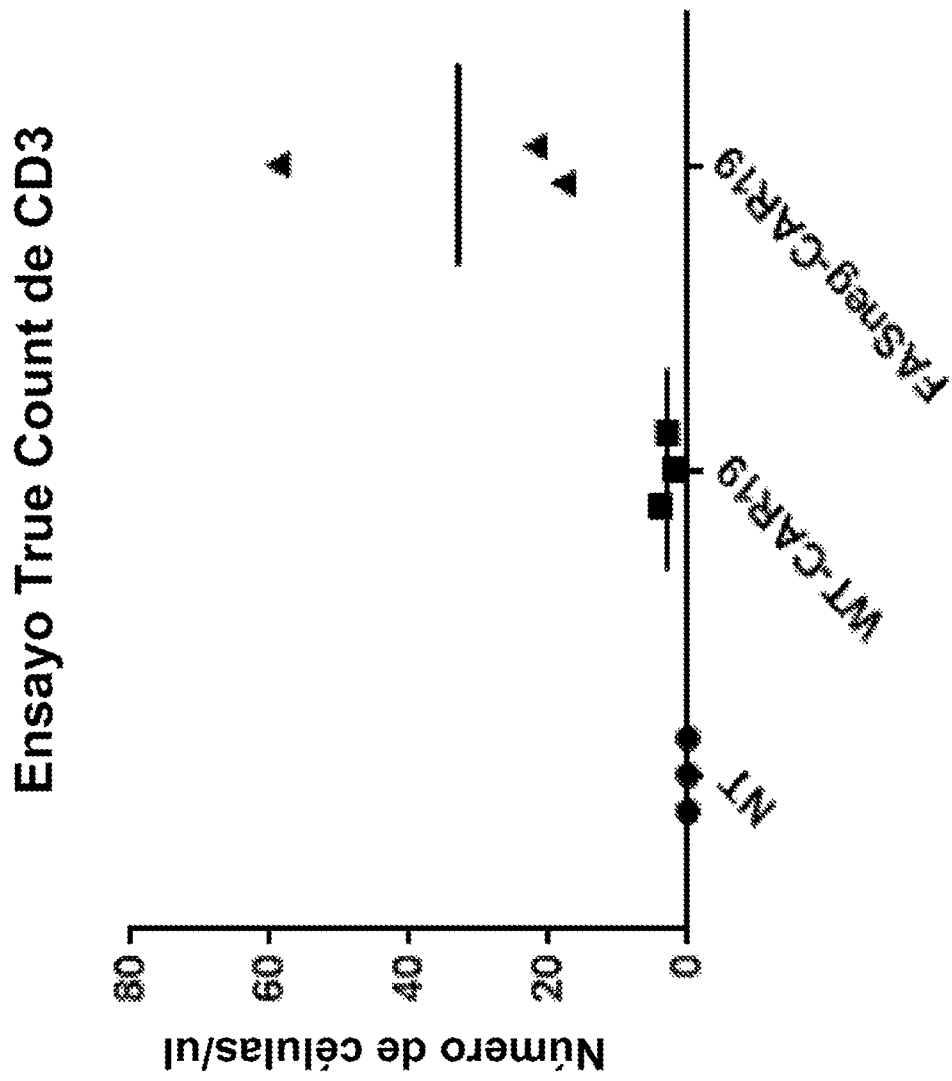
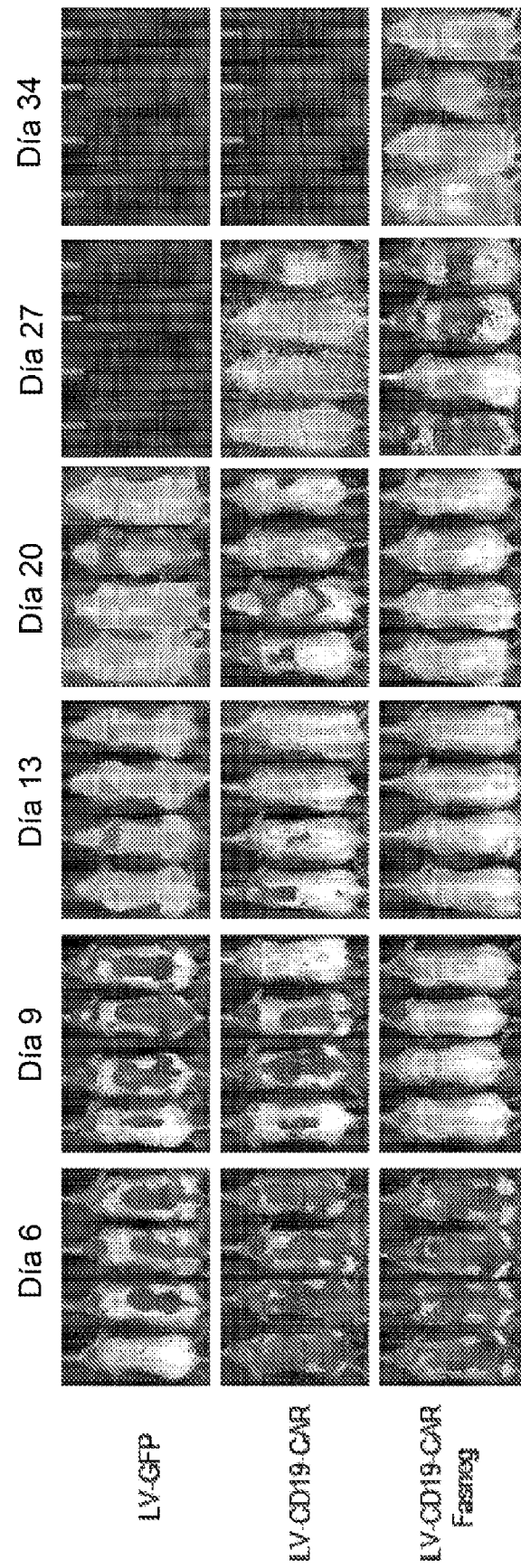


Figura 35A



**Figura 35B**



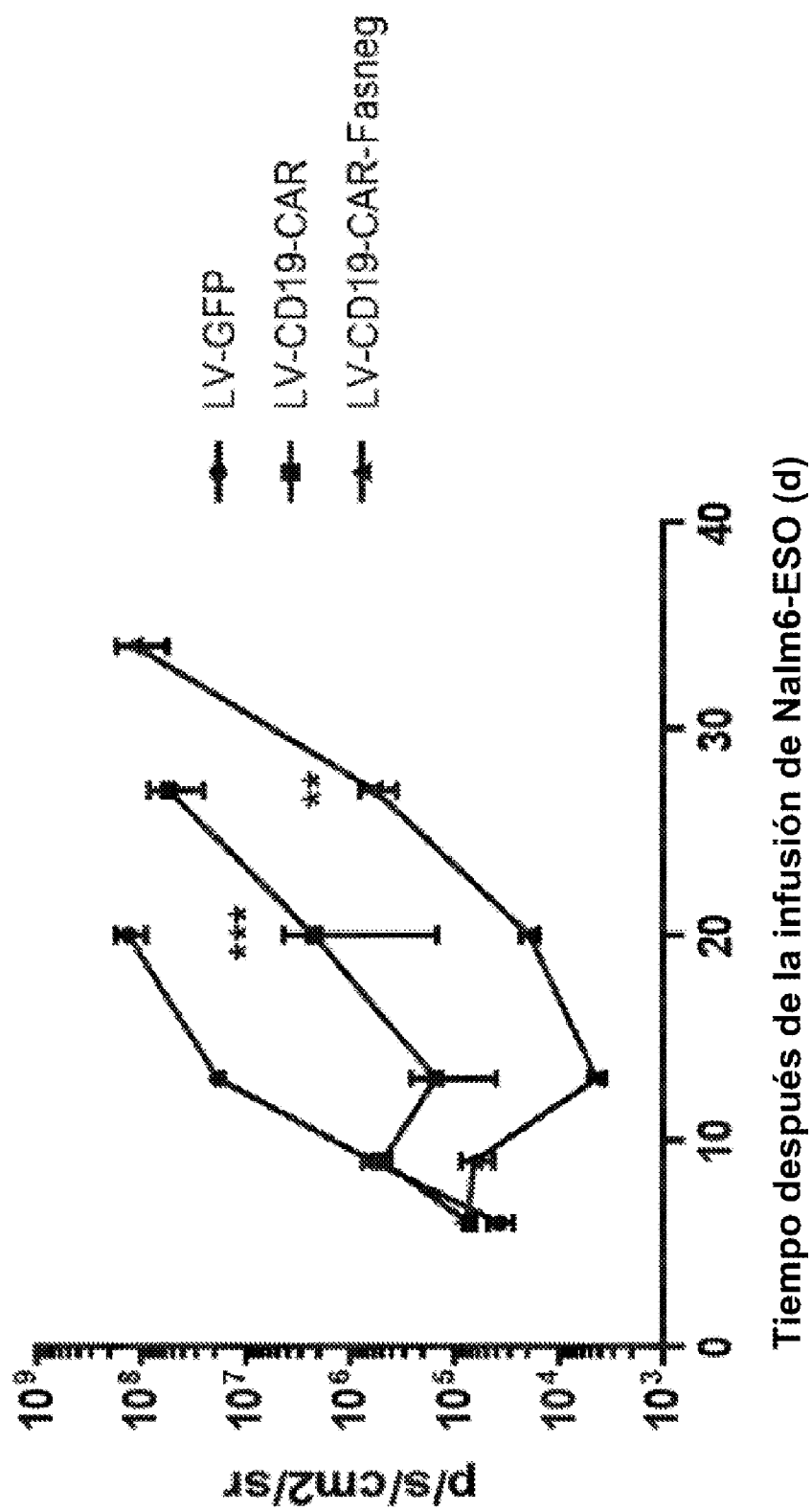


Figura 35C

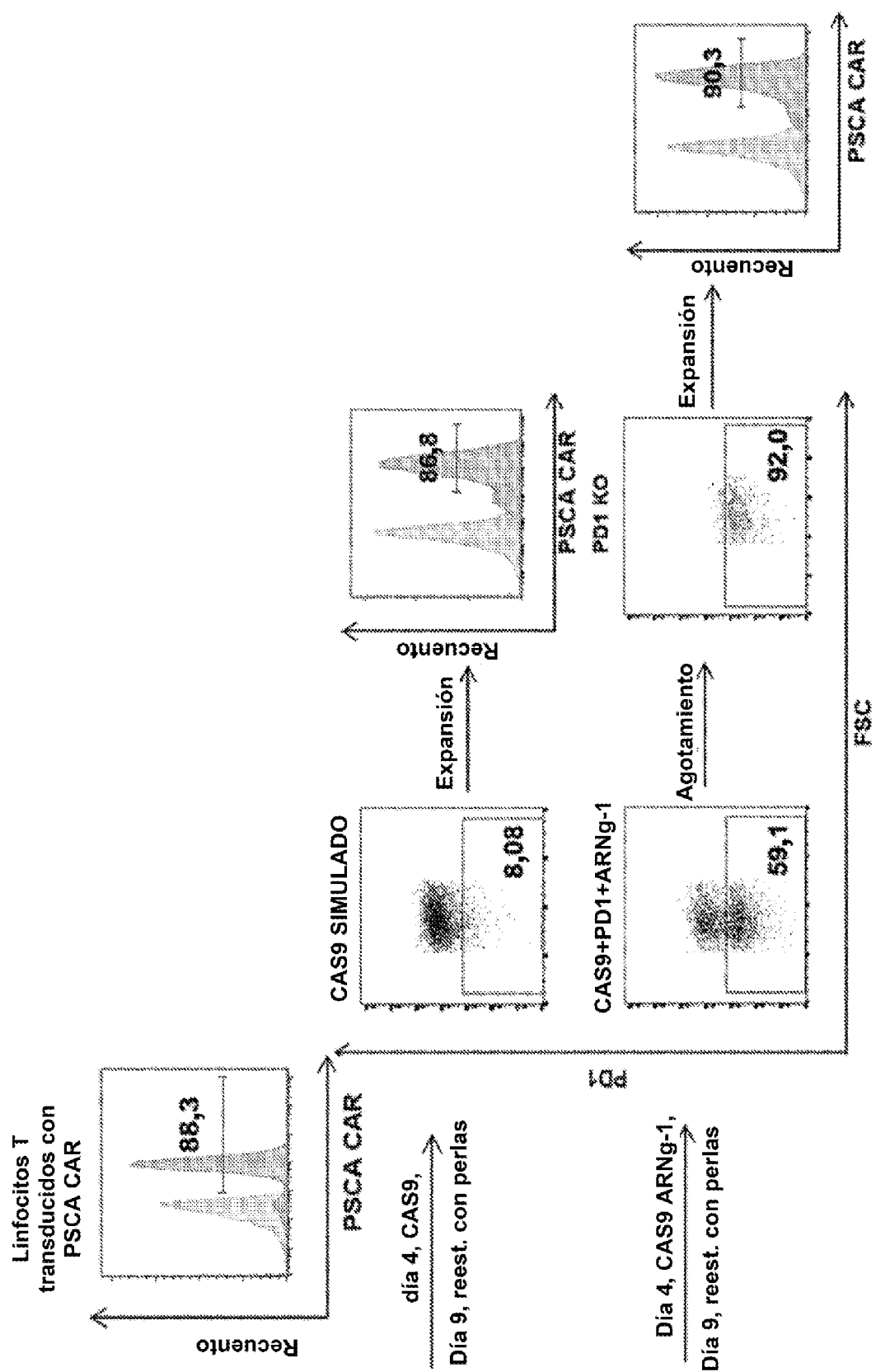
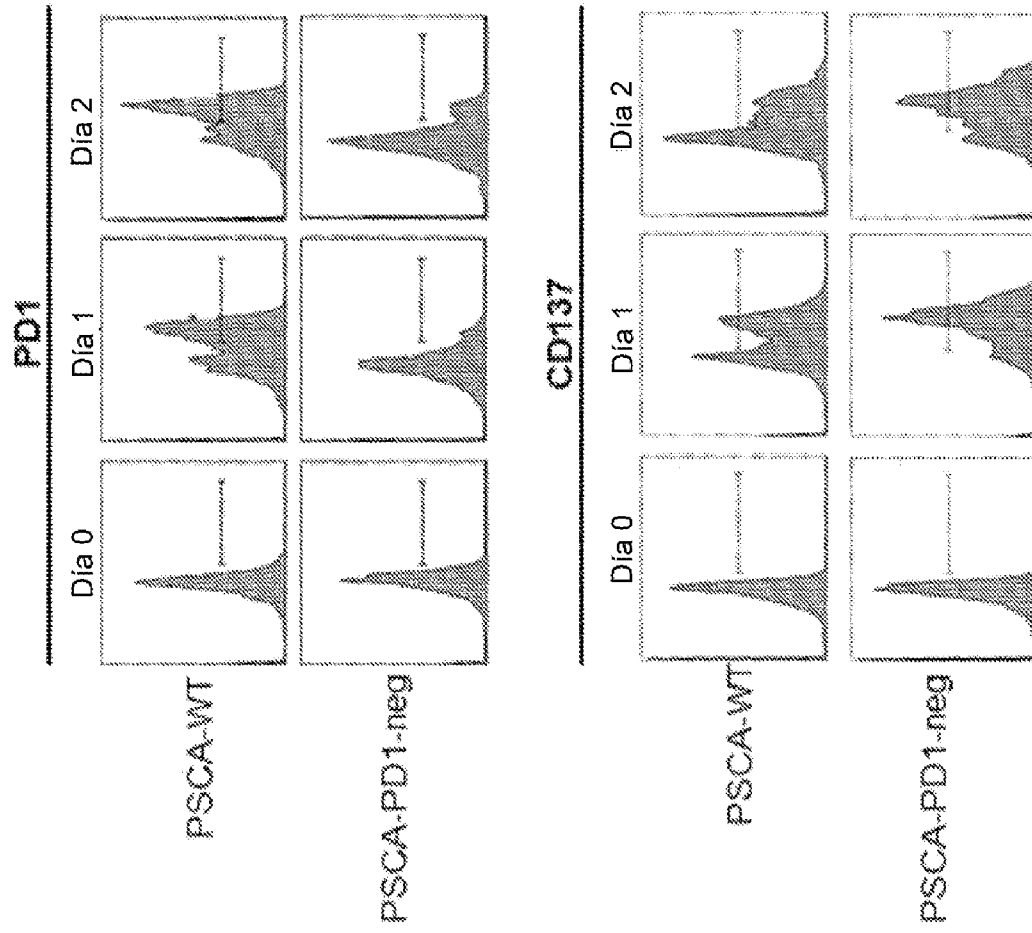


Figura 36



**Figura 37**

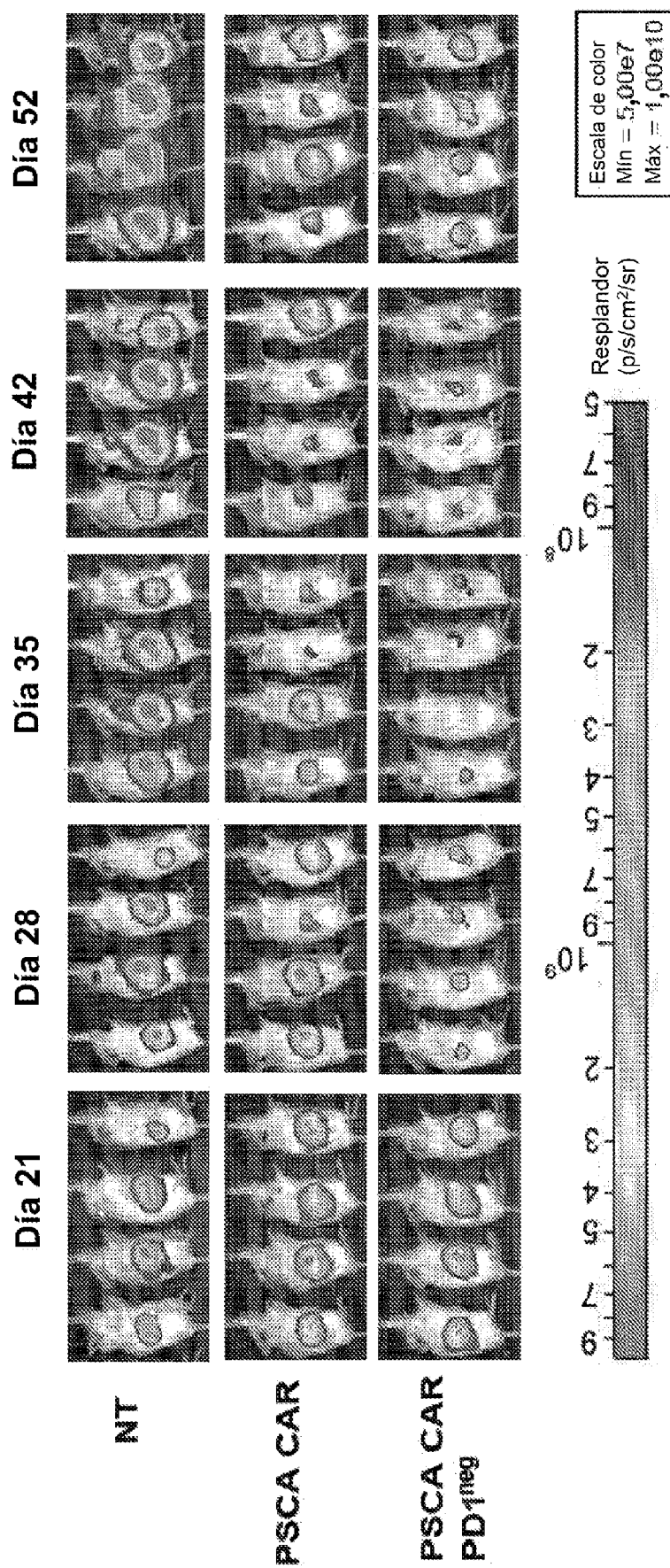


Figura 38A

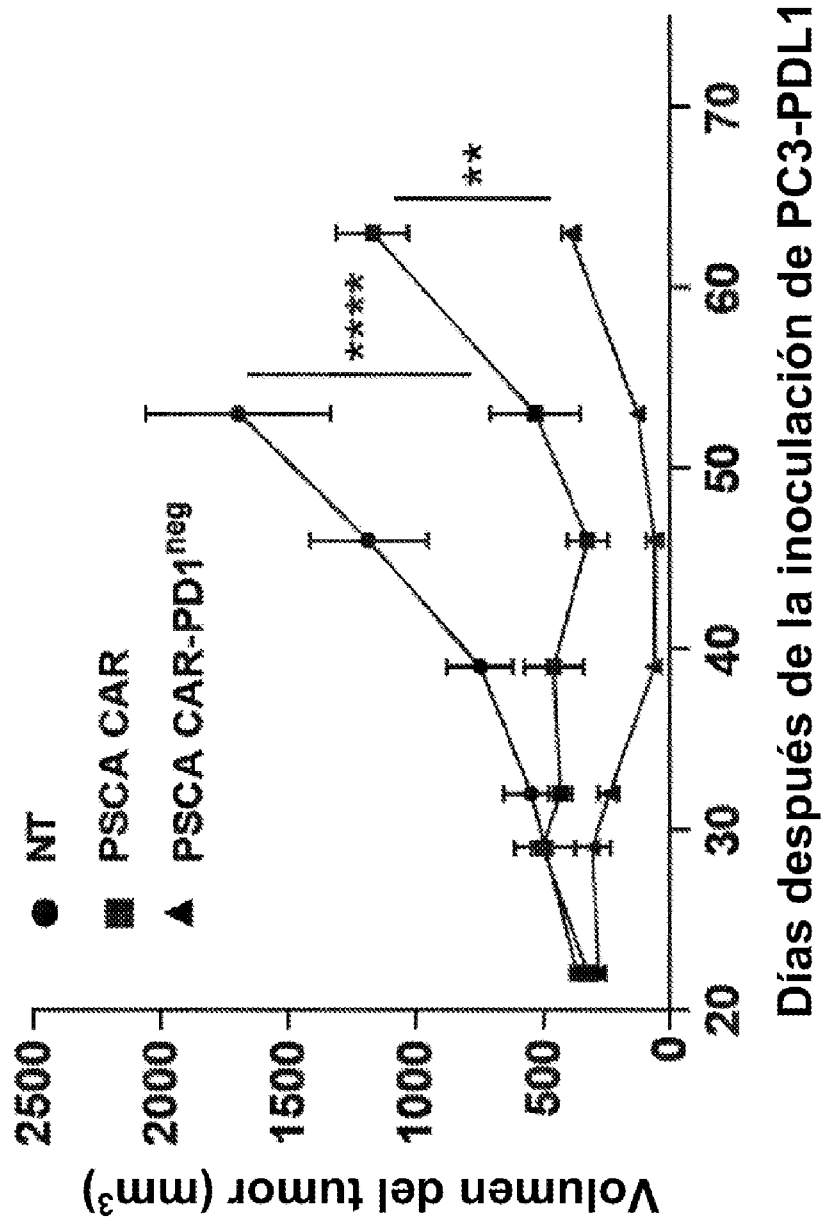


Figura 38B

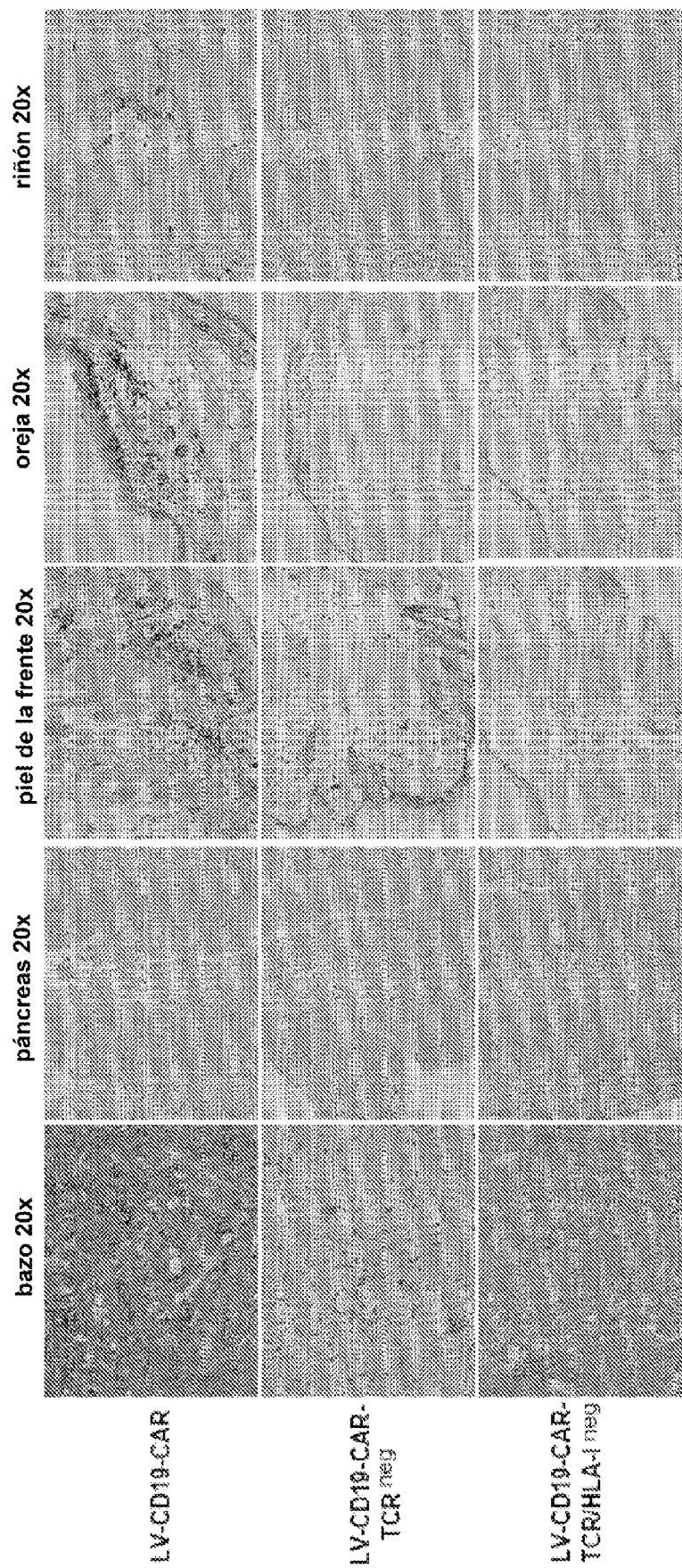
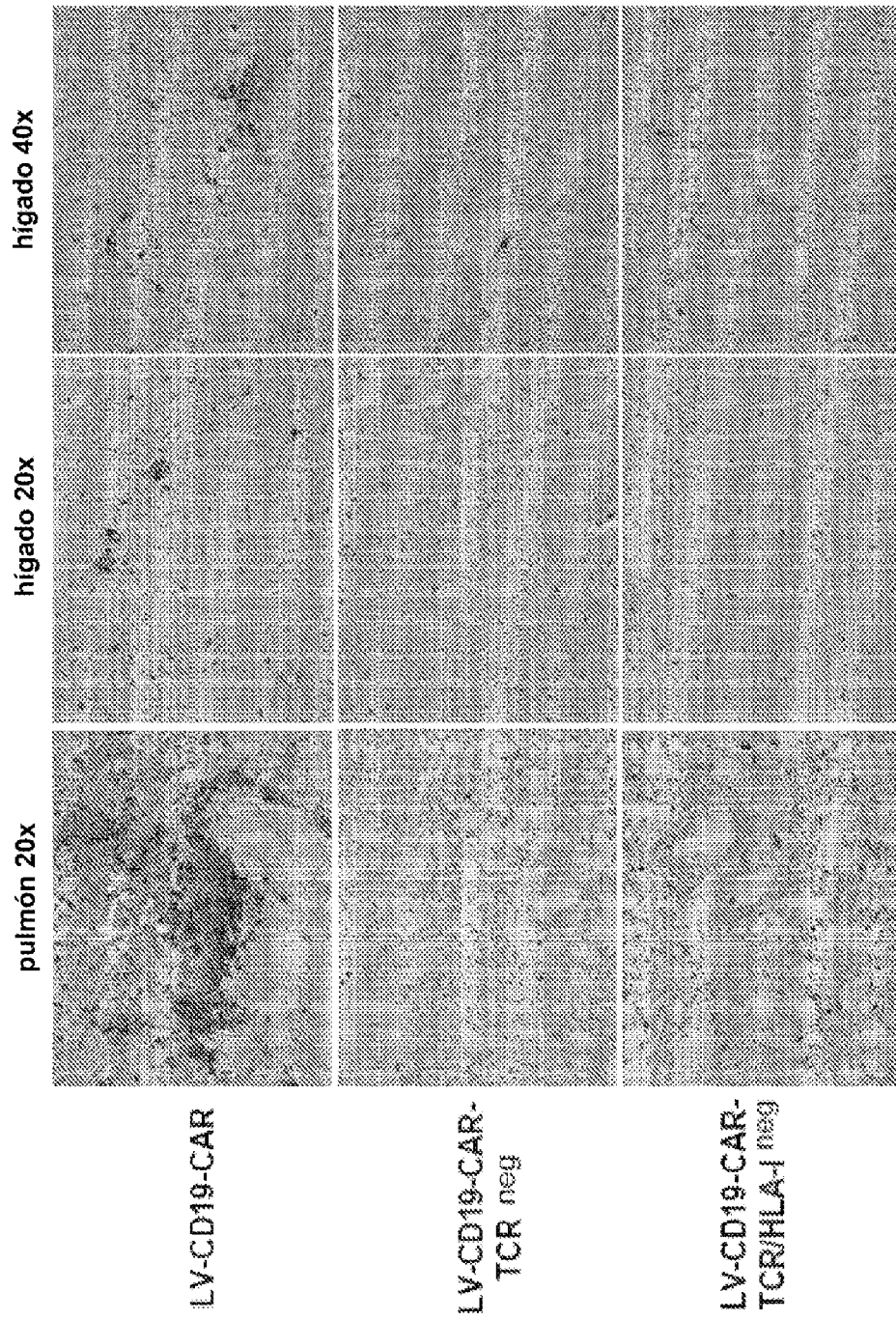


Figura 39



**Figura 39 Continuación**

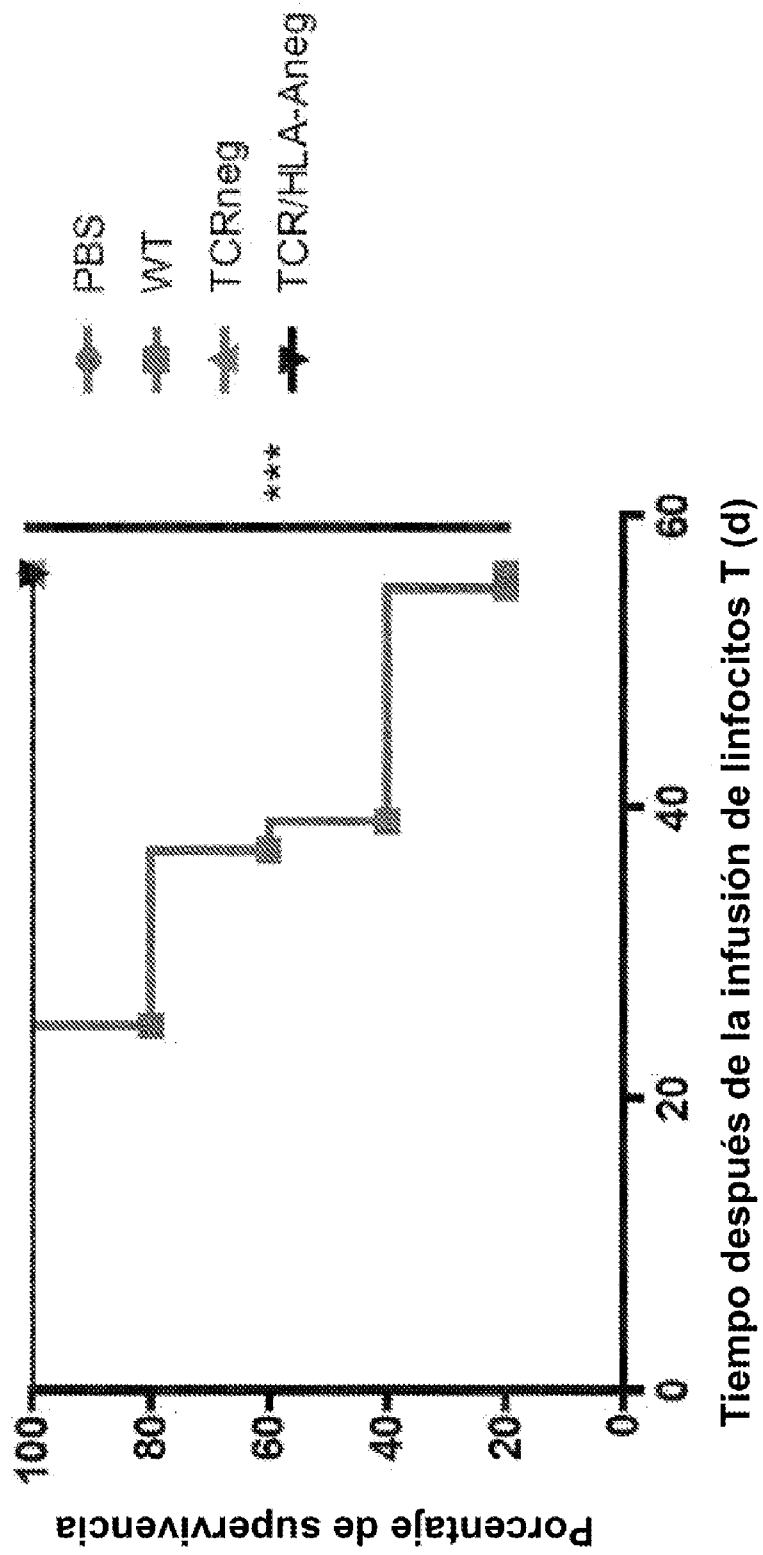


Figura 40A



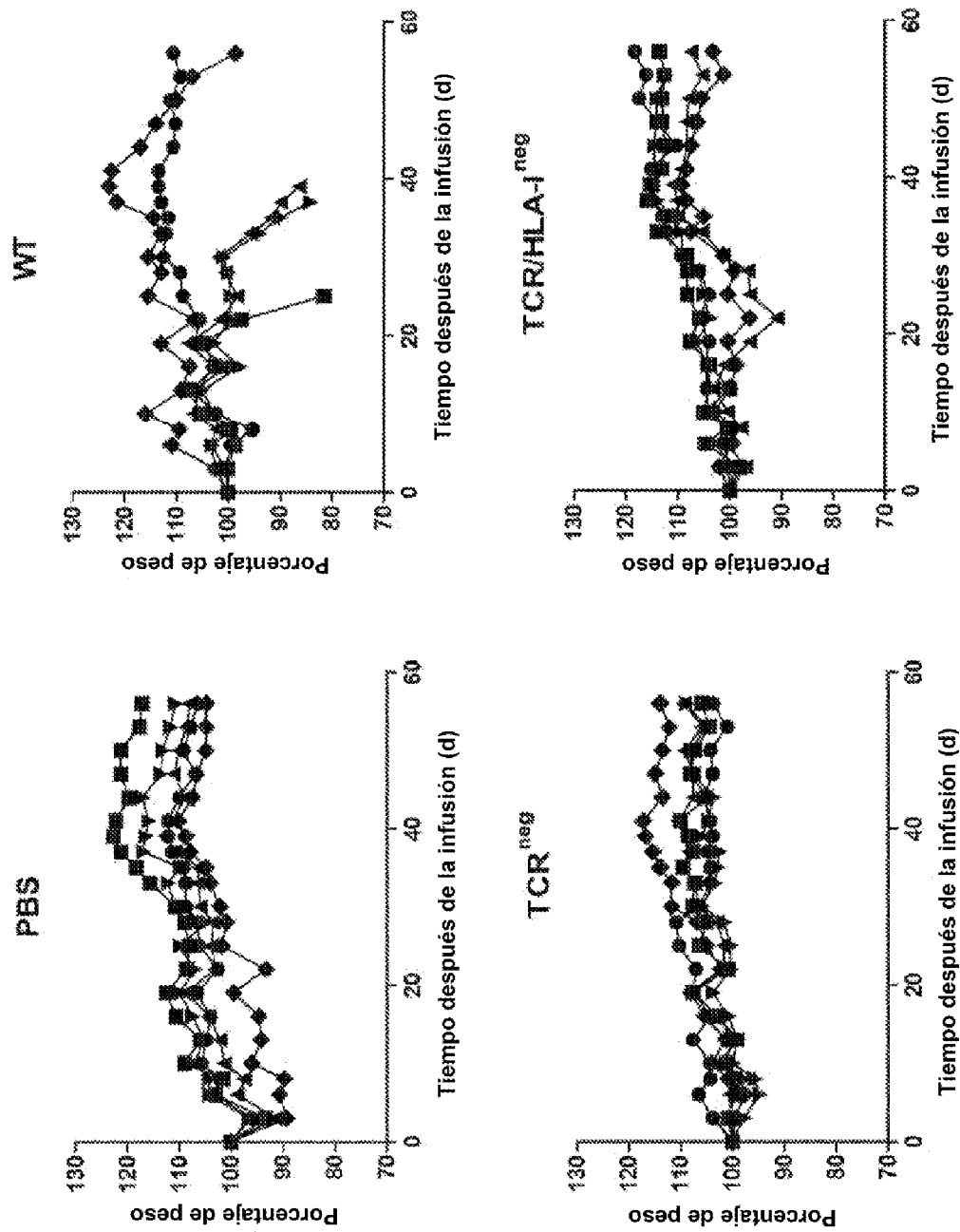


Figura 40B

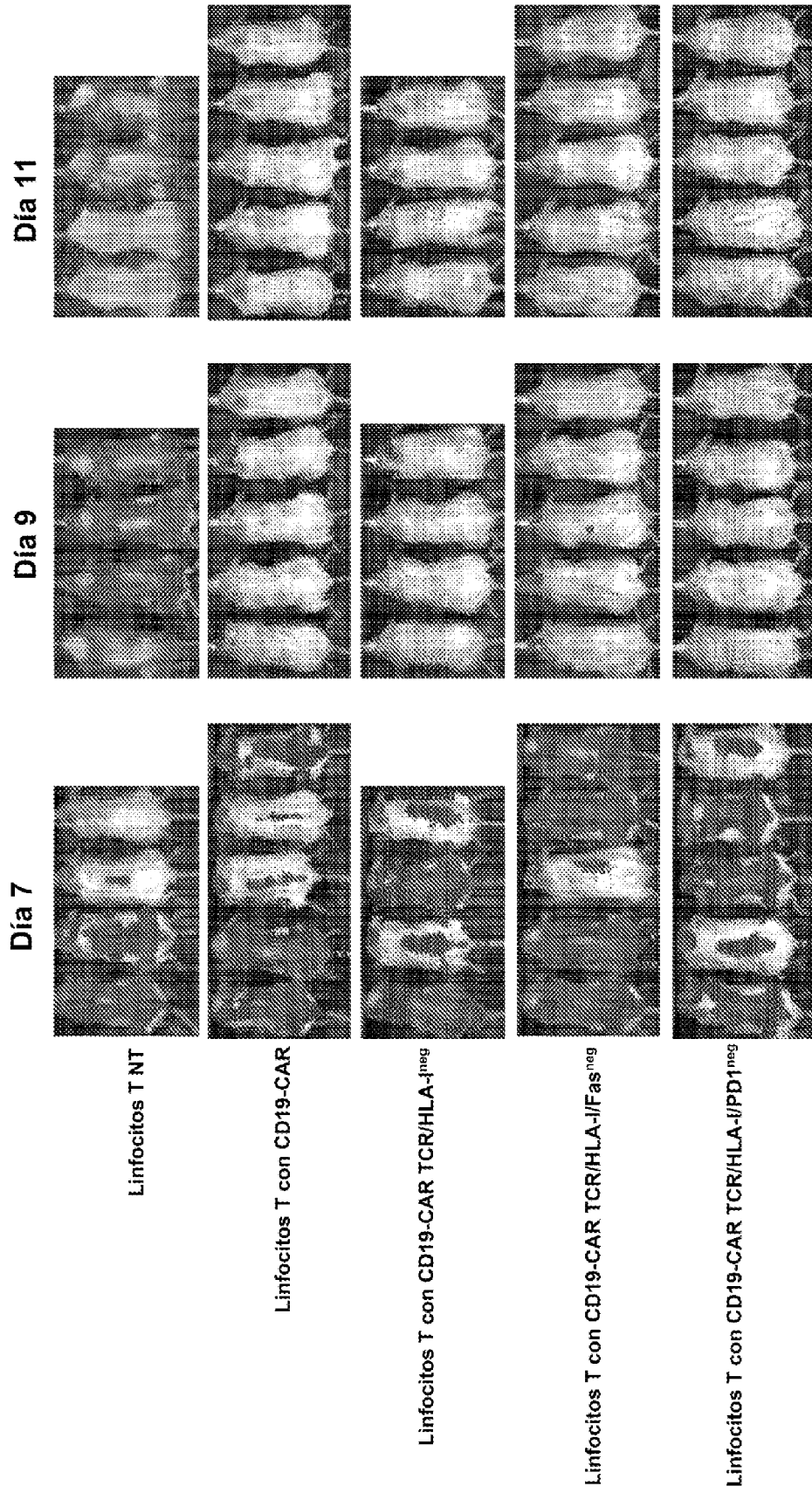


Figura 41A

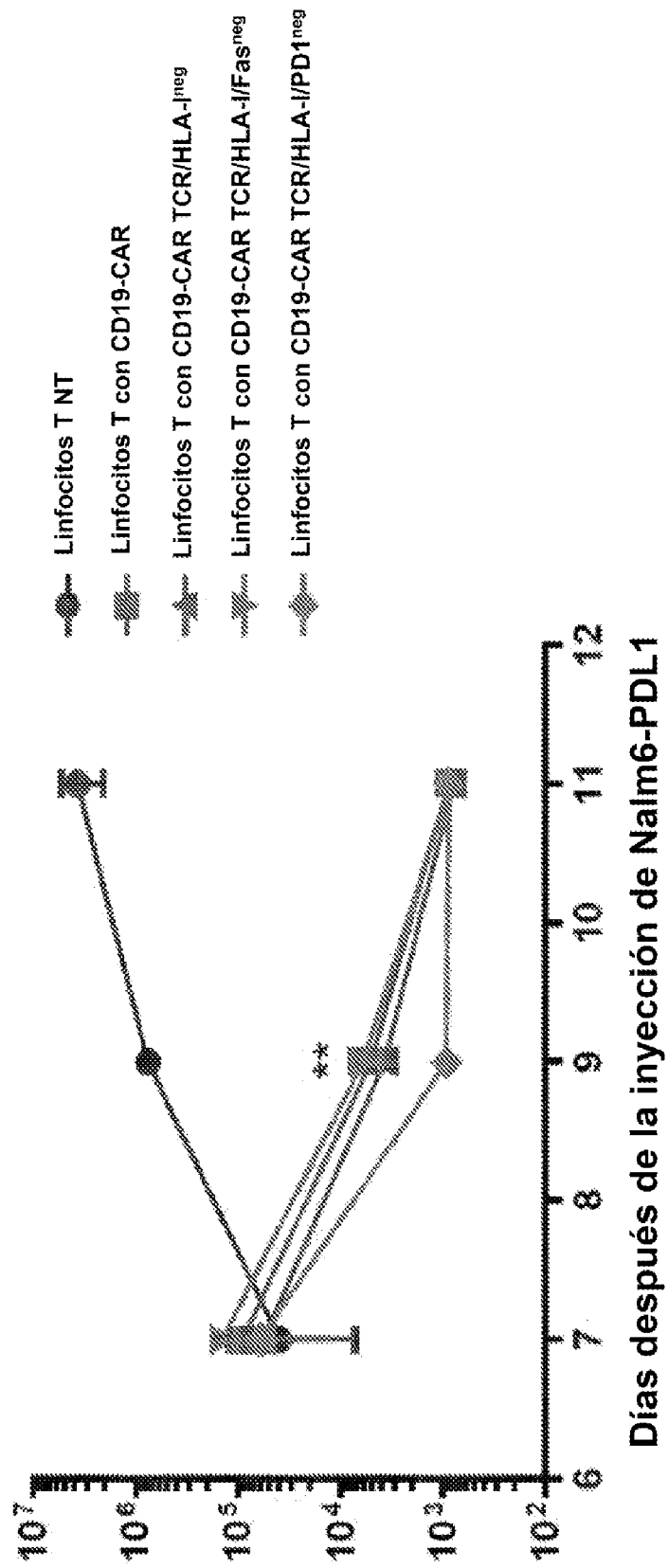


Figura 41B

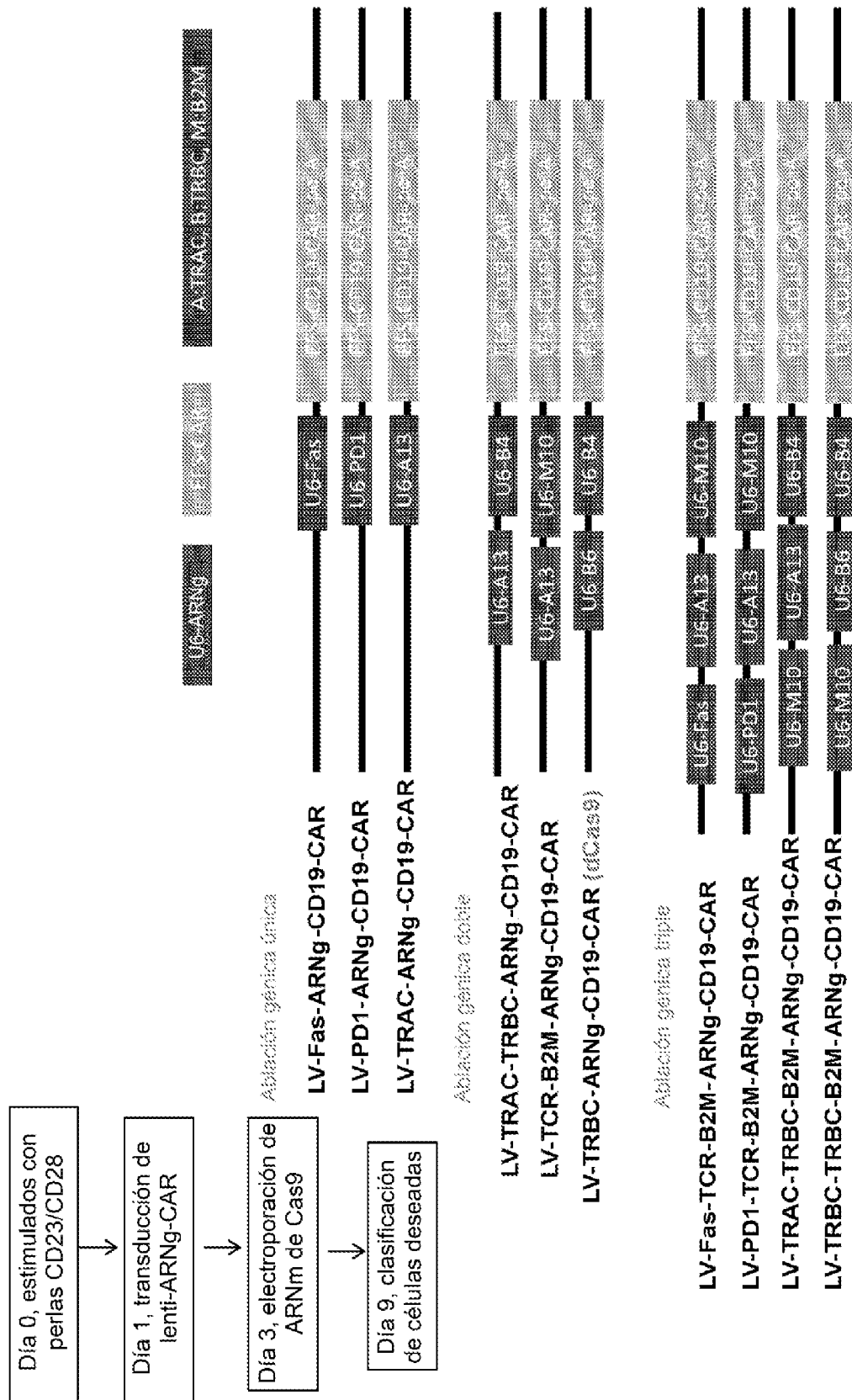
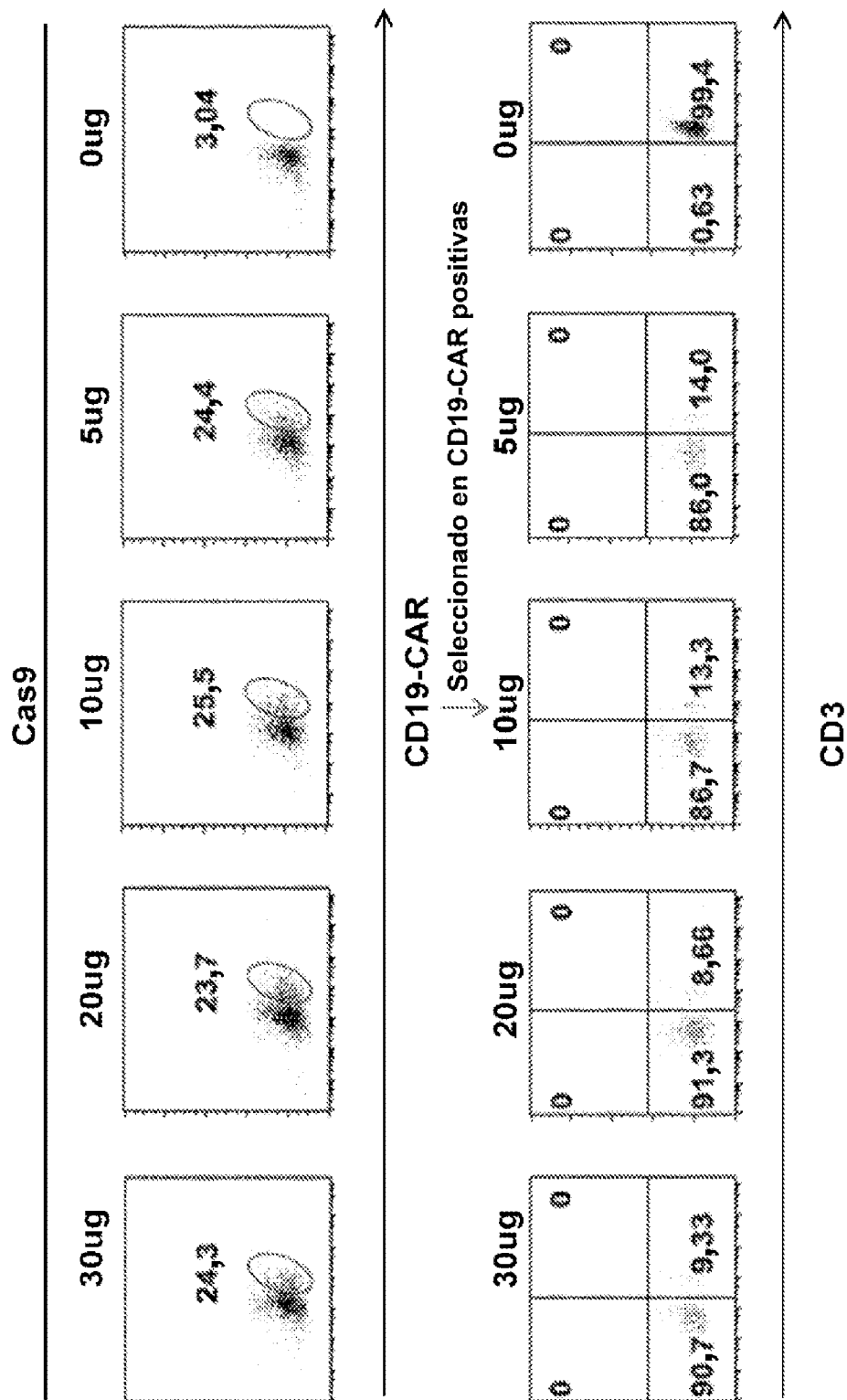
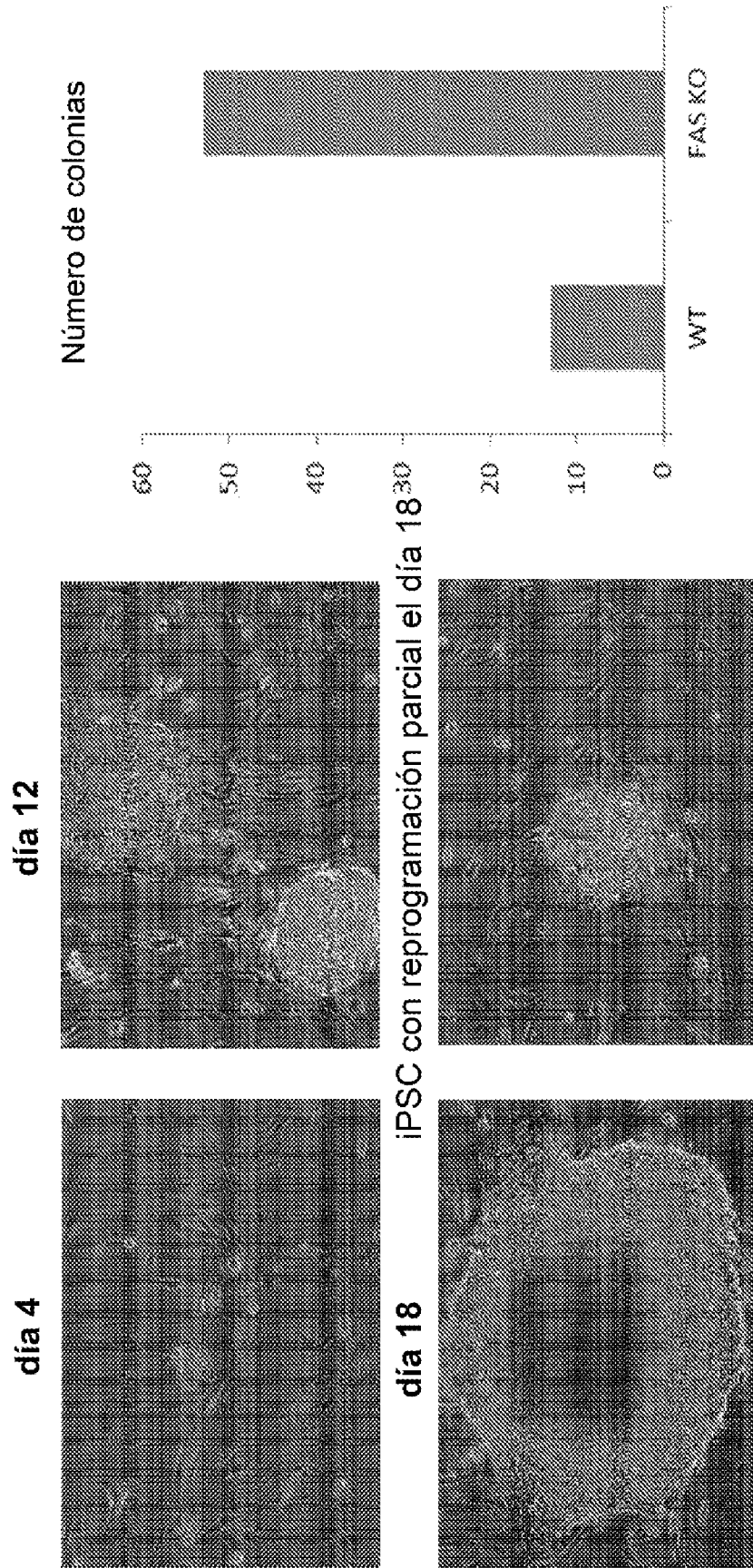


Figura 42



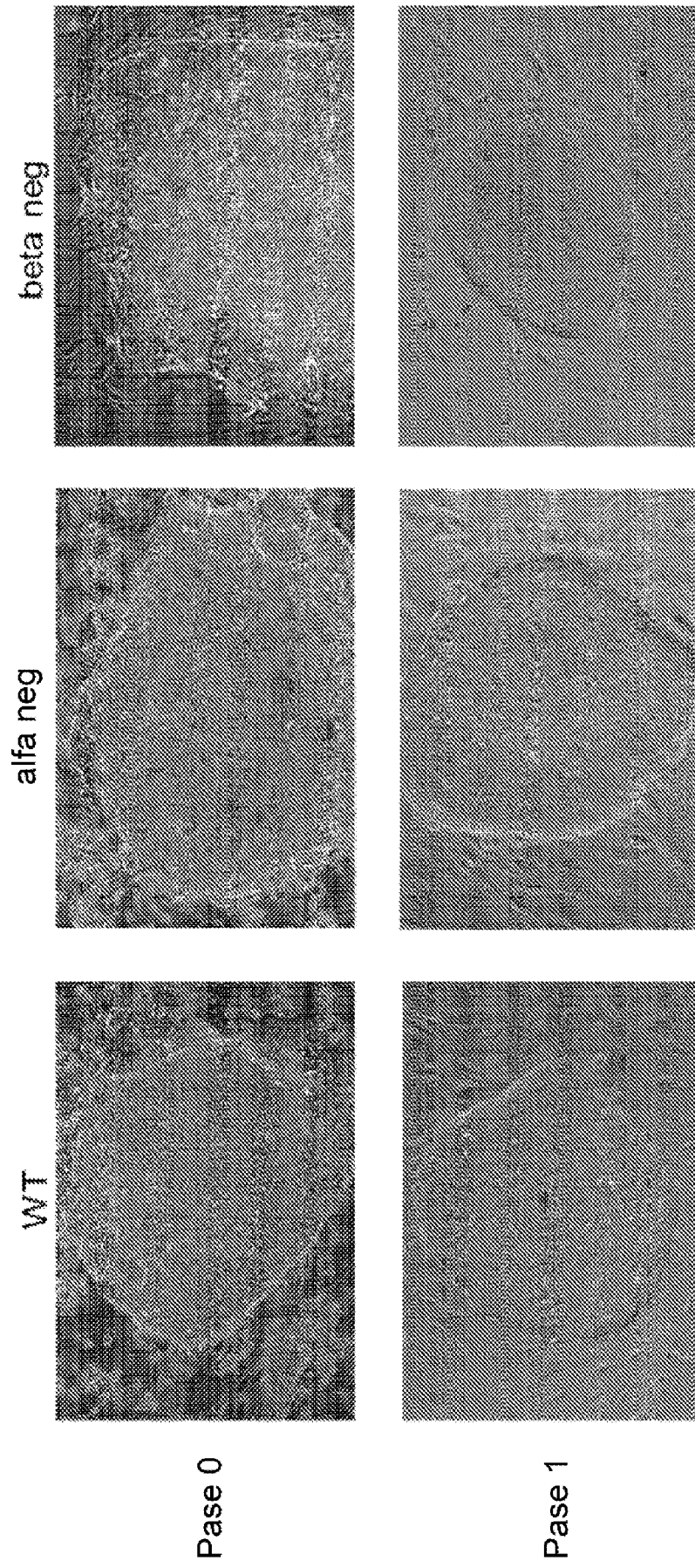
**Figura 43**



**Figura 44B**

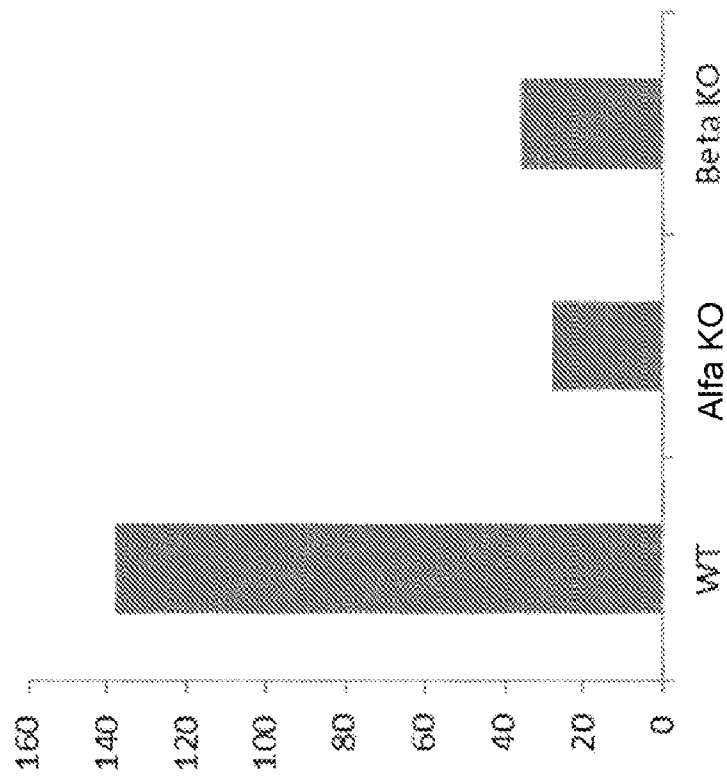
Pase 0

**Figura 44A**

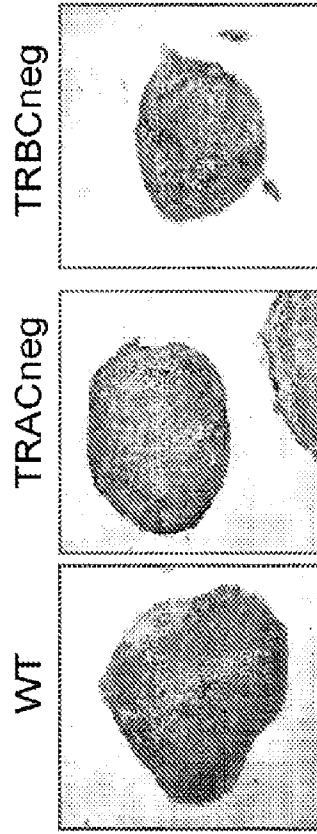


**Figura 45A**

Número de colonias



**Figura 45B**



**Figura 45C**



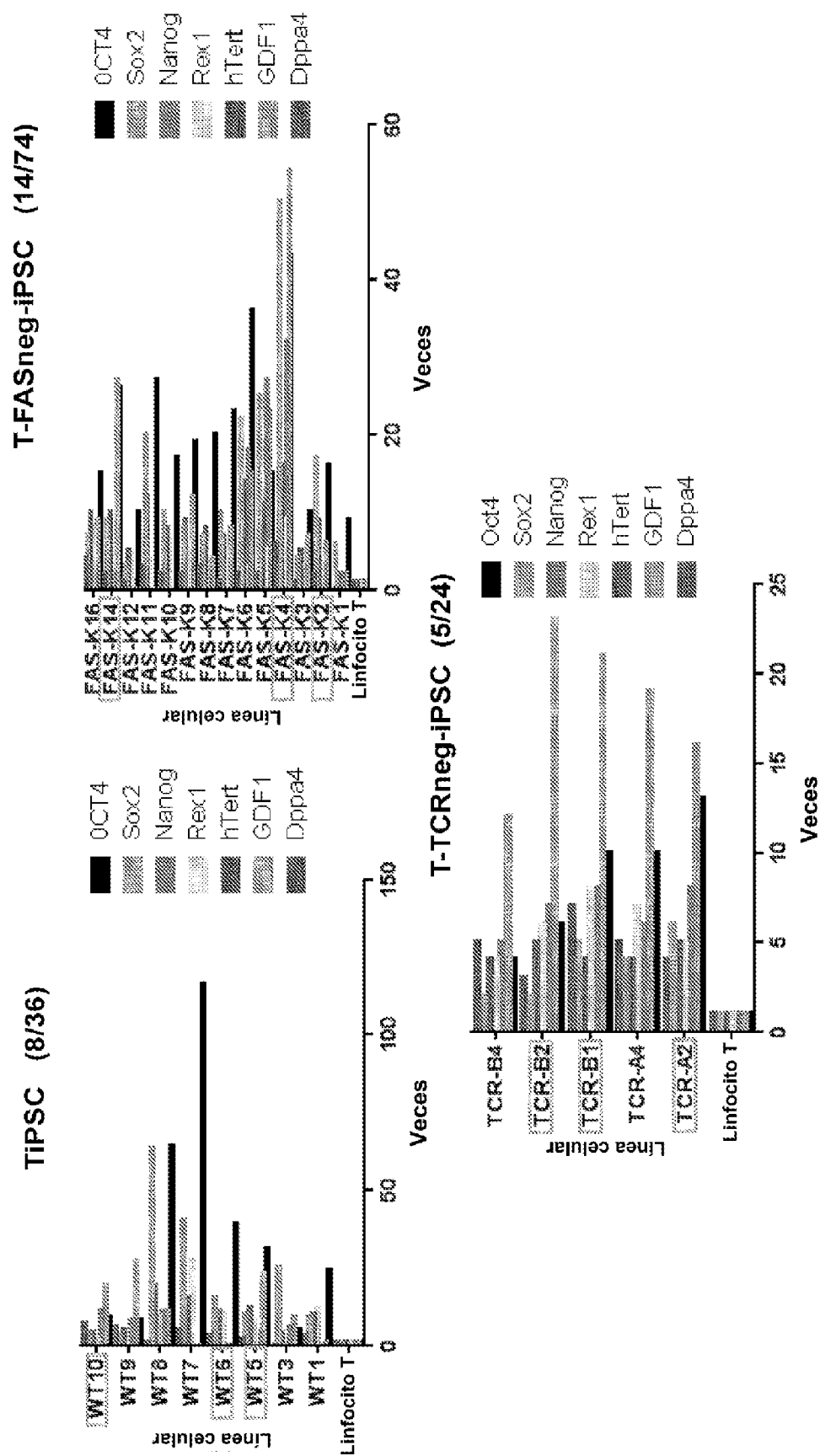
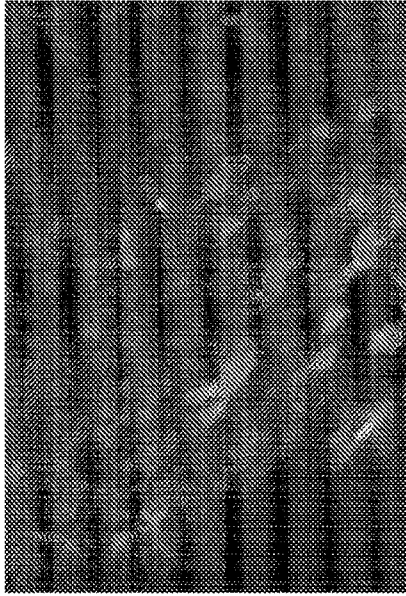
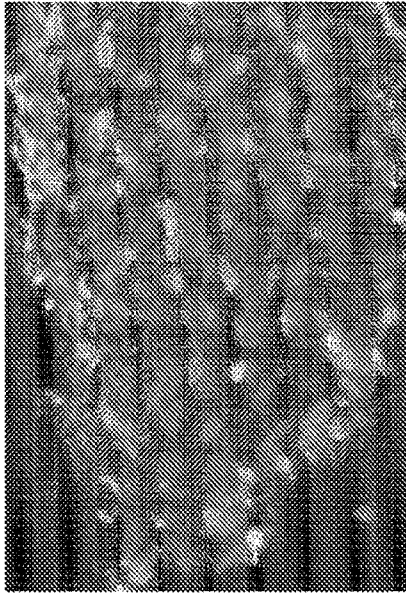


Figura 46

SSEA4

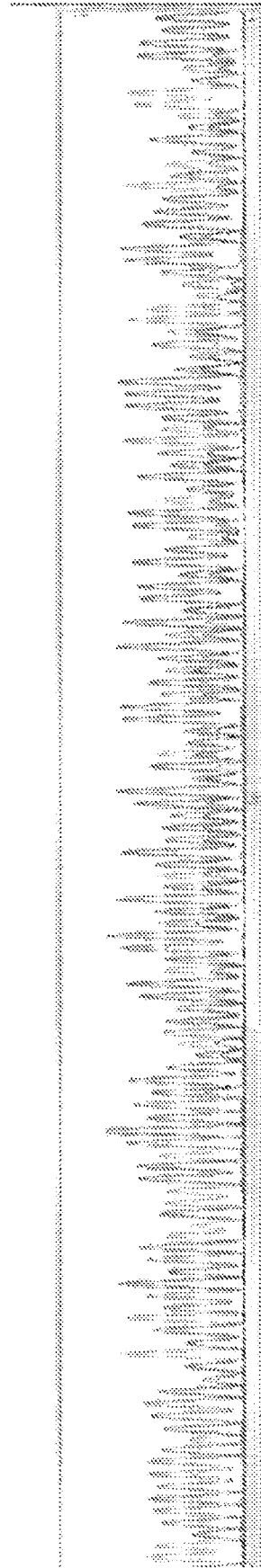


Tra-1-60



**Figura 47A**

T-FasKO-iPSC



**Figura 47B**

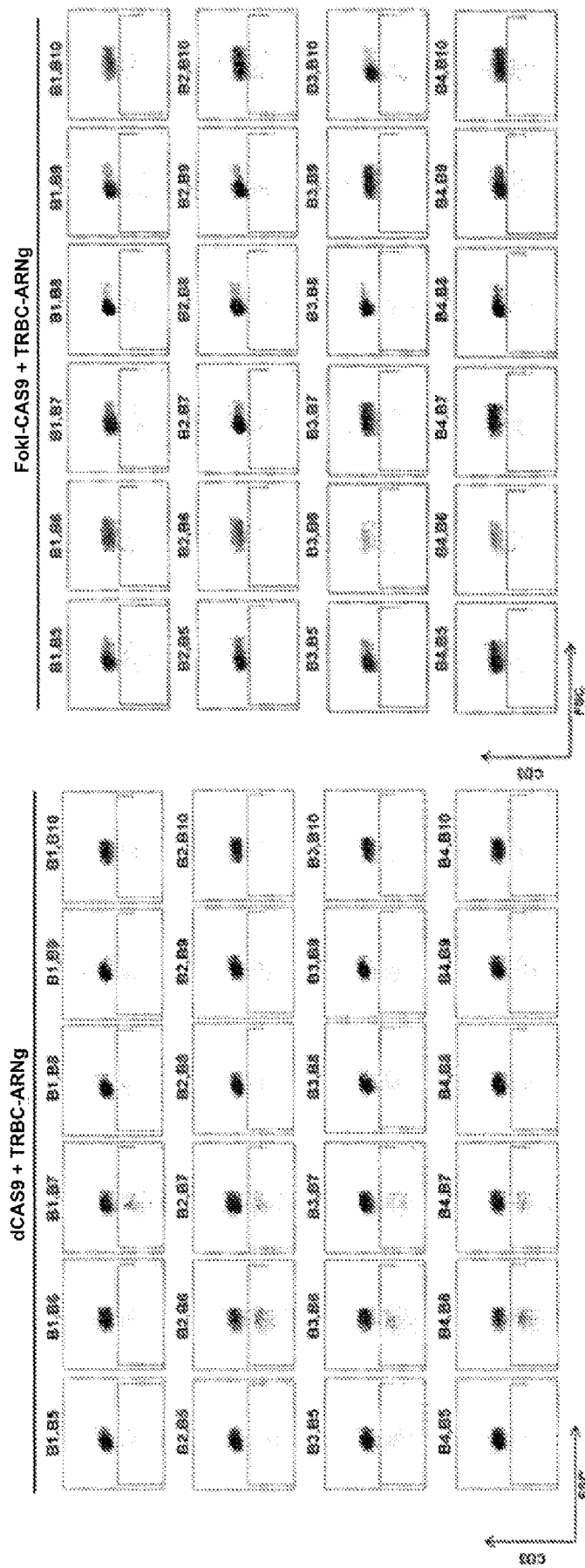


Figura 48A

D10A-CAS9 + TRBC-ARNg

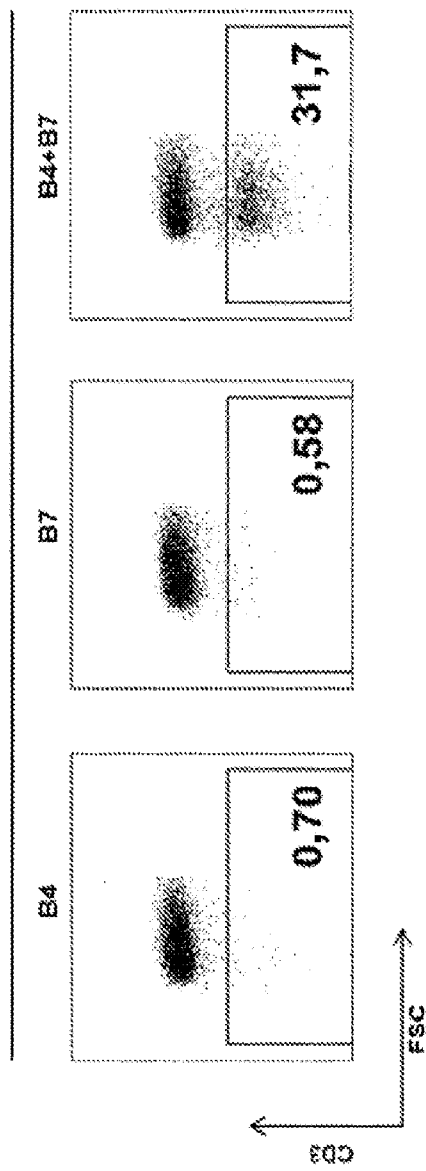


Figura 48B

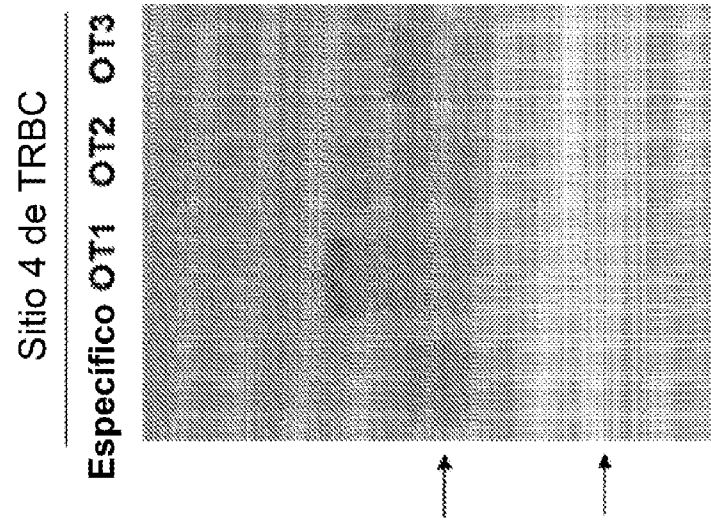


Figura 48C



Figura 49

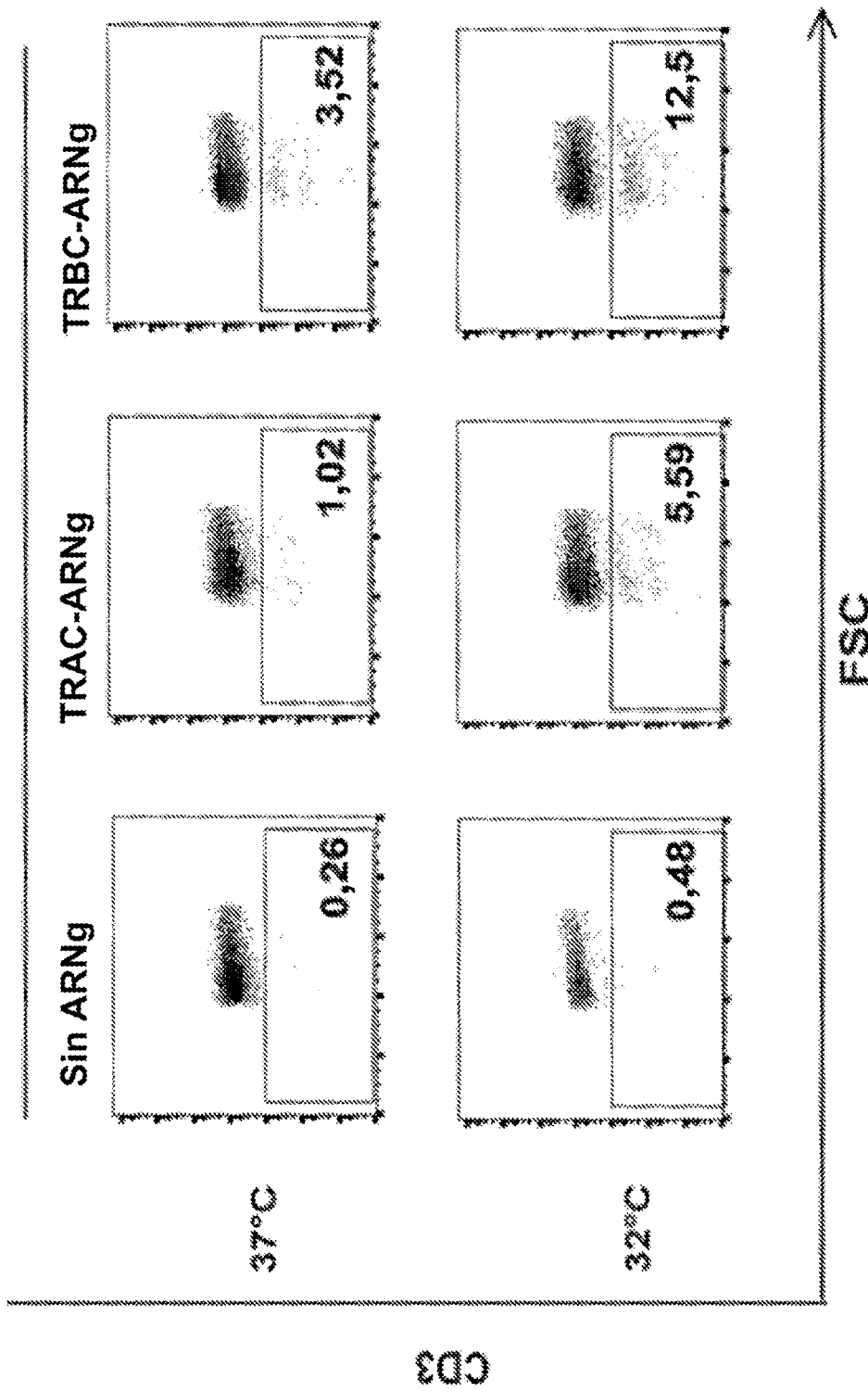


Figura 50A

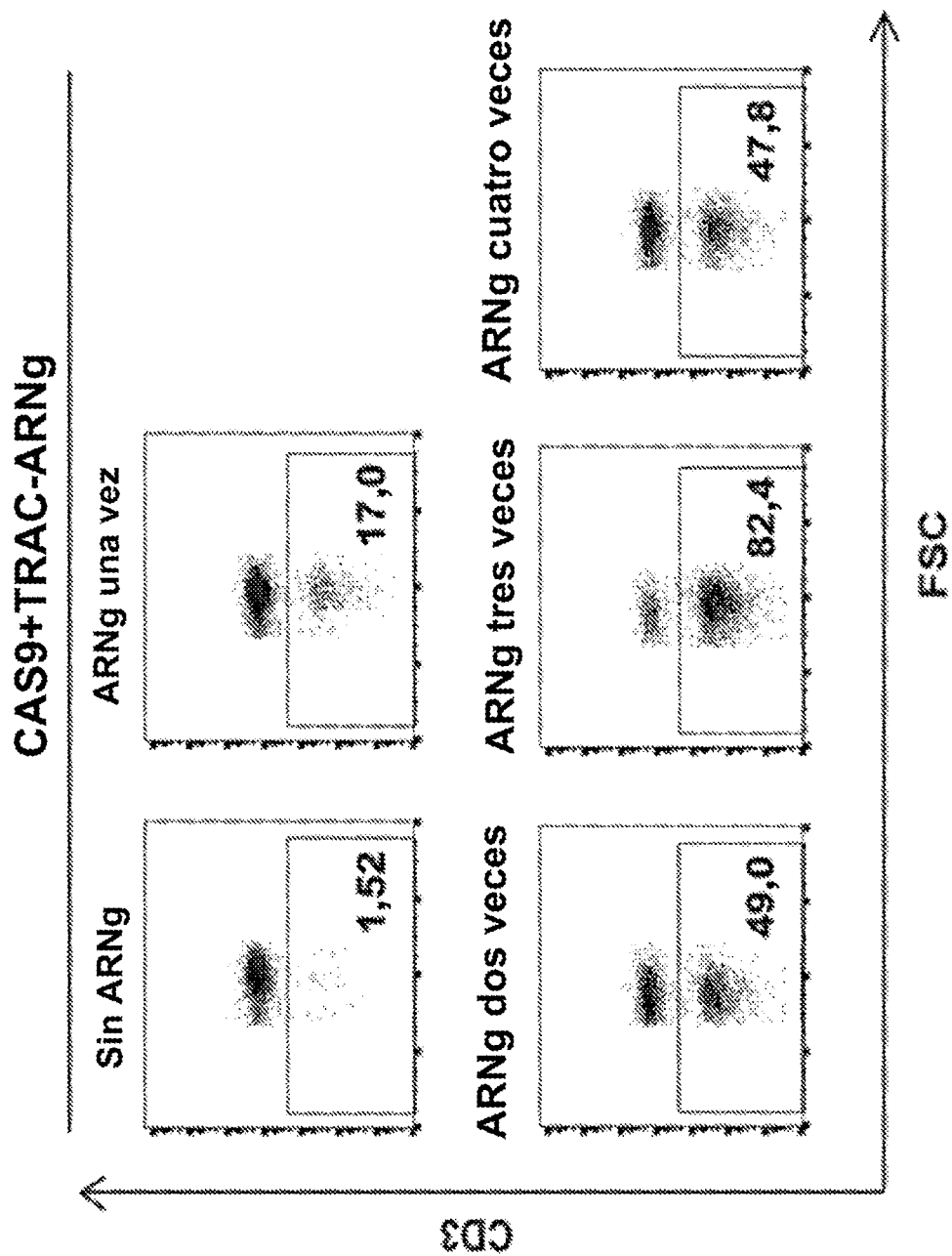
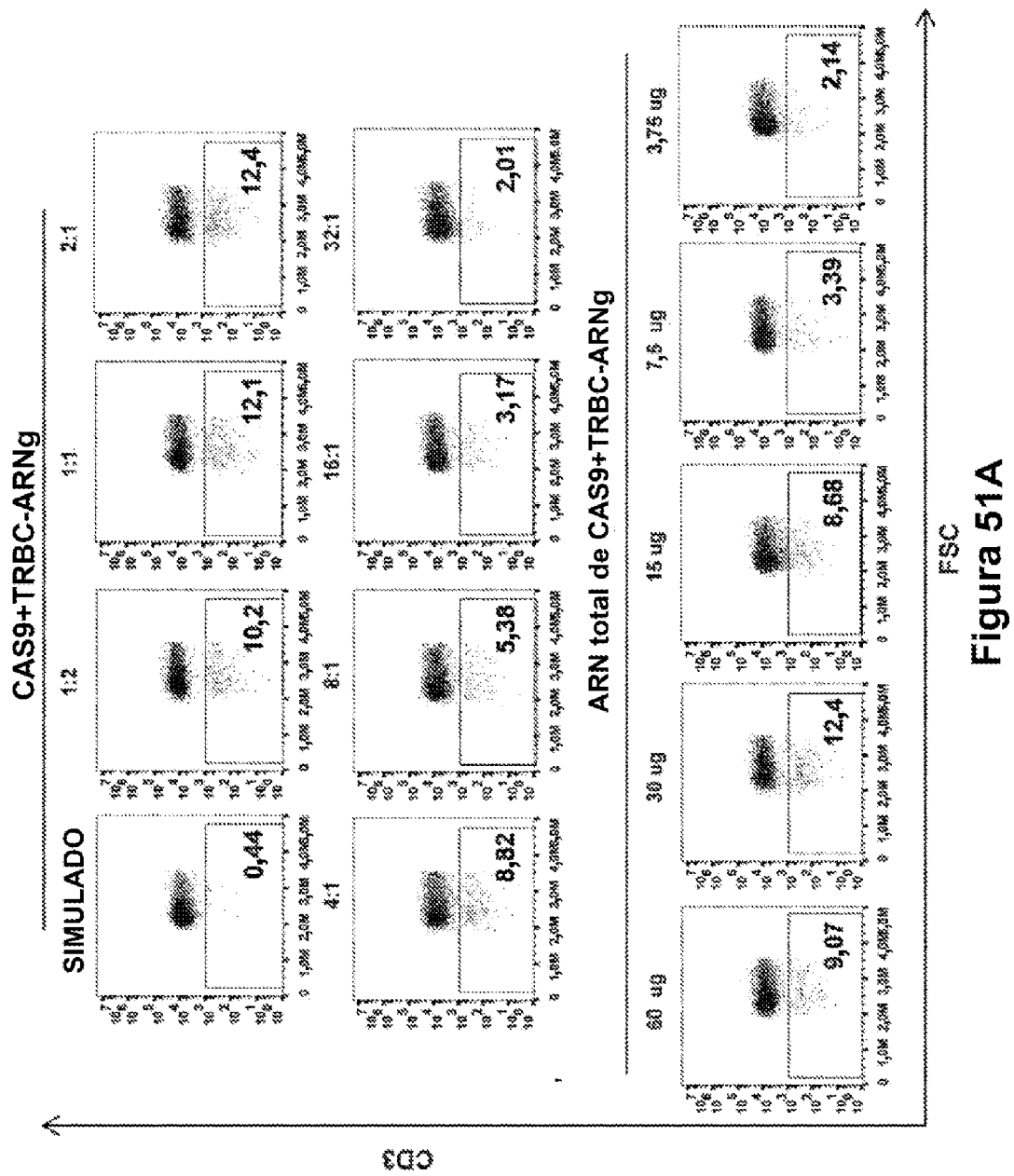


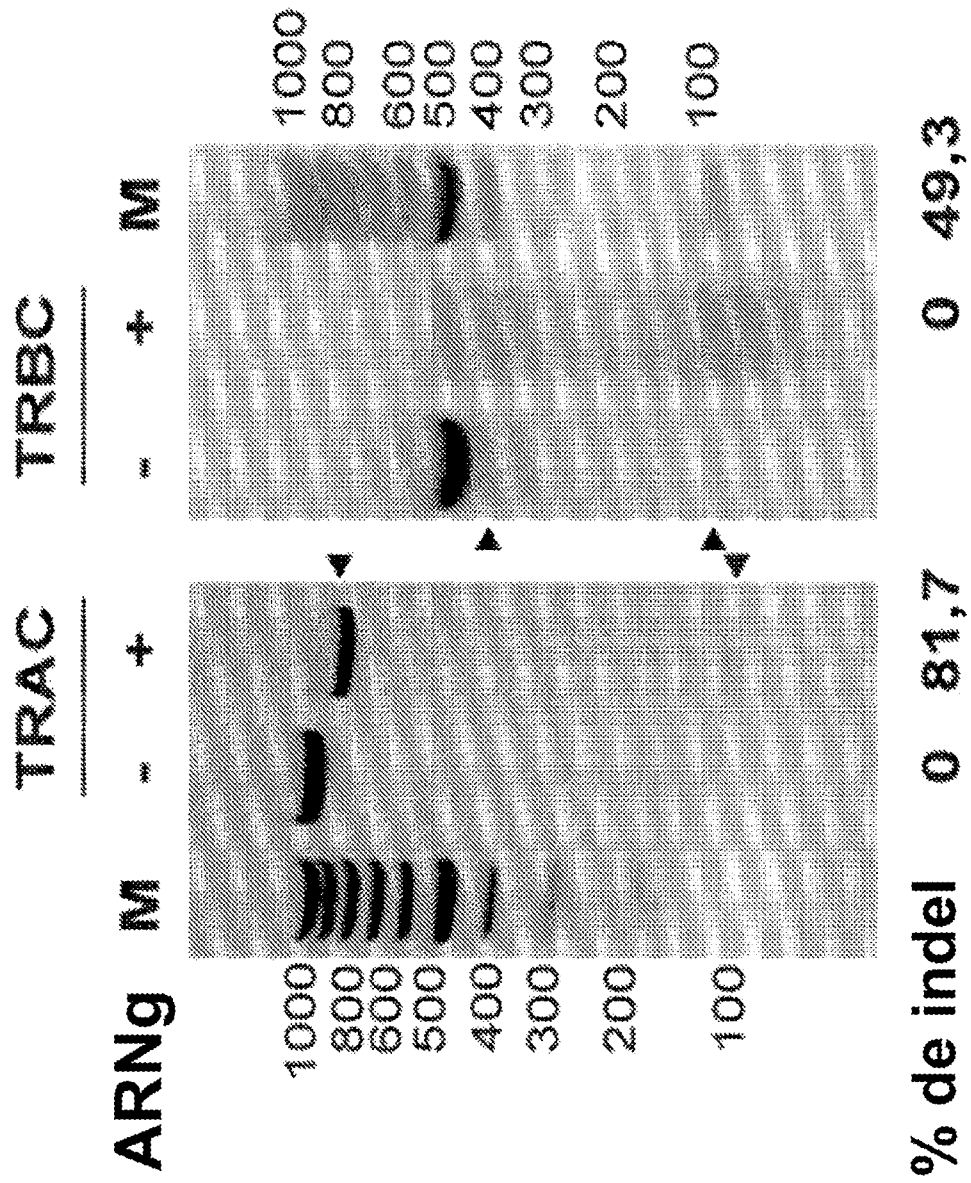
Figura 50B





CAS9/ veces	ARNg/ veces	Proteína %	Genoma %
1	0	0	0
1	1	17	27,7 (5/18)
1	2	49	60 (12/20)
1	3	82,4	89,4(17/19)
1	4	47,8	55 (11/20)

Figura 51B



## Figura 52

**Figura 53A**

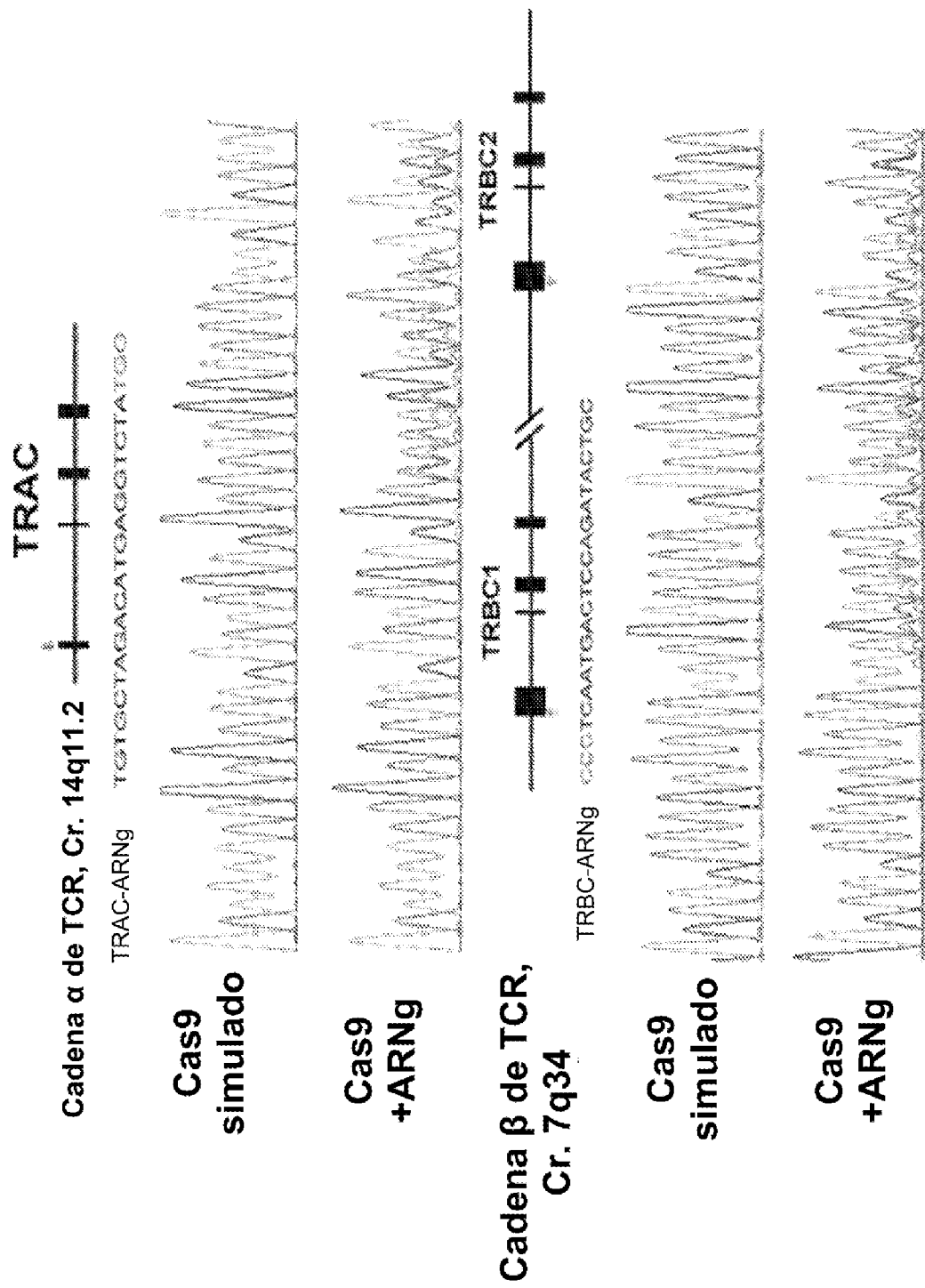
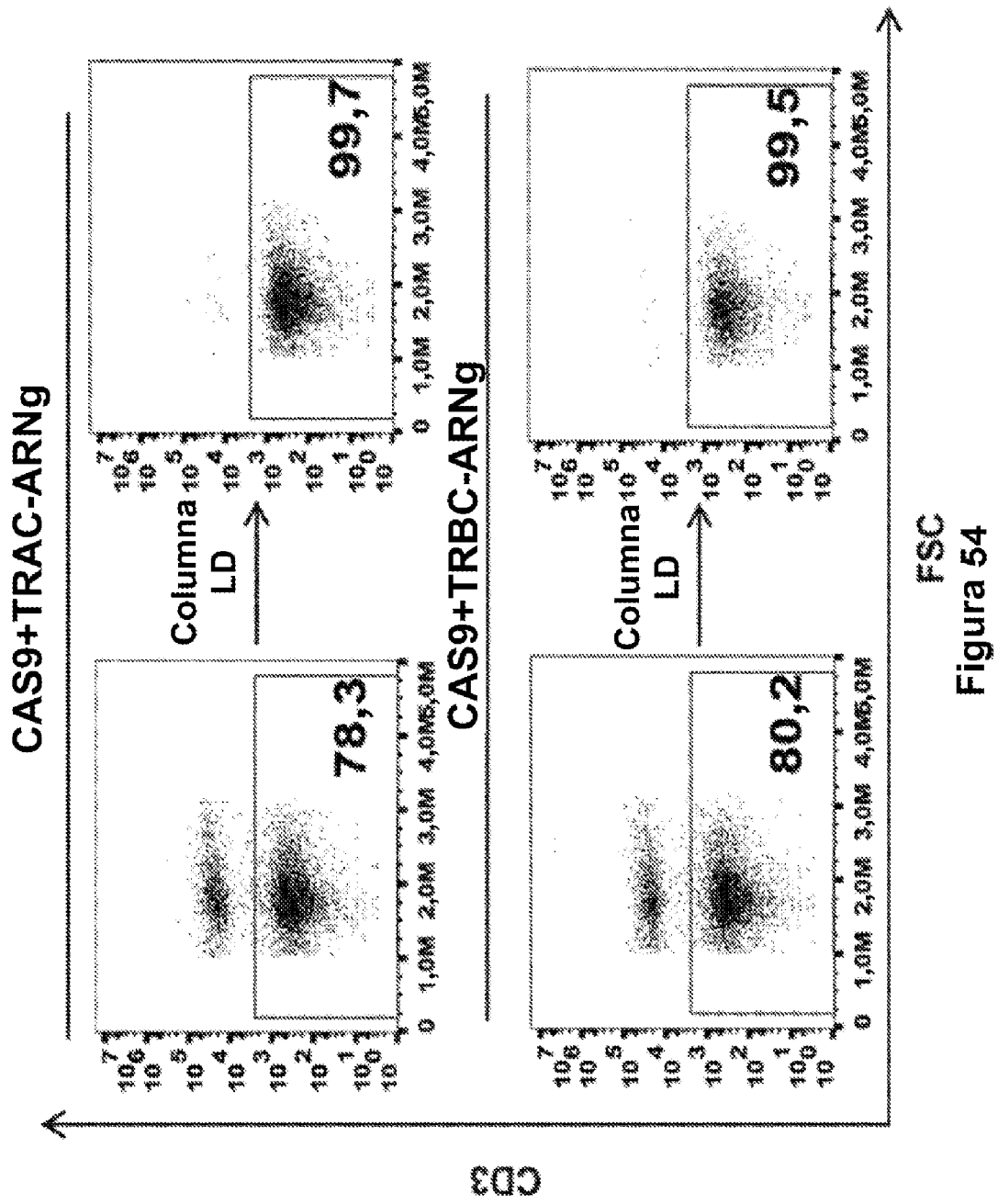


Figura 53B



Linfocitos T negativos para CR/CD3

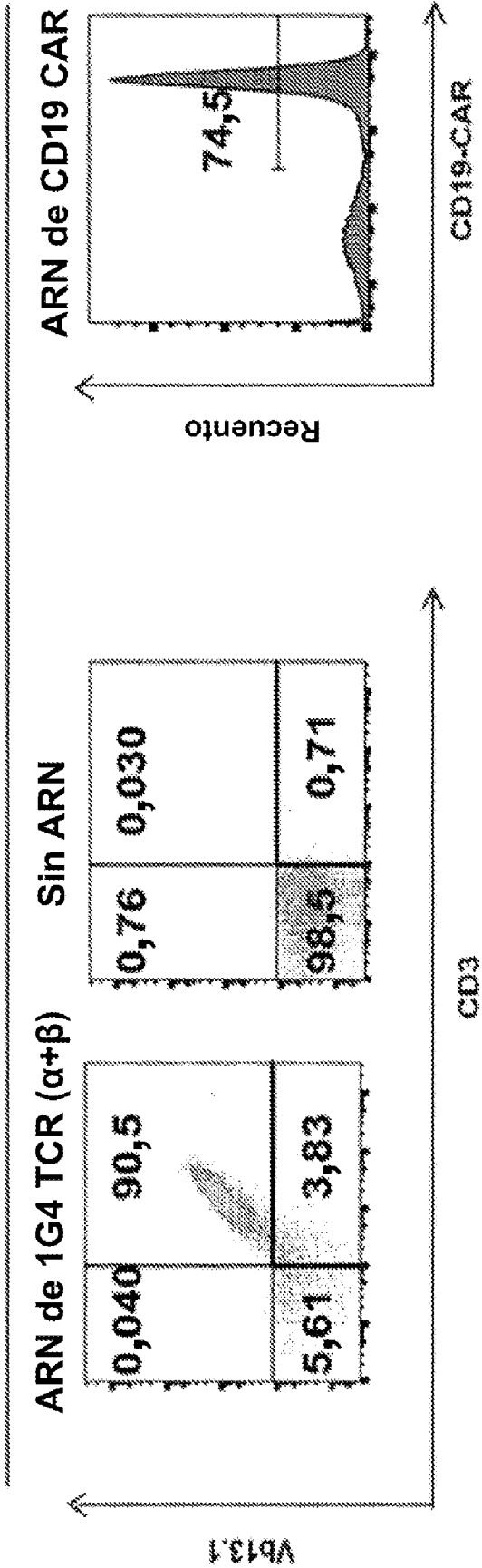


Figura 55

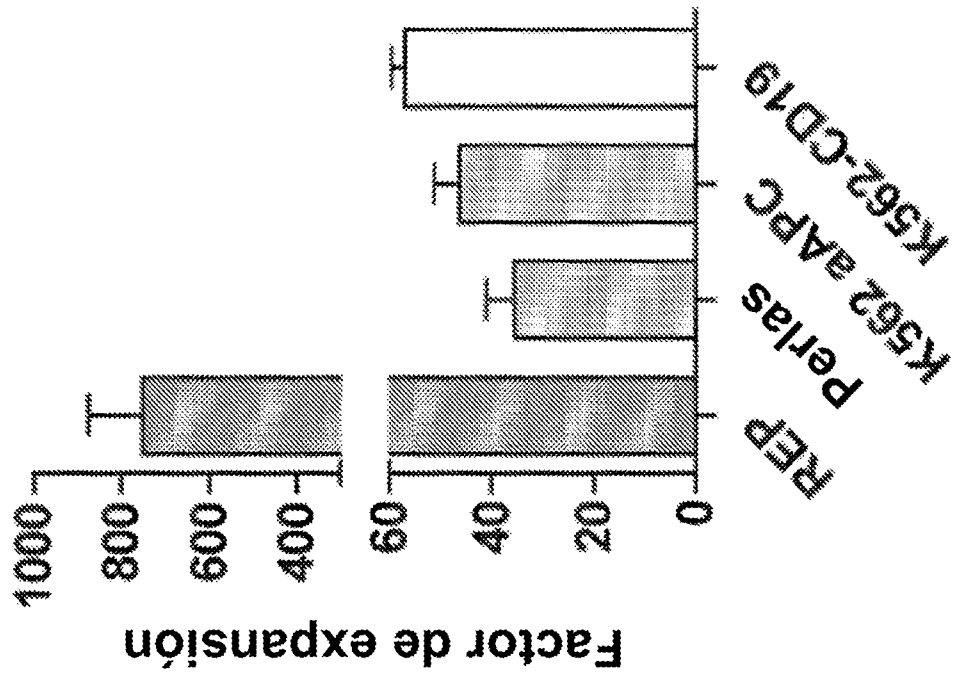


Figura 56

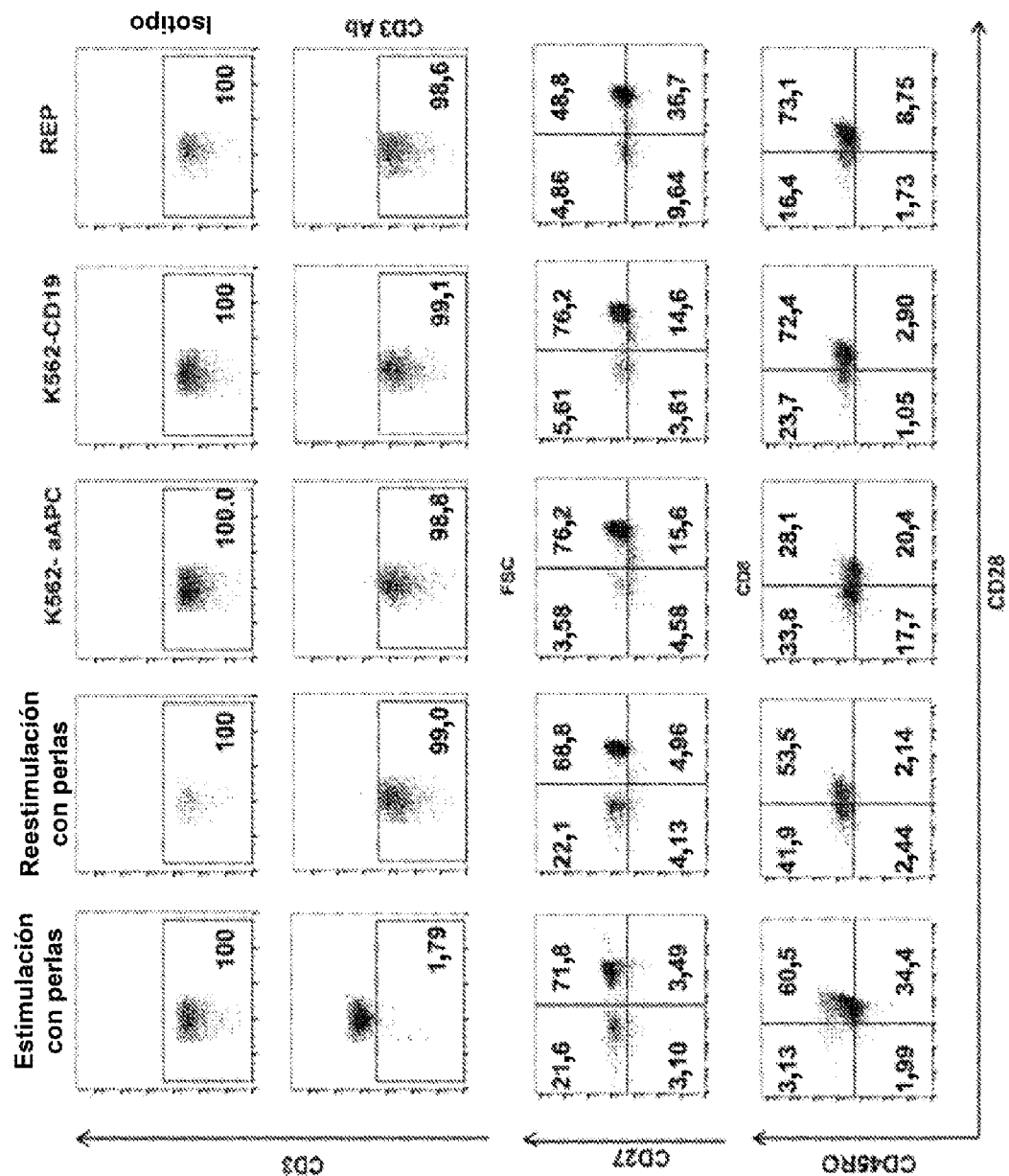
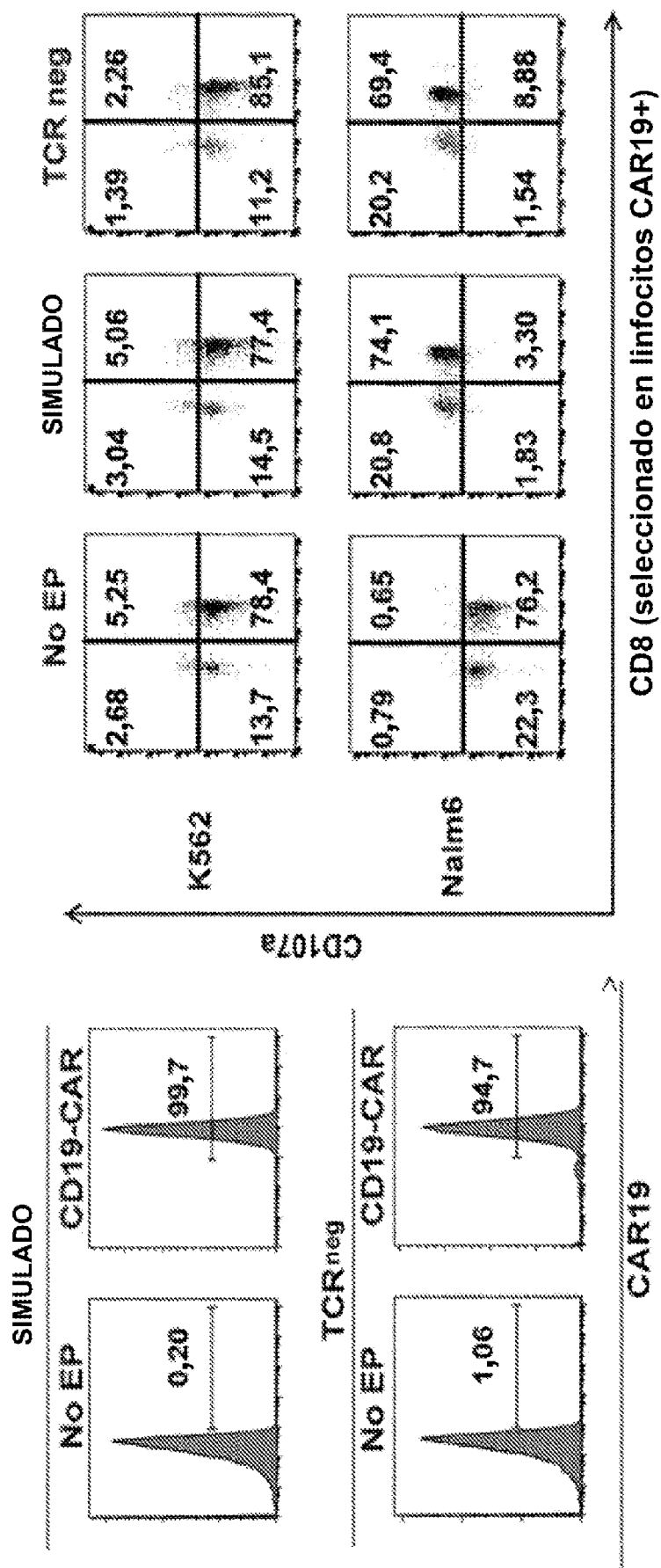


Figura 57





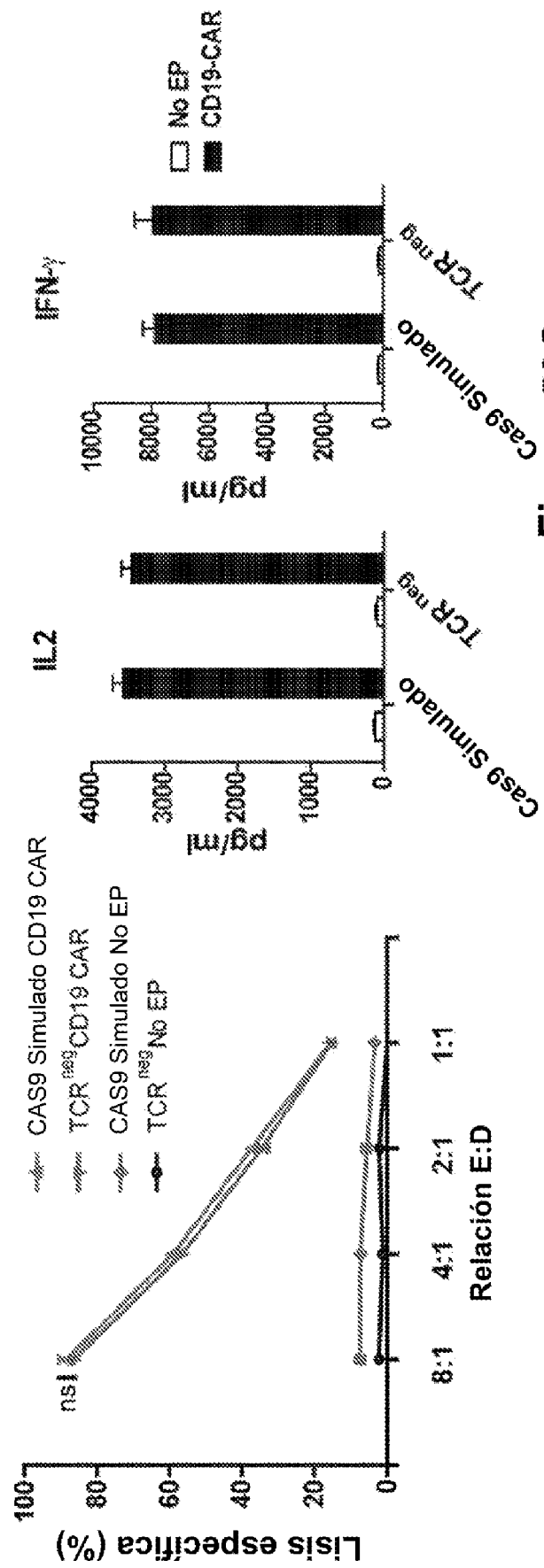


Figura 59C

Figura 59B

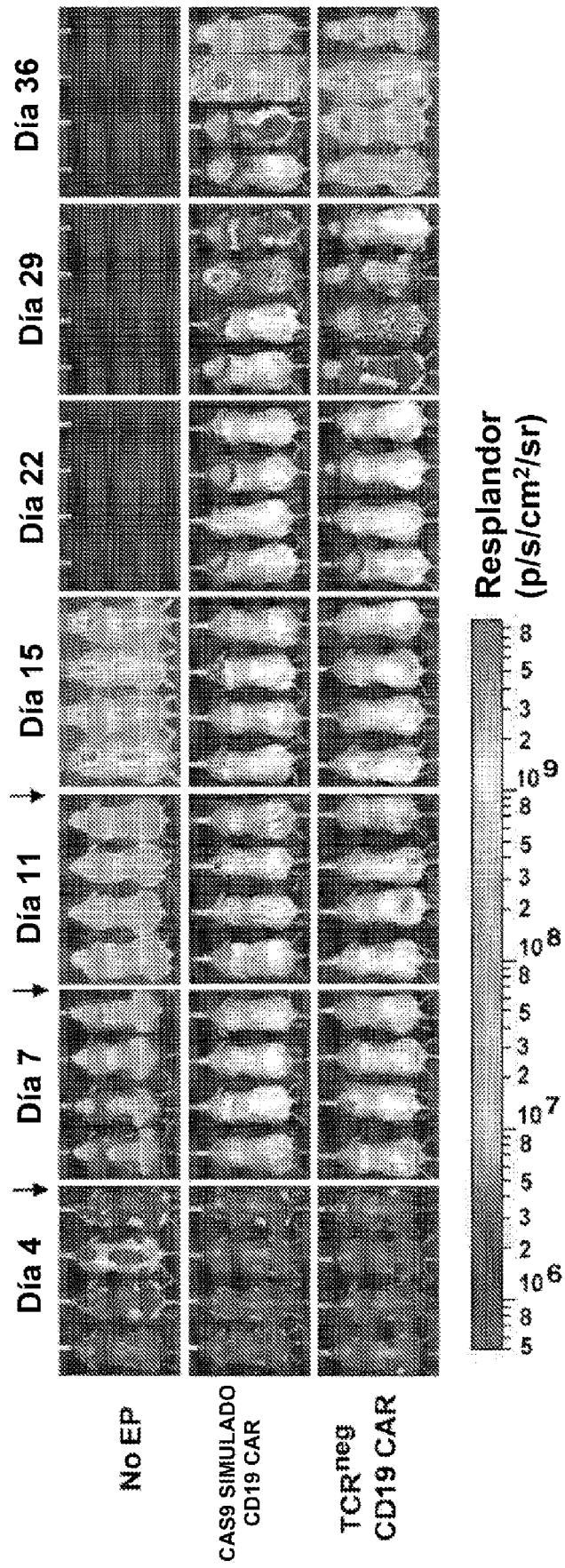


Figura 59D

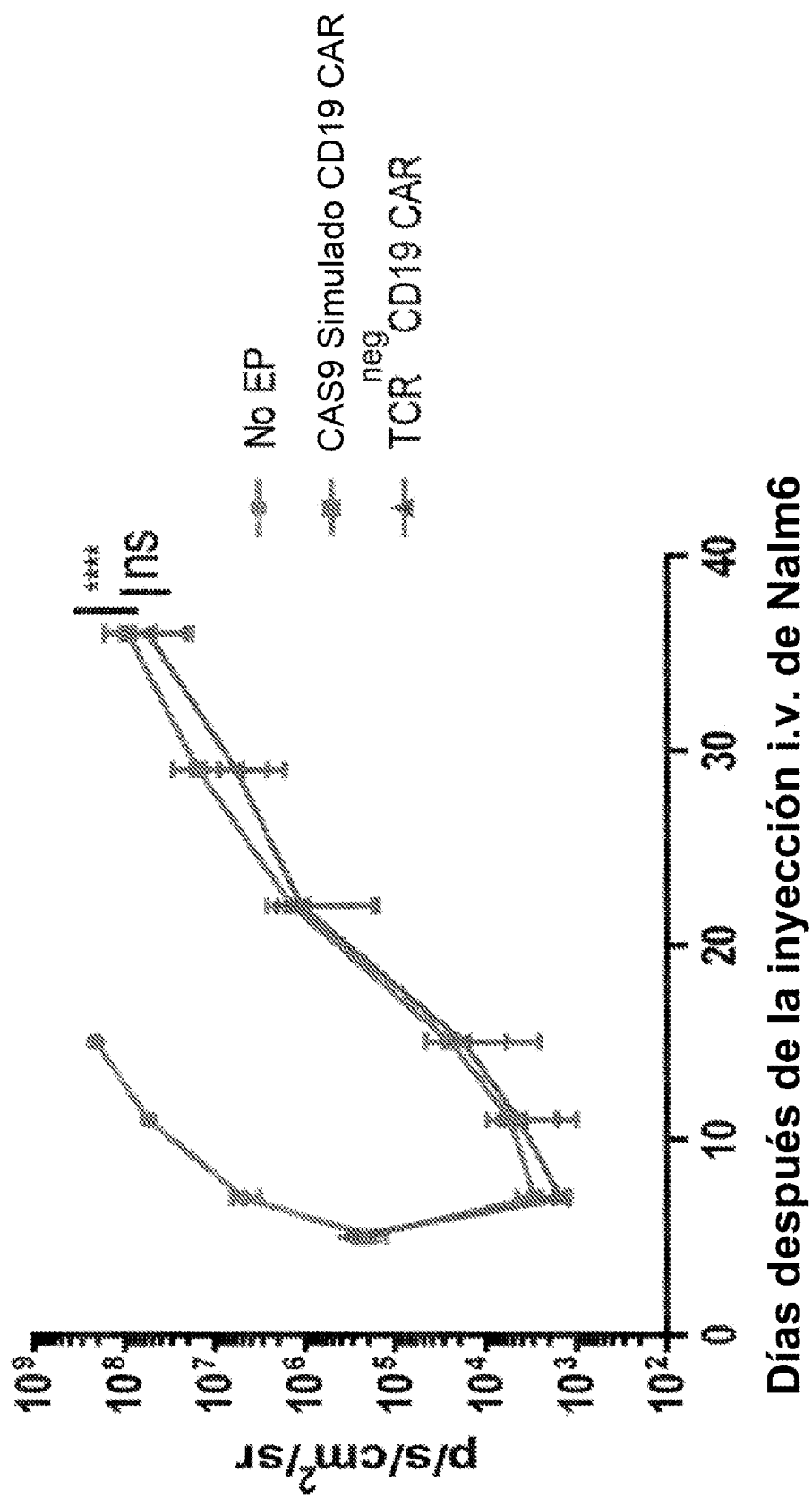
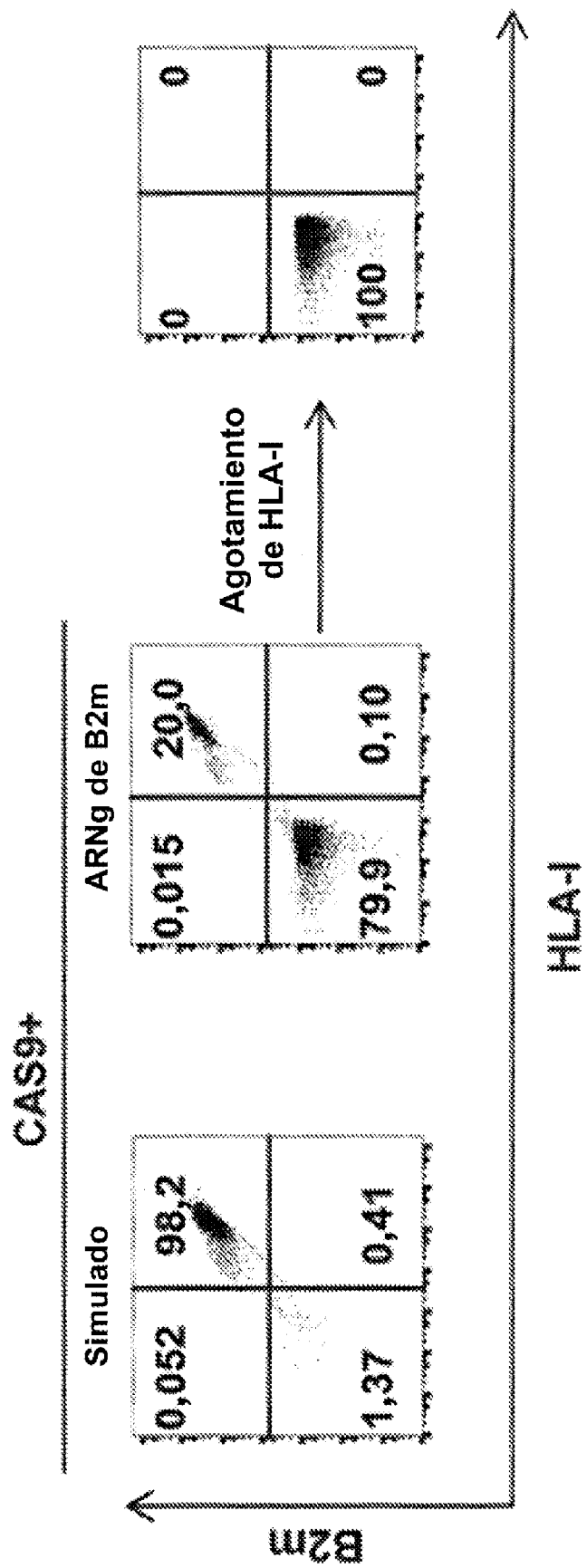


Figura 59E



**Figura 60**

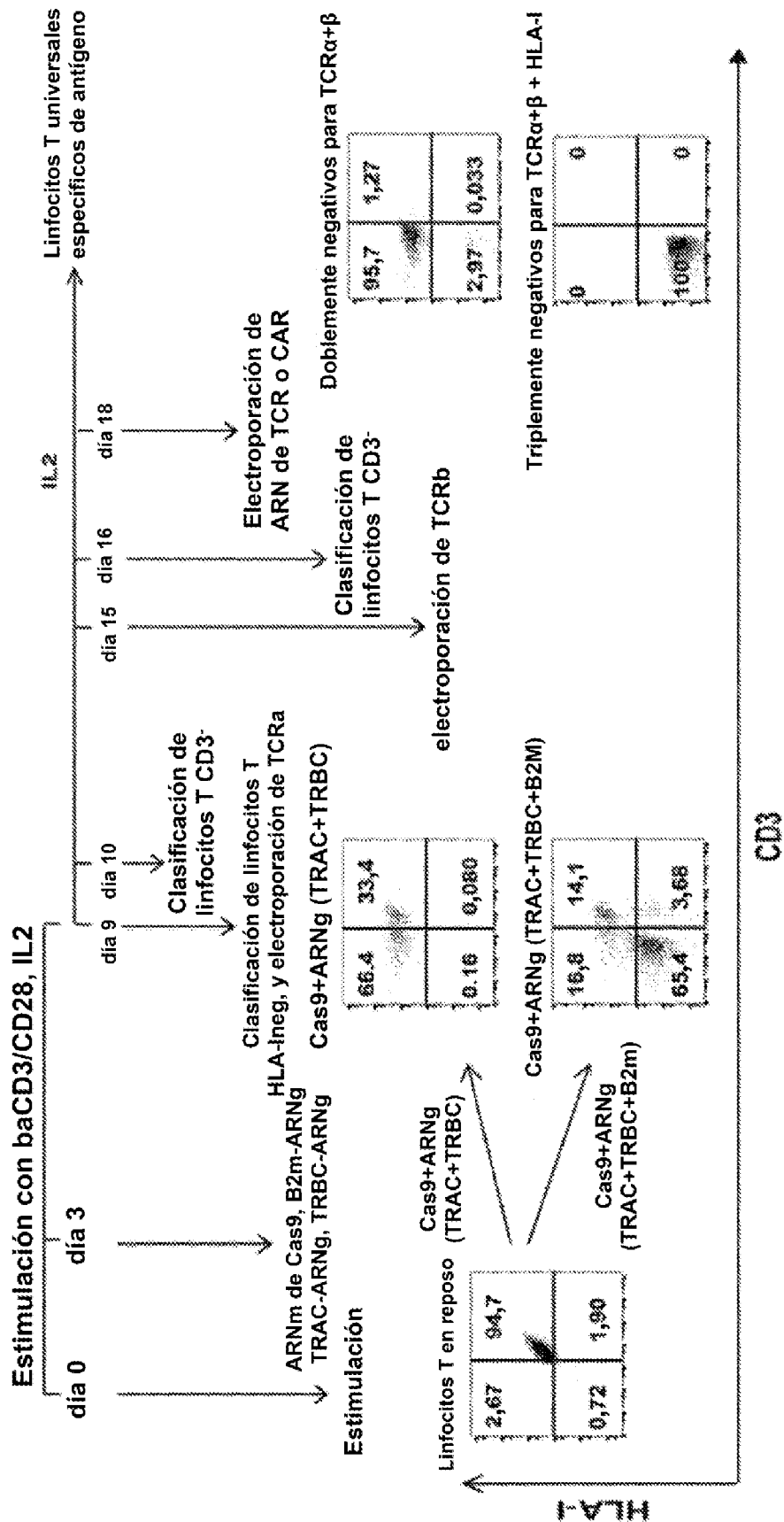


Figura 61

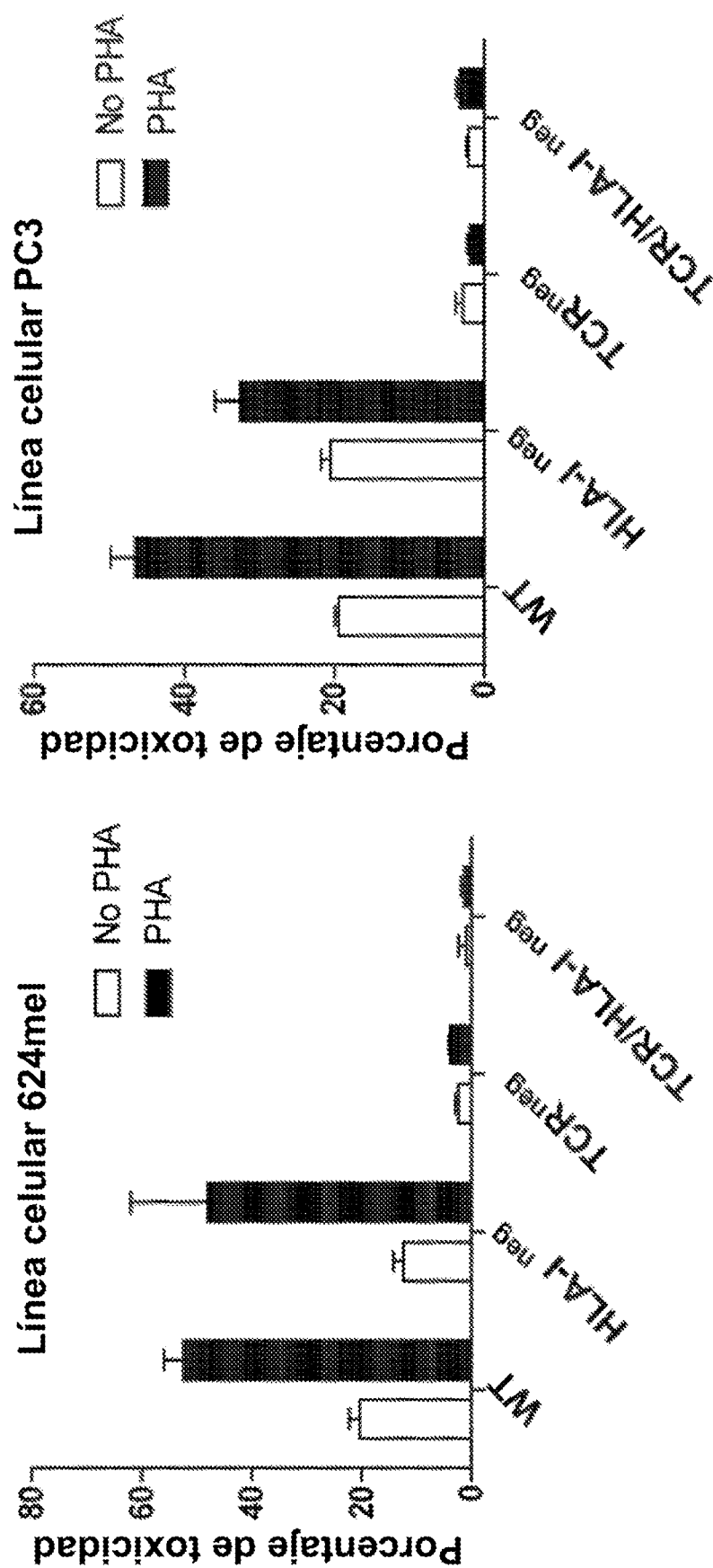


Figura 62

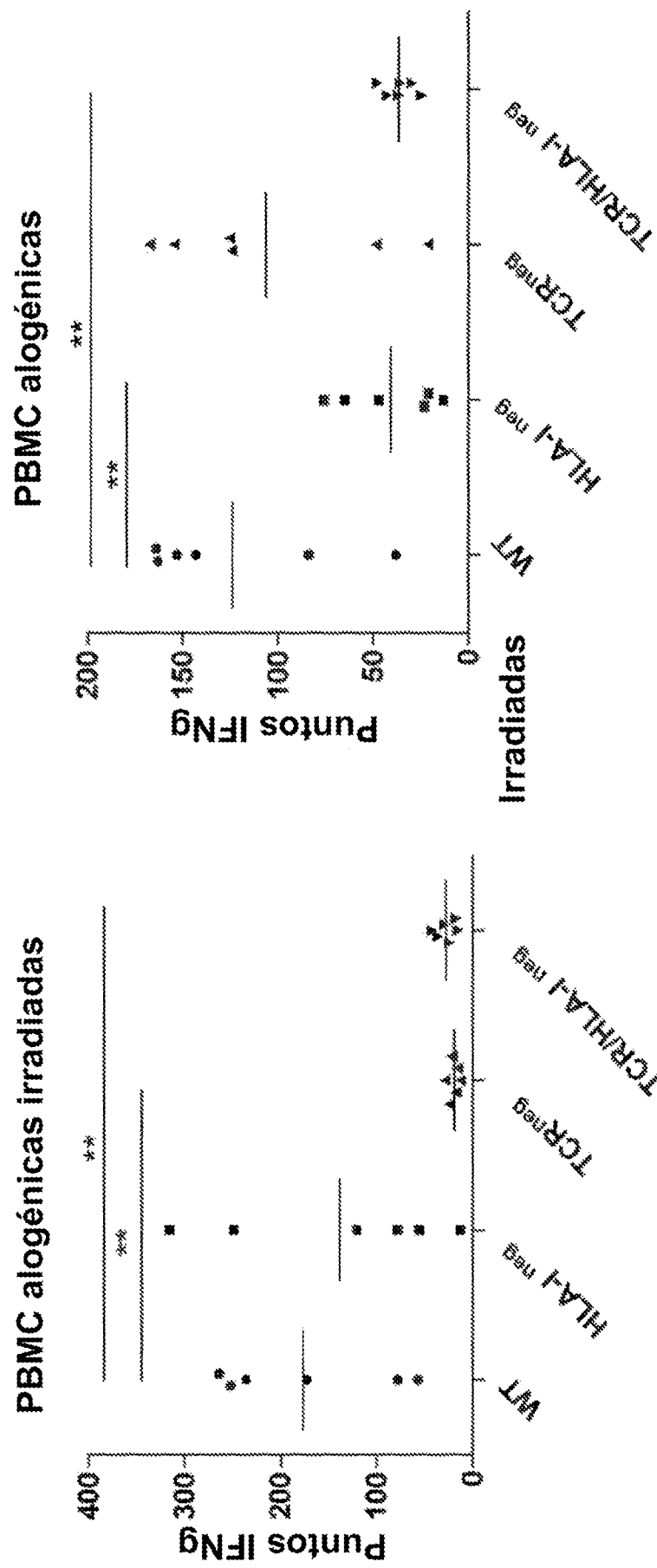


Figura 63



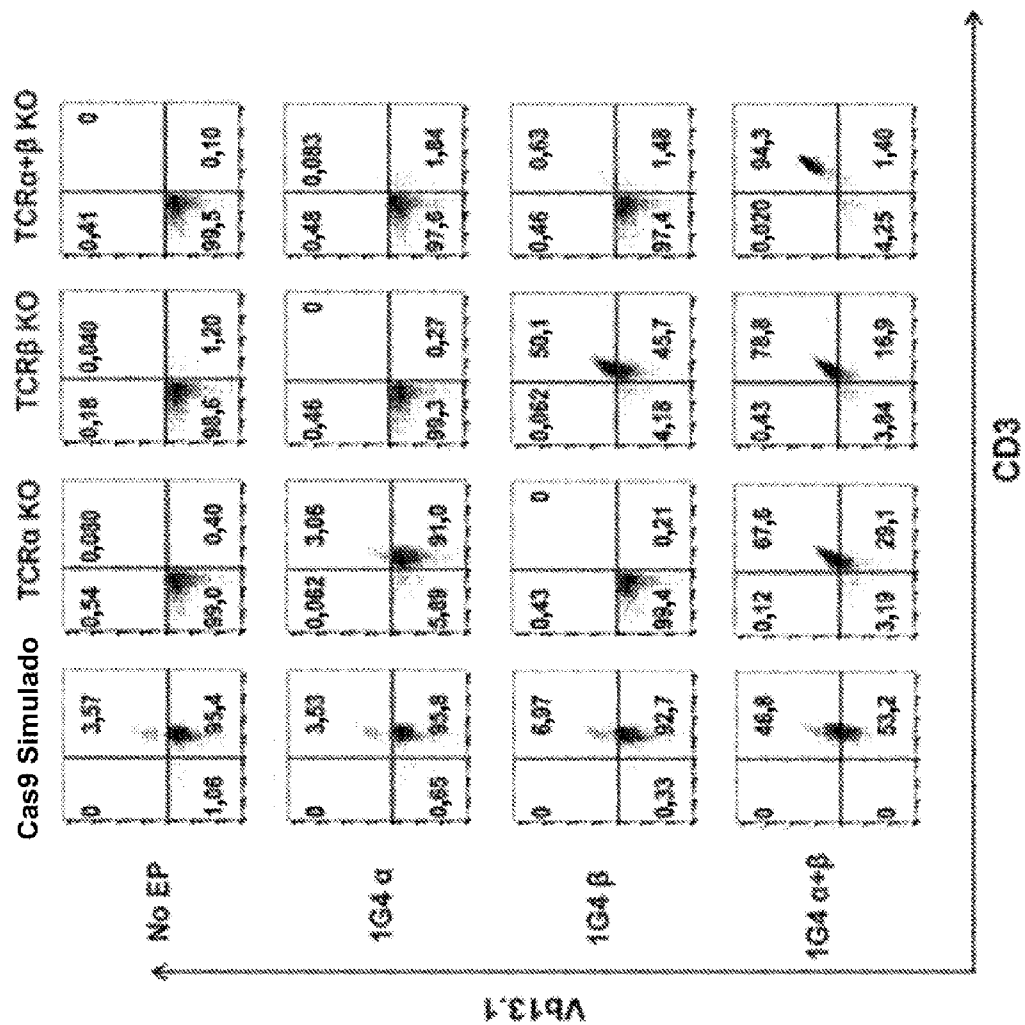


Figura 64

# Redirección de 1G4TCR

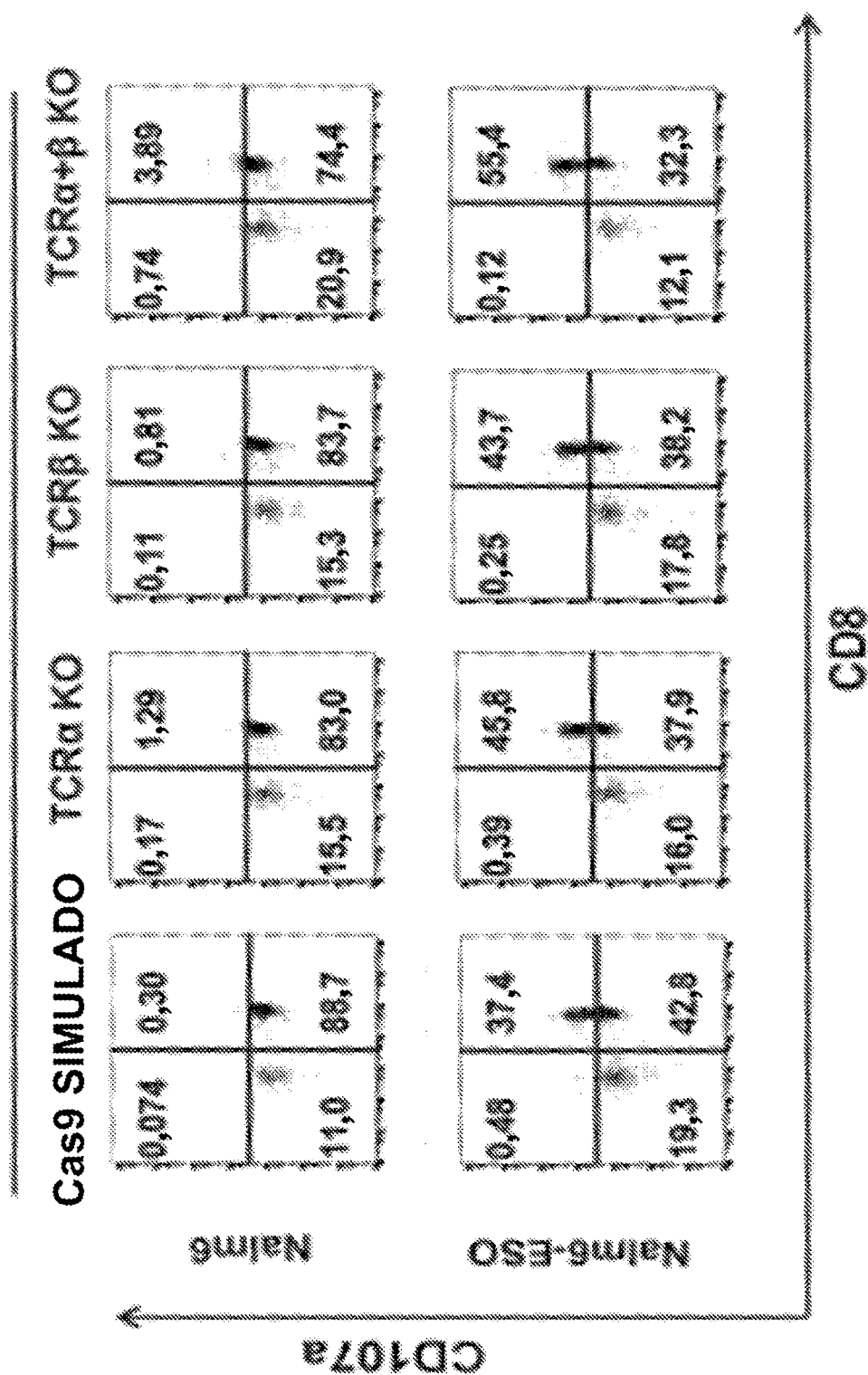


Figura 65A

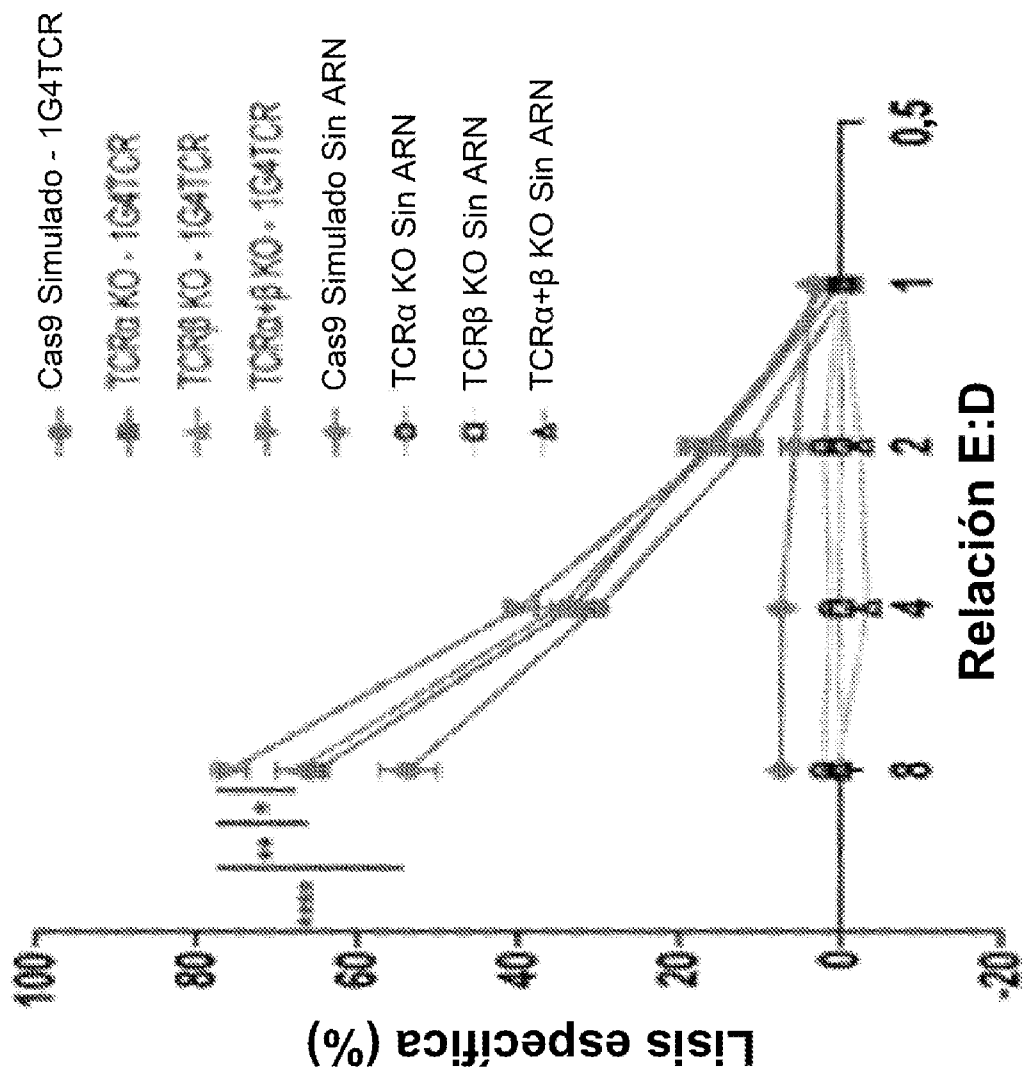


Figura 65B

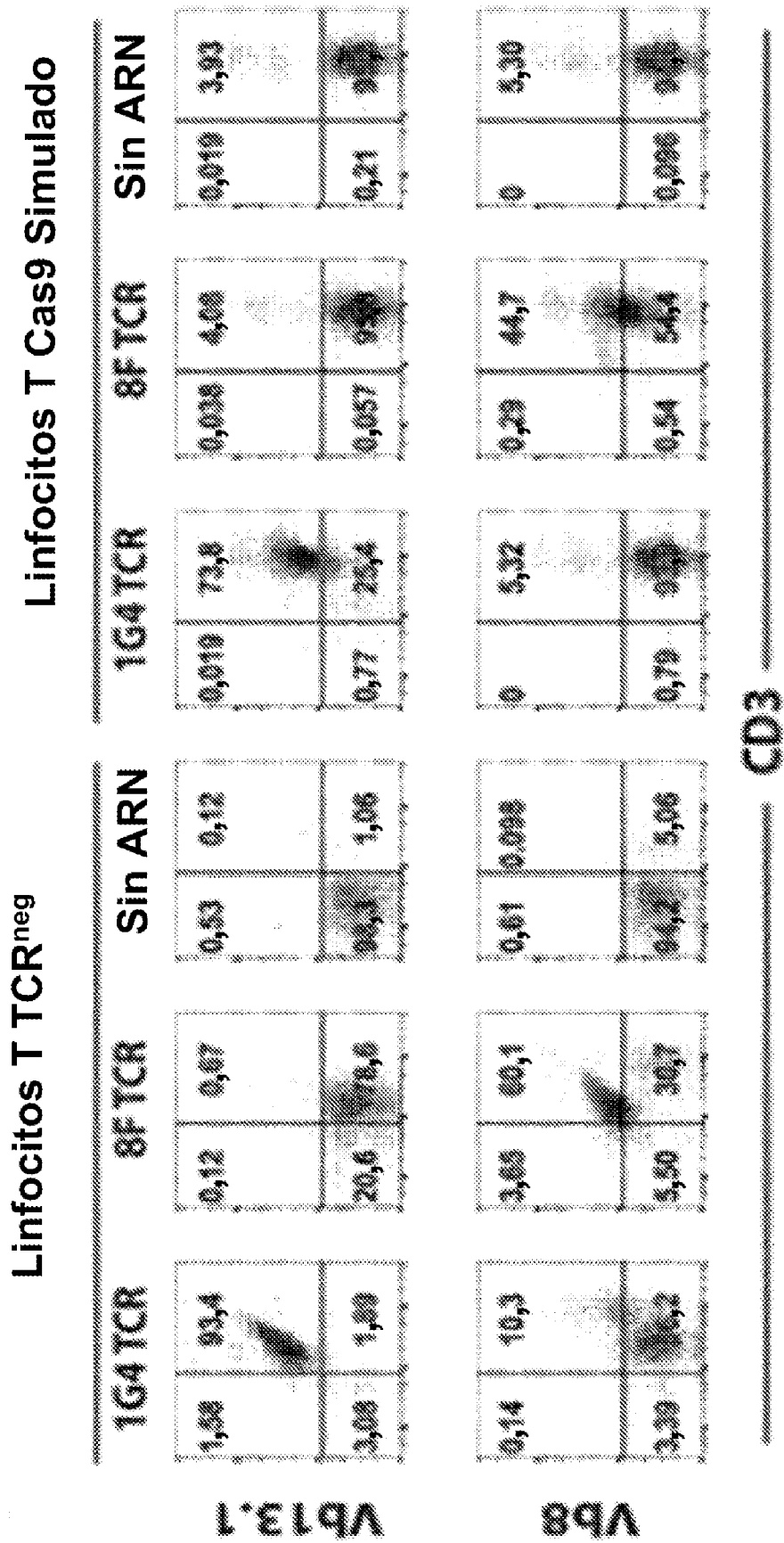


Figura 66

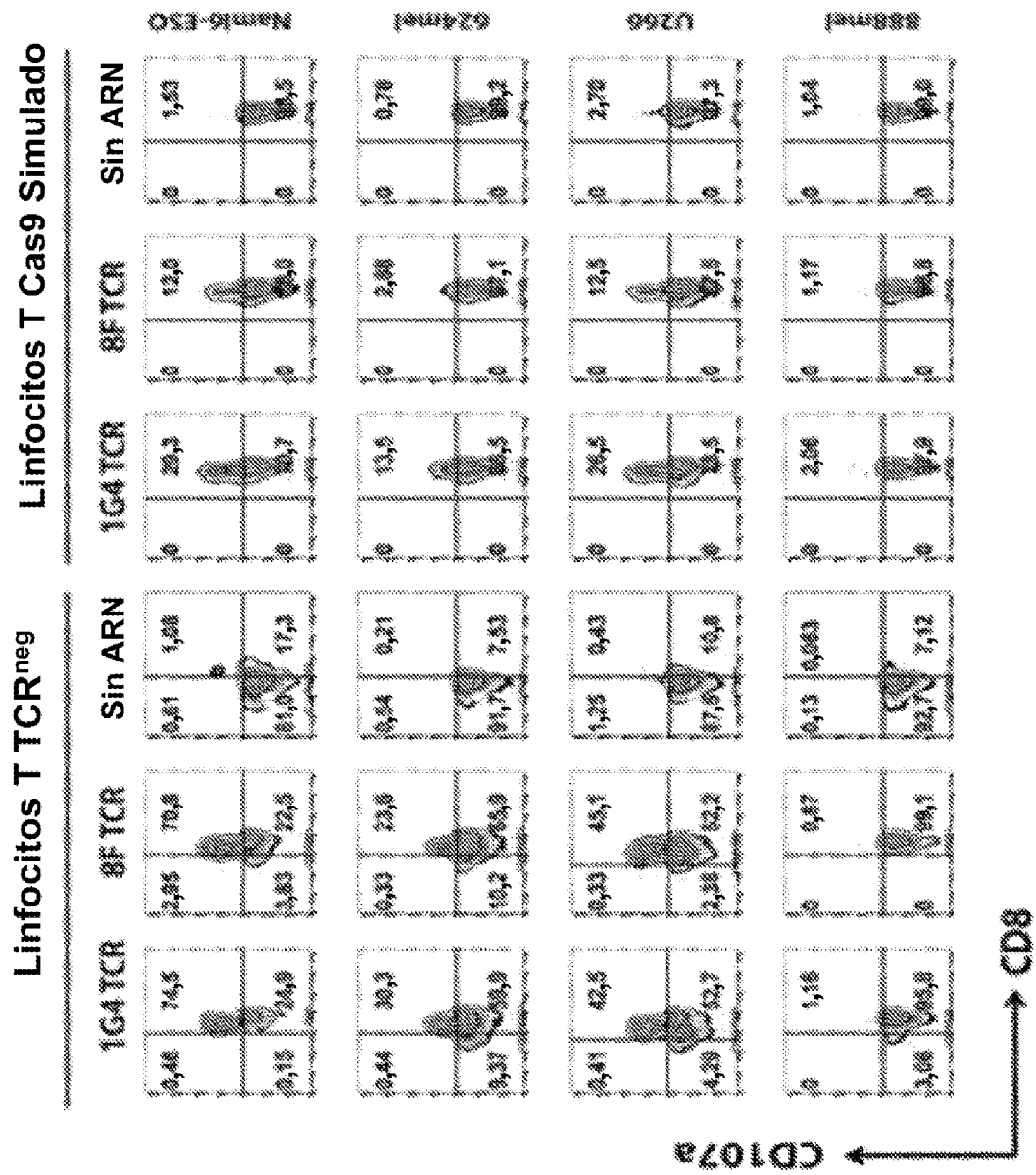


Figura 67A

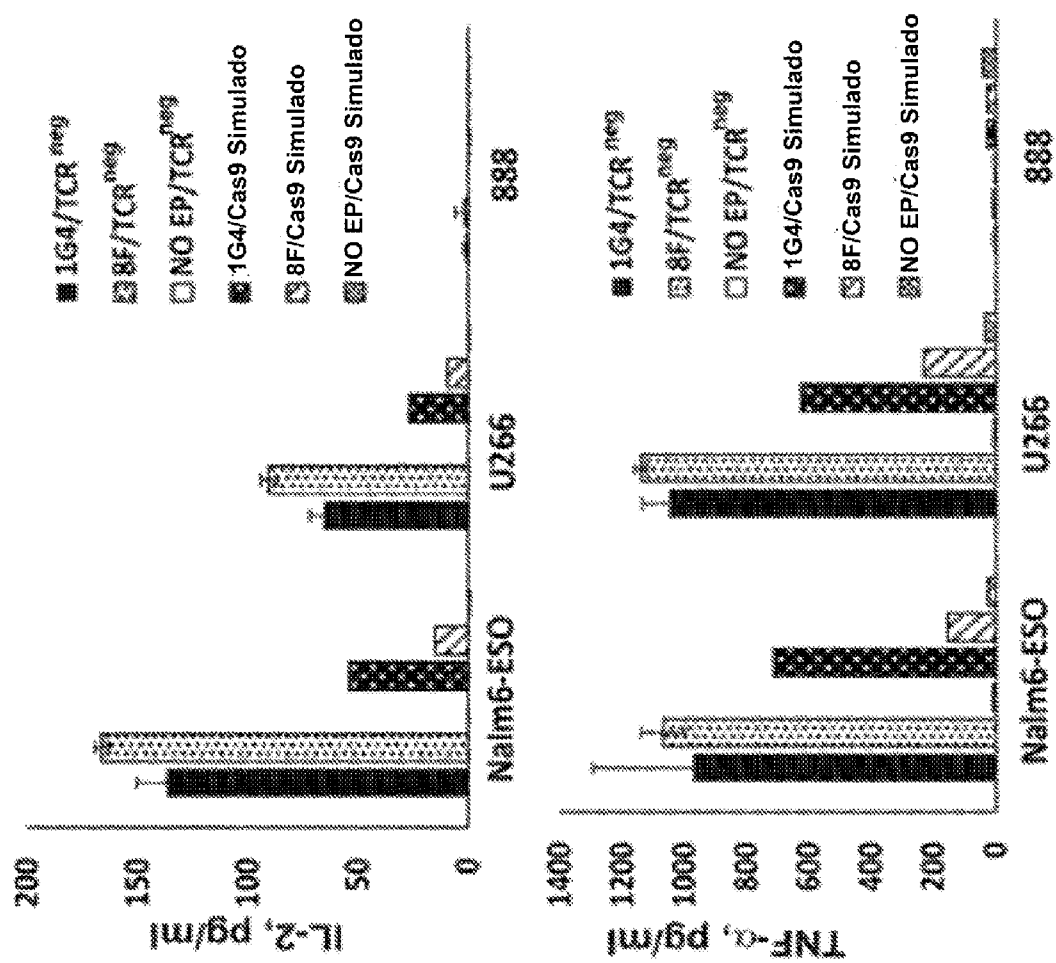


Figura 67B

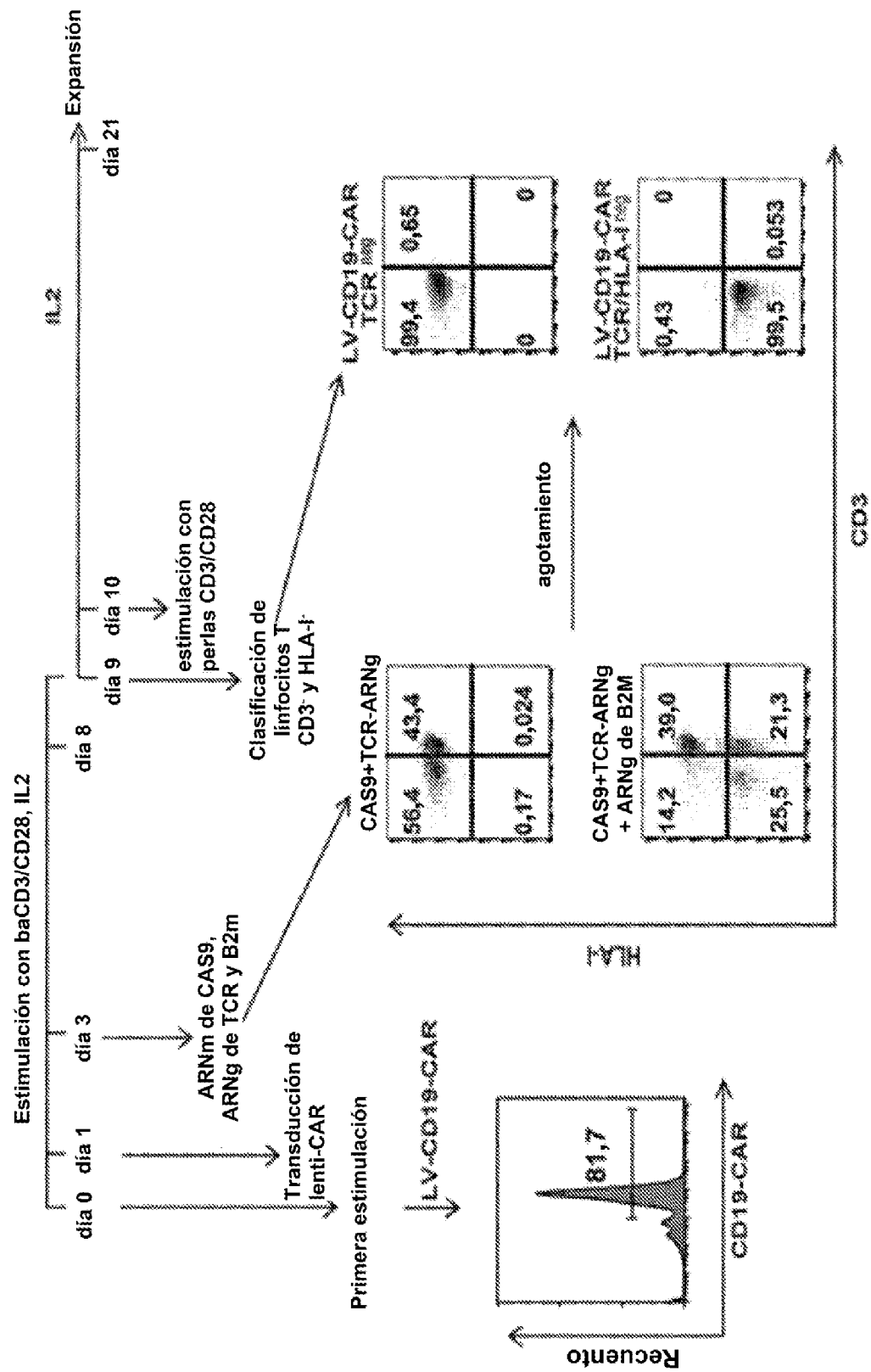


Figura 68

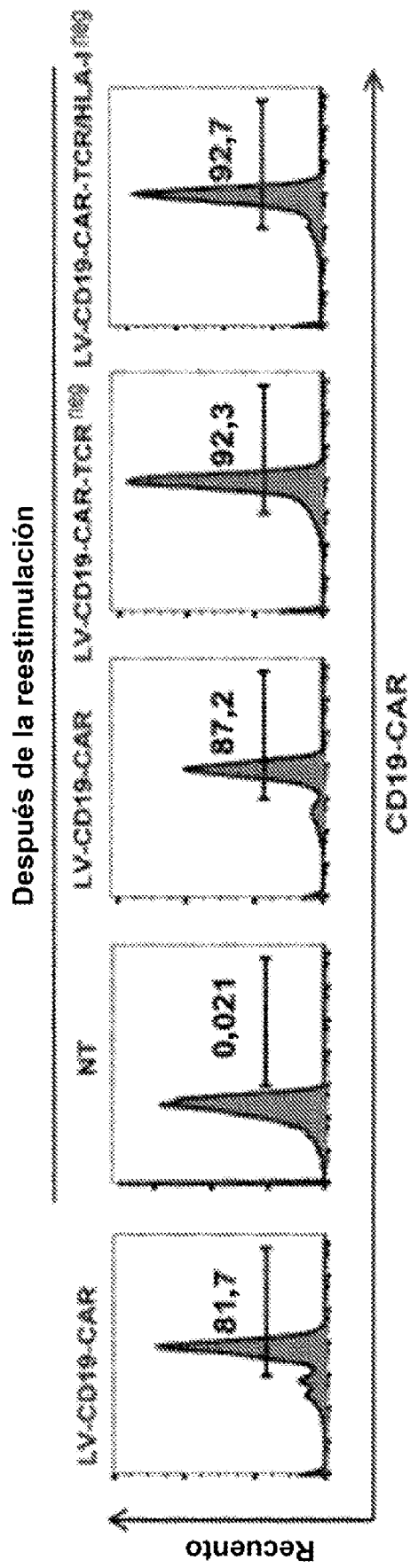


Figura 69



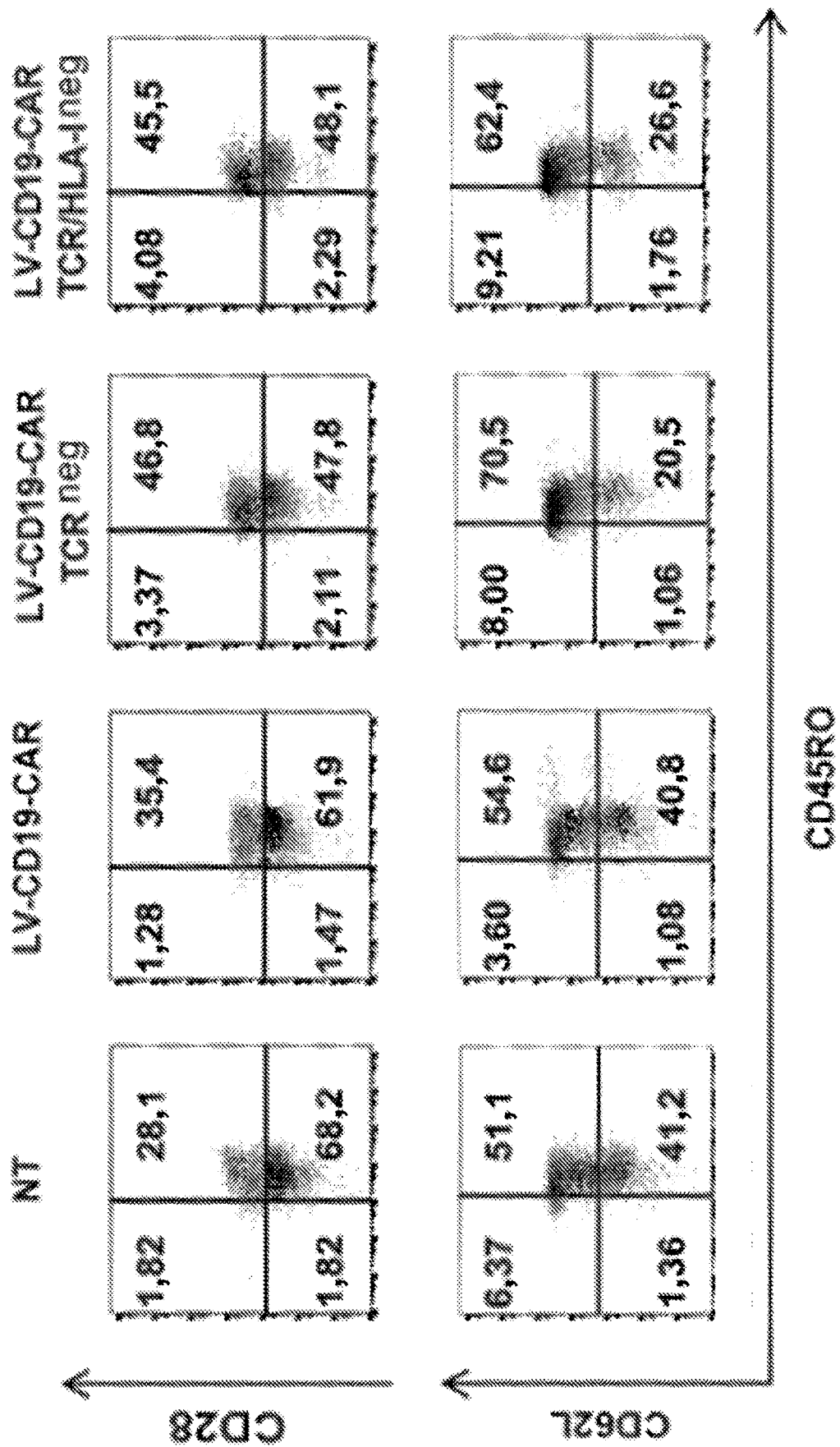


Figura 70

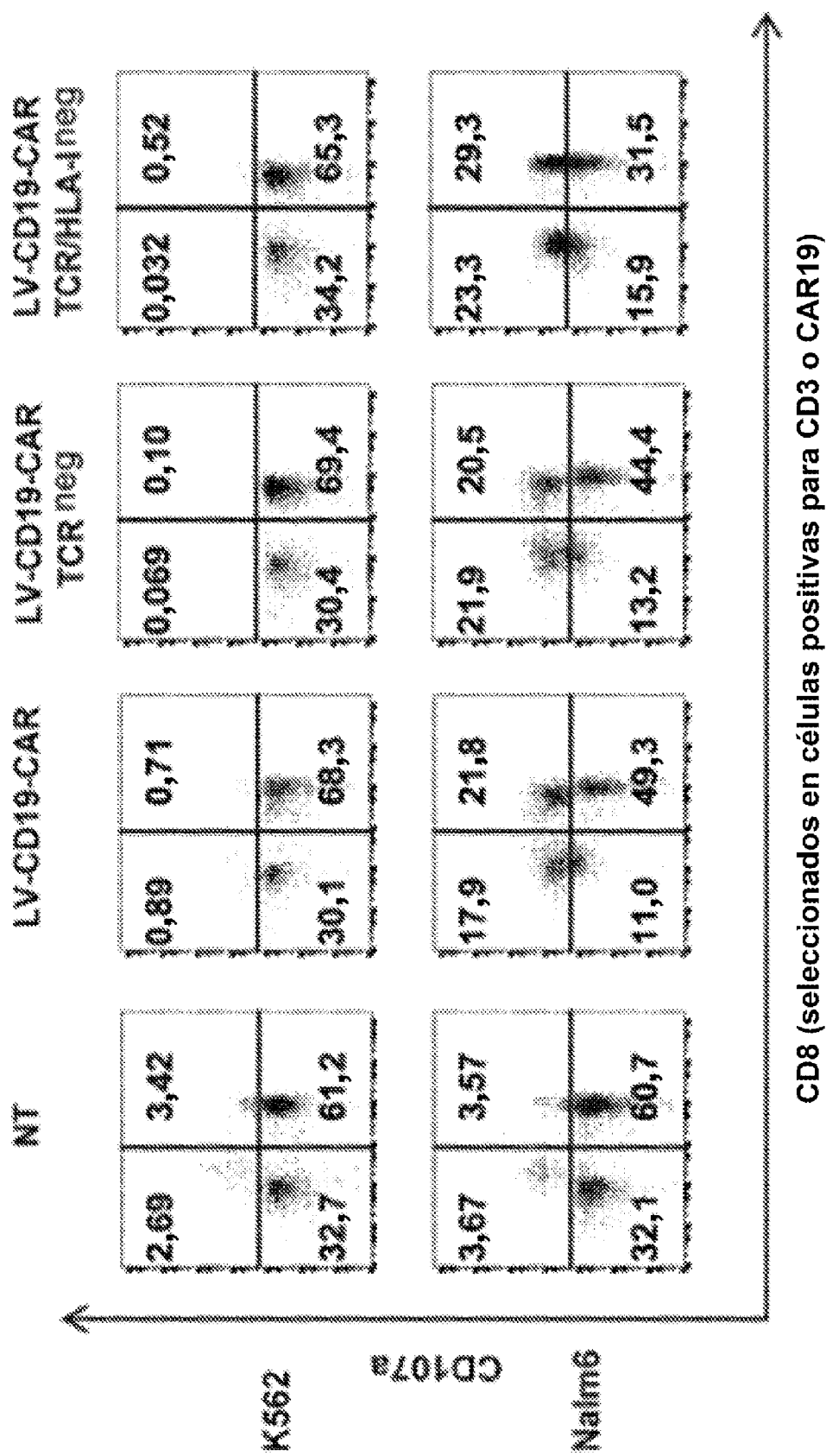


Figura 71

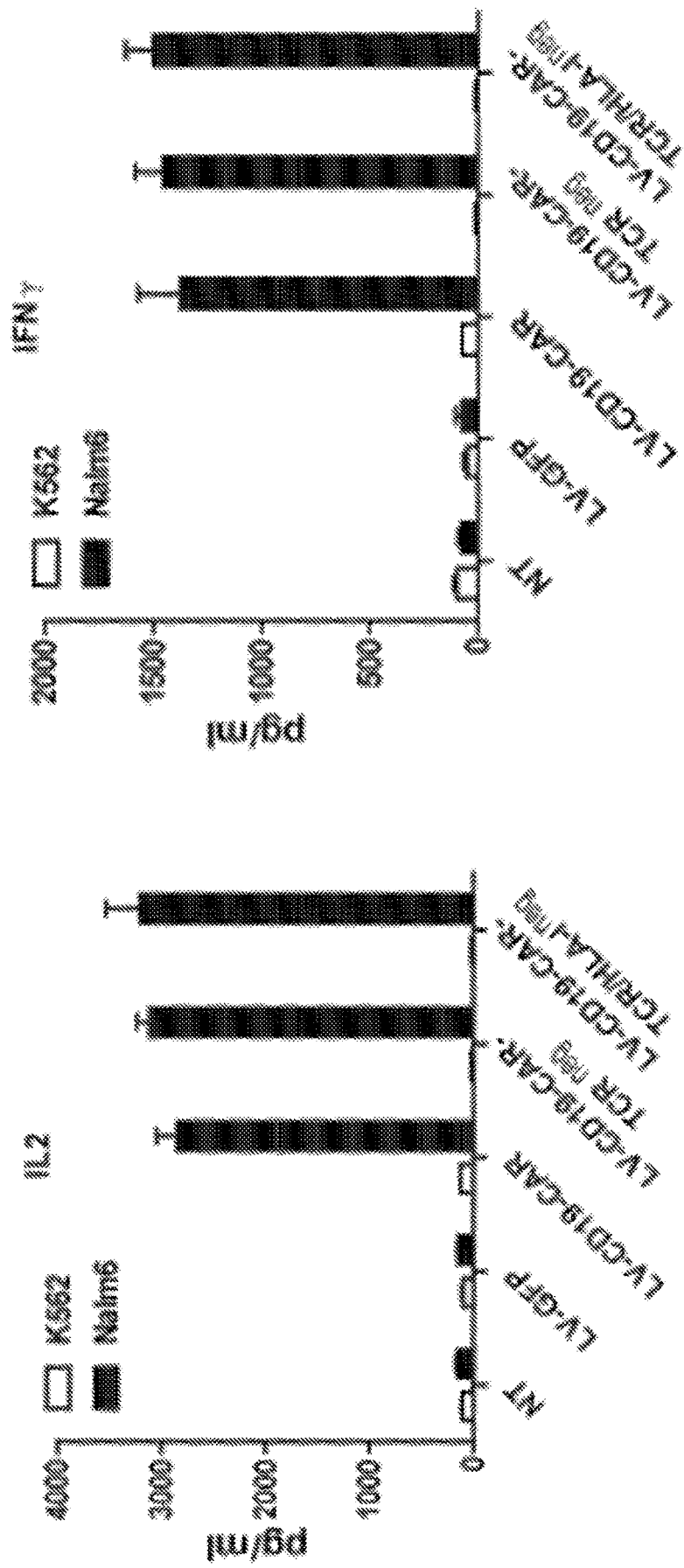


Figura 72

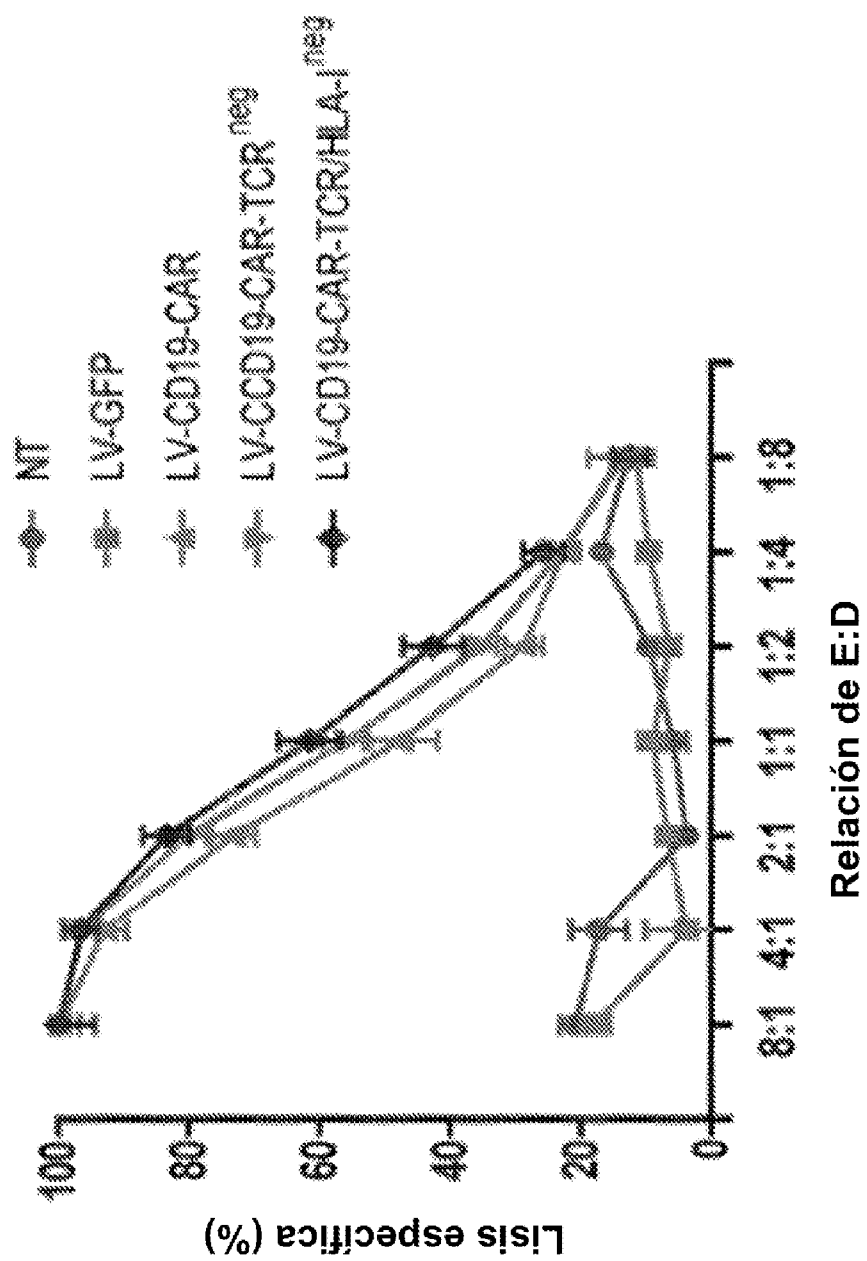


Figura 73

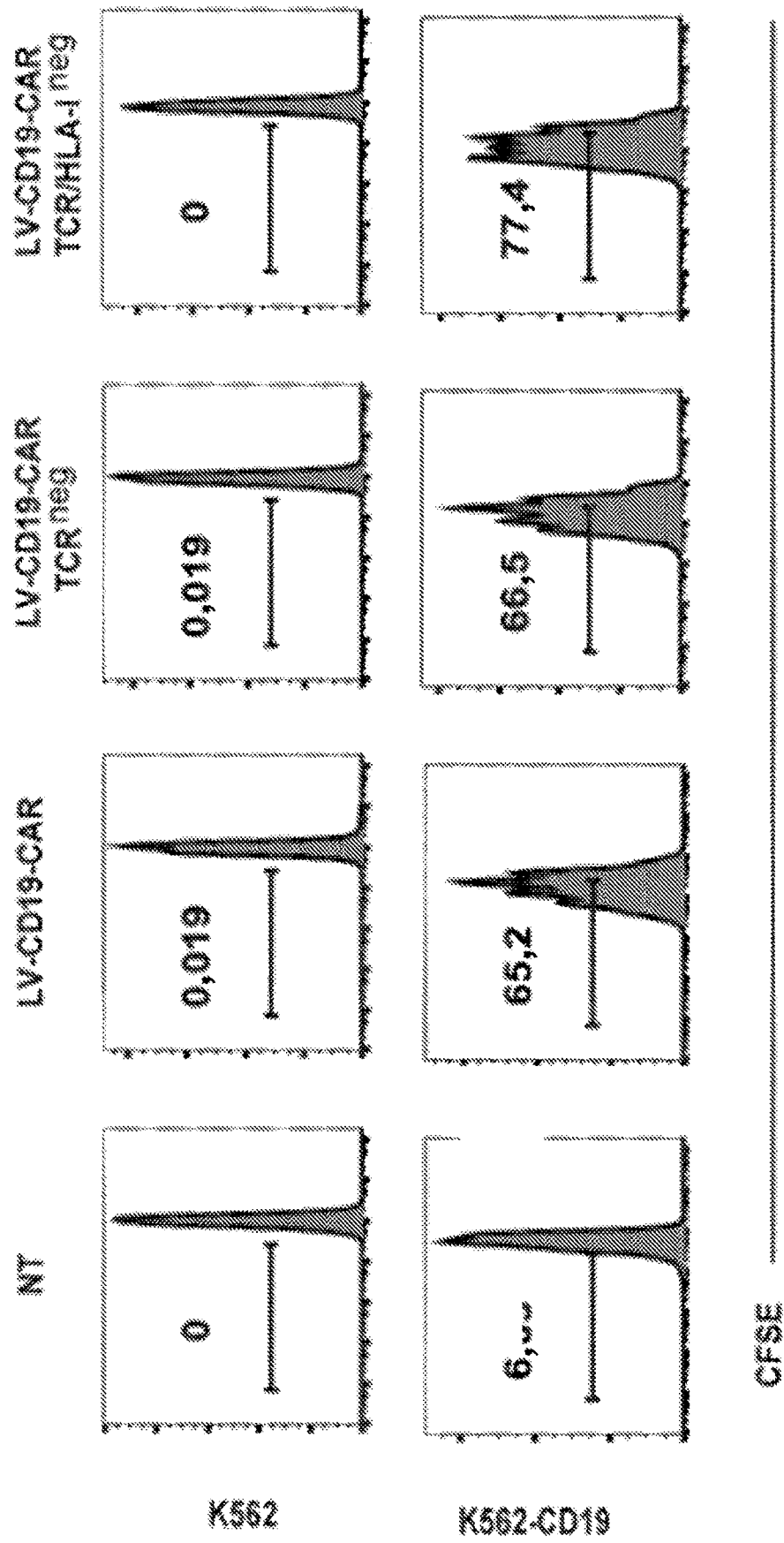


Figura 74

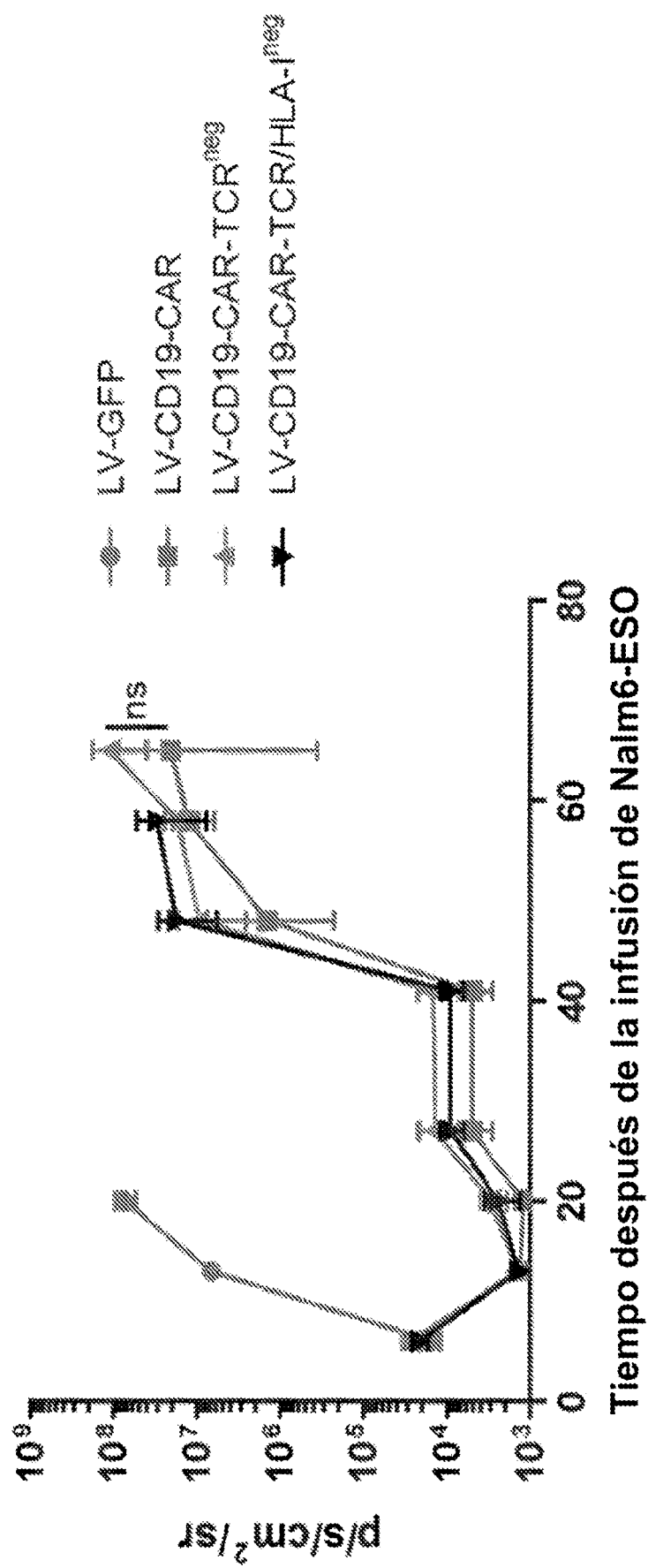


Figura 75A

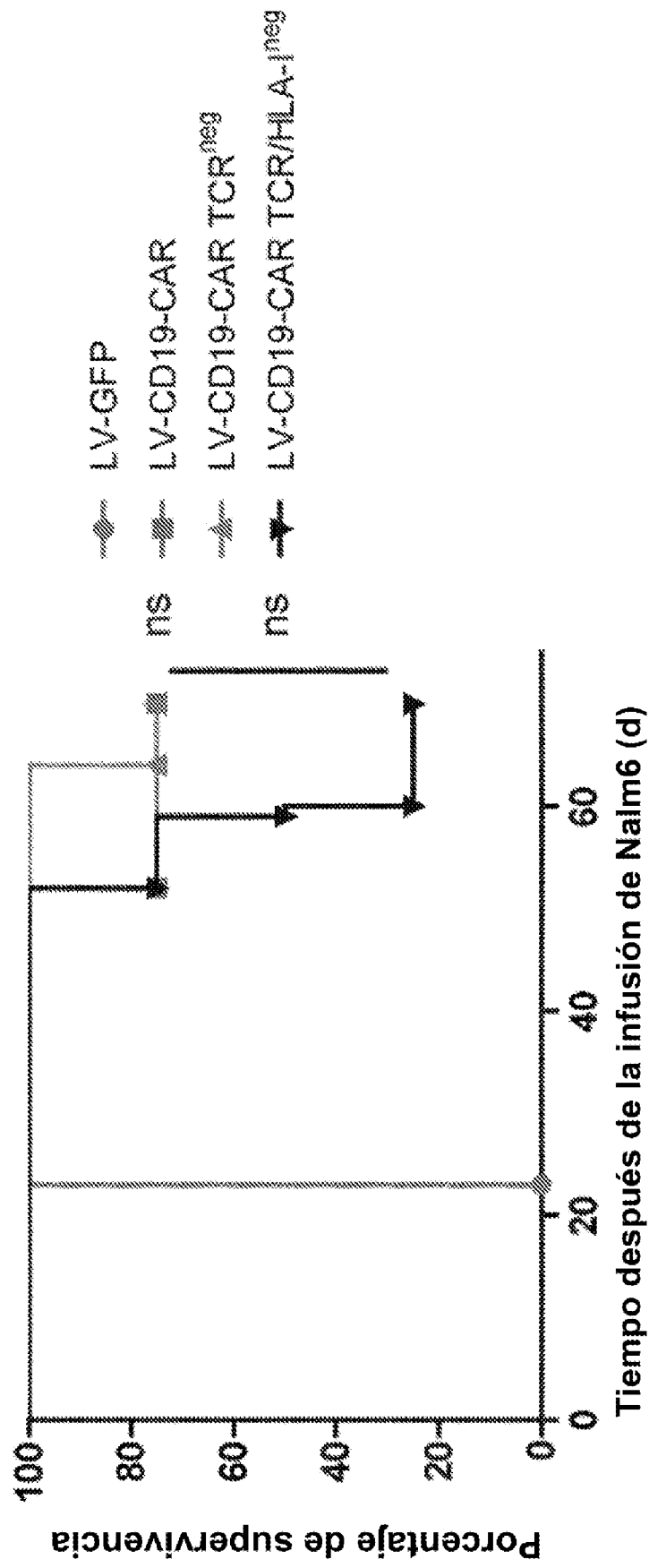


Figura 75B

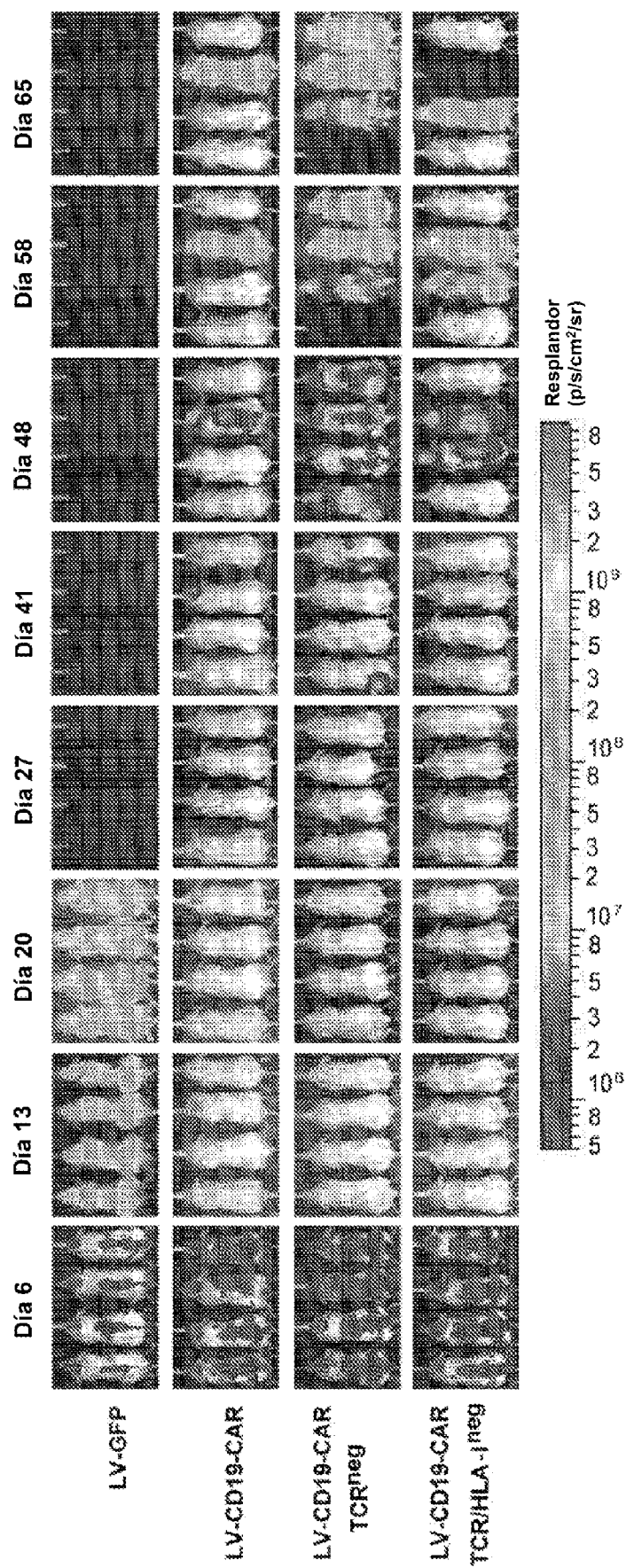


Figura 76



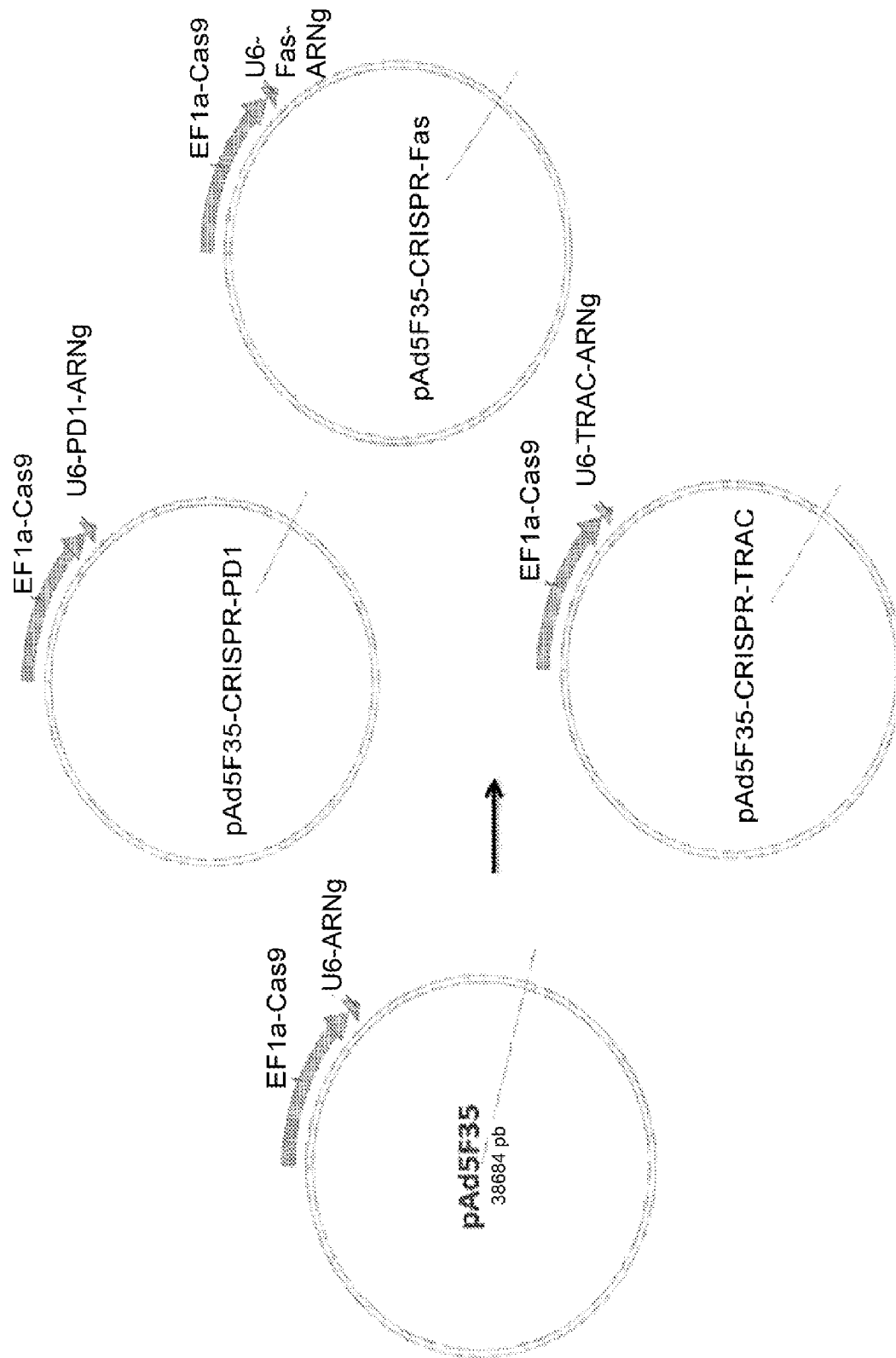


Figura 77

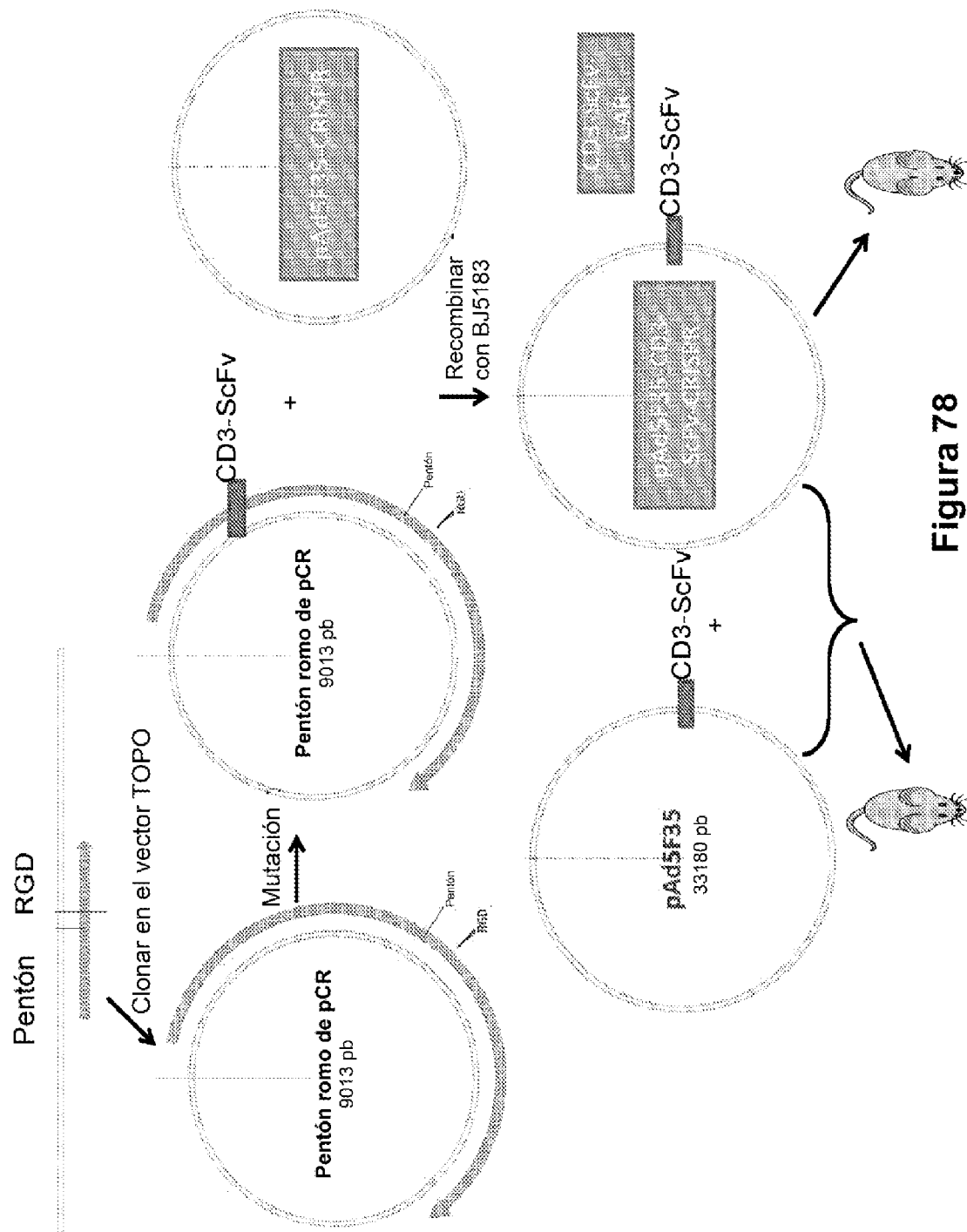


Figura 78

PD1-ARNg: GCCCAGGATGGTTCTTAGGT

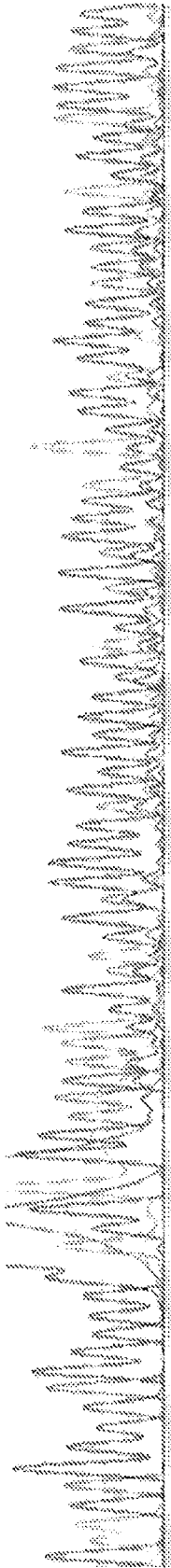


Figura 79A

WT: TGGGCTGGCCGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGGT  
1: TGGGCTGGCCGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGGT  
6: TGGGCTGGCCGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGGT  
7: TGGGCTGGCCGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGGT  
8: TGGGCTGGCCGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGGT  
13: TGGGCTGGCCGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTAGGTGG  
16: TGGGCTGGCCGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGGT  
19: TGGGCTGGCCGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGGT

Figura 79B

N.º de EP	Condición EP1	ARN de EP1 (ug)			ARN de EP2 (ug)			Cubeta	volumen (ul)	CD3 - %	82M - %	Factor de exp.
		CAS9	ARNg	Condición EP2	CAS9	ARNg	ARNg					
1	360v 1ms	40	20	360v 1ms	40	20	10	2mm	200	81,8	88,6	2,7
2	360v 1ms	40	10	360v 1ms	40	10	5	2mm	200	71,6	77,5	4,7
3	360v 1ms	40	2	360v 1ms	40	2	5	2mm	200	66,2	59,5	7,3
4	360v 1ms	40	0	360v 1ms	40	0	10	2mm	200	75,9		8,5
5	360v 1ms	20	10	360v 1ms	20	10	5	2mm	200	68,2	56,2	5,5
6	360v 1ms	40	20	360v 1ms	40	20	10	4mm	200	35,6	17,8	16,8
7	360v 1ms	20	10	360v 1ms	20	10	5	4mm	200	15,8	3,8	19,1
8	360v 1ms	80	40	360v 1ms	80	40	20	4mm	400	28	11,2	5,7
9	500v 500us	40	20	500v 500us	40	20	10	4mm	200	37,4	17,8	17,2
10	500v 1ms	20	10	500v 500us	20	10	5	4mm	200	22,8	9,3	18,5
11	500v 700us	20	10	500v 500us	20	10	5	4mm	200	18,1	5	16,7
12	No EP Solo lavado								200	1,8	1,5	18,8

Figura 80

ARN de EP1 (ug) ARN de EP2 (ug)									
N.º de EP	Condición EP1	Condición EP2	ARNg de CAS9	ARNg	Cubeta	Volumen de EP (ul)	CD3-	B2M-	Expansión D7
1	360v 1ms	360v 1ms	80	20	4mm	400	78,8	80,8	3,4
2	360v 1ms	360v 1ms	80	20	4mm	400	58,4	69,9	5,6
3	360v 1ms	360v 1ms	80	10	4mm	400	37,6	47,6	7,0
4	360v 2ms	360v 2ms	80	20	4mm	400	74,2	83,7	2,9
5	360v 2ms	360v 2ms	80	10	4mm	400	80,5	83,4	3,0
6	360v 2ms	360v 1ms	80	10	4mm	400	40,5	51,0	6,7
7	360v 2ms	360v 1ms	80	10	4mm	400	55,7	64,1	5,7
8	360v 2ms	360v 2ms	80	20	4mm	400	50,0	64,0	6,5
9	360v 2ms	360v 1ms	80	20	4mm	400	61,8	74,1	6,1
10	360v 1ms	360v 1ms	40	10	2mm	200	82,8	85,5	1,1
11	360v 1ms	360v 1ms	40	10	2mm	200	84,8	82,4	0,8
12	360v 1ms	360v 1ms	40	10	2mm	200	85,9	85,3	0,8
13	360v 1ms	360v 1ms	40	10	2mm	200	67,8	79,9	1,0
14	360v 1ms	360v 800us	80	20	4mm	400	51,3	62,8	6,9
15	No EP					200	4,1	6,3	13,0

Figura 81

	Condición EP1	Condición EP2	CAS9	ARNg	CD3-	B2M-	Expansión D7		
1	400v	3ms	500v	1ms	80	20	62,2	84,4	3,2
2	400v	3ms	500v	1ms	120	20	59,6	76,5	3,7
3	400v	3ms	500v	1ms	120	30	72,6	85,1	3,4
4	400v	2ms	500v	1ms	120	20	63,5	84,8	5,2
5	400v	2ms	500v	1ms	120	30	67,3	86,7	3,6
6	400v	2ms	500v	800us	120	20	54,8	79,3	3,9
7	400v	2ms	500v	800us	120	30	69,7	87,1	3,6
8	500v	2ms	500v	800us	80	20	63,6	85,2	3,3
9	500v	2ms	500v	800us	120	20	64,2	83,0	2,9
10	500v	2ms	500v	800us	120	30	76,5	84,1	2,1
11	500v	2ms	500v	800us	120	30	75,9	87,6	2,0
12	500v	2ms	500v	1ms	120	30	81,4	89,8	2,0
13	450v	2ms	500v	1ms	80	20	66,3	88,1	3,1
14	450v	2ms	500v	1ms	120	20	71,0	88,2	2,7
15	450v	3ms	500v	1ms	120	20	74,8	88,2	1,8
16	400v	3ms	500v	1ms	80	20	60,6	72,0	2,2
17	NO EP						0,5	0,7	9,9

Figura 82

N.º de EP	Condición EP1	Condición EP2	CAS9	ARNg	CD3-	B2m-	Exp. Día 8		
1	400v	2ms	500v	1ms	120	20	68,8	78,9	7,8
2	400v	2ms	500v	1ms	120	10	51,5	60,3	9,7
3	500v	1ms	500v	1ms	120	20	70,6	79	8,3
4	500v	1ms	500v	1ms	120	10	52,1	62,9	10,1
5	500v	1ms	500v	1ms	120	5	30,6	31,4	11,4
6	500v	1ms	500v	1ms	120	1	8,91	5,51	12,4
7	500v	1ms	400v	1ms	120	20	55,9	67	10,3
8	400v	2ms	500v	800us	120	20	61,6	73,4	8,6
9	400v	2ms	500v	800us	120	10	42,9	49,9	10,4
10	400v	2ms	500v	800us	80	10	41,8	49,3	10,0
11	400v	2ms	500v	1ms	120	20	59,1	68,1	6,8
12	NO EP						3,73	2,79	17,0

Figura 83

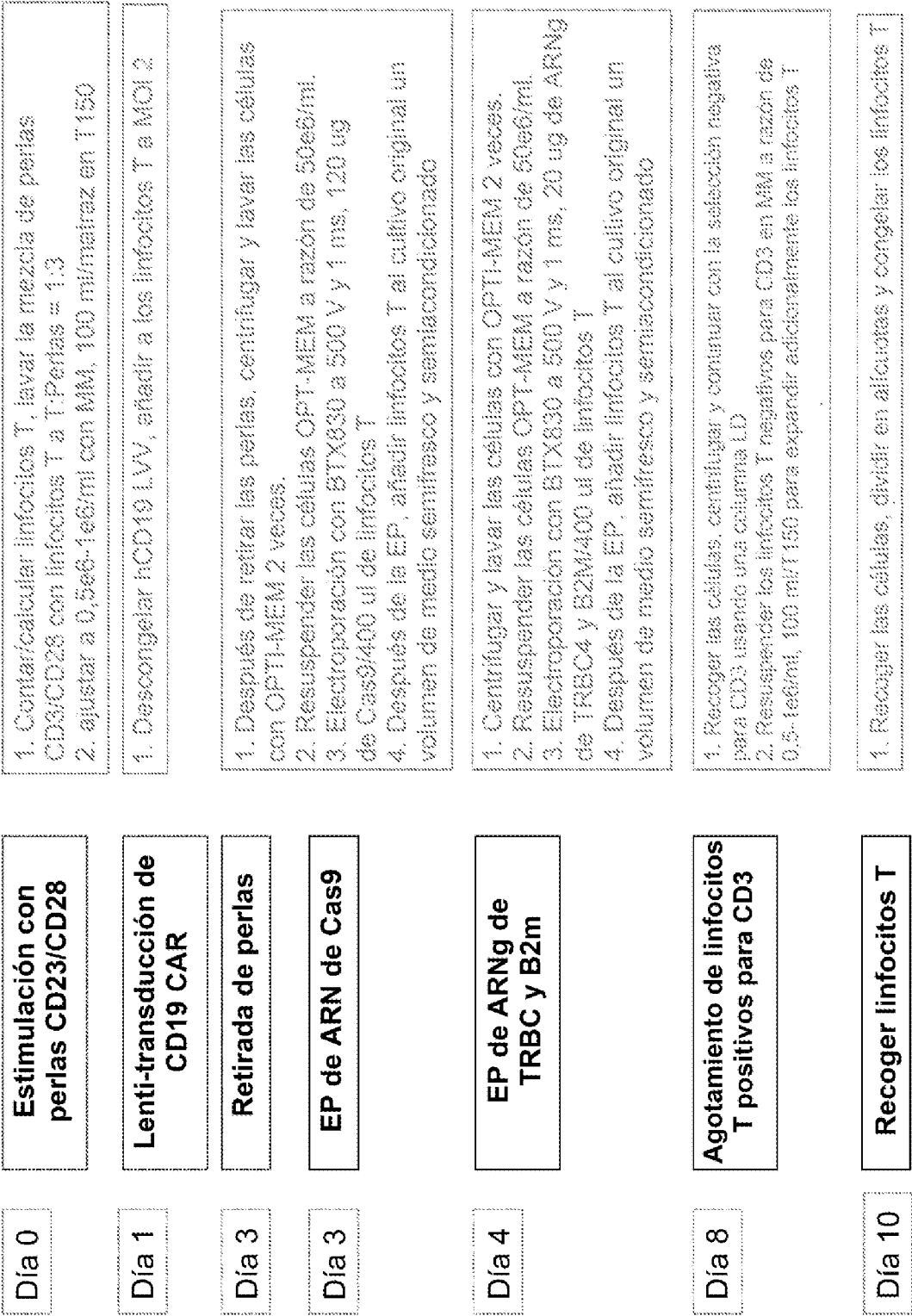


Figura 84



N.º de célula	N.º de grupo	Donante	Linfocitos T	Día 0	Día 3	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 10
1	ND391		CART/SIMULADO EP	10,0	19,8	63,4	127,9	310,2	556,8	1090,8
2	ND391		CART/CRISPR	100,0	178,2	175,4	350,4	571,6	1036,8	2985,6
3	ND463		CART/SIMULADO EP	10,0	17,1	57,0	115,1	301,9	648,6	1282,5
4	ND463		CART/CRISPR	90,0	153,5	150,8	309,6	522,8	861,6	2839,2
5	ND463		NOMOD	30,0	43,5	173,8	305,2	733,2	1503,2	2935,2
6	ND469		CART/SIMULADO EP	10,0	12,0	66,6	99,3	301,9	577,2	1017,9
7	ND469		CART/CRISPR	60,0	108,2	74,1	147,0	252,0	521,6	1190,4
Factor de expansión										
N.º de grupo	Donante	Linfocitos T	Día 0	Día 3	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 10	
1	ND391	ND391 CART/SIMULADO EP	1	2	6	13	31	56	109	
2	ND391	ND391CART/CRISPR	1	2	2	4	6	10	30	
3	ND463	ND463 CART/SIMULADO EP	1	2	6	12	30	65	128	
4	ND463	ND463 CART/CRISPR	1	2	2	3	6	10	32	
5	ND463	ND463 NOMOD	1	1	6	10	24	50	98	
6	ND469	ND469 CART/SIMULADO EP	1	1	7	10	30	58	102	
7	ND469	ND469 CART/CRISPR	1	2	1	2	4	9	20	

## Figura 85

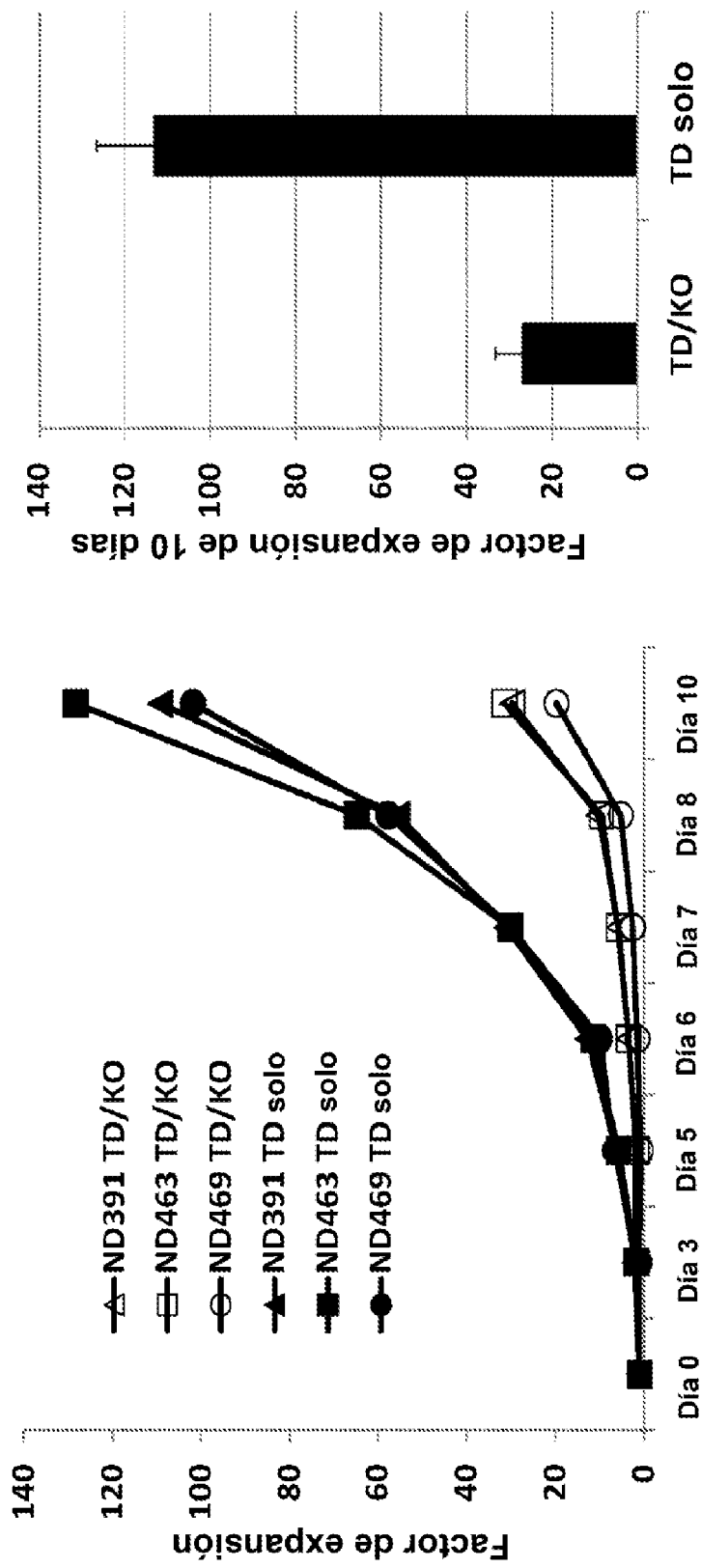


Figura 86

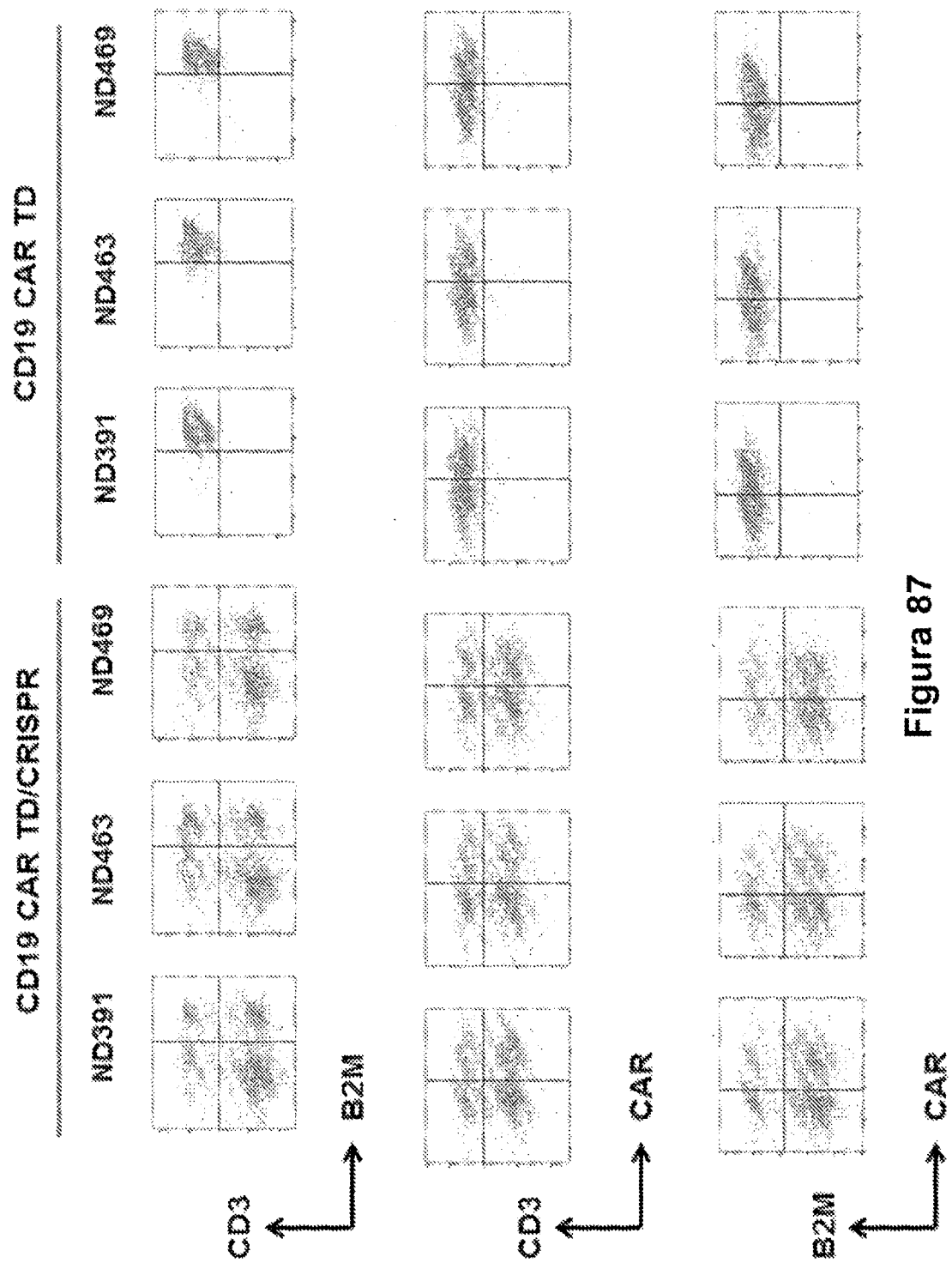
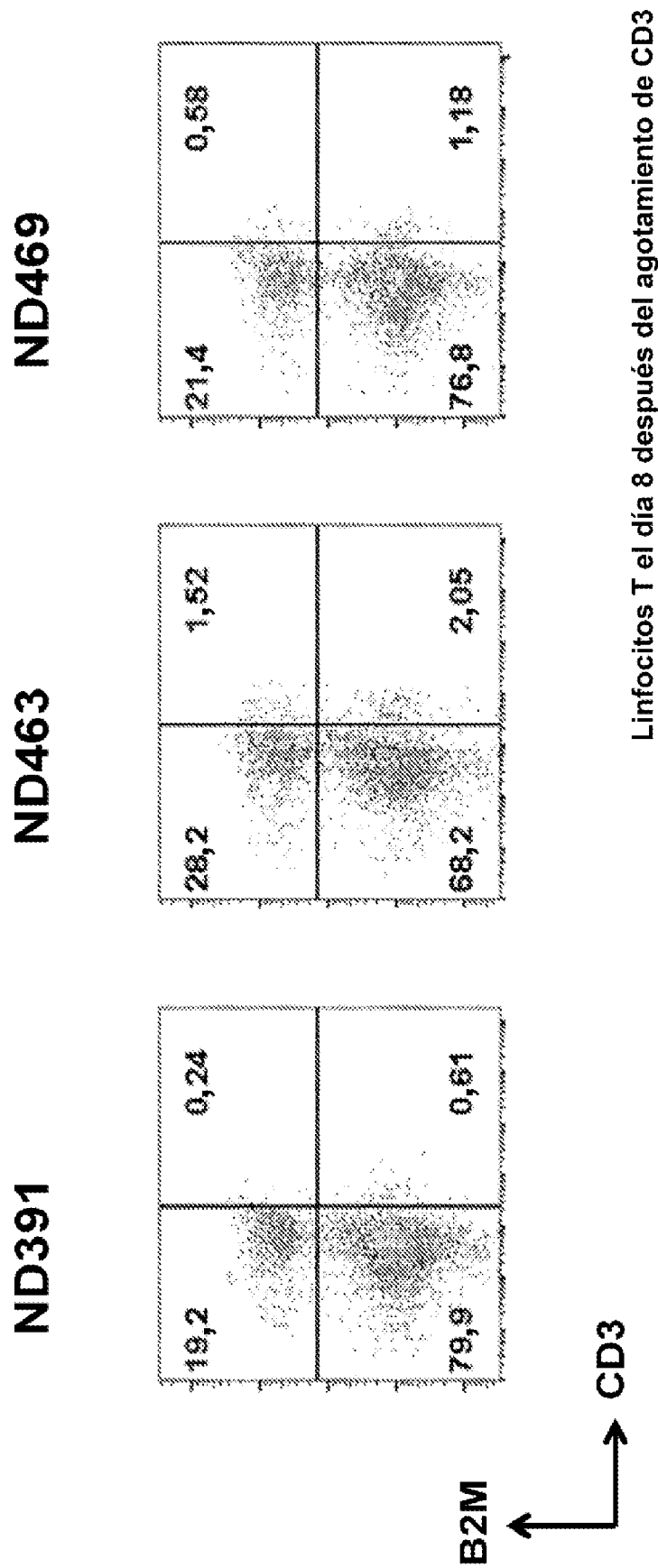
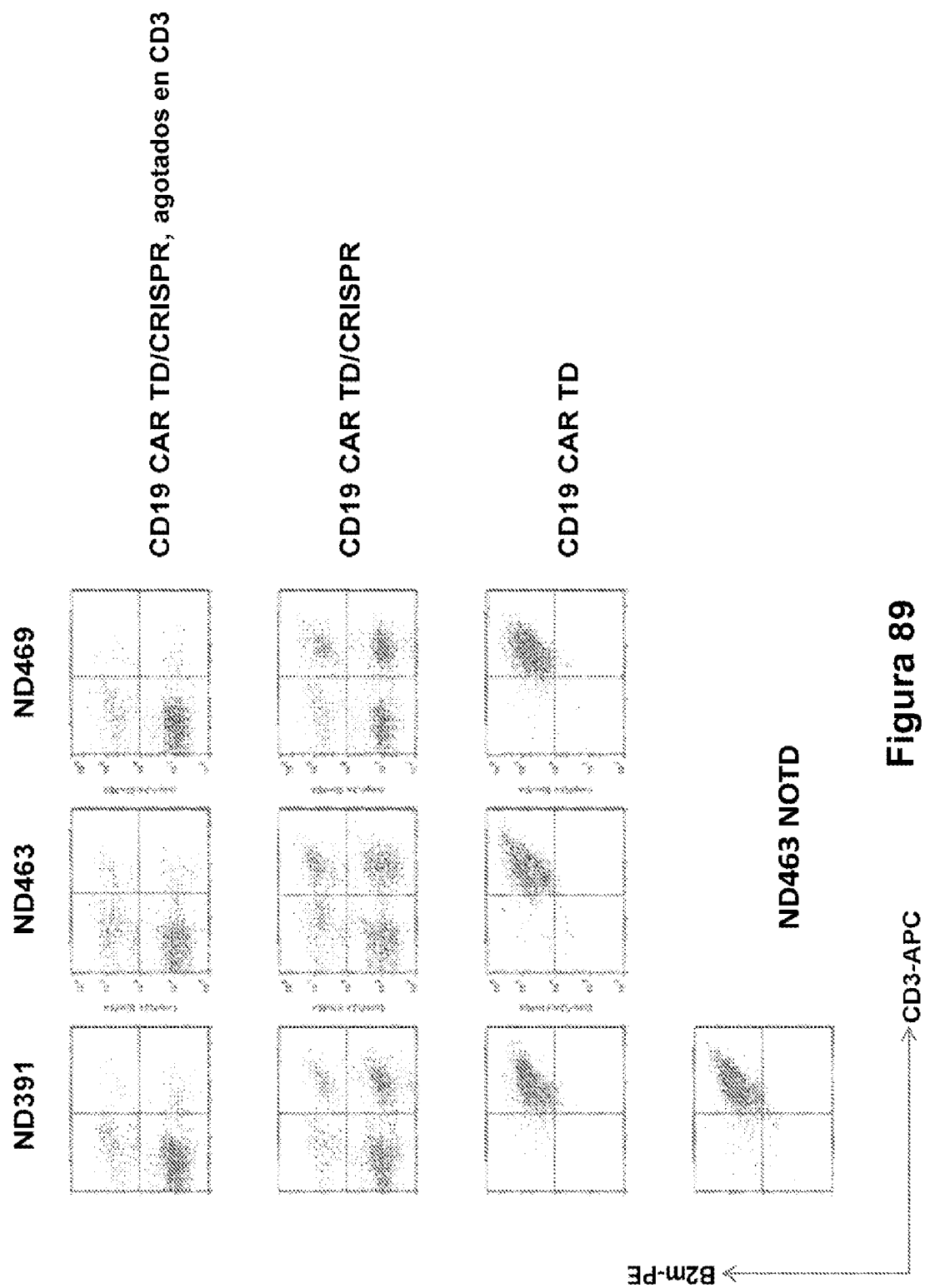


Figura 87



**Figura 88**



**Figura 89**

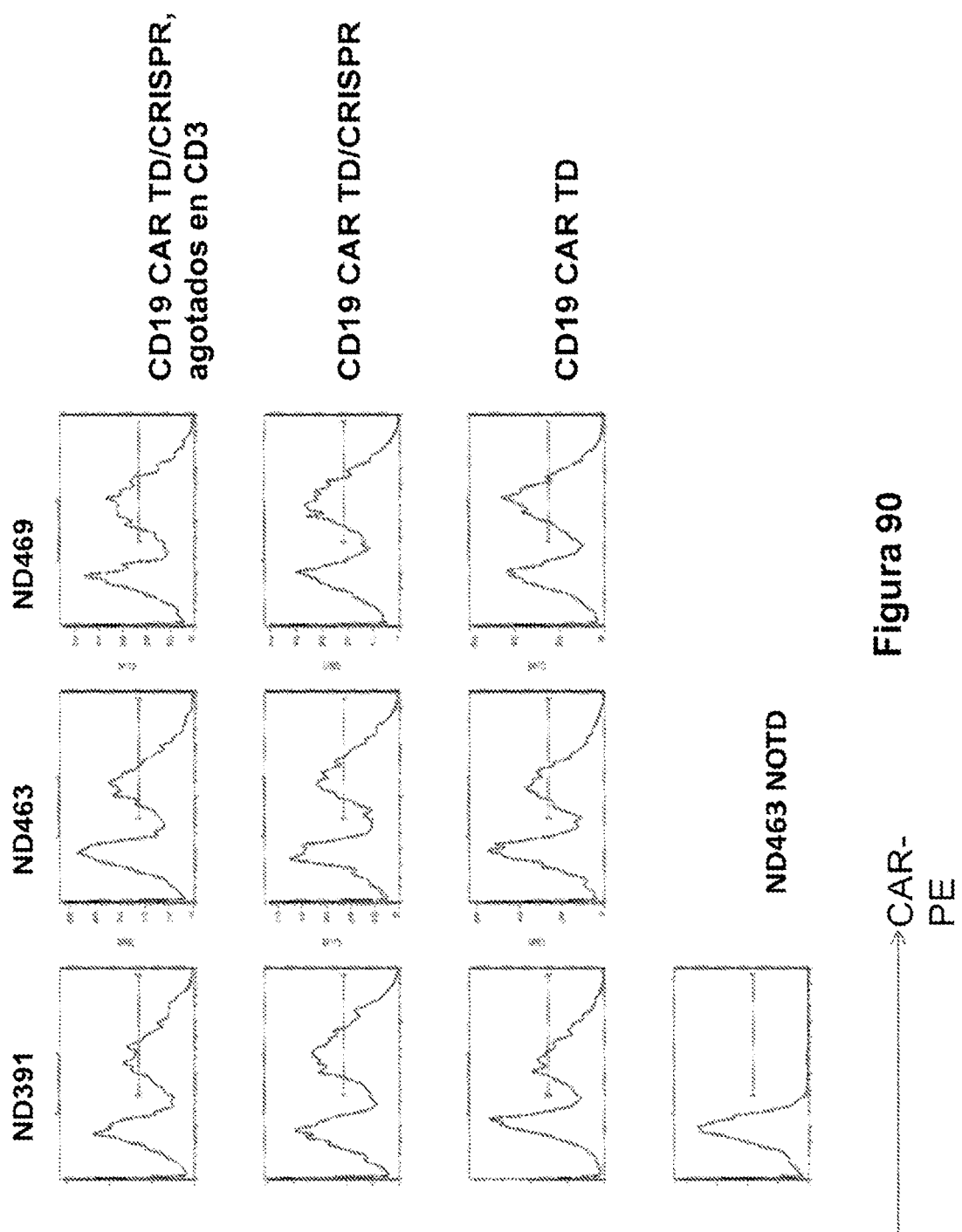


Figura 90

agotados en CD3

CRISPR,

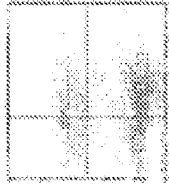
CD19 CAR TD/

CD19 CAR TD/

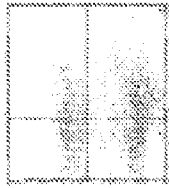
CRISPR

CD19 CAR TD

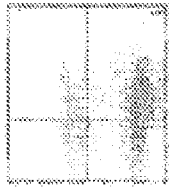
ND469



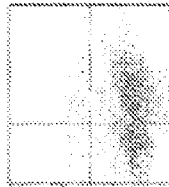
ND463



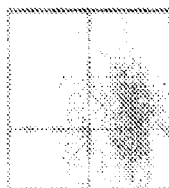
ND391



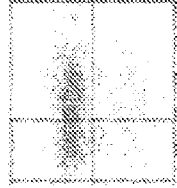
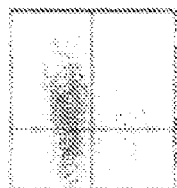
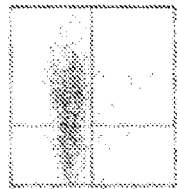
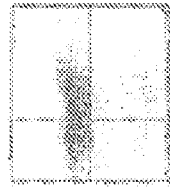
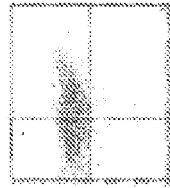
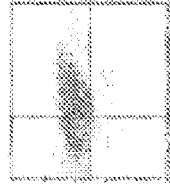
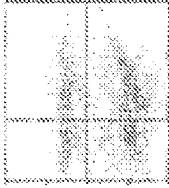
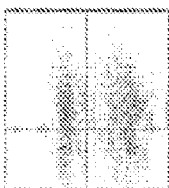
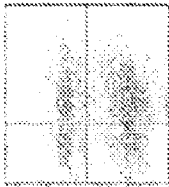
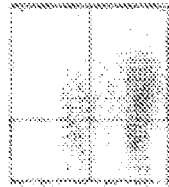
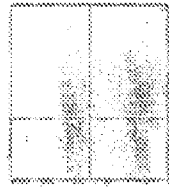
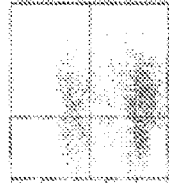
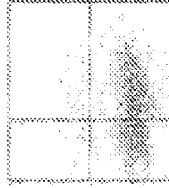
ND469



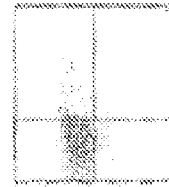
ND463



ND391



ND463 NOTD



B2M-PE

CAR-APC

Figura 91

CD3-FITC

CAR-APC

ID de célula donante	% de CAR19+	% de CAR19+ CD3- B2M-	% de CAR19+ CD3- B2M+	% de CAR19+ CD3+ B2M-	% de CAR19+ CD3+ B2M+
ND391	51,4	85,2	12,8	1,6	0,4
ND463	48,5	73,4	22,9	1,8	1,9
ND469	55,8	82,1	16,5	0,8	0,6

Figura 92



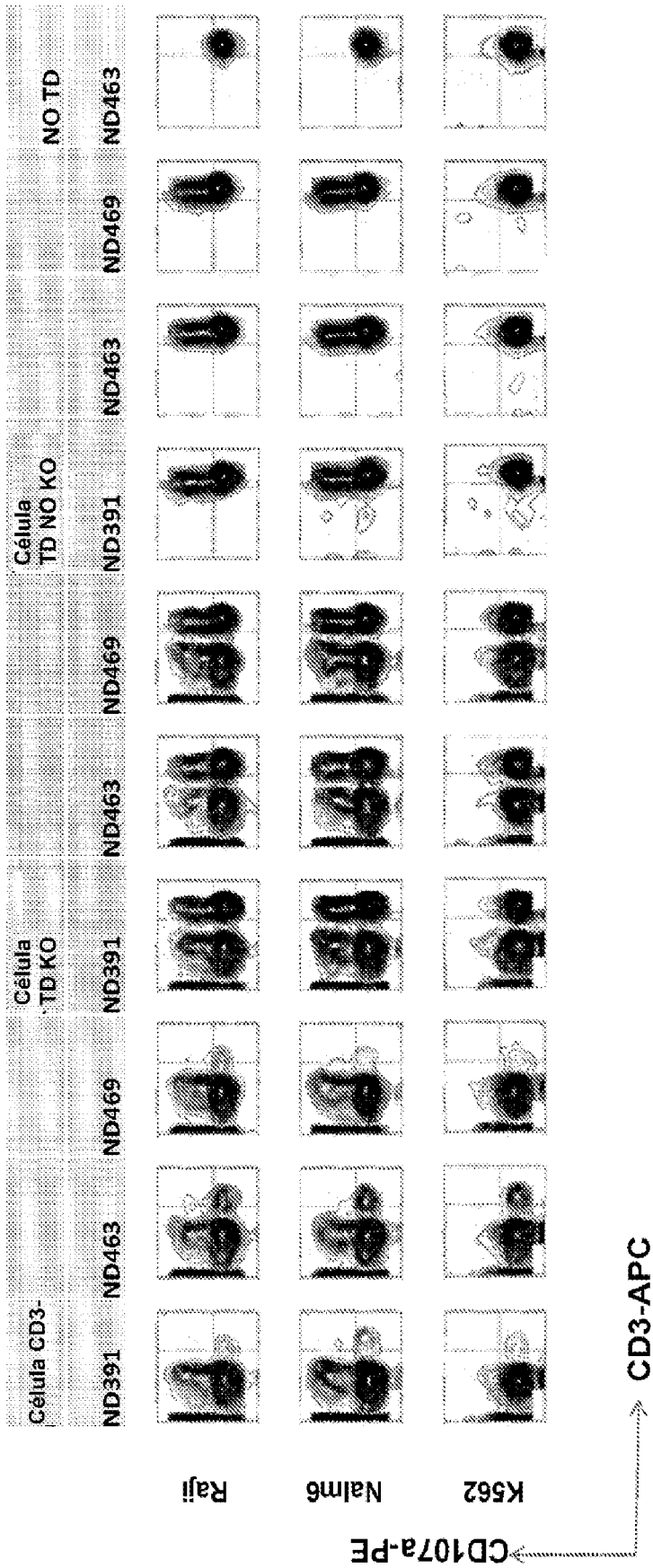
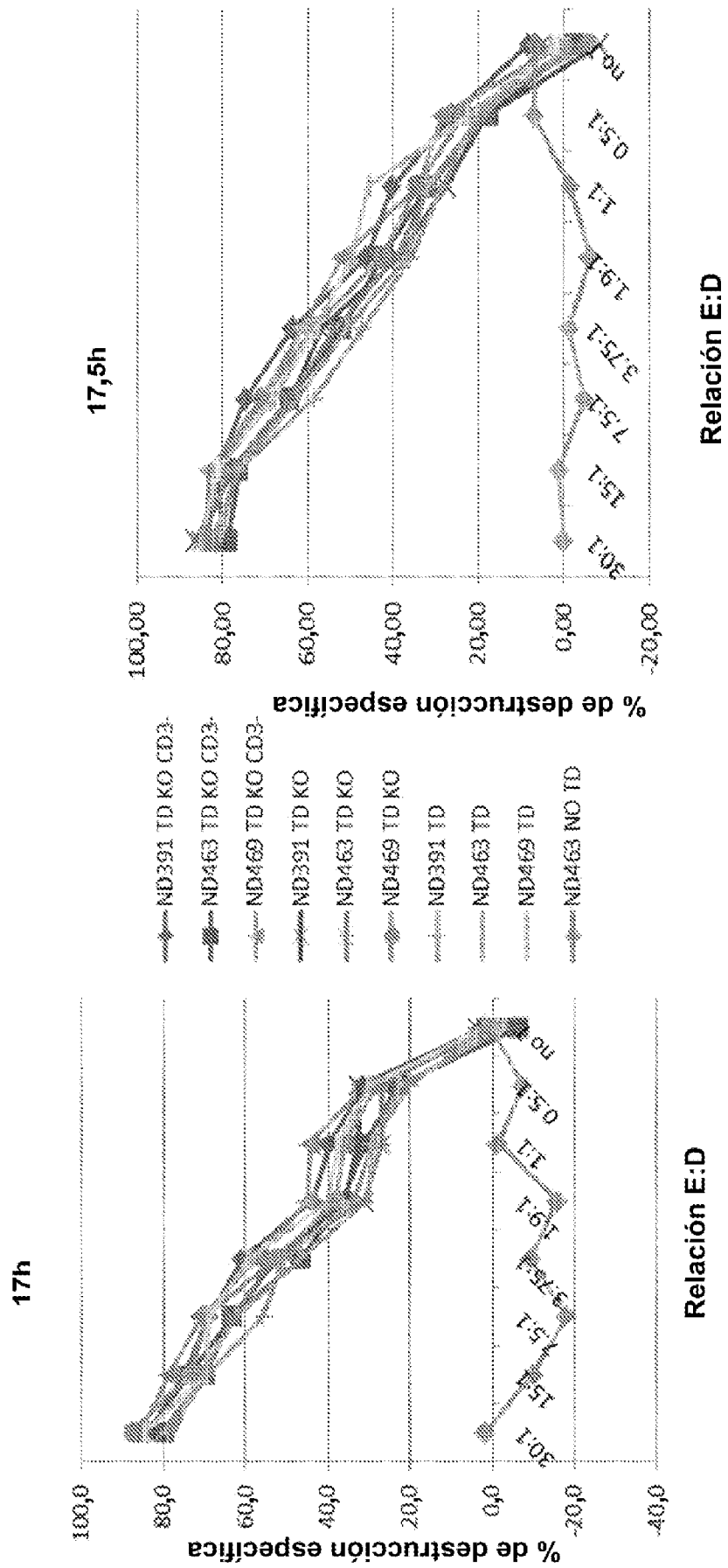


Figura 93



**Figura 94**

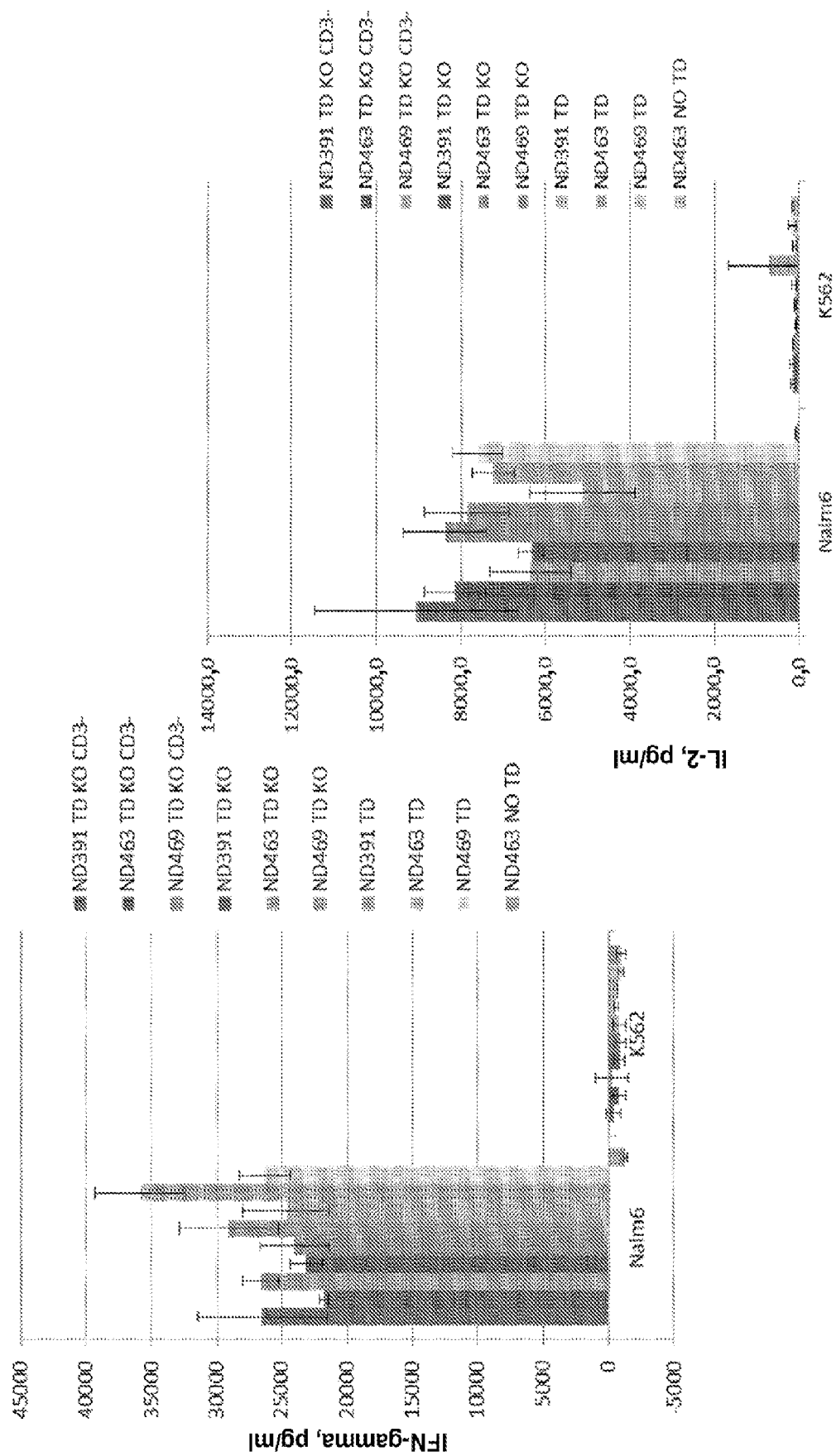


Figura 95

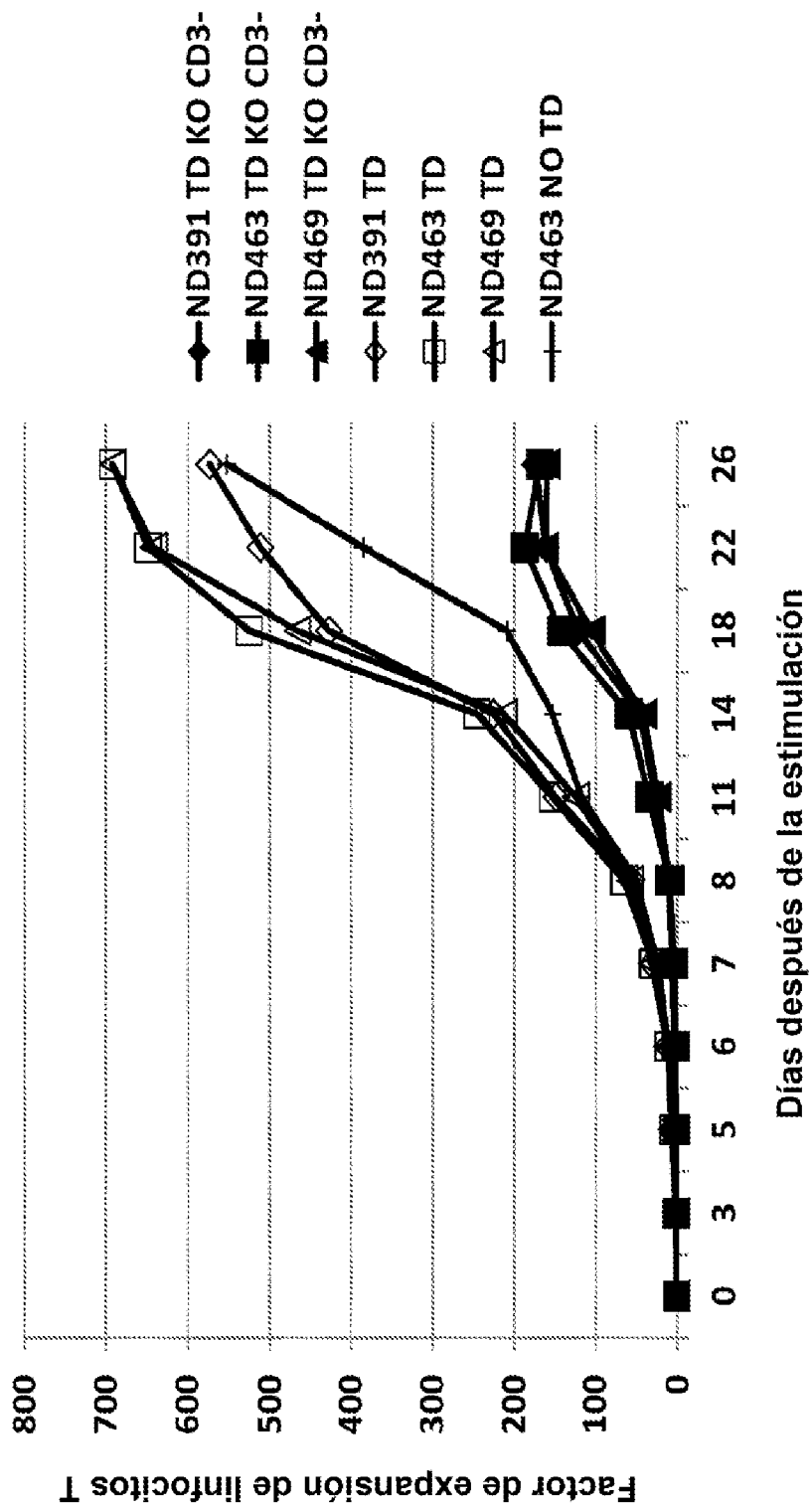


Figura 96