

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 017 080**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/74** (2006.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2015** **E 24153261 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025** **EP 4368705**

54 Título: **Método para generar linfocitos T compatibles para trasplante alogénico**

30 Prioridad:

**11.03.2014 DK PA201470119**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**12.05.2025**

73 Titular/es:

**CELLECTIS (100.00%)  
8, rue de la Croix Jarry  
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**POIROT, LAURENT;  
SOURDIVE, DAVID;  
DUCHATEAU, PHILIPPE y  
CABANIOLS, JEAN-PIERRE**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 3 017 080 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

Método para generar linfocitos T compatibles para trasplante alogénico

### 5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a linfocitos T modificados por ingeniería, a un método para su preparación y a su uso como medicamento, particularmente para inmunoterapia. Los linfocitos T modificados por ingeniería de la invención se caracterizan por que la expresión de beta-2-microglobulina (B2M) se inhibe, por ejemplo, mediante el uso de endonucleasas de corte poco frecuente capaces de inactivar selectivamente mediante la escisión del ADN el gen que codifica B2M, o mediante el uso de moléculas de ácido nucleico que inhiben la expresión de B2M. Para hacer que los linfocitos T no sean reactivos, se inactiva al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T, por ejemplo, mediante el uso de endonucleasas de sitio de corte poco frecuente capaces de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica dicho componente TCR. Adicionalmente, se puede realizar una etapa de expresión del polipéptido inmunosupresor, tal como el homólogo de MHC I viral o el ligando NKG2D en dichos linfocitos T modificados para prolongar la supervivencia de dichos linfocitos T modificados en el organismo huésped. Dicho linfocito T modificado es particularmente adecuada para trasplantes alogénicos, especialmente porque reduce tanto el riesgo de rechazo por parte del sistema inmunitario del huésped como el riesgo de desarrollar enfermedad de injerto contra huésped. La invención abre el camino a estrategias de inmunoterapia adoptiva estándar y asequibles que usan linfocitos T para tratar el cáncer, infecciones y enfermedades autoinmunes.

### Estado de la técnica

La inmunoterapia adoptiva, que implica la transferencia de linfocitos T específicos de antígeno autólogos generados *ex vivo*, es una estrategia prometedora para tratar infecciones víricas y cáncer. Los linfocitos T usados para inmunoterapia adoptiva pueden generarse mediante expansión de linfocitos T específicos de antígeno o redirección de linfocitos T mediante ingeniería genética (Park, Rosenberg *et al.* 2011).

Se han generado con éxito especificidades novedosas en linfocitos T mediante la transferencia genética de receptores de linfocitos T transgénicos o receptores quiméricos de antígenos (CAR) (Jena, Dotti *et al.* 2010). Los CAR son receptores sintéticos que consisten en un resto de dirección que está asociado con uno o más dominios de señalización en una única molécula de fusión. En general, el resto de unión de un CAR consiste en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo monocatenario (scFv), que comprende los fragmentos ligeros y variables de un anticuerpo monoclonal unidos por un enlazador flexible. También se han usado con éxito restos de unión basados en dominios de receptores o ligandos. Los dominios de señalización para CAR de primera generación proceden de la región citoplásmica del CD3zeta o las cadenas gamma de receptores de Fc. Se ha mostrado que los CAR de primera generación redirigen con éxito la citotoxicidad de los linfocitos T, sin embargo, no lograron proporcionar una expansión prolongada y actividad antitumoral *in vivo*. Se han añadido dominios de señalización de moléculas coestimulantes, incluyendo CD28, OX-40 (CD134) y 4-1BB (CD137) solos (segunda generación) o en combinación (tercera generación) para potenciar la supervivencia y aumentar la proliferación de linfocitos T con CAR modificados. Los CAR han permitido con éxito que los linfocitos T se redirijan hacia antígenos expresados en la superficie de células tumorales de diversos tumores malignos, incluidos linfomas y tumores sólidos (Jena, Dotti *et al.* 2010).

El protocolo actual para tratamiento de pacientes usando inmunoterapia adoptiva se basa en la transferencia de células autólogas. En este enfoque, se recuperan linfocitos T de pacientes, genéticamente modificados o seleccionados *ex vivo*, se cultivan *in vitro* para amplificar el número de células si es necesario y finalmente se infunden en el paciente. Además de la infusión de linfocitos, el hospedador puede manipularse de otras maneras que apoyan el injerto de los linfocitos T o su participación en una respuesta inmunitaria, por ejemplo precondicionamiento (con radiación o quimioterapia) y administración de factores de crecimiento de linfocitos (tales como IL-2). Cada paciente recibe un tratamiento fabricado individualmente, usando los propios linfocitos del paciente (es decir una terapia autóloga). Las terapias autólogas se enfrentan a obstáculos técnicos y logísticos sustanciales para la aplicación práctica, su generación requiere instalaciones dedicadas caras y personal experto, deben generarse en un tiempo corto después del diagnóstico de un paciente y, en muchos casos, el pretratamiento del paciente ha dado como resultado función inmunitaria degradada, de modo que los linfocitos del paciente pueden ser poco funcionales y estar presentes en números muy bajos. Debido a estos obstáculos, la preparación de células autólogas de cada paciente es en efecto un producto nuevo, dando como resultado variaciones sustanciales en la eficacia y seguridad.

En el mejor de los casos, se querría usar una terapia normalizada en la que las células terapéuticas alogénicas podrían prefabricarse, caracterizarse en detalle y estar disponibles para administración inmediata a pacientes. Por alogénico se entiende que las células se obtienen de individuos que pertenecen a la misma especie pero son genéticamente diferentes. Sin embargo, el uso de células alogénicas tiene en la actualidad muchas desventajas. En hospedadores inmunocompetentes las células alogénicas son rechazadas rápidamente, un proceso denominado rechazo de hospedador frente a injerto (HvG) y esto limita sustancialmente la eficacia de las células transferidas. En huéspedes inmunocompetentes, las células alogénicas son capaces de injertarse, pero sus especificidades de los receptores de linfocitos T endógenos (TCR) pueden reconocer el tejido del huésped como extraño, lo que da como resultado enfermedad de injerto contra el hospedador (GvHD), lo que puede conducir a daño tisular grave y muerte.

Para proporcionar linfocitos T alogénicos, los inventores revelaron previamente un método para modificar genéticamente los linfocitos T, en el que diferentes genes efectores, en particular aquellos que codifican receptores de linfocitos T, se inactivaron mediante el uso de nucleasas TAL específicas, mejor conocido con la marca TALEN™ (Collectis, 8, rue de la Croix Jarry, 75013 PARÍS). Se ha demostrado que este método es altamente eficiente en células primarias que usan transfección de ARN como parte de una plataforma que permite la producción en masa de linfocitos T alogénicos (documento WO 2013/176915).

Otros autores, para proporcionar linfocitos T CAR, desvelan la inactivación por la nucleasa de dedos de cinc del gen HLA-A (WO2013/074916 y Torikai et al, Blood 2013).

La beta-2 microglobulina, también conocido como B2M, es la cadena ligera de las moléculas de MHC de clase I y, como tal, una parte integral del complejo mayor de histocompatibilidad en seres humanos, la B2M está codificada por el gen b2m que se encuentra en el cromosoma 15, en oposición a los otros genes del MHC, que se encuentran como clúster génico en el cromosoma 6. La proteína humana está compuesta por 119 aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y tiene un peso molecular de 11.800 Dalton. Se ha demostrado en modelos de ratones deficientes para beta-2-microglobulina que la B2M es necesaria para la expresión en la superficie celular de MHC de clase I y la estabilidad del surco de unión a péptido. Se demostró además que los trasplantes hemopoyéticos de ratones que son deficientes para la expresión normal de MHC I en la superficie celular son rechazados por las células NK1.1+ en ratones normales debido a una mutación dirigida en el gen de la beta-2-microglobulina, lo que sugiere que la expresión deficiente de las moléculas de MHC I hace que las células de la médula sean susceptibles al rechazo por parte del sistema inmunitario del huésped (Bix et al., 1991).

La proteína CIITA (SEQ ID NO: 4 - secuencia de referencia en NCBI: NP\_000237.2) que actúa como un regulador positivo de la transcripción génica del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, incluyendo la transcripción del gen  $\beta 2m$  y a menudo se denomina "factor de control maestro" para la expresión de estos genes. El ARNm de CIITA (SEQ ID NO: 5) solo puede detectarse en líneas y tejidos de células positivas para el sistema de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II. Esta distribución tisular altamente restringida sugiere que la expresión de genes DE HLA clase II está en gran medida bajo el control de CIITA (Mach B., et al., 1994).

La respuesta inmunitaria adaptativa es un sistema biológico complejo donde interaccionan numerosos componentes celulares. Las células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales pueden procesar cuerpos extraños y exponerlos a los linfocitos T auxiliares en el contexto de las moléculas de MHC de clase II. Los linfocitos T auxiliares activados a su vez estimularán la respuesta de los linfocitos B y la respuesta de los linfocitos T citotóxicos (LTC). Los LTC reconocen péptidos extraños presentados por moléculas de MHC de clase I, pero, en el caso de alorreactividad, reconocen y matan células portadoras de moléculas de MHC de clase I. Las moléculas de MHC de clase I están compuestas por 2 entidades: la cadena pesada transmembrana altamente polimórfica un pequeño polipéptido invariable, la beta2-microglobulina (beta2-m) codificada por el gen B2M. La expresión de la cadena pesada de MHC de clase I en la superficie celular requiere su asociación con beta2-m. Por lo tanto, la anulación de la expresión de beta2-m en los linfocitos T CAR afectará a la expresión del MHC de clase I y las hará invisibles para los LTC del huésped. Sin embargo, los linfocitos T CAR deficientes en MHC de clase I son susceptibles a la lisis por las células NK del huésped, cuyo objetivo son células que carecen de moléculas de MHC de clase I [Ljunggren HG et al. (1990), Immunol Today. 11:237-244].

El documento WO2012145384 (Russel) desvela la alteración del gen B2M, en particular en una célula madre, y se refiere al riesgo de destrucción por las células NK.

Figueiredo *et al* 2007 se refiere al uso de ARN en horquilla pequeño (ARNhp) para dirigirse a B2M o los transcritos de la cadena pesada de HLA, para obtener un silenciamiento condicional transitorio, entre otros en linfocitos B y células HeLa.

Riolobos *et al*, 2013, se dirige a la modificación por ingeniería genética de HLA en células madre embrionarias humanas mediante dos enfoques alternativos. En primer lugar, los autores obtienen células madre homocigotas para HLA con haplotipos comunes. En segundo lugar, los autores derivan las células negativas para HLA de clase I mediante alteración dirigida de ambos alelos del gen B2M en células madre embrionarias.

Las células NK ejercen funciones citotóxicas hacia las células con las que interactúan en función del equilibrio entre las señales activadoras e inhibitoras que recibieron a través de diferentes receptores monomórficos o polimórficos. Un receptor activador central en las células NK humanas es NKG2D y sus ligandos incluyen proteínas tales como MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3 [Raulet DH, (2003), Nature Reviews Immunology 3 (10): 781-79]. Por otro lado, la señal inhibitoria está mediada por la interacción entre los receptores NK como LIR-1/ILT2 y moléculas de MHC de clase I [Ljunggren HG et al. (1990), Immunol Today. 11:237-244]. Algunos virus, tales como los citomegalovirus, han adquirido mecanismos para evitar la vigilancia inmunitaria mediada por las células NK. El genoma del HCMV codifica proteínas que pueden prevenir la expresión en la superficie del MHC de clase I (es decir, US2, US3, US6 y US11) al tiempo que expresa una proteína homóloga del MHC de clase I (UL18) que actúa como señuelo para bloquear la lisis celular mediada por NK [Kim, Y et al. (2008), PLOS Pathogens. 4: e1000123 y Wilkinson G. et al. (2010). J Clin Virol.

41(3):206-212]. Además, el HCMV interfiere con la ruta el NKG2D secretando una proteína capaz de unirse a los ligandos NKG2D y evitar su expresión en la superficie [Welte SA et al. 2003], Eur J Immunol 33 (1): 194-203]. En células tumorales, algunos mecanismos han evolucionado para evadir la respuesta de NKG2D secretando ligandos de NKG2D, tales como ULBP2, MICB o MICA (Waldhauer I, Steinle A (2003). La liberación proteolítica de la proteína 2 de unión a UL16 soluble de las células tumorales. Cancer Res 2006; 66(5): 2520-2526; Salih HR et al. (2006), Hum Immunol. 2006 Mar;67(3):188-95; Salih HR et al. (2003) Blood. 2003 Aug 15;102(4):1389-96; Salih HR et al. (2002) J Immunol.;169(8):4098-102].

El presente inventor proporciona en el presente documento estrategias para la inmunoterapia mediante las cuales los linfocitos T, especialmente linfocitos T alogénicos, están especialmente indicados para trasplantes alogénicos, lo que reduce el riesgo de rechazo de huésped contra injerto y de desarrollar enfermedad de injerto contra huésped y hacer que los linfocitos T sean "sigilosos", en particular con respecto a las células CPA o las células NK.

### Objeto de la invención

La presente invención concierne linfocitos T modificados por ingeniería, en particular linfocitos T alogénicos obtenidos de un donante, modificados por ingeniería para que sean adecuados para fines de inmunoterapia, para uso alogénico para el tratamiento de cánceres, infecciones o enfermedades inmunitarias en un paciente. Los linfocitos T modificados por ingeniería de la presente invención permiten más particularmente la modulación precisa de la expresión de ciertas moléculas efectoras importantes para el reconocimiento inmunitario y la histocompatibilidad.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un linfocito T modificado que expresa un Receptor de Antígeno Quimérico dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada, estando dicho linfocito T caracterizado además por que i) la expresión de B2M se inhibe en dicho linfocito T mediante una modificación del genoma y ii) la expresión de al menos un gen que codifica un componente del receptor TCR está inactivado, para su uso alogénico para el tratamiento de cánceres, infecciones o enfermedades inmunitarias en un paciente.

La inhibición de la expresión de B2M se logra mediante una modificación del genoma, más particularmente a través de la expresión en el linfocito T de una endonucleasa de corte poco frecuente capaz de inactivarse selectivamente por escisión de ADN del gen que codifica B2M, tal como el gen  $\beta 2m$  humano establecido en la SEQ ID NO:2 (NCBI Secuencia de referencia: NG\_012920.1), o un gen que tiene al menos un 70 %, tal como al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 99 %, de identidad de secuencia con el gen  $\beta 2m$  humano establecido en la SEQ ID NO:2 sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 2. Tal endonucleasa de corte poco frecuente puede ser una nucleasa TAL, una meganucleasa, una nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o una endonucleasa guiada por ARN (tal como Cas9).

De acuerdo con otras realizaciones determinadas, la inhibición de la expresión de B2M se logra usando (por ejemplo, introduciendo en el linfocito T) una molécula de ácido nucleico que se hibrida (por ejemplo, se une) específicamente en condiciones celulares con el ARNm celular y/o el ADN genómico que codifica B2M, inhibiendo de esta manera la transcripción y/o la traducción del gen. De acuerdo con realizaciones particulares, la inhibición de la expresión de B2M se logra usando (por ejemplo, introduciendo en el linfocito T) un oligonucleótido antisentido, una ribozima o una molécula de ARN interferente (ARNi). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos del complemento de SEQ ID NO: 3 (es decir, el ARNm que codifica B2M humano; Secuencia de Referencia NCBI: NM\_004048).

El linfocito T se modifica por ingeniería aún más para hacerlo no alorreactiva, especialmente al inactivar uno o más genes implicados en el auto-reconocimiento, tales como aquellos, por ejemplo, que codifican componentes de los receptores de linfocitos T (TCR). Esto se puede lograr mediante una modificación del genoma, más particularmente a través de la expresión en el linfocito T de una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivarse selectivamente por escisión de ADN, preferentemente rotura de la doble cadena, al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR), tal como el gen que codifica TCR alfa o TCR beta. Dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente puede ser una nucleasa TAL, meganucleasa, nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o endonucleasa guiada por ARN (tal como, Cas9). Preferentemente, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es capaz de inactivar selectivamente mediante la escisión del ADN el gen que codifica para el TCR alfa.

El linfocito T está modificado por ingeniería para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada, tal como el antígeno de linfocitos B CD19.

La presente invención proporciona por lo tanto linfocitos T modificados por ingeniería, en particular linfocitos T aislados modificados por ingeniería, caracterizados por que la expresión de beta 2-microglobulina (B2M) se inhibe.

De acuerdo con determinadas realizaciones, se proporciona un linfocito T que expresa una endonucleasa de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente mediante escisión de ADN el gen que codifica B2M. Más particularmente, dicho linfocito T comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia

de nucleótidos que codifica dicha endonucleasa de corte poco frecuente, que puede ser una nucleasa TAL, una meganucleasa, una nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o una endonucleasa guiada por ARN.

De acuerdo con otras realizaciones determinadas, se proporciona un linfocito T que comprende una molécula de ácido nucleico exógena que inhibe la expresión de B2M. De acuerdo con realizaciones particulares, dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, una ribozima o una molécula de ARN interferente (ARNi). De acuerdo con realizaciones preferidas, dicha molécula de ácido nucleico comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos del complemento de SEQ ID NO: 3.

El linfocito T tiene además al menos un gen inactivado que codifica un componente del receptor TCR. Más particularmente, dicho linfocito T puede expresar una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN, preferentemente rotura de la doble cadena, dicho al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR). En consecuencia, dicho linfocito T puede comprender una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR). La interrupción de TCR proporciona un linfocito T no alorreactivo que puede usarse en estrategias de tratamiento alogénico.

De acuerdo con la presente invención, el linfocito T está modificado por ingeniería para que exprese un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada, tal como el antígeno de linfocitos B CD19. Particularmente, el linfocito T comprende una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho CAR. La unión del antígeno objetivo por el CAR tiene el efecto de desencadenar una respuesta inmunitaria por parte del linfocito T dirigida contra la célula patológica, lo que da como resultado la desgranulación de varias citocinas y enzimas de degradación en el espacio intermedio entre las células.

De acuerdo con algunas realizaciones, se realiza una modificación adicional de los linfocitos T para hacerlas sigilosas mediante la expresión de al menos un polipéptido inmunosupresor no endógeno, tal como un homólogo viral de MHC, por ejemplo, UL18, o tal como un ligando NKG2D.

De acuerdo con algunas realizaciones, el linfocito T de la presente invención expresa al menos un polipéptido inmunosupresor no endógeno. Según realizaciones más particulares, dicho polipéptido inmunosupresor no endógeno es un homólogo de MHC viral, tal como UL18. El linfocito T puede comprender una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comparte al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % y más preferentemente al menos el 95 % de identidad con SEQ ID NO:89. Según otras realizaciones más particulares, dicho polipéptido inmunosupresor no endógeno es un ligando NKG2D. El linfocito T puede comprender una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comparte al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % y, más preferentemente, al menos el 95 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO:90-97.

Como resultado de la presente invención, los linfocitos T modificados por ingeniería son para su uso como productos terapéuticos, idealmente como un producto "disponibles libremente, para su uso alogénico en el tratamiento o prevención del cáncer, infecciones bacterianas o víricas o enfermedades autoinmunitarias.

Por tanto, la presente invención proporciona un linfocito T modificado por ingeniería o una composición farmacéutica, que comprende el mismo para su uso alogénico para el tratamiento de cánceres, infecciones o enfermedades autoinmunitarias en un paciente. De acuerdo con determinadas realizaciones, la composición farmacéutica o linfocito T modificado por ingeniería es para su uso en el tratamiento de un cáncer y, más particularmente, para su uso en el tratamiento del linfoma. De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la composición farmacéutica o linfocito T modificado por ingeniería es para su uso en el tratamiento de infección vírica. De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la composición farmacéutica o linfocito T modificado por ingeniería es para su uso el tratamiento de infecciones bacterianas. De acuerdo con otras ciertas realizaciones, el linfocito T modificado por ingeniería es para su uso en combinación con agentes inmunosupresores o agentes inmunoablativos.

Se entiende que los detalles proporcionados en el presente documento con respecto a un aspecto de la invención también se aplican a cualquiera de los otros aspectos de la invención.

### Descripción de las figuras

**Figura 1:** Representación esquemática de la relación normal entre los linfocitos T del donante, los linfocitos T del huésped y las células presentadoras de antígeno.

**Figura 2:** Representación esquemática de los linfocitos T terapéuticos genéticamente modificados según la invención y los linfocitos T y células tumorales del paciente.

**Figura 3:** Comparación de la distribución de dispersión frontal lateral (FSC), un indicador del tamaño celular, entre

células positivas para TCR y negativas para TCR.

**Figura 4:** Análisis de citometría de flujo de TCR alfa/beta y expresión de CD3 en linfocitos T primarios humanos después de electroporación de ARNm de nucleasa TALE de TRAC (parte superior).

**Figura 5:** Análisis de citometría de flujo de la expresión de HLA\_ABC en la superficie de los linfocitos T primarios humanos en: A. Linfocitos T de control. B. después de electroporación de ARNm nucleasa TALE de  $\beta 2m$ .

**Figura 6: A.** Análisis de citometría de flujo de la expresión de CAR (anti F(ab')<sub>2</sub>) después de electroporación de linfocitos T con o sin ARNm que codifica un CAR monocatenario. **B.** Análisis de citometría de flujo de la expresión de CD107a (marcador de desgranulación) en linfocitos T electroporados cocultivados con células daudi.

**Figura 7:** Representación esquemática de las posibles interacciones entre un linfocito T CAR allogénico con diversas células inmunitarias del huésped (linfocitos T CD8+ y CD4+, CPA, tal como células dendríticas y células NK), linfocitos T CAR que tiene su gen B2M inactivado por KO. El signo (+) representa activación y el signo (-) inhibición. La interacción potencial entre el linfocito T CAR con la célula tumoral permanece sin cambios. La inactivación del gen B2M, que es un componente del MCHI, hace que este último no sea funcional con respecto a las interacciones con linfocitos T citotóxicos (CD8+) del huésped y con células NK. A continuación, las células NK pueden ejercer su activación en los linfocitos T CAR allogénicos a través de la vía activadora, tal como NKG2D/ligando de NKG2D.

**Figura 8:** Representación esquemática de las posibles interacciones entre un linfocito T CAR allogénico con diversas células inmunitarias del huésped (linfocitos T CD8+ y CD4+, CPA, tal como células dendríticas y células NK), el linfocito T CAR que tiene su gen B2M inactivado por KO y que expresa el homólogo de MCHI vírico. El signo (+) representa activación y el signo (-) inhibición. La interacción potencial entre el linfocito T CAR con la célula tumoral permanece sin cambios. En cuanto a la figura anterior (solo B2M KO), se alivia la interacción entre el linfocito T CAR y el linfocito T CD8+ del huésped. En este caso, la expresión del homólogo de MCHI vírico hace que la interacción con las células NK sea inoperante a través del receptor de MCHI/inhibidor. La doble modificación genética de los linfocitos T CAR allogénicos por KO de B2M combinada con la expresión del homólogo de MCHI vírico fortalece su protección inmunosupresora.

**Figura 9:** Representación esquemática de las posibles interacciones entre un linfocito T CAR allogénico con diversas células inmunitarias del huésped (linfocitos T CD8+ y CD4+, CPA, tal como células dendríticas y células NK), el linfocito T CAR que tiene su gen B2M inactivado por KO y que expresa un ligando NKG2D soluble. El signo (+) representa activación y el signo (-) inhibición. La interacción potencial entre el linfocito T CAR con la célula tumoral permanece sin cambios. En cuanto a la figura anterior (solo B2M KO), se alivia la interacción entre el linfocito T CAR y el linfocito T CD8+ del huésped. La expresión del ligando NKG2D soluble es otra forma de inactivación de la interacción con las células NK. En este caso, el ligando NKG2D soluble puede unirse al receptor de NKG2D en la célula NK pero no ejerce ninguna acción, al contrario del ligando NKG2D de los linfocitos T CAR con el que ejerce una competencia inhibitoria. La doble modificación genética de los linfocitos T allogénicos por KO de B2M combinada con la expresión del ligando NKG2D soluble fortalece su protección inmunosupresora.

**Figura 10:** Análisis FACS de la expresión de  $\beta 2m$  en linfocitos T. Los linfocitos T no transfectados (arriba) y transfectados (centro y abajo) se analizan mediante FACS para determinar la viabilidad (izquierda) y la expresión de  $\beta 2m$  (derecha).

### Descripción detallada de la invención

Salvo que se defina específicamente en este documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia en los campos de la terapia génica, bioquímica, genética y biología molecular.

Todos los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención, con métodos y materiales adecuados que se describen en este documento. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes, a menos que se especifique de otra manera.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia en la materia. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera edición, (Sambrook *et al*, 2001, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis *et al*. Patente de Estados Unidos N.º 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries y S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney,

Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); la serie, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson y M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., Nueva York), específicamente, vol. 154 y 155 (Wu *et al.* eds.) y vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); y Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

#### Métodos para preparar linfocitos T modificados por ingeniería

En un aspecto general no reivindicado se desvelan métodos para preparar linfocitos T modificados por ingeniería, en particular linfocitos T alogénicos obtenidos de un donante.

Un método para preparar un linfocito T modificado, preferentemente un linfocito T alogénico obtenido de un donante, comprende las etapas de:

- a) proporcionar un linfocito T, preferentemente un linfocito T alogénico obtenido de un donante; y
- b) inhibir la expresión de beta 2-microglobulina (B2M) y/o transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CIITA) en dicho linfocito T.

De acuerdo con determinadas realizaciones no reivindicadas, el método comprende inhibir la expresión de beta 2-microglobulina (B2M). Como alternativa, o además, el método puede comprender inhibir la expresión del transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CIITA).

De acuerdo con determinadas realizaciones no reivindicadas, la inhibición de la expresión de B2M se logra mediante una modificación del genoma, más particularmente a través de la expresión en el linfocito T de una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica B2M (por ejemplo, el gen  $\beta 2m$  humano expuesto en la SEQ ID NO:2).

Con "inactivar" o "inactivación" de un gen se pretende que el gen de interés (por ejemplo, el gen que codifica B2M o CIITA) no se exprese en una forma de proteína funcional. En realizaciones particulares, la modificación genética del método se basa en la expresión, en células proporcionadas para modificación por ingeniería, de una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente tal que la misma cataliza la escisión en un gen objetivo, inactivando de ese modo dicho gen objetivo. Las roturas de la cadena de ácido nucleico causadas por la endonucleasa se reparan habitualmente a través de los distintos mecanismos de recombinación homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ). Sin embargo, la NHEJ es un proceso de reparación imperfecto que a menudo da como resultado cambios en la secuencia de ADN en el sitio de la escisión. Los mecanismos implican que se vuelvan a unir lo que queda de los dos extremos del ADN a través de la re-ligadura directa (Critchlow y Jackson 1998) o mediante la llamada unión de los extremos mediada por microhomología (Betts, Brenchley *et al.*, 2003; Ma, Kim, *et al.*, 2003). La reparación a través de la unión de extremos no homólogos (NHEJ) a menudo da como resultado pequeñas inserciones o deleciones, y se puede utilizar para la creación de supresiones génicas específicas. Dicha modificación puede ser una sustitución, delección o adición de al menos un nucleótido. Las células en las que se produce un evento de mutagénesis inducida por escisión, es decir, un evento de mutagénesis consecutivo a un evento de NHEJ, pueden identificarse y/o seleccionarse mediante un método bien conocido en la técnica.

Una endonucleasa de corte poco frecuente a usarse para inactivar el gen  $\beta 2m$  puede, por ejemplo, ser una nucleasa TAL, una meganucleasa, una nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o una endonucleasa guiada por ARN (tal como Cas9).

Según una realización particular, la endonucleasa de corte poco frecuente es una nucleasa TAL.

Según otra realización particular, la endonucleasa de corte poco frecuente es una endonucleasa dirigida, también conocida con el nombre de meganucleasa.

Según otra realización particular, la endonucleasa de corte poco frecuente es una nucleasa en dedo de cinc (ZFN).

Según otra realización particular, la endonucleasa de corte poco frecuente es una endonucleasa guiada por ARN. Según una realización preferida, la endonucleasa guiada por ARN es el complejo Cas9/CRISPR.

Según una realización específica, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una TAL-nucleasa codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:67. Según otra realización específica, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una TAL-nucleasa codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:68. En otra realización específica más, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una combinación de una TAL-nucleasa codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:67 y una TAL-nucleasa codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de

nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 68.

Para expresarse en el linfocito T, dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente puede introducirse en la célula por medio de una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente. De acuerdo con realizaciones no reivindicadas particulares, el método comprende además introducir en dicho linfocito T una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente, preferentemente, una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivarse selectivamente por escisión de ADN del gen que codifica B2M (por ejemplo, el gen de  $\beta 2m$  humano expuesto en la SEQ ID NO:2). Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico exógeno puede comprender la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:67 o la SEQ ID NO:68.

Como resultado, se obtiene un linfocito T modificado por ingeniería que expresa una endonucleasa de corte poco frecuente, preferentemente una endonucleasa de corte poco frecuente capaz de inactivarse selectivamente por escisión de ADN del gen que codifica B2M. Por consiguiente, La inactivación del gen B2M por dicha endonucleasa de corte poco frecuente conduce a la inhibición de la expresión de B2M en el linfocito T modificado por ingeniería. Por lo tanto, se obtiene un linfocito T modificado por ingeniería que se caracteriza por que la expresión de B2M está inhibida.

De acuerdo con determinadas realizaciones distintas, la inhibición de la expresión de B2M se logra usando (por ejemplo, introduciendo en el linfocito T) una molécula de ácido nucleico que se hibrida (por ejemplo, se une) específicamente en condiciones celulares con el ARNm celular y/o el ADN genómico que codifica B2M, inhibiendo de esta manera la transcripción y/o la traducción del gen. De acuerdo con realizaciones particulares, la inhibición de la expresión de B2M se logra usando (por ejemplo, introduciendo en el linfocito T) un oligonucleótido antisentido, una ribozima o una molécula de ARN interferente (ARNi).

De acuerdo con una realización particular, la molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido.

De acuerdo con una realización particular, la molécula de ácido nucleico es una ribozima, preferentemente una ribozima en cabeza de martillo.

De acuerdo con otras realizaciones particulares, el ácido nucleico es una molécula de un ARN interferente (ARNi), tal como un microARN (miARN), ARN interferente pequeño (ARNip) o ARN de horquilla corta (ARNhc). Por tanto, de acuerdo con una realización preferida, la molécula de ácido nucleico es un microARN. De acuerdo con otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico es un ARN interferente pequeño. De acuerdo con otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico es un ARN de horquilla corta.

Como resultado, se obtiene un linfocito T modificado por ingeniería que se caracteriza por que se inhibe la expresión de B2M.

Dado que la B2M es un componente estructural importante del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), la inhibición de la expresión de B2M conduce a una reducción o eliminación de moléculas del MHC sobre la superficie del linfocito T modificado por ingeniería. Por consiguiente, el linfocito T modificado por ingeniería ya no presenta antígenos sobre la superficie que son reconocidos por las células C8+. Especialmente en el caso de un linfocito T alogénico obtenido de un donante, la reducción o eliminación de moléculas de MHC que presentan antígeno no propio en la superficie del linfocito T evita que el linfocito T modificado por ingeniería, cuando se infunde en un huésped alogénico, sea reconocido por los linfocitos CD8+ del huésped. Esto hace que el linfocito T modificado por ingeniería sea especialmente adecuado para trasplantes alogénicos, especialmente porque reduce el riesgo de rechazo por el sistema inmunológico del huésped.

El linfocito T modificado por ingeniería de la presente invención no expresa un receptor de linfocitos T (TCR) funcional en su superficie celular. Los receptores de linfocitos T son receptores de la superficie celular que participan en la activación de los linfocitos T en respuesta a la presentación del antígeno. El TCR está compuesto en general por dos cadenas, alfa y beta, que se ensamblan para formar un heterodímero y se asocia con las subunidades transductoras de CD3 para formar el complejo de receptores de linfocitos T presente en la superficie celular. Cada cadena alfa y beta del TCR consiste en una región variable (V) y constante (C) N-terminal de tipo inmunoglobulina, un dominio hidrófobo transmembrana y una región citoplásmica corta. Con respecto a moléculas de inmunoglobulina, la región variable de las cadenas alfa y beta se genera por la recombinación V(D)J, creando una gran diversidad de especificidades de antígeno en la población de linfocitos T. Sin embargo, a diferencia de inmunoglobulinas que reconocen antígeno intacto, los linfocitos T se activan mediante fragmentos de péptidos procesados en asociación con una molécula de MHC, introduciendo una dimensión extra al reconocimiento de antígenos por linfocitos T, conocido como restricción de MHC. El reconocimiento de las disparidades del MHC entre el donante y el receptor a través del receptor de linfocitos T conduce a la proliferación de linfocitos T y al desarrollo potencial de la enfermedad de injerto contra el huésped (EICH). Se ha mostrado que la expresión en superficie normal del TCR depende de la síntesis y el ensamblaje coordinados de los siete componentes del complejo (Ashwell y Klusner 1990). La inactivación de TCR alfa o TCR beta puede dar como resultado la eliminación del TCR de la superficie de los linfocitos T, lo que impide el reconocimiento del aloantígeno y, por lo tanto, la EICH. La inactivación de al menos un gen que codifica un componente TCR hace que los linfocitos T modificados por ingeniería sean menos alorreactivas. Con "inactivar" o "inactivación" de



un gen se pretende que el gen de interés (por ejemplo, al menos un gen que codifica un componente del TCR) no se exprese en una forma de proteína funcional.

Así, el método de acuerdo con realizaciones particulares comprende además inactivar al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T. Más particularmente, la inactivación se logra usando (por ejemplo, introduciendo en el linfocito T) una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN, preferentemente rotura de la doble cadena, al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR). De acuerdo con realizaciones particulares, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es capaz de inactivar selectivamente mediante la escisión del ADN el gen que codifica para TCR alfa o TCR beta. De acuerdo con una realización preferida, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es capaz de inactivar selectivamente mediante la escisión del ADN el gen que codifica para el TCR alfa. Especialmente en el caso de un linfocito T alogénico obtenido de un donante, la inactivación de al menos un gen que codifica un componente del TCR, notablemente TCR alfa, conduce a linfocitos T modificados por ingeniería, cuando se infunde en un huésped alogénico, que no son alorreactivos. Esto hace que el linfocito T modificado por ingeniería sea especialmente adecuado para trasplantes alogénicos, especialmente porque reduce el riesgo de enfermedad del injerto contra el huésped.

Una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente que se usará para inactivar al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T puede, por ejemplo, ser una TAL-nucleasa, meganucleasa, nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o endonucleasa guiada por ARN (tal como Cas9).

De acuerdo con una realización particular, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una TAL-nucleasa.

De acuerdo con otra realización particular, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una endonucleasa dirigida, también conocida con el nombre de meganucleasa.

De acuerdo con otra realización particular, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una nucleasa de dedo de cinc (ZNF).

De acuerdo con otra realización particular, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una endonucleasa guiada por ARN. De acuerdo con una realización preferida, la endonucleasa guiada por ARN es el complejo Cas9/CRISPR.

Para expresarse en el linfocito T, dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente puede introducirse en la célula por medio de una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente. De acuerdo con realizaciones particulares, el método comprende además introducir en dicho linfocito T una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivarse selectivamente por escisión de ADN, preferentemente rotura de la doble cadena, al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR).

Como resultado, se obtiene un linfocito T modificado que expresa además una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR). Por consiguiente, se obtiene un linfocito T modificado por ingeniería que se caracteriza por que al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) está inactivo.

El linfocito T modificado por ingeniería expresa además un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR) dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada. Por lo tanto, el método comprende además introducir en dicho linfocito T una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR) dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada.

El linfocito T que se va a modificar de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier linfocito T adecuado. Por ejemplo, el linfocito T puede ser un linfocito T inflamatorio, linfocito T citotóxico o linfocito T auxiliares. Particularmente, el linfocito T es un linfocito T citotóxico. En determinadas realizaciones, dicho linfocito T se selecciona entre linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. Se pueden extraer de la sangre o proceder de células madre. Las células madre pueden ser células madre adultas, células madre embrionarias, más particularmente células madre no humanas, células madre de sangre medular, células progenitoras, células madre de la médula ósea, células madre pluripotenciales inducidas o células madre hematopoyéticas. Las células humanas representativas son células CD34+. En realizaciones particulares, el linfocito T que se va a modificar de acuerdo con la presente invención es un linfocito T humano. Antes de la expansión y modificación genética de las células de la invención, se puede obtener una fuente de células de un sujeto, tal como un paciente, a través de diversos métodos no limitantes. El linfocito T se puede obtener de varias fuentes no limitantes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas realizaciones de la presente invención, se puede usar cualquier número de líneas de linfocitos T disponibles y conocidas por los expertos en la materia. En otra realización, dicha célula puede proceder de un donante sano, de un paciente diagnosticado con cáncer o de un paciente diagnosticado con una infección. En

otra realización, dicha célula es parte de una población mixta de células que presentan diferentes características fenotípicas.

#### Endonucleasa de sitio de corte poco frecuente

5 De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, se emplean endonucleasas de sitio de corte poco frecuente que son capaces de inactivarse selectivamente mediante la escisión del ADN del gen de interés, tal como el gen que codifica B2M.

10 La expresión "endonucleasa de sitio de corte poco frecuente" se refiere a una enzima de tipo salvaje o variante capaz de catalizar la hidrólisis (escisión) de enlaces entre ácidos nucleicos dentro de una molécula de ADN o ARN, preferentemente, una molécula de ADN. Particularmente, dicha nucleasa puede ser una endonucleasa, más preferentemente una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente que es altamente específica, que reconoce sitios objetivo de ácido nucleico que varían de 10 a 45 pares de bases (pb) de longitud, que generalmente varía de 10 a 35  
15 pares de bases de longitud, más habitualmente de 12 a 20 pares de bases. La endonucleasa de acuerdo con la presente invención reconoce secuencias de polinucleótidos específicos, conocidas adicionalmente como "secuencia objetivo" y escinde el ácido nucleico dentro de estas secuencias objetivo o en secuencias adyacentes a las mismas, dependiendo de la estructura molecular de dicha endonucleasa. La endonucleasa de sitio de corte poco frecuente puede reconocer y generar una rotura de cadena sencilla o doble en secuencias de polinucleótidos específicas.

20 En realizaciones particulares, dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente de acuerdo con la presente invención es una endonucleasa guiada por ARN, tal como el complejo Cas9/CRISPR. Las endonucleasas guiadas por ARN constituyen una nueva generación de herramientas de ingeniería del genoma en las que una endonucleasa se asocia con una molécula de ARN. En este sistema, la secuencia de nucleótidos de la molécula de ARN determina la  
25 especificidad del objetivo y activa la endonucleasa (Gasiunas, Barrangou et al., 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al., 2013; Mali, Yang et al., 2013). Cas9, también llamada Csn1 es una proteína grande que participa tanto en la biogénesis de ARNcr como en la destrucción del ADN invasor. Cas9 se ha descrito en diferentes especies bacterianas como *S. thermophiles*, *Listeria innocua* (Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012) y *S. Pyogenes* (Deltcheva, Chylinski et al. 2011). La proteína Cas9 grande (> 1200 aminoácidos) contiene dos dominios de nucleasa predichos, a saber, el dominio de nucleasa HNH (similar a McrA) que se encuentra en el medio de la proteína y un dominio de nucleasa similar a RuvC dividido (pliegue RNasa H). La variante de Cas9 puede ser una  
30 Cas9 endonucleasa que no existe de forma natural en la naturaleza y que se obtiene mediante ingeniería genética o por mutagénesis. Las variantes de Cas9 de acuerdo con la invención pueden, por ejemplo, obtenerse mediante mutaciones, es decir, delecciones o inserciones o sustituciones de al menos un resto en la secuencia de aminoácidos de una Cas9 endonucleasa de *S. pyogenes* (COG3513).

En otras realizaciones particulares, dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente también puede ser una endonucleasa dirigida, también conocida con el nombre de meganucleasa. Dichas endonucleasas dirigidas son bien conocidas en la técnica (Stoddard 2005). Las endonucleasas dirigidas son altamente específicas, reconocen los sitios  
40 objetivo del ADN que varían de 12 a 45 pares de bases (pb) de longitud, habitualmente varían de 14 a 40 pb de longitud. La endonucleasa dirigida de acuerdo con la invención puede corresponder, por ejemplo, a una endonucleasa LAGLIDADG, a una endonucleasa HNH o a una endonucleasa GIY-YIG. La endonucleasa dirigida preferida de acuerdo con la presente invención puede ser una variante de *I-CreI*. Una endonucleasa "variante", es decir, una endonucleasa que no existe de forma natural en la naturaleza y que se obtiene por ingeniería genética o por  
45 mutagénesis aleatoria puede unir secuencias de ADN diferentes de las reconocidas por las endonucleasas de tipo salvaje (véase la solicitud internacional WO2006/097854).

En otras realizaciones particulares, dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente puede ser una "nucleasa de dedo de cinc" (ZFN), que generalmente es una fusión entre el dominio de escisión de la enzima de restricción de tipo  
50 IIS, FokI, y un dominio de reconocimiento de ADN que contiene 3 o más motivos de dedos de cinc C2H2. La heterodimerización en una posición particular en el ADN de dos ZFN individuales en orientación y espaciado precisos conduce a una rotura de la doble cadena (DSB) en el ADN. El uso de dichas endonucleasas quiméricas se ha notificado de forma extensa en la técnica, revisado por Urnov et al. (Genome editing with engineered zinc finger nucleases (2010) Nature reviews Genetics 11:636-646). Los ZFN estándar fusionan el dominio de escisión con el extremo C de cada  
55 dominio de dedo de cinc. Para permitir que los dos dominios de escisión se dimericen y escindan el ADN, los dos ZFN individuales se unen a cadenas opuestas de ADN con sus extremos C a cierta distancia. Las secuencias enlazadoras más utilizadas entre el dominio de dedo de cinc y el dominio de escisión requieren que el borde 5' de cada sitio de unión esté separado por de 5 a 7 pb. El método más directo para generar nuevas matrices de dedos de cinc es combinar "módulos" de dedos de cinc más pequeños de especificidad conocida. El proceso de ensamblaje modular  
60 más común implica combinar tres dedos de cinc separados que pueden reconocer cada uno una secuencia de ADN de 3 pares de bases para generar una matriz de 3 dedos que puede reconocer un sitio objetivo de 9 pares de bases. Se han usado numerosos métodos de selección para generar conjuntos de dedos de cinc capaces de apuntar a las secuencias deseadas. Los esfuerzos de selección iniciales utilizaron la presentación en fagos para seleccionar proteínas que unían un objetivo de ADN dado de un gran conjunto de matrices de dedos de cinc parcialmente  
65 aleatorizadas. Los esfuerzos más recientes han utilizado sistemas de un híbrido de levadura, sistemas bacterianos de uno y dos híbridos, y células de mamíferos.

En otras realizaciones particulares, dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una "nucleasa TALE" o una "MBBBD-nucleasa" resultante de la fusión de un dominio de unión al ADN normalmente derivado de proteínas efectoras activadoras de la transcripción (TALE) o de un dominio de unión base por base modular (MBBBD), con un dominio catalítico que tiene actividad endonucleasa. Tal dominio catalítico generalmente proviene de enzimas, tal como por ejemplo I-TevI, CoIE7, NucA y Fok-I. La nucleasa TALE se puede conformar en formas monoméricas o diméricas, dependiendo del dominio catalítico seleccionado (documento WO2012138927). Dichas nucleasas TALE modificadas por ingeniería están disponibles comercialmente bajo el nombre comercial TALEN™ (Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 París, Francia). En general, el dominio de unión al ADN deriva de un efector de tipo activador de transcripción (TALE), en el que la especificidad de secuencia es impulsada por una serie de repeticiones de 33-35 aminoácidos que se originan de las proteínas bacterianas de *Xanthomonas* o *Ralstonia* AvrBs3, PthXo1, AvrHah1, PthA, Tal1c como ejemplos no limitantes. Estas repeticiones difieren esencialmente en dos posiciones de aminoácidos que especifican una interacción con un par de bases (Boch, Scholze *et al.* 2009; Moscou y Bogdanove 2009). Cada par de bases en el objetivo de ADN se pone en contacto con una sola repetición, con la especificidad resultante de los dos aminoácidos variantes de la repetición (el denominado dipéptido variable de repetición, RVD). Los dominios de unión a TALE pueden comprender además un dominio de translocación N-terminal responsable del requisito de una primera base de timina (T0) de la secuencia objetivo y un dominio C-terminal que contiene señales de localización nuclear (NLS). Un dominio de unión a ácido nucleico TALE generalmente corresponde a un armazón de TALE central modificado por ingeniería que comprende una pluralidad de secuencias repetidas TALE, comprendiendo cada repetición un RVD específico para cada base de nucleótidos de un sitio de reconocimiento TALE. En la presente invención, cada secuencia de repetición TALE de dicho armazón central está hecha de 30 a 42 aminoácidos, más preferentemente 33 o 34, en el que dos aminoácidos críticos (el denominado dipéptido variable de repetición, RVD) ubicado en las posiciones 12 y 13 median en el reconocimiento de un nucleótido de dicha secuencia del sitio de unión a TALE; dos aminoácidos críticos equivalentes se pueden localizar en posiciones distintas de 12 y 13, especialmente en la secuencia de repetición TALE más alta que 33 o 34 aminoácidos de longitud. Preferentemente, los RVD asociados con el reconocimiento de los diferentes nucleótidos son HD para reconocer C, NG para reconocer T, NI por reconocer A, NN para reconocer G o A. En otra realización, los aminoácidos críticos 12 y 13 pueden mutar hacia otros restos de aminoácidos para modular su especificidad hacia los nucleótidos A, T, C y G, y en particular para mejorar esta especificidad. Un dominio de unión a ácido nucleico TALE generalmente comprende entre 8 y 30 secuencias repetidas de TALE. Más preferentemente, dicho armazón central de la presente invención comprende entre 8 y 20 secuencias repetidas TALE; de nuevo más preferentemente 15 secuencias repetidas TALE. También puede comprender una secuencia de repetición TALE única truncada adicional hecha de 20 aminoácidos ubicados en el extremo C de dicho conjunto de secuencias de repetición TALE, es decir, una secuencia de repetición de semi-TALE en C-terminal adicional. Otros dominios modulares de unión a ácido nucleico específicos de base por base (MBBBD) se describen en el documento WO 2014/018601. Dichos MBBBD pueden modificarse por ingeniería, por ejemplo, a partir de proteínas recién identificadas, a saber, EAV36\_BURRH, E5AW43\_BURRH, E5AW45\_BURRH y E5AW46\_BURRH del genoma recientemente secuenciado de los hongos endosimbiontes *Burkholderia Rhizoxinica*. Estos polipéptidos de unión a ácido nucleico comprenden módulos de aproximadamente 31 a 33 aminoácidos que son específicos de base. Estos módulos muestran menos del 40 % de identidad de secuencia con repeticiones comunes de TALE de *Xanthomonas* y presentan más variabilidad de secuencia de polipéptidos. Los diferentes dominios de las proteínas anteriores (módulos, extremos N y C) de *Burkholderia* y *Xanthomonas* son útiles para diseñar nuevas proteínas o armazones que tengan propiedades de unión a secuencias de ácido nucleico específicas y pueden combinarse para formar proteínas quiméricas TALE-MBBBD.

#### Moléculas inhibidoras de ácido nucleico

De acuerdo con ciertos otros aspectos, se emplean moléculas de ácido nucleico que inhiben la expresión de B2M. Más particularmente, el ácido nucleico puede ser un oligonucleótido antisentido, ribozima o molécula de ARN interferente (ARNi). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de la complementaria de SEQ ID NO:3.

De acuerdo con realizaciones particulares, el ácido nucleico inhibidor es un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de B2M. Dicho oligonucleótido antisentido es un ácido nucleico (ya sea ADN o ARN) que hibrida específicamente (por ejemplo, se une) en condiciones celulares con el ARNm celular y/o el ADN genómico que codifica B2M, inhibiendo de ese modo la transcripción y/o traducción del gen. La unión puede ser por complementariedad convencional de pares de bases. Como alternativa, la unión puede ser, por ejemplo, en caso de unión a dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Aunque se prefiere, la complementariedad absoluta no es necesaria.

Los oligonucleótidos antisentido empleados de acuerdo con la invención pueden ser ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Por tanto, de acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido antisentido es una molécula de ADN monocatenaria o bicatenaria, más preferentemente una molécula de ADN bicatenaria. Según otra realización preferida, el oligonucleótido antisentido es una molécula de ARN monocatenario o bicatenario, más preferentemente una molécula de ARN monocatenario.

De acuerdo con realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido modificado que es resistente a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas y, por lo tanto, es estable *in vivo* e *in vitro*.

El oligonucleótido antisentido puede modificarse en el resto base, el resto de azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula. El oligonucleótido antisentido puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos (por ejemplo, para dirigir a receptores de células huésped), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular. Por lo tanto, el oligonucleótido antisentido puede conjugarse con otra molécula, tal como un péptido o agente de transporte.

De acuerdo con realizaciones particulares, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un resto de base modificado que se selecciona del grupo que incluye, aunque no de forma limitativa, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxitrietil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiuridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina.

De acuerdo con otras realizaciones particulares, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un resto de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, aunque no de forma limitativa, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

De acuerdo con otras realizaciones particulares, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un esqueleto de fosfato modificado seleccionado del grupo que incluye, aunque no de forma limitativa, un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforoamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un alquilfosfotriéster y un formacetal o análogo del mismo.

Se puede administrar un oligonucleótido antisentido a la célula, por ejemplo, en forma de un vector de expresión, tal como un plásmido o un vector viral, que, cuando se transcribe en las células, produce ARN que es complementario de al menos una porción única del ARNm celular para BM2. Como alternativa, el oligonucleótido antisentido puede generarse *ex vivo* e introducirse en la célula por cualquier medio conocido en la técnica. El oligonucleótido antisentido puede sintetizarse *ex vivo* mediante un método estándar conocido en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como un sintetizador de ADN automatizado disponible comercialmente de, por ejemplo, Applied Biosystems). Se han desarrollado varios métodos para administrar ADN o ARN antisentido a las células, por ejemplo, mediante inyección directa o mediante modificación diseñada para apuntar a la célula deseada (por ejemplo, usando oligonucleótidos antisentido unidos a péptidos o anticuerpos que se unen específicamente a receptores o antígenos expresados en la superficie de la célula objetivo).

De acuerdo con realizaciones preferidas, se usa un vector de ADN recombinante en el que una secuencia de nucleótidos que codifica un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de BM2 se coloca bajo el control de un promotor, tal como un promotor fuerte de pol III o pol II. El uso de tal construcción para transfectar una célula objetivo, tal como un linfocito T, dará como resultado la transcripción de una cantidad suficiente de ARN monocatenario que formará pares de bases complementarias con el transcrito endógeno y, por lo tanto, evitará la traducción del ARNm de BM2. Según estas realizaciones, un vector de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el oligonucleótido antisentido se introduce en la célula donde se produce la transcripción de un ARN antisentido. Tal vector puede permanecer episomal o estar cromosómicamente integrado, siempre que pueda transcribirse para producir el ARN antisentido. La expresión de la secuencia que codifica el ARN antisentido puede ser por cualquier promotor conocido en la técnica que actúa en mamíferos, preferentemente células humanas. Dicho promotor puede ser inducible o constitutivo. Los promotores de ejemplo incluyen, pero sin limitación, la región promotora temprana de SV40, conteniendo el promotor la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous, el promotor de la timidina del herpes y las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína.

Como alternativa, las construcciones de ADNc de sentido contrario que sintetizan ARN de sentido contrario de forma constitutiva o inducible, dependiendo del promotor utilizado, se pueden introducir en la célula.

De acuerdo con realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de la complementaria de la SEQ ID NO: 3. En el caso de una molécula bicatenaria, dicho oligonucleótido antisentido bicatenario comprende una primera cadena que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 3 y una segunda cadena complementaria de dicha primera cadena. En el caso de una molécula monocatenaria, dicho oligonucleótido monocatenario comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de la complementaria de SEQ ID NO: 3.

El oligonucleótido antisentido puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria de una región no

codificante o codificante del ARNm de BM2. De acuerdo con realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al extremo 5' del ARNm de BM2, por ejemplo, la secuencia no traducida en 5' hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG. De acuerdo con otras realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia no traducida en 3' del ARNm de BM2. De acuerdo con otras realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de la región codificante del ARNm de BM2. Ya sea que esté diseñado para hibridarse con la región 5', 3' o de codificación del ARNm de BM2, un oligonucleótido antisentido debe tener al menos seis nucleótidos de longitud, preferentemente al menos 10 nucleótidos de longitud y tiene, preferentemente, menos de aproximadamente 100 y, más preferentemente, menos de aproximadamente 50, 25, 20, 15 o 10 nucleótidos de longitud. De acuerdo con realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido tiene de 6 a 25, tal como de 10 a 25 nucleótidos de longitud.

Según otras realizaciones particulares, una molécula de ribozima diseñada para escindir catalíticamente el transcrito de ARNm de BM2 se usa para evitar la traducción y expresión de BM2 en el linfocito T (véase, por ejemplo, los documentos WO 90/11364 y US 5.093.246 para orientación general). De acuerdo con realizaciones preferidas, la ribozima es una ribozima en cabeza de martillo. Las ribozimas en cabeza de martillo escinden los ARNm en ubicaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm objetivo, por ejemplo, el ARNm de BM2, tal como el ARNm de BM2 expuesto en SEQ ID NO: 3. El único requisito es que el ARNm objetivo tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. Las construcciones y la producción de ribozimas en cabeza de martillo son bien conocidas en la técnica y se describen con más detalle en Haseloff y Gerlach (1988). Según realizaciones preferidas, la ribozima está modificada por ingeniería de tal manera que el sitio de reconocimiento de escisión se encuentra cerca del extremo 5' del ARNm de BM2. Esto aumenta la eficiencia y minimiza la acumulación intracelular de transcripciones de ARNm no funcionales.

Al igual que con los oligonucleótidos antisentido, una ribozima usada de acuerdo con la invención puede estar compuesta por oligonucleótidos modificados para, por ejemplo, mejorar la estabilidad. La ribozima puede administrarse a la célula por cualquier medio conocido en la técnica. La ribozima puede liberarse en el linfocito T en forma de un vector de expresión, tal como un plásmido o un vector viral, que, cuando se transcribe en las células, produce la ribozima. De acuerdo con realizaciones preferidas, se usa un vector de ADN recombinante en el que una secuencia de nucleótidos que codifica la ribozima se coloca bajo el control de un promotor, tal como un promotor fuerte de pol III o pol II, para que una célula transfectada produzca cantidades suficientes de ribozima para destruir el ARNm endógeno e inhibir la traducción. Dado que las ribozimas, a diferencia de los oligonucleótidos antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular más baja para la eficiencia.

Según otras realizaciones particulares, el ácido nucleico inhibidor es una molécula de ARN interferente (ARNi). La interferencia de ARN es un proceso biológico en el que las moléculas de ARN inhiben la expresión génica, causando normalmente la destrucción de ARNm específico. Los tipos de ejemplo de moléculas de ARNi incluyen microARN (miARN), ARN interferente pequeño (ARNip) y ARN de horquilla corta (ARNhc). De acuerdo con una realización preferida, la molécula de ARNi es un miARN. Según otra realización preferida, la molécula de ARNi es un ARNip. De acuerdo con aún otra realización preferida, la molécula de ARNi es un ARNhc. La producción de moléculas de ARNi *in vivo* e *in vitro* y sus métodos de uso se describen en, por ejemplo, los documentos US6.506.559, WO 01/36646, WO 00/44895, US2002/01621126, US2002/0086356, US2003/0108923, WO 02/44321, WO 02/055693, WO 02/055692 y WO 03/006477.

Según una realización preferida, la molécula de ARNi es un ARN interferente complementario a la SEQ ID NO: 3. De acuerdo con otra realización preferida, la molécula de ARNi es una molécula de ácido ribonucleico que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos del complemento de la SEQ ID NO: 3. De acuerdo con otra realización preferida, la molécula de ARNi es una molécula de ácido ribonucleico bicatenario que comprende una primera cadena idéntica a 20 hasta 25, tal como de 21 a 23, nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 3 y una segunda cadena complementaria a dicha primera cadena.

#### Modificación por ingeniería de la vía PD1/PDL1 de regulación de linfocitos T

La presente invención tiene como objetivo facilitar el injerto de linfocitos T, especialmente linfocitos T alogénicos, inhibiendo la expresión de B2M y opcionalmente CIITA en combinación con la inactivación de TCR.

En combinación con este enfoque, los inventores han descubierto que los linfocitos T pueden ser alterados por PD1 (proteína 1 de muerte celular programada, también conocida como PD1; PD-1; CD279; SLEB2; hPD-1; hPD-I o hSLE1), que es una molécula de proteína de superficie celular de 288 aminoácidos codificada por el gen PDCD1 (NCBI - NC\_000002.12). Esta proteína se expresa en los linfocitos T y las células pro-B y se ha descubierto que regula negativamente las respuestas de los linfocitos T (Carter L., *et al.* 2002). La formación del complejo receptor de PD-1/ligando PD-L1 transmite una señal inhibidora, que reduce la proliferación de los linfocitos T.

El ligando 1 de muerte programada (PD-L1) es una proteína transmembrana de tipo 1 de 40 kDa que se considera que desempeña un papel importante en la supresión del sistema inmunológico durante eventos particulares, tal como el embarazo, aloinjertos de tejido, enfermedad autoinmune y otros estados patológicos, tal como hepatitis. PD-L1

(también llamado CD274 o B7H1) está codificado por el gen CD274 (NCBI - NM\_014143).

De acuerdo con un aspecto particular, la expresión de PD-1 y TCR se inhibe en los linfocitos T modificados por ingeniería de la invención, que tiene el doble efecto de activar los linfocitos T como parte de un trasplante alogénico. Sin embargo, la inactivación o inhibición de PD-1 también se puede implementar como parte de un trasplante autólogo de linfocitos T, donde no se requeriría la inhibición o la interrupción de TCR.

De acuerdo con un aspecto adicional la inhibición o interrupción de PD1 se combina con la sobreexpresión de su ligando PDL-1 en los linfocitos T trasplantados. Esta sobreexpresión se puede obtener, por ejemplo, tras la transformación lentiviral o retroviral en linfocitos T, en la que PD-1 se inhibe o altera, o por cualquier otro medio descrito en la técnica. En consecuencia, el PDL1 que se sobreexpresa en los linfocitos T no afectará a las células trasplantadas [PD1], pero solo los linfocitos T [PD1\*] del paciente. Como resultado, los linfocitos T del paciente se inhiben y no se activan contra las células trasplantadas, lo que facilita su injerto y persistencia en el huésped.

De acuerdo con una realización preferida, la invención proporciona linfocitos T modificados por ingeniería que son [PD1\*] [TCR], mientras sobreexpresan PDL1 para facilitar su trasplante a un paciente, en particular como parte de una inmunoterapia.

#### Expresión de al menos un polipéptido inmunosupresor no endógeno

De acuerdo con algunas realizaciones preferidas, la inhibición de la expresión de beta-2m y opcionalmente CIITA se lleva a cabo con una etapa adicional de expresión en dicho linfocito T de al menos un polipéptido inmunosupresor no endógeno.

Por polipéptido "no endógeno" se entiende un polipéptido que normalmente no es expresado por la célula inmune de un donante, preferentemente un polipéptido expresado por un polinucleótido exógeno que se ha importado al genoma de la célula inmune. Por ejemplo, la IL12 no se considera en la presente invención como un polipéptido no endógeno porque se expresa a partir de un gen preexistente de la célula inmune del donante.

Por "inmunosupresor" se entiende que la expresión de dicho polipéptido no endógeno tiene el efecto de aliviar la respuesta inmune del paciente huésped contra las células inmunes del donante.

El método puede, por tanto, comprender introducir en dicho linfocito T una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un polipéptido inmunosupresor no endógeno, tal como un homólogo vírico de MHC o un ligando NKG2D.

#### Expresión del homólogo vírico de MHC

De acuerdo con realizaciones particularmente preferidos, dicho polipéptido inmunosupresor no endógeno expresado en dicho linfocito T es un homólogo vírico de MHC, tal como, por ejemplo, UL18 (denominado NP\_044619 en la base de datos de proteínas NCBI).

De acuerdo con estas realizaciones, el método puede comprender, por tanto, introducir en dicho linfocito T una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un homólogo vírico de MHC, tal como UL18. La molécula de ácido nucleico exógeno puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comparte al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % y más preferentemente al menos el 95 % de identidad con SEQ ID NO:89.

La interacción entre el linfocito T alogénico y las células inmunes del huésped se representa esquemáticamente en la Figura 8 (expresión del homólogo vírico de MHC) con respecto a la situación de la Figura 7 (sin expresión). En ambas figuras, el MHC de clase I se inactiva, preferentemente, al interrumpir (KO) el gen de beta2M.

#### Expresión del ligando NKG2D

Algunos virus, tales como los citomegalovirus, han adquirido mecanismos para evitar que las células NK medien en la vigilancia inmune e interfieran con la vía de NKG2D al secretar una proteína capaz de unirse a los ligandos de NKG2D y prevenir su expresión en la superficie (Welte, S.A.; Sinzger, C.; Lutz, S.Z.; Singh-Jasuja, H.; Sampaio, K.L.; Eknigk, U.; Rammensee, H.G.; Steinle, A. 2003 "Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein". Eur. J. Immunol., 33, 194-203). En células tumorales, algunos mecanismos han evolucionado para evadir la respuesta de NKG2D secretando ligandos de NKG2D, tales como ULBP2, MICB o MICA (Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, et al. (2003) Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. Blood 102: 1389-1396)

De acuerdo con otras realizaciones particularmente preferidas, el polipéptido inmunosupresor no endógeno que se expresará en dichos linfocitos T es un ligando de NKG2D.

De acuerdo con estas realizaciones, el método puede comprender, por tanto, introducir en dicho linfocito T una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un ligando de NKG2D. La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comparte al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % y, más preferentemente, al menos el 95 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO:90-97.

La interacción entre el linfocito T alogénico y las células inmunes del huésped se representa esquemáticamente en la Figura 9 (expresión del ligando e NKG2D soluble) con respecto a la situación de la Figura 7 (sin expresión). En ambas figuras, el MHC de clase I se desactiva al interrumpir (KO) el gen de beta2M.

La Tabla 10 presentada adicionalmente en el texto representa un homólogo vírico de MHC (UL18) y un panel de ligandos de NKG2D y su secuencia de polipéptidos que se expresarán de acuerdo con la presente invención.

#### Receptores de antígeno quiméricos (CAR)

La inmunoterapia adoptiva, que implica la transferencia de linfocitos T específicos de antígeno autólogos generados *ex vivo*, es una estrategia prometedora para tratar el cáncer o las infecciones virales. Los linfocitos T usados para inmunoterapia adoptiva pueden generarse mediante expansión de linfocitos T específicos de antígeno o redirección de linfocitos T mediante ingeniería genética (Park, Rosenberg et al. 2011). La transferencia de linfocitos T específicas de antígeno viral es un procedimiento bien establecido utilizado para el tratamiento de infecciones víricas asociadas a trasplantes y tumores malignos raros relacionados con virus. De forma similar, se ha mostrado que el aislamiento y transferencia de linfocitos T específicos de tumor tienen éxito en el tratamiento del melanoma.

Se han generado con éxito nuevas especificidades en los linfocitos T a través de la transferencia genética de receptores de linfocitos T transgénicos o receptores de antígeno quimérico (CAR) (Jena, Dotti et al. 2010). Los CAR son receptores sintéticos que consisten en un resto de dirección que está asociado con uno o más dominios de señalización en una única molécula de fusión. En general, el resto de unión de un CAR consiste en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo monocatenario (scFv), que comprende los fragmentos ligeros y variables de un anticuerpo monoclonal unidos por un enlazador flexible. También se han usado con éxito restos de unión basados en dominios de receptores o ligandos. Los dominios de señalización para CAR de primera generación proceden de la región citoplásmica del CD3zeta o las cadenas gamma de receptores de Fc. Se ha mostrado que los CAR de primera generación redirigen con éxito la citotoxicidad de linfocitos T, sin embargo, no lograron proporcionar una expansión prolongada y actividad antitumoral *in vivo*. Dominios de señalización de moléculas coestimuladoras que incluyen CD28, OX-40 (CD134) y 4-1BB (CD137) se han añadido solos (segunda generación) o en combinación (tercera generación) para mejorar la supervivencia y aumentar la proliferación de linfocitos T modificados con CAR. Los CAR han permitido con éxito que los linfocitos T se redirijan hacia antígenos expresados en la superficie de células tumorales de diversos tumores malignos, incluidos linfomas y tumores sólidos (Jena, Dotti *et al.* 2010).

CD19 es un objetivo atractivo para la inmunoterapia porque la gran mayoría de la leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B) expresa de manera uniforme CD19, mientras que la expresión está ausente en las células no hematopoyéticas, así como mieloides, eritroides y linfocitos T y células madre de médula ósea. Se están realizando ensayos clínicos dirigidos a CD19 sobre tumores malignos de linfocitos B con respuestas antitumorales alentadoras. La mayoría infunde linfocitos T genéticamente modificados para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) con especificidad derivada de la región scFv de un anticuerpo monoclonal de ratón específico para CD19 FMC63 (documento WO2013/126712).

Así, de acuerdo con determinadas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico expresado por el linfocito T modificado por ingeniería se dirige contra el antígeno de linfocitos B CD19.

De acuerdo con determinadas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico es un receptor de antígeno quimérico de cadena sencilla. Como un ejemplo de receptor de antígeno quimérico de cadena sencilla que se expresará en los linfocitos T modificados por ingeniería de acuerdo con la presente invención es un polipéptido único que comprende al menos un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana y al menos un dominio transductor de señal, en el que dicho dominio de unión a ligando extracelular comprende un scFv derivado del anticuerpo monoclonal específico anti-CD19 4G7. Una vez transducido al linfocito T, por ejemplo mediante el uso de transducción retroviral o lentiviral, este CAR contribuye al reconocimiento del antígeno CD19 presente en la superficie de los linfocitos B malignos implicados en el linfoma o la leucemia.

De acuerdo con realizaciones particulares, el receptor de antígeno quimérico es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6 o una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 %, tal como al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al un menos el 99 %, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:6 sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 6. Preferentemente, la variante es capaz de unirse a CD19.

Un receptor de antígeno quimérico particularmente preferido es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, al menos el 95 % o al un menos el 99 %, de identidad de

secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:7 sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 7. Dicha variante puede diferir del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO:7 en la sustitución de al menos uno, al menos dos o al menos tres restos de aminoácidos. Preferentemente, dicha variante es capaz de unirse a CD19.

- 5 De acuerdo con otras determinadas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico puede dirigirse contra otro antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada, tal como un grupo de moléculas de diferenciación, tal como CD16, CD64, CD78, CD96, CLL1, CD116, CD117, CD71, CD45, CD71, CD123 y CD138, un antígeno de superficie asociado a tumor, tal como ErbB2 (HER2/neu), antígeno carcinoembrionario (CEA), molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante III de EGFR (EGFRvIII), CD19, CD20, CD30, CD40, disialogangliósido GD2, mucina ductal-epitelial, gp36, TAG-72, glucosfingolípidos, antígeno asociado a glioma, gonadotropina coriónica humana  $\beta$ , alfafetoproteína (AFP), AFP sensible a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptasa inversa telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxilo esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno específico de prostata (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGA-1a, p53, prosteína, PSMA, supervivencia y telomerasa, antígeno 1 de tumor de carcinoma prostático (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrina B2, CD22, factor de crecimiento de insulina (IGF1) -I, IGF-II, receptor del IGF1, mesotelina, una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que presenta un epítipo peptídico específico de tumor, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, antígenos tumorales del estroma, el dominio extra A (EDA) y el dominio extra B (EDB) de fibronectina y el dominio A1 de tenascina C (TnC A1) y la proteína asociada a fibroblasto (fap); un antígeno específico de linaje o específico de tejido tal como CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD33, CD34, CD133, CD138, CTLA-4, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), GM-CSF, receptores de citocina, endoglina, una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), BCMA (CD269, TNFRSF 17), mieloma múltiple o antígeno de leucemia linfoblástica, tal como uno seleccionado de TNFRSF17 (UNIPROT Q02223), SLAMF7 (UNIPROT Q9NQ25), GPRC5D (UNIPROT Q9NZD1), FKBP11 (UNIPROT Q9NYL4), KAMP3, ITGA8 (UNIPROT P53708) y FCRL5 (UNIPROT Q68SN8). Un antígeno de superficie específico de virus, tal como un antígeno específico de VIH (tal como gp120 de VIH); un antígeno específico del VEB, un antígeno específico del CMV, un antígeno específico del VPH, un antígeno específico del virus Lasse, un antígeno específico del virus de la gripe, así como cualquier derivado o variante de estos antígenos de superficie.

- 30 En otras determinadas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico es un receptor de antígeno quimérico de múltiples cadenas. Los receptores de antígeno quimérico de la técnica anterior introducidos en los linfocitos T se han formado de polipéptidos de cadena única que requieren la incorporación en serie de dominios de señalización. Sin embargo, al mover dominios de señalización desde su posición yuxtamembrana natural puede interferir con su función. Para superar este inconveniente, el solicitante diseñó recientemente un CAR multicatenario derivado de Fc $\epsilon$ R1 para permitir la posición normal yuxtamembrana de todos los dominios de señalización relevantes. En esta nueva arquitectura, el dominio de unión a IgE de alta afinidad de la cadena alfa de Fc $\epsilon$ R1 se reemplaza por un dominio de unión a ligando extracelular como scFv para redirigir la especificidad de linfocitos T contra objetivos celulares y las colas N y/o C terminales de la cadena beta de Fc $\epsilon$ R1 se usan para colocar señales coestimuladoras en posiciones normales yuxtamembrana como se describe en el documento WO 2013/176916.

- 40 En consecuencia, un CAR expresado por el linfocito T modificado de acuerdo con la invención puede ser un receptor de antígeno quimérico de múltiples cadenas particularmente adaptado a la producción y expansión de linfocitos T modificados por ingeniería de la presente invención. Dichos CAR multicatenarios comprenden al menos dos de los siguientes componentes:

- 45 a) un polipéptido que comprende el dominio transmembrana de la cadena alfa de Fc $\epsilon$ R1 y un dominio de unión a ligando extracelular,
- b) un polipéptido que comprende una parte de la cola citoplasmática N y C-terminal y el dominio transmembrana de la cadena beta de Fc $\epsilon$ R1 y/o
- 50 c) al menos dos polipéptidos que comprenden cada uno una parte de la cola intracitoplasmática y el dominio transmembrana de la cadena gamma de Fc $\epsilon$ R1, por el cual diferentes polipéptidos se multimerizan juntos espontáneamente para formar CAR dimérico, trimérico o tetramérico.

- 55 De acuerdo con tales arquitecturas, los dominios de unión a ligandos y los dominios de señalización nacen en polipéptidos separados. Los diferentes polipéptidos están anclados en la membrana en una proximidad cercana que permite interacciones entre sí. En tales arquitecturas, los dominios de señalización y coestimulación pueden estar en posiciones yuxtamembrana (es decir, adyacentes a la membrana celular en el lado interno de la misma), que se considera que permite una mejor función de los dominios coestimuladores. La arquitectura de múltiples subunidades también ofrece más flexibilidad y posibilidades de diseñar CAR con más control sobre la activación de linfocitos T. Por ejemplo, es posible incluir varios dominios de reconocimiento de antígeno extracelular que tienen una especificidad diferente para obtener una arquitectura CAR multiespecífica. También es posible controlar la relación relativa entre las diferentes subunidades en el CAR multicatenario. Este tipo de arquitectura se ha detallado recientemente por el solicitante en el documento PCT/US2013/058005.

- 65 El montaje de las diferentes cadenas como parte de un solo CAR multicatenario es posible, por ejemplo, mediante el



uso de las diferentes cadenas alfa, beta y gamma del receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) (Metzger, Alcaraz et al. 1986) a la que están fusionados los dominios de señalización y coestimuladores. La cadena gamma comprende una región transmembrana y una cola citoplasmática que contiene un motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) (Cambier 1995).

El CAR multcatenario puede comprender varios dominios de unión a ligando extracelulares, para unir simultáneamente diferentes elementos en diana aumentando de este modo la activación y función de células inmunitarias. En una realización, los dominios de unión a ligando extracelular pueden colocarse en tándem en el mismo polipéptido transmembrana y opcionalmente pueden separarse por un enlazador. En otra realización, dichos dominios de unión a ligando extracelulares diferentes pueden colocarse en diferentes polipéptidos transmembrana que componen el CAR multcatenario.

El dominio de transducción de señal o dominio de señalización intracelular del CAR multcatenario de la invención es responsable de la señalización intracelular después de la unión del dominio de unión a ligando extracelular con el objetivo, dando como resultado la activación de la célula inmunitaria y respuesta inmunitaria. En otras palabras, el dominio de transducción de señal es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se expresa el CAR multcatenario. Por ejemplo, la función efectora de un linfocito T puede ser una actividad citolítica o actividad auxiliar que incluye la secreción de citocinas.

En la presente solicitud, la expresión "dominio de transducción de señal" se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal efectora a señal funcional y dirige la célula para realizar una función especializada.

Los ejemplos preferidos de dominio de transducción de señal para su uso en CAR de cadena simple o múltiple pueden ser las secuencias citoplasmáticas del receptor Fc o el receptor de linfocitos T y los co-receptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señal después del acoplamiento del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional. El dominio de transducción de señal comprende dos clases distintas de secuencia de señalización citoplásmica, la que inician la activación primaria dependiente de antígeno y las que actúan de una manera dependiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimulante. La secuencia de señalización citoplásmica primaria puede comprender motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptores de ITAM. Los ITAM son motivos de señalización bien definidos hallados en la cola intracitoplásmica de diversos receptores que actúan como sitios de unión para tirosina quinasas de clase syk/zap70. Los ejemplos de ITAM utilizados en la invención pueden incluir como ejemplos no limitantes los derivados de TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, FcRépsilon, CD3 gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. De acuerdo con realizaciones particulares, el dominio de transducción de señalización del CAR multcatenario puede comprender el dominio de señalización CD3zeta o el dominio intracitoplásmico de las cadenas beta o gamma de FcεRI.

De acuerdo con realizaciones particulares, el dominio de transducción de señal de CAR multcatenarios de la presente invención comprende una molécula señal coestimuladora. Una molécula coestimulantes es una molécula de superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que es necesaria para una respuesta inmunitaria eficaz.

Los dominios de unión a ligando pueden ser cualquier receptor de antígeno usado previamente, y referido, con respecto al CAR monocatenario al que se hace referencia en la literatura, en particular scFv de anticuerpos monoclonales.

#### Linfocitos T modificados por ingeniería

Como resultado de la presente invención, pueden obtenerse linfocitos T modificados por ingeniería que tienen características mejoradas. En particular, la presente invención proporciona un linfocito T modificado por ingeniería, preferentemente aislado, que se caracteriza además porque la expresión de B2M está inhibida.

De acuerdo con determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un linfocito T modificado por ingeniería, preferentemente aislado, que expresa una endonucleasa de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN, preferentemente rotura de la doble cadena, el gen que codifica B2M. De acuerdo con realizaciones particulares, dicho linfocito T comprende una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha endonucleasa de corte poco frecuente. De acuerdo con realizaciones más particulares, dicha endonucleasa de corte poco frecuente es una nucleasa TAL, una meganucleasa, una nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o una endonucleasa guiada por ARN. Por tanto, de acuerdo con una realización específica, la endonucleasa de corte poco frecuente es una TAL-nucleasa. De acuerdo con otra realización específica, la endonucleasa de corte poco frecuente es una meganucleasa. De acuerdo con otra realización, la endonucleasa de corte poco frecuente es una nucleasa en dedo de cinc. De acuerdo con otra realización específica, la endonucleasa de corte poco frecuente es una endonucleasa guiada por ARN, tal como Cas9.

De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un linfocito T modificado por ingeniería, preferentemente aislado, que comprende una molécula de ácido nucleico exógeno que inhibe la expresión de B2M. De acuerdo con realizaciones particulares, dicho linfocito T comprende una molécula de ácido nucleico exógeno que

comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M. Según realizaciones más particulares, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M es un oligonucleótido antisentido, ribozima o molécula de ARN interferente (ARNi). Por lo tanto, de acuerdo con una realización específica, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M es un oligonucleótido antisentido.

5 De acuerdo con otra realización específica, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M es una ribozima y, preferentemente, una ribozima en cabeza de martillo. De acuerdo con otra realización específica, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M es una molécula de ARN interferente.

10 De acuerdo con determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un linfocito T modificado por ingeniería, preferentemente aislado, que expresa adicionalmente una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN, preferentemente rotura de la doble cadena, el gen que codifica CIITA. De acuerdo con realizaciones particulares, dicho linfocito T comprende una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente. Según realizaciones más particulares, dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una nucleasa TAL, 15 meganucleasa, nucleasa con dedo de cinc (ZFN) o endonucleasa guiada por ARN. Por lo tanto, de acuerdo con una realización específica, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una TAL-nucleasa. De acuerdo con otra realización específica, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una meganucleasa. De acuerdo con otra realización específica, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una nucleasa con dedos de cinc. De acuerdo con otra realización específica más, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una endonucleasa 20 guiada por ARN o ADN, tal como Cas9 o Argonaute.

De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un linfocito T modificado por ingeniería, preferentemente aislado, que comprende una molécula de ácido nucleico exógena que inhibe la expresión de CIITA. De acuerdo con realizaciones particulares, dicho linfocito T comprende una molécula de ácido nucleico exógeno que 25 comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de CIITA. Según realizaciones más particulares, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de CIITA es un oligonucleótido antisentido, ribozima o molécula de ARN interferente (ARNi). Por lo tanto, de acuerdo con una realización específica, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de CIITA es un oligonucleótido antisentido. De acuerdo con otra realización específica, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de CIITA es una 30 ribozima y, preferentemente, una ribozima en cabeza de martillo. De acuerdo con otra realización específica, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de CIITA es una molécula de ARN interferente.

De acuerdo con determinadas realizaciones, el linfocito T modificado por ingeniería además expresa una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN, 35 preferentemente rotura de la doble cadena, al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR), tal como TCR alfa. De acuerdo con realizaciones particulares, dicho linfocito T comprende una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente.

40 El linfocito T modificado por ingeniería comprende además expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada. De acuerdo con realizaciones particulares, dicho linfocito T comprende una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho CAR.

45 De acuerdo con algunas realizaciones, la presente invención proporciona un linfocito T modificado por ingeniería, preferentemente aislado, que expresa al menos un polipéptido inmunosupresor no endógeno. De acuerdo con realizaciones particulares, dicho polipéptido inmunosupresor no endógeno es un homólogo de MHC viral, tal como UL18. El linfocito T puede comprender, por tanto, una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una 50 secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comparte al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % y más preferentemente al menos el 95 % de identidad con SEQ ID NO:89. De acuerdo con otras realizaciones particulares, dicho polipéptido inmunosupresor no endógeno es un ligando de NKG2D. El linfocito T puede comprender, por tanto, una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comparte al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % y, más preferentemente, al menos el 95 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO:90-97.

55 Se entiende que los detalles dados en el presente documento, en particular con respecto a la endonucleasa de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN del gen que codifica B2M, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivarse selectivamente por escisión de ADN al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR), 60 y el receptor de antígeno quimérico también se aplican a este aspecto de la invención.

Además, en el alcance de la presente invención también se abarca una célula o línea celular obtenida de un linfocito T modificado por ingeniería de acuerdo con la invención, [CAR]<sup>+</sup>, es decir, armada con un receptor de antígeno quimérico para dirigir el reconocimiento específico de células tumorales, mostrando uno de estos fenotipos:

[b2m][TCR]<sup>+</sup>[CAR]<sup>+</sup>

[b2m]<sup>-</sup> [TCR]<sup>-</sup> [PD1]<sup>-</sup> [CAR]<sup>+</sup>

[b2m]<sup>-</sup> [TCR]<sup>-</sup> [PD1]<sup>-</sup> [PDL-1]<sup>+</sup> [CAR]<sup>+</sup>

[b2m]<sup>-</sup> [TCR]<sup>-</sup> [homólogo vírico de MHC]<sup>+</sup> [CAR]<sup>+</sup> o

[b2m]<sup>-</sup> [TCR]<sup>-</sup> [ligando de NKG2D]<sup>+</sup> [CAR]<sup>+</sup>

## 10 Métodos de administración

Los inventores han considerado cualquier medio conocido en la técnica para permitir la administración dentro de las células o compartimentos subcelulares de dichas células las moléculas de ácido nucleico empleadas de acuerdo con la invención. Estos medios incluyen la transducción viral, la electroporación y también los medios de administración liposomales, vehículos poliméricos, vehículos químicos, lipoplexos, poliplexos, dendrímeros, nanopartículas, emulsión, endocitosis natural o vía de fagocitosis como ejemplos no limitantes.

Según la presente invención, las moléculas de ácido nucleico detalladas en el presente documento pueden introducirse en el linfocito T mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los ejemplos no limitantes apropiados los métodos no limitantes para introducir una molécula de ácido nucleico en un linfocito T incluyen los métodos de transformación estable, en el que la molécula de ácido nucleico está integrada en el genoma de la célula, métodos de transformación transitorios en los que la molécula de ácido nucleico no está integrada en el genoma de la célula y los métodos mediados por virus. Dicha molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula mediante, por ejemplo, un vector viral recombinante (por ejemplo, retrovirus, adenovirus), liposomas y similares. Los métodos de transformación transitoria incluyen, por ejemplo, microinyección, electroporación o bombardeo de partículas. En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es un vector, tal como un vector viral o plásmido. De manera adecuada, dicho vector es un vector de expresión que permite la expresión del o los polipéptidos o proteínas respectivos detallados en el presente documento por el linfocito T.

Una molécula de ácido nucleico introducida en el linfocito T puede ser ADN o ARN. En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico introducida en el linfocito T es el ADN. En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico introducida en el linfocito T es ARN y, en particular, un ARNm que codifica un polipéptido o proteína detallado en el presente documento, en el que el ARNm se introduce directamente en el linfocito T, por ejemplo mediante electroporación. Se describe una técnica de electroporación adecuada, por ejemplo, en la publicación internacional WO2013/176915 (en particular, la sección titulada "Electroporación" que une las páginas 29 a 30). Una molécula de ácido nucleico particular que puede ser un ARNm es la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica B2M. Otra molécula de ácido nucleico particular que puede ser un ARNm es la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica CIITA. Otra molécula de ácido nucleico particular que puede ser un ARNm es la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN al menos un gen que codifica un componente del Receptor de linfocitos T (TCR).

Como una realización preferida de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican las endonucleasas de la presente invención se transfectan en forma de ARNm para obtener una expresión transitoria y evitar la integración cromosómica de ADN extraño, por ejemplo mediante electroporación. Los inventores han determinado diferentes condiciones óptimas para la electroporación de ARNm en linfocitos T que se muestran en la Tabla 1. El inventor utilizó la tecnología cytoPulse que permite, mediante el uso de campos eléctricos pulsados, permeabilizar transitoriamente células vivas para la administración de material a las células (patente de Estados Unidos 6.010.613 y documento WO 2004/083379). La duración del pulso, la intensidad y el intervalo entre pulsos pueden modificarse para alcanzar las mejores condiciones para una alta eficiencia de transfección con una mortalidad mínima. Básicamente, los primeros pulsos de alto campo eléctrico permiten la formación de poros, mientras que los pulsos posteriores de campo eléctrico inferior permiten mover el polinucleótido a la célula. En un aspecto de la presente invención, el inventor describe las etapas que condujeron al logro de una eficiencia de transfección >95 % del ARNm en los linfocitos T y el uso del protocolo de electroporación para expresar transitoriamente diferentes tipos de proteínas en los linfocitos T. En particular, la descripción se refiere en una realización no reivindicada, a un método para transformar linfocitos T, que comprende poner en contacto dichos linfocitos T con ARN y aplicar a los linfocitos T una secuencia de pulso ágil que consiste en:

- (a) un impulso eléctrico con un intervalo de voltaje de 2250 a 3000 V por centímetro, un ancho de pulso de 0,1 ms y un intervalo de pulso de 0,2 a 10 ms entre los pulsos eléctricos de las etapas (a) y (b);
- (b) un pulso eléctrico con un intervalo de voltaje de 2250 a 3000 V con un ancho de pulso de 100 ms y un intervalo de pulso de 100 ms entre el pulso eléctrico de la etapa (b) y el primer pulso eléctrico de la etapa (c); y
- (c) 4 pulsos eléctricos con un voltaje de 325 V con un ancho de pulso de 0,2 ms y un intervalo de pulso de 2 ms entre cada uno de los 4 pulsos eléctricos.

En una realización particular, el método de transformación de linfocitos T comprende poner en contacto dichos linfocitos T con ARN y aplicar a los linfocitos T una secuencia de pulso ágil que consiste en:

- 5       (a) un impulso eléctrico con un voltaje de 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000V por centímetro, un ancho de pulso de 0,1 ms y un intervalo de pulso de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ms entre los pulsos eléctricos de la etapa (a) y (b);
- (b) un impulso eléctrico con un intervalo de voltaje de 2250, de 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000V con un ancho de pulso de 100 ms y un intervalo de pulso de 100 ms
- 10       entre el pulso eléctrico de la etapa (b) y el primer impulso eléctrico de la etapa (c); y
- (c) 4 pulsos eléctricos con un voltaje de 325 V con un ancho de pulso de 0,2 ms y un intervalo de pulso de 2 ms entre cada uno de los 4 pulsos eléctricos.

- 15       Cualquier valor incluido en el intervalo de valores descrito anteriormente se desvela en la presente solicitud. El medio de electroporación puede ser cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Preferentemente, el medio de electroporación tiene una conductividad en un intervalo que abarca de 0,01 a 1,0 miliSiemens.

**Tabla 1:** Programas de cytopulse diferentes usados para determinar la tensión mínima necesaria para electroporación en linfocitos T procedentes de PBMC.

Programa de cyto-pulso	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
	Pulsos	V	duración (ms)	Intervalo (ms)	Pulsos	V	duración (ms)	Intervalo (ms)	Pulsos	V	duración (ms)	Intervalo (ms)
1	1	600	0,1	0,2	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2
2	1	900	0,1	0,2	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
3	1	1200	0,1	0,2	1	1200	0,1	100	4	130	0,2	2
4	1	1200	0,1	10	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
5	1	900	0,1	20	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2

Linfocitos T no alorreactivos:

Aunque el método descrito anteriormente podría llevarse a cabo *in vivo* como parte de una terapia génica, por ejemplo, mediante el uso de vectores virales dirigidos a los linfocitos T en la circulación sanguínea, que incluiría secuencias genéticas que expresan una endonucleasa específica de sitio de corte poco frecuente junto con otras secuencias genéticas que expresan, por ejemplo, un CAR, se pretende más generalmente que el método descrito anteriormente se practique *ex vivo* en linfocitos T cultivados obtenibles de pacientes o donantes. Los linfocitos T modificados por ingeniería *ex vivo* son para su uso como parte de un tratamiento alogénico. En este caso, es preferente modificar por ingeniería además las células para hacerlas no alorreactivas para asegurar su injerto adecuado. En consecuencia, el método puede incluir etapas adicionales de procurar los linfocitos T de un donante e inactivar genes de las mismas implicadas en el reconocimiento de MHC o que son objetivos de fármacos inmunosupresores, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2013/176915.

Los receptores de linfocitos T (TCR) son receptores de superficie celular que participan en la activación de los linfocitos T en respuesta a la presentación del antígeno. El TCR está compuesto en general por dos cadenas, alfa y beta, que se ensamblan para formar un heterodímero y se asocia con las subunidades transductoras de CD3 para formar el complejo de receptores de linfocitos T presente en la superficie celular. Cada cadena alfa y beta del TCR consiste en una región variable (V) y constante (C) N-terminal de tipo inmunoglobulina, un dominio hidrófobo transmembrana y una región citoplásmica corta. Con respecto a moléculas de inmunoglobulina, la región variable de las cadenas alfa y beta se genera por la recombinación V(D)J, creando una gran diversidad de especificidades de antígeno en la población de linfocitos T. Sin embargo, a diferencia de inmunoglobulinas que reconocen antígeno intacto, los linfocitos T son activados por fragmentos peptídicos procesados en asociación con una molécula de MHC, introduciendo una dimensión extra al reconocimiento de antígenos por linfocitos T, conocido como restricción de MHC. El reconocimiento de diferencias de MHC entre el donante y el receptor mediante el receptor de linfocitos T conduce a proliferación de linfocitos T y el desarrollo potencial de GVHD. Se ha mostrado que la expresión en superficie normal del TCR depende de la síntesis y el ensamblaje coordinados de los siete componentes del complejo (Ashwell y Klusner 1990). La inactivación de TCR alfa o TCR beta puede dar como resultado la eliminación de TCR de la superficie de los linfocitos T evitando el reconocimiento del aloantígeno y, por lo tanto, la EICH.

Por tanto, todavía de acuerdo con la invención, el injerto de los linfocitos T mejora inactivando al menos un gen que codifica un componente del TCR. El TCR se vuelve no funcional en las células al inactivar el gen de TCR alfa y/o el o los genes TCR beta.

Con respecto al uso del sistema Cas9/CRISPR, los inventores han determinado secuencias diana apropiadas dentro de los 3 exones que codifican TCR, permitiendo una reducción significativa de la toxicidad en las células vivas, mientras se mantiene la eficiencia de escisión. Las secuencias diana preferidas se indican en la Tabla 2 (+ para una proporción más baja de células negativas para TCR, ++ para relación intermedia, +++ para una relación más alta).

**Tabla 2:** Secuencias diana apropiadas para el ARN guía usando Cas9 en linfocitos T

Exón TCR	Posición	Cadena	Secuencia genómica objetivo	SEQ ID	eficiencia
Ej1	78	-1	GAGAATCAAAATCGGTGAATAGG	8	+++
Ej3	26	1	TTCAAAACCTGTCAGTGATTGGG	9	+++
Ej1	153	1	TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG	10	+++
Ej3	74	-1	CGTCATGAGCAGATTAAACCCGG	11	+++
Ej1	4	-1	TCAGGGTTCTGGATATCTGTGGG	12	+++
Ej1	5	-1	GTCAGGGTTCTGGATATCTGTGG	13	+++
Ej3	33	-1	TTCGGAACCCAATCACTGACAGG	14	+++
Ej3	60	-1	TAAACCCGGCCACTTTCAGGAGG	15	+++
Ej1	200	-1	AAAGTCAGATTTGTTGCTCCAGG	16	++
Ej1	102	1	AACAAATGTGTCACAAAGTAAGG	17	++
Ej1	39	-1	TGGATTTAGAGTCTCTCAGCTGG	18	++
Ej1	59	-1	TAGGCAGACAGACTTGTCAGTGG	19	++
Ej1	22	-1	AGCTGGTACACGGCAGGGTCAGG	20	++
Ej1	21	-1	GCTGGTACACGGCAGGGTCAGGG	21	++
Ej1	28	-1	TCTCTCAGCTGGTACACGGCAGG	22	++
Ej3	25	1	TTTCAAAACCTGTCAGTGATTGG	23	++
Ej3	63	-1	GATTAAACCCGGCCACTTTCAGG	24	++
Ej2	17	-1	CTCGACCAGCTTGACATCACAGG	25	++
Ej1	32	-1	AGAGTCTCTCAGCTGGTACACGG	26	++
Ej1	27	-1	CTCTCAGCTGGTACACGGCAGGG	27	++
Ej2	12	1	AAGTTCCTGTGATGTCAAGCTGG	28	++

(continuación)

Exón TCR	Posición	Cadena	Secuencia genómica objetivo	SEQ ID	eficiencia
Ej3	55	1	ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG	29	++
Ej3	86	1	TGCTCATGACGCTGCGGCTGTGG	30	++
Ej1	146	1	ACAAAAGTGTGCTAGACATGAGG	31	+
Ej1	86	-1	ATTTGTTTGAGAATCAAAATCGG	32	+
Ej2	3	-1	CATCACAGGAAGCTTTCTAAAAGG	33	+
Ej2	34	1	GTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGG	34	+
Ej3	51	-1	CCACTTTCAGGAGGAGGATTCGG	35	+
Ej3	18	-1	CTGACAGGTTTTGAAAGTTTAGG	36	+
Ej2	43	1	AGCTTTGAAACAGGTAAGACAGG	37	+
Ej1	236	-1	TGGAATAATGCTGTTGTTGAAGG	38	+
Ej1	182	1	AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG	39	+
Ej3	103	1	CTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG	40	+
Ej3	97	1	CTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGG	41	+
Ej3	104	1	TGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGG	42	+
Ej1	267	1	CTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGG	43	+
Ej1	15	-1	ACACGGCAGGGTCAGGGTTCTGG	44	+
Ej1	177	1	CTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGG	45	+
Ej1	256	-1	CTGGGGAAGAAGGTGTCTTCTGG	46	+
Ej3	56	1	TCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGG	47	+
Ej3	80	1	TTAATCTGCTCATGACGCTGCGG	48	+
Ej3	57	-1	ACCCGGCCACTTTTCAGGAGGAGG	49	+
Ej1	268	1	TTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGG	50	+
Ej1	266	-1	CTTACCTGGGCTGGGGAAGAAGG	51	+
Ej1	262	1	GACACCTTCTTCCCCAGCCCAGG	52	+
Ej3	102	1	GCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGG	53	+
Ej3	51	1	CCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGG	54	+

Los antígenos del MHC también son proteínas que desempeñaron un papel importante en las reacciones de trasplante. El rechazo está mediado por los linfocitos T que reaccionan a los antígenos de histocompatibilidad en la superficie de los tejidos implantados y el grupo más grande de estos antígenos son los antígenos de histocompatibilidad mayor (MHC). Estas proteínas se expresan en la superficie de todos los vertebrados superiores y se denominan antígenos HLA (para los antígenos leucocitarios humanos) en las células humanas. Al igual que TCR, las proteínas del MHC cumplen una función vital en la estimulación de los linfocitos T. Las células presentadoras de antígeno (a menudo células dendríticas) muestran péptidos que son productos de degradación de proteínas extrañas en la superficie celular en el MHC. En presencia de una señal coestimuladora, el linfocito T se activa y actuará en una célula objetivo que también muestra el mismo complejo péptido/MHC. Por ejemplo, un linfocito T auxiliar estimulada se dirigirá a un macrófago que muestra un antígeno junto con su MHC, o un linfocito T citotóxico (LTC) actuará en una célula infectada por virus que muestra péptidos virales extraños.

Por tanto, con el fin de proporcionar menos linfocitos T alorreactivos, el método puede comprender además la etapa de inactivar o mutar un gen de HLA.

El grupo de genes de HLA de clase I en seres humanos comprende tres loci principales, B, C y A, así como varios loci menores. El grupo de HLA de clase II también comprende tres loci principales, DP, DQ y DR, y los grupos de genes de clase I y clase II son polimórficos, en cuanto a que hay varios alelos diferentes de los genes de clase I y II dentro de la población. También hay varias proteínas accesorias que desempeñan un papel en el funcionamiento de HLA. Las subunidades Tap1 y Tap2 son partes del complejo transportador TAP que es esencial para cargar los antígenos peptídicos en los complejos de HLA de clase I y las subunidades proteosómicas LMP2 y LMP7 desempeñan un papel en la degradación proteolítica de los antígenos peptídicos para su visualización en el HLA. Se ha demostrado que la reducción en LMP7 reduce la cantidad de MHC de clase I en la superficie celular, quizá a través de una falta de estabilización (Fehling et al. (1999) Science 265:1234-1237). Además de TAP y LMP, está el gen de las tapasinas, cuyo producto forma un puente entre el complejo TAP y las cadenas HLA clase I y mejora la carga de péptidos. La reducción de los resultados de la tapasina en células con ensamblaje de MHC de clase I deteriorado, la expresión reducida en la superficie celular del MHC de clase I y las respuestas inmunitarias alteradas (Grande et al. (2000) Immunity 13:213-222 and Garbi et al. (2000) Nat. Immunol. 1:234-238). Cualquiera de los genes anteriores puede inactivarse como parte de la presente invención como se desvela, por ejemplo, en el documento WO 2012/012667.

Por lo tanto, de acuerdo con determinadas realizaciones, el método comprende además inactivar al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en RFXANK, RFX5, RFXAP, TAP1, TAP2, ZXDA, ZXDB y ZXDC. La inactivación

puede, por ejemplo, lograrse utilizando una modificación del genoma, más particularmente a través de la expresión en el linfocito T de una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN un gen seleccionado del grupo que consiste en RFXANK, RFX5, RFXAP, TAP1, TAP2, ZXDA, ZXDB y ZXDC.

## 5 Activación y expansión de linfocitos T

El método desvelado anteriormente puede incluir una etapa adicional de activación y/o expansión de los linfocitos T. Esto se puede hacer antes o después de la modificación genética de los linfocitos T, usando los métodos descritos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20060121005. De acuerdo con estos métodos, los linfocitos T de la invención pueden expandirse por contacto con una superficie que se ha unido a un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3 TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T.

En particular, las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse *in vitro*, tal como mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de proteína quinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de los linfocitos T, se utiliza un ligando que une la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de linfocitos T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Para estimular la proliferación de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Como pueden apreciar fácilmente los expertos en la materia, La relación entre partículas y células puede depender del tamaño de partícula en relación con la célula objetivo. En algunas realizaciones adicionales de la presente divulgación, las células, tales como linfocitos T, se combinan con perlas recubiertas de agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y luego las células se cultivan. En una realización alternativa, antes del cultivo, las células y las perlas recubiertas con agente no se separan sino que se cultivan juntas. Las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las perlas paramagnéticas a las que se unen anti-CD3 y anti-CD28 (perlas 3x28) entren en contacto con los linfocitos T. En una realización, las células (por ejemplo, de 4 a 10 linfocitos T) y las perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas T DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 en una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, preferentemente PBS (sin cationes divalentes, tales como calcio y magnesio). De nuevo, los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente que se puede usar cualquier concentración celular. La mezcla se puede cultivar durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero por hora en el medio. En otra realización, la mezcla se puede cultivar durante 21 días. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo y/o medio RPMI 1640 o, X-vivo 5, (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-g, 1L-4, 1L-7, GM-CSF, -10, -2, 1L-15, TGFp y TNF- o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de las células incluyen, pero sin limitación, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores, tales como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, libre de suero o suplementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) 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 infunden en un sujeto. Las células objetivo se mantienen en condiciones necesarias para apoyar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (por ejemplo, 37 °C) y atmósfera (por ejemplo, aire más 5 % de CO<sub>2</sub>). Los linfocitos T que han estado expuestos a tiempos de estimulación variados pueden presentar características diferentes

En otra realización particular, dichas células pueden expandirse cocultivando con tejido o células. Dichas células también pueden expandirse *in vivo*, por ejemplo, en la sangre del sujeto después de la administración de dicha célula en el sujeto.

## Aplicaciones terapéuticas

Se pretende que los linfocitos T que se pueden obtener de acuerdo con los métodos descritos anteriormente se usen como un medicamento y, en particular, para el tratamiento de, entre otros, cáncer, infecciones (tales infecciones víricas) o enfermedades inmunes en un paciente que lo necesite. En consecuencia, la presente invención proporciona linfocitos T modificados por ingeniería para su uso alogénico para el tratamiento de cánceres, infecciones o enfermedades inmunitarias en un paciente. Particularmente, la presente invención proporciona linfocitos T modificados por ingeniería para su uso alogénico en el tratamiento de un cáncer, tal como linfoma, o infección vírica. También se proporcionan composiciones, particularmente composiciones farmacéuticas, que comprenden al menos un linfocito T modificado por ingeniería de la presente invención para su uso alogénico para el tratamiento de cánceres, infecciones o enfermedades inmunitarias. En determinadas realizaciones, una composición puede comprender una población de linfocitos T modificados por ingeniería genética de la presente invención.



El tratamiento puede mejorar, ser curativo o profiláctico. Puede ser parte de un tratamiento de inmunoterapia alogénica. Por autólogo, se entiende que las células, la línea celular o la población de células utilizadas para tratar pacientes se originan a partir de dicho paciente o de un donante compatible con el Antígeno Leucocitario Humano (HLA). Por alogénico se entiende que las células o la población de células utilizadas para tratar pacientes no son originarias de dicho paciente sino de un donante.

La invención está prevista para inmunoterapia alogénica, en la medida en que permite la transformación de linfocitos T, normalmente obtenidas de donantes, en células no alorreactivas. Esto puede hacerse bajo protocolos estándar y reproducirse tantas veces como sea necesario. Los linfocitos T modificados resultantes pueden agruparse y administrarse a uno o varios pacientes, disponibles como producto terapéutico "disponible libremente".

Los tratamientos son principalmente tratar a pacientes diagnosticados con cáncer. Los cánceres son, preferentemente, leucemias y linfomas, que tienen tumores líquidos, pero también puede referirse a tumores sólidos. Los tipos de cánceres a tratar con los linfocitos T genéticamente modificados de la invención incluyen, pero sin limitación, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas leucemias o neoplasias linfoides, tumores benignos y malignos, y tumores malignos, por ejemplo, sarcomas, carcinomas y melanomas. También se incluyen tumores/cánceres de adultos y tumores/cánceres pediátricos.

El tratamiento puede llevarse a cabo en combinación con una o más terapias seleccionadas del grupo de terapia con anticuerpos, quimioterapia, terapia de citocinas, terapia de células dendríticas, terapia génica, terapia hormonal, terapia con luz láser y radioterapia.

De acuerdo con determinadas realizaciones, los linfocitos T de la invención pueden experimentar una fuerte expansión de linfocitos T *in vivo* tras la administración a un paciente y pueden persistir en los fluidos corporales durante un período prolongado de tiempo, preferentemente durante una semana, más preferentemente durante 2 semanas, incluso más preferentemente durante al menos un mes. Aunque se espera que los linfocitos T según la invención persistan durante estos períodos, su vida útil en el cuerpo del paciente no debe exceder un año, preferentemente 6 meses, más preferentemente 2 meses e incluso más preferentemente un mes.

La administración de las células o la población de células de acuerdo con la presente invención puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluso por inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intraganglionar, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa o intralinfática, o intraperitonealmente. En una realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran preferentemente mediante inyección intravenosa.

La administración de las células o la población de células puede consistir en la administración de 104-109 células por kg de peso corporal, preferentemente de 105 a 106 células/kg de peso corporal incluyendo todos los valores enteros de números de células dentro de esos intervalos. Las células o la población de células pueden administrarse en una o más dosis. En otra realización, dicha cantidad efectiva de células se administran como una dosis única. En otra realización, dicha cantidad efectiva de células se administra como más de una dosis durante un período de tiempo. El momento de la administración está a criterio del médico responsable y depende de la condición clínica del paciente. Las células o la población de células pueden obtenerse de cualquier fuente, como un banco de sangre o un donante. Si bien las necesidades individuales varían, la determinación de intervalos óptimos de cantidades efectivas de un tipo celular dado para una enfermedad o afecciones particulares dentro de la habilidad de la técnica. Una cantidad efectiva significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico. La dosis administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hubiera, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

En otras realizaciones, dicha cantidad efectiva de células o composición que comprende esas células se administra parenteralmente. Dicha administración puede ser una administración intravenosa. Dicha administración puede realizarse directamente mediante inyección dentro de un tumor.

En determinadas realizaciones, las células se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o siguiendo) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluidos, aunque sin limitaciones, el tratamiento con agentes como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, El tratamiento con citarabina (también conocido como ARA-C) o natalizimab para pacientes con EM o tratamiento con efaliztimab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. En realizaciones adicionales, los linfocitos T de la invención se usan en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tal como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micoplenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos medicamentos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 11; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Citr. Opin. mm n. 5:763-773, 93). En una realización adicional, las composiciones celulares de la presente invención se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) trasplante de médula ósea,

terapia ablativa de linfocitos T que utiliza 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 la terapia ablativa de linfocitos B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con dosis altas de quimioterapia seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas realizaciones, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de los linfocitos T genéticamente expandidas de la presente invención. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

También se abarcan dentro de este aspecto métodos para tratar a un paciente que lo necesita, que comprenden a) proporcionar al menos un linfocito T modificado por ingeniería de la presente invención, preferentemente una población de dicho linfocito T; y b) administrar dicho linfocito T o población a dicho paciente.

También se abarcan dentro de este aspecto métodos para preparar un medicamento usando al menos un linfocito T modificado por ingeniería de la presente invención y, preferentemente, una población de dicho linfocito T. En consecuencia, la presente divulgación proporciona el uso de al menos un linfocito T modificado por ingeniería de la presente invención y, preferentemente, una población de dicho linfocito T, en la fabricación de un medicamento. Dicho medicamento es para su uso alogénico en el tratamiento de un cáncer, tal como linfoma, o infección vírica.

## Otras definiciones

- Los restos de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos se designan en el presente documento de acuerdo con el código de una letra, en los que, por ejemplo, Q significa Gln o resto de glutamina, R significa Arg o resto de arginina y D significa Asp o resto de ácido aspártico.

- Sustitución de aminoácido significa el reemplazo de un resto de aminoácido por otro, por ejemplo, el reemplazo de un resto de arginina con un resto de glutamina en una secuencia peptídica es una sustitución de aminoácidos.

- Los nucleótidos se designan del siguiente modo: se usa un código de una letra para designar la base de un nucleósido: a es adenina, t es timina, c es citosina y g es guanina. Para los nucleótidos degenerados, r representa g o a (nucleótidos púricos), k representa g o t, s representa g o c, w representa a o t, m representa a o c, y representa t o c (nucleótidos pirimidínicos), d representa g, a o t, v representa g, a o c, b representa g, t o c, h representa a, t o c, y n representa g, a, t o c.

- "Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o "polinucleótidos" se refiere a nucleótidos y/o polinucleótidos, tal como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquiera de ligadura, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos de origen natural (tales como ADN y ARN) o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas enantioméricas de nucleótidos de origen natural) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de bases pirimidínicas o púricas. Las modificaciones de azúcar incluyen, por ejemplo, reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, todo el resto de azúcar puede ser reemplazado por estructuras similares estérica y electrónicamente, tales como azúcares aza y análogos de azúcar carbocíclico. Los ejemplos de modificaciones en un resto base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden estar unidos mediante enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

- por "polinucleótido que comprende sucesivamente una primera región de homología con secuencias corriente arriba de dicha rotura de la doble cadena, una secuencia que se insertará en el genoma de dicha célula y una segunda región de homología con secuencias corriente abajo de dicha rotura de la doble cadena" se pretende que signifique una construcción de ADN o una matriz que comprende una primera y segunda porción que son homólogas a las regiones 5' y 3' de un objetivo de ADN *in situ*. La construcción de ADN también comprende una tercera porción posicionada entre la primera y la segunda porción que comprende alguna homología con la secuencia de ADN correspondiente *in situ* o, como alternativa, no comprende homología con las regiones 5' y 3' del ADN objetivo *in situ*. Tras la escisión del ADN objetivo, se estimula un evento de recombinación homóloga entre el genoma que contiene el gen objetivo comprendido en el locus de interés y esta matriz, en el que la secuencia genómica que contiene la diana de ADN se reemplaza por la tercera porción de la matriz y una parte variable de la primera y segunda porciones de dicha matriz.

- por "ADN objetivo", "secuencia objetivo de ADN", "secuencia objetivo de ADN", "secuencia objetivo de ácido nucleico", "secuencia objetivo" o "sitio de procesamiento" se entiende una secuencia de polinucleótidos a la que una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente puede dirigirse y procesar según la presente invención. Estos términos se refieren a una localización de ADN específica, preferentemente una localización genómica en una célula, pero también una porción de material genético que puede existir independientemente del cuerpo principal

de material genético, tal como plásmidos, episomas, virus, transposones o en orgánulos tales como las mitocondrias, como ejemplo no limitante. Ejemplos no limitantes de secuencias objetivo guiadas por ARN, son las secuencias del genoma que pueden hibridar con el ARN guía que dirige la endonucleasa guiada por ARN a un locus deseado.

- 5
- Por "vector de liberación" o "vectores de liberación" se entiende cualquier vector de liberación que se puede usar en la presente invención para poner en contacto celular (es decir, "contactar") o liberar dentro de células o compartimentos subcelulares (es decir, "introducir") agentes/sustancias químicas y moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) necesarios en la presente invención. Incluye, pero no se limita a vectores de liberación liposomales, vectores de liberación víricos, vectores de liberación de fármacos, vehículos químicos, vehículos poliméricos, lipoplexos, poliplexos, dendrímeros, microburbujas (medios de contraste de ultrasonidos), nanopartículas, emulsiones u otros vectores de transferencia apropiados. Estos vectores de liberación permiten la liberación de moléculas, sustancias químicas, macromoléculas (genes, proteínas) u otros vectores, tales como plásmidos, o péptidos penetrantes. En estos últimos casos, los vectores de liberación son vehículos de moléculas.
- 10
- Los términos "vector" o "vectores" se refieren a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un "vector" en la presente invención incluye, aunque no de forma limitativa, un vector vírico, un plásmido, un vector de ARN o una molécula de ARN o ADN lineal o circular que puede consistir en ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómicos, semisintéticos o sintéticos. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma (vector episomal) y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos (vectores de expresión). Los expertos en la materia conocen un gran número de vectores adecuados y están disponibles comercialmente.
- 15
- 20

Los vectores virales incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa, tal como ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y virus de la estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai), virus de ARN de cadena positiva, tales como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN de doble cadena, incluyendo adenovirus, virus del herpes (por ejemplo, virus del herpes simple tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (por ejemplo, vaccinia, viruela aviar y viruela del canario). Otros virus incluyen el virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis, por ejemplo. Los ejemplos de retrovirus incluyen: leucosis-sarcoma aviar, tipo C de mamífero, virus de tipo B, virus de tipo D, grupo HTLV-BLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, En Fundamental Virology, Tercera edición, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1996)).

- 25
- Por "vector lentiviral" se entiende vectores lentivirales basados en el VIH que son muy prometedores para la liberación de genes debido a su capacidad de empaquetamiento relativamente grande, inmunogenicidad reducida y su capacidad para transducir de manera estable con alta eficiencia una amplia gama de diferentes tipos de células. Los vectores lentivirales generalmente se generan después de la transfección transitoria de tres (empaquetamiento, envoltura y transferencia) o más plásmidos en las células productoras. Como el VIH, los vectores lentivirales entran en la célula objetivo a través de la interacción de las glucoproteínas de la superficie viral con los receptores en la superficie celular. Al entrar, el ARN del virus sufre transcripción inversa, que está mediada por el complejo de transcriptasa inversa del virus. El producto de la transcripción inversa es un ADN vírico lineal bicatenario, que es el sustrato para la integración viral en el ADN de las células infectadas. Por "vectores lentivirales integrativos (o VL)", se entiende vectores tales como ejemplo no limitante, que son capaces de integrarse en el genoma de una célula objetivo. Por el contrario, por "vectores lentivirales no integrativos (o NILV)" se entiende vectores de liberación de genes eficientes que no se integran el genoma de una célula objetivo a través de la acción de la integrasa del virus.
- 30
- Los vectores y vectores de liberación pueden asociarse o combinarse con cualquier técnica de permeabilización celular, tales como sonoporación o electroporación o derivados de estas técnicas.
- 35
- Por "célula" o "células" se entiende cualquier célula viva eucariota, células primarias y líneas celulares derivadas de estos organismos para cultivos *in vitro*.
- 40
- Por "célula primaria" o "células primarias" se entiende células tomadas directamente de tejido vivo (es decir, material de biopsia) y establecidas para el crecimiento *in vitro*, que han sufrido muy pocas duplicaciones de población y, por lo tanto, son más representativos de los principales componentes funcionales y características de los tejidos de los que derivan, en comparación con líneas celulares tumorigénicas continuas o inmortalizadas artificialmente.
- 45

Como ejemplos no limitantes, las líneas celulares pueden seleccionarse del grupo que consiste en células CHO-K1; células HEK293; células Caco2; células U2-OS; células NIH 3T3; células NSO; células SP2; células CHO-S; células DG44; células K-562, células U-937; células MRC5; células IMR90; células Jurkat; células HepG2; células HeLa; células HT-1080; células HCT-116; células Hu-h7; células Huvec; células Molt 4.

Todas estas líneas celulares pueden modificarse mediante el método de la presente divulgación para proporcionar

modelos de líneas celulares para producir, expresar, cuantificar, detectar, estudiar un gen o una proteína de interés; estos modelos también se pueden utilizar para detectar moléculas biológicamente activas de interés en investigación y producción, y en varios campos como el químico, biocombustibles, terapéutica y agronomía como ejemplos no limitantes.

- por "mutación" se entiende la sustitución, delección, inserción de hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta o más nucleótidos/aminoácidos en un polinucleótido (ADNc, gen) o una secuencia de polipéptidos. La mutación puede afectar a la secuencia de codificación de un gen o a su secuencia reguladora. También puede afectar a la estructura de la secuencia genómica o a la estructura/estabilidad del ARNm codificado.
- por "variante (s)", se entiende una variante repetida, una variante, una variante de unión al ADN, una variante de una nucleasa TALE, una variante de polipéptido obtenida por mutación o reemplazo de al menos un resto en la secuencia de aminoácidos de la molécula original.
- por "variante funcional" se entiende un mutante catalíticamente activo de una proteína o un dominio de proteína; dicho mutante puede tener la misma actividad en comparación con su proteína madre o dominio de proteína o propiedades adicionales, o actividad más alta o más baja.
- Por "gen" se entiende la unidad básica de la herencia, que consiste en un segmento de ADN dispuesto de manera lineal a lo largo de un cromosoma, que codifica una proteína específica o segmento de proteína. Un gen normalmente incluye un promotor, una región no traducida en 5', una o más secuencias de codificación (exones), opcionalmente intrones, una región no traducida en 3'. El gen puede comprender además un terminador, potenciadores y/o silenciadores.
- Como se usa en este documento, el término "locus" es la ubicación física específica de una secuencia de ADN (por ejemplo, de un gen) en un cromosoma. El término "locus" puede referirse a la ubicación física específica de una secuencia diana de endonucleasa de sitio de corte poco frecuente en un cromosoma. Tal locus puede comprender una secuencia diana que es reconocida y/o escindida por una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente según la invención. Se entiende que el lugar de interés de la presente invención no solo puede calificar una secuencia de ácido nucleico que existe en el cuerpo principal del material genético (es decir, en un cromosoma) de una célula, sino también una porción de material genético que puede existir independientemente para dicho cuerpo principal de material genético como los plásmidos, episomas, virus, transposones o en orgánulos como las mitocondrias como ejemplos no limitantes.
- El término "escisión" se refiere a la rotura del esqueleto covalente de un polinucleótido. La escisión puede iniciarse mediante varios métodos que incluyen, aunque no de forma limitativa, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Es posible la escisión de cadena sencilla y la escisión de cadena doble y la división de cadena doble puede producirse como resultado de dos eventos de escisión de cadena sencilla. La escisión de doble cadena de ADN, ARN o ADN/ARN híbrido puede dar como resultado la producción de extremos romos o extremos escalonados.
- Por "proteína de fusión" se entiende el resultado de un proceso bien conocido en la técnica que consiste en la unión de dos o más genes que originalmente codifican proteínas separadas o parte de ellas, la traducción de dicho "gen de fusión" da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales.
- "Identidad", se refiere a la identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico o polipéptidos. La identidad se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear a efectos de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Un grado de similitud o identidad entre las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos es una función del número de nucleótidos o aminoácidos idénticos o coincidentes en las posiciones compartidas por las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, respectivamente. Se pueden usar varios algoritmos y/o programas de alineación para calcular la identidad entre dos secuencias, incluidos FASTA o BLAST, que están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencia GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y se pueden usar con, por ejemplo, configuración predeterminada. Por ejemplo, se contemplan los polipéptidos que tienen al menos un 70 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad con polipéptidos específicos descritos en el presente documento y que exhiben preferentemente las mismas funciones, así como el polinucleótido que codifica dichos polipéptidos.
- "inhibir" o "inhibición" la expresión de CIITA significa que la expresión de CIITA en la célula se reduce al menos en un 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 %. Más particularmente, "inhibir" o "inhibición" de la expresión de CIITA significa que la cantidad de CIITA en la célula se reduce al menos en un 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el

30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 %. La expresión o cantidad de proteína en una célula se puede determinar por cualquier medio adecuado conocido en la técnica, tales como ELISA, inmunohistoquímica, transferencia Western o citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos de ClITA. Dichos anticuerpos están disponibles comercialmente de varias fuentes, tal como de Abcam pic, Cambridge, UK; o Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU.

- "dominio de transducción de señales" o "ligando coestimulador" se refiere a una molécula en una célula presentadora de antígeno que se une específicamente a una molécula coestimuladora relacionada 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, aunque no de forma limitativa, activación de proliferación, la diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitaciones, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulante inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, 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 coestimulante también abarca, entre otras cosas, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimulante presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitaciones, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83.
- Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de este modo en una respuesta coestimulante por la célula, tal como, pero sin limitación, proliferación. Las moléculas coestimulantes incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y receptor de ligando Toll.
- Una "señal coestimuladora" como se usa en el presente documento se refiere a una señal, que, en combinación con la señal primaria, tal como la ligadura TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o regulación por aumento o disminución de las moléculas clave.
- "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene sitios de unión para dos antígenos diferentes dentro de una sola molécula de anticuerpo. Los expertos en la materia apreciarán que otras moléculas además de la estructura del anticuerpo canónico pueden construirse con dos especificidades de unión. Se apreciará además que la unión al antígeno por anticuerpos biespecíficos puede ser simultánea o secuencial. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante técnicas químicas (véase, por ejemplo, Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5807), por técnicas de "polidoma" (véase la patente de Estados Unidos n.º 4.474.893) o mediante técnicas de ADN recombinante, que todos son conocidos *per se*. Como ejemplo no limitante, cada dominio de unión comprende al menos una región variable de una cadena pesada de anticuerpo ("región VH o H"), en el que la región VH del primer dominio de unión se une específicamente al marcador de linfocitos tal como CD3, y la región VH del segundo dominio de unión se une específicamente al antígeno tumoral.
- La expresión "dominio de unión a ligando extracelular" como se usa en el presente documento se define como un oligo o polipéptido que es capaz de unirse con un ligando. Preferentemente, el dominio será capaz de interactuar con una molécula de superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando extracelular puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana con una patología particular. Así, los ejemplos de marcadores de la superficie celular que pueden actuar como ligandos incluyen aquellos asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.
- El término "sujeto" o "paciente" como se usa en el presente documento incluye a todos los miembros del reino animal, incluidos los primates no humanos y los humanos.
- La descripción escrita anterior de la invención proporciona una manera y proceso de hacerla y usarla de tal manera que cualquier persona experta en esta técnica esté habilitada para hacerla y usarla, estando esta habilitación proporcionada en particular para el objeto de las reivindicaciones adjuntas, que forman parte de la descripción original.

Cuando se indique un límite numérico o un intervalo en este documento, los puntos extremos se incluyen. Además, todos los valores y subintervalos dentro de un límite o intervalo numérico se incluyen específicamente como si se hubieran escrito explícitamente.

Habiendo descrito generalmente la presente invención, se puede obtener una mayor comprensión haciendo referencia a ciertos ejemplos específicos, que se proporcionan en el presente documento solo con fines ilustrativos y no se pretende que sean limitantes, a menos que se especifique lo contrario.

## Ejemplos

Nucleasas TALE que escinden la CIITA humana

El ARNm que codifica las nucleasas TALE dirigidas a los exones del gen CIITA humano se solicitó a Collectis Bioresearch (8, rue de la Croix Jarry, 75013 PARÍS). La Tabla 3 a continuación indica las secuencias objetivo divididas por cada una de las dos entidades independientes (llamadas seminucleasas TALE), cada una de las cuales contiene una secuencia repetida diseñada para unirse y dividirse entre secuencias objetivo que consisten en dos secuencias largas de 17 pb (llamadas semiobjetivos) separadas por un espaciador de 15 pb. Debido a que los exones 2 y 3 son compartidos por todas las variantes de transcritos de CIITA, se diseñaron dos pares TALEN para el Exón 2 y 3. No se ha predicho ningún objetivo obvio fuera del sitio en el genoma humano usando TALE-Nucleasas que se dirigen a estas secuencias.

**Tabla 3:** Descripción de las nucleasas TALE CIITA y secuencias objetivo relacionadas

Nombre del objetivo	Secuencia objetivo
TALEN 1_Exón 2_CMH-II-TA	TTCCCTCCCAGGCAGCTC acagtgtgccacca TGGAGTTGGGGCCCCTA (SEQ ID NO: 55)
TALEN 2_Exón 2_CMH-II-TA	TGCCTCTACCACTTCTA Tgaccagatggacct GGCTGGAGAAGAAGAGA (SEQ ID NO: 56)
TALEN 1_Exón3_CMH-II-TA	5'TCTTCATCCAAGGGACT Ttctctccagaacc CGACACAGACACCATCA (SEQ ID NO: 57)
TALEN 2_Exón3_CMH-II-TA	TGTTGTGTGACATGGAA Ggtgatgaagagacc AGGGAGGCTTATGCCAA (SEQ ID NO: 58)

Nucleasas TALE que escinden la  $\beta 2m$  humana

El ARNm que codifica las nucleasas TALE dirigidas a los exones del gen de  $\beta 2m$  humana se solicitó a Collectis Bioresearch (8, rue de la Croix Jarry, 75013 PARÍS). La Tabla 4 a continuación indica las secuencias objetivo escindidas por cada una de las dos entidades independientes (llamadas seminucleasas TALE), cada una de las cuales contiene una secuencia de repetición modificada por ingeniería para unirse y escindirse entre secuencias objetivo que consisten en dos secuencias largas de 17 pb (llamadas semiobjetivos) separadas por un espaciador de 15 pb.

**Tabla 4:** Descripción de las nucleasas TALE de  $\beta 2m$  y secuencias objetivo relacionadas

Nombre del objetivo	Secuencia objetivo	Secuencia de la seminucleasa TALE
B2M_T03	5' – CCAAAGATTCAGGTTT actcacgtcatccagc (spacer) AGAGAATGGAAAGTC-3' (SEQ ID NO: 59)	Repetición B2M-T03-L (pCLS24605) SEQ ID NO:67
		B2M_T03-R: pCLS24606 SEQ ID NO: 68

Nucleasas TALE que escinden genes de TCR humanos (TRAC y TRBC)

El genoma humano contiene dos cadenas beta de receptor de linfocitos T funcionales (TRBC1 y TRBC2). Durante el desarrollo de linfocitos T alfa/beta, se selecciona una de estas dos cadenas constantes en cada célula para unirla a la región variable de TCR-beta y formar una cadena beta funcional de longitud completa. La Tabla 5 a continuación presenta una secuencia objetivo TRAC y 2 TRBC y sus secuencias TALEN correspondientes. Los 2 objetivos de TRBC se eligieron en secuencias conservadas entre TRBC1 y TRBC2 de modo que la nucleasa TALE correspondiente escindiría tanto TRBC1 como TRBC2 al mismo tiempo.

**Tabla 5** Descripción de las nucleasas TALE TRAC y TRBC y secuencias de los sitios objetivo de las nucleasas

TALE en los genes humanos correspondientes.

Objetivo	Secuencia objetivo	Seminucleasa TALE
TRAC_T01	TTGTCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGA (SEQ ID NO: 60)	TRAC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 69)
		TRAC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 70)
TRBC_T01	TGTGTTTGAGCCATCAG aagcagagatctccc ACACCCAAAAGGCCACA (SEQ ID NO: 61)	TRBC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 71)
		TRBC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 72)
TRBC_T02	TTCCACCCGAGGTCGC tgtgtttgagccatca GAAGCAGAGATCTCCCA (SEQ ID NO: 62)	TRBC_T02-L TALEN (SEQ ID NO: 73)
		TRBC_T02-R TALEN (SEQ ID NO: 74)

Se han diseñado otras secuencias objetivo en los genes TRAC y CD52, que se muestran en la Tabla 6.

5

**Tabla 6:** Secuencias objetivo adicionales para las nucleasas TALE TRAC.

Objetivo	Secuencia objetivo
TRAC_T02	TTAGAAAGTTCCTGTG atgtcaagctggtcg AGAAAAGCTTTGAAACA (SEQ ID NO: 63)
TRAC_T03	TCCAGTGACAAGTCTGT ctgcctattcaccga TTTTGATTCTCAAACAA (SEQ ID NO: 64)
TRAC_T04	TATATCACAGACAAAAC tgtgctagacatgag GTCTATGGACTTCAAGA (SEQ ID NO: 65)
TRAC_T05	TGAGGTCTATGGACTTC aagagcaacagtgtgct GTGGCCTGGAGCAACAA (SEQ ID NO: 66)

#### Electroporación de ARNm de linfocitos T purificados activados utilizando la tecnología Cytopulse

Después de determinar el mejor programa de cytopulse que permita una electroporación de ADN eficiente de los linfocitos T, los inventores probaron si este método era aplicable a la electroporación de ARNm.

10

Se volvieron a suspender  $5 \times 10^6$  linfocitos T purificados preactivados durante 6 días con PHA/IL2 en tampón de citoparación T (aparato BTX-Harvard) y se electroporaron en cubetas de 0,4 cm con 10 µg de ARNm que codifica GFP o 20 µg de plásmidos que codifican GFP o pUC usando el programa de cytopulse preferido de la tabla 7.

15

Tabla 7: Programa de cytopulse usado para electroporar linfocitos T purificados.

Programa de Cytopulse	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
	Pulso	V	duración (ms)	Intervalo (ms)	Pulso	V	duración (ms)	Intervalo (ms)	Pulso	V	duración (ms)	Intervalo (ms)
3	1	1200	0,1	0,2	1	1200	0,1	100	4	130	0,2	2



48 horas después de la transfección, las células se tiñeron con colorante de viabilidad (eFluor-450) y se determinó la viabilidad celular y el % de células GFP+ viables mediante citometría de flujo.

La electroporación de ARN con la condición óptima determinada en el presente documento no fue tóxica y permitió la transfección de más del 95 % de las células viables.

En síntesis, todo el conjunto de datos muestra que los linfocitos T pueden transfectarse eficientemente con ADN o ARN. En particular, la transfección de ARN no tiene impacto en la viabilidad celular y permite niveles de expresión uniformes del gen transfectado de interés en la población celular.

La transfección eficiente se puede lograr temprano después de la activación celular, independientemente del método de activación utilizado (cuentas recubiertas con PHA/IL-2 o CD3/CD28). Los inventores han logrado transfectar células desde 72 horas después de la activación con eficiencias de > 95 %. Adicionalmente, la transfección eficiente de los linfocitos T después de la descongelación y activación también se puede obtener utilizando el mismo protocolo de electroporación.

#### Electroporación de ARNm en linfocitos T humanos primarios para la expresión funcional de la nucleasa TALE

Después de demostrar que la electroporación de ARNm permite la expresión eficiente de GFP en linfocitos T humanos primarios, los inventores probaron si este método era aplicable a la expresión de otras proteínas de interés. Las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (nucleasa TALE) son nucleasas específicas del sitio generadas por la fusión de un dominio de unión de ADN TAL a un dominio de escisión de ADN. Son poderosas herramientas de edición del genoma, ya que inducen roturas de doble cadena en prácticamente cualquier secuencia de ADN deseada. Estas roturas de doble cadena activan la unión de extremos no homólogos (NHEJ), un mecanismo de reparación de ADN propenso a errores, potencialmente llevando a la inactivación de cualquier gen de interés deseado. Como alternativa, si se introduce un molde de reparación adecuado en las células al mismo tiempo, las roturas de ADN inducidas por nucleasa TALE pueden repararse mediante recombinación homóloga, ofreciendo así la posibilidad de modificar a voluntad la secuencia del gen.

Se ha utilizado la electroporación de ARNm para expresar una nucleasa TALE modificada por ingeniería para escindir específicamente una secuencia en el gen humano que codifica la cadena alfa del receptor de antígeno de linfocitos T (TRAC). Se espera que las mutaciones inducidas en esta secuencia den como resultado la inactivación génica y la pérdida del complejo TCRαβ de la superficie celular. El ARN de nucleasa TALE TRAC o ARN no codificante como control se transfectan en linfocitos T humanos primarios activados utilizando la tecnología Cytopulse. La secuencia de electroporación consistió en 2 pulsos de 1200 V seguidos de cuatro pulsos de 130 V como se describe en la Tabla 7.

Por análisis de citometría de flujo de la expresión de superficie TCR 7 días después de la electroporación (Figura 4, panel superior), se observó que el 44 % de los linfocitos T perdieron la expresión de TCRαβ. Se analizó el ADN genómico de las células transfectadas mediante amplificación por PCR del locus TRAC seguido de 454 secuenciación de alto rendimiento. El 33 % de los alelos secuenciados (727 de 2153) contenían inserción o delección en el sitio de escisión de la nucleasa TALE.

Estos datos indican que la electroporación de ARNm usando tecnología de cytopulse da como resultado la expresión funcional de la nucleasa TALE TRAC.

#### Actividad de la nucleasa TALE-TRAC y la TRBC-TALE nucleasa en células HEK293

Cada construcción de nucleasa TALE se subclonó usando digestión con enzimas de restricción en un vector de expresión de mamífero bajo el control del promotor largo de pEF1alfa. Un día antes de la transfección se sembraron un millón de células HEK293. Las células se transfectaron con 2,5 µg de cada uno de los dos plásmidos que codifican las nucleasas TALE que reconocen los dos semiobjetivos en la secuencia genómica de interés en la región de cadena constante alfa del receptor de linfocitos T (TRAC) o la región de cadena constante beta del receptor de linfocitos T (TRBC) bajo el control del promotor EF1-alfa o 5 µg de un vector de control pUC (pCLS0003) usando 25 µl de lipofectamina (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La escisión de doble cadena generada por las nucleasas TALE en las secuencias de codificación TRAC se repara en células vivas mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ), que es un mecanismo propenso a errores. La actividad de las nucleasas TALE en células vivas se mide por la frecuencia de inserciones o delecciones en el locus genómico objetivo. 48 horas después de la transfección, Se aisló el ADN genómico de las células transfectadas y se realizaron PCR específicas de locus utilizando los siguientes cebadores: para TRAC: 5'-ATCACTGGCATCTGGACTCCA-3' (SEQ ID NO: 75), for TRBC1: 5'-AGAGCCCCTACCAGAACCAGAC-3' (SEQ ID NO: 76, o para TRBC2: 5'-GGACCTAGTAACATAATTGTGC-3' (SEQ ID NO: 77), and the reverse primer for TRAC: 5'-CCTCATGTCTAGCACAGTTT-3' (SEQ ID NO: 78), for TRBC1 and TRBC2: 5'-ACCAGCTCAGCTCCACGTGGT-3' (SEQ ID NO: 79). Los productos de PCR se secuenciaron mediante un sistema de secuenciación 454 (454 Life Sciences). Se obtuvieron aproximadamente 10.000 secuencias por producto de PCR y luego se analizaron para detectar la presencia de eventos de inserción o eliminación específicos del sitio; Los resultados se encuentran en la Tabla 8.

**Tabla 8:** Porcentajes de indeles para la nucleasa TALE dirigida a TRAC T01, TRBC T01 y TRBC T02 objetivos.

Objetivo	% Indeles con transfección de nucleasa TALE	% Indeles con transfección de control de pUC
TRAC T01	41,9	0,3
TRBC_T01 en la cadena constante 1	3,81	0
TRBC_T01 en la cadena constante 2	2,59	0
TRBC_T02 en la cadena constante 1	14,7	0
TRBC_T02 en la cadena constante 1	5,99	0

#### Actividad de $\beta$ 2m y TRAC-nucleasa TALE en linfocitos T primarios

- 5 Cada construcción de nucleasa TALE se subclonó usando digestión con enzimas de restricción en un vector de expresión de mamífero bajo el control del promotor T7.

ARNm que codifica la escisión de nucleasa de TALE  $\beta$ 2m, La secuencia genómica TRAC y TRBC se sintetizó a partir del plásmido que transportaba las secuencias de codificación aguas abajo del promotor T7. Los linfocitos T aislados de la sangre periférica se activaron durante 5 días usando microesferas activadoras anti-CD3/CD28 (tecnologías Life) y luego se transfectaron 5 millones de células mediante electroporación con 10  $\mu$ g de cada uno de los 2 ARNm que codifican la seminucleasa TALE (o sin codificación) ARN como controles) utilizando un instrumento CytoLVT-P. Como consecuencia de las inserciones y deleciones inducidas por NHEJ, la secuencia de codificación para  $\beta$ 2m y/o TRAC estará fuera de marco en una fracción de las células dando como resultado genes no funcionales. 5 días después de la electroporación, las células se marcaron con anticuerpo anti- $\beta$ 2m o anti-TCR conjugado con fluorocromo mediante citometría de flujo para detectar la presencia de  $\beta$ 2m o TCR en su superficie celular. Como todos los linfocitos T expandidos de la sangre periférica normalmente expresan  $\beta$ 2m y TCR, La proporción de células  $\beta$ 2m negativas o TCR negativas es una medida directa de la actividad nucleasa de TALE.

#### 20 Análisis funcional de linfocitos T con gen TRAC dirigido

El objetivo de la inactivación del gen TRAC es hacer que los linfocitos T no respondan a la estimulación del receptor de células T. Como se describe en el párrafo anterior, Los linfocitos T se transfectaron con ARNm que codifica TRAC de escisión de nucleasa de TALE. 16 días después de la transfección, las células fueron tratadas con hasta 5  $\mu$ g/ml de fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich), un mitógeno de linfocitos T que actúa a través del receptor de células T. Las células con un receptor funcional de linfocitos T deben aumentar de tamaño después del tratamiento con PHA. Después de tres días de incubación, Las células se marcaron con un anticuerpo anti-TCR conjugado con fluorocromo y se analizaron por citometría de flujo para comparar la distribución del tamaño celular entre las células TCR-positivas y TCR-negativas. La Figura 3 muestra que las células positivas para TCR aumentan significativamente de tamaño después del tratamiento con PHA, mientras que las células negativas para TCR tienen el mismo tamaño que las células no tratadas, lo que indica que la inactivación de TRAC las hizo insensibles a la señalización de TCR.

#### Análisis funcional de linfocitos T con gen $\beta$ 2m dirigido

35 De forma similar a lo anterior, Las células transfectadas con TALEN y las células de control (transfectadas sin ARN) se tiñeron con anticuerpo marcado con fluorocromo contra la proteína B2M, así como con un anticuerpo que reconoce las tres clases de moléculas MHC-I (HLA-A, -B o -C). La transfección con TALEN indujo la pérdida de la expresión superficial de las moléculas B2M y MHC-I en más del 37 % de las células T. (Véase Figura 5)

#### 40 Seguridad genómica de la $\beta$ 2m-nucleasa TALE y TRAC-nucleasa TALE en linfocitos T primarios

Como nuestras construcciones incluyen subunidades de nucleasa, Una pregunta importante es si la transfección múltiple de nucleasa de TALE puede conducir a la genotoxicidad y a la escisión fuera del objetivo en secuencias diana de "coincidencia estrecha" o al emparejar mal las seminucleasas TALE. Para estimar el impacto de TRAC-TALE-nucleasa y  $\beta$ 2m-TALE-nucleasa en la integridad de los genomas celulares, Enumeramos secuencias en el genoma humano que presentaban el potencial de escisión fuera del sitio. Para generar esta lista, identificamos todas las secuencias en el genoma con hasta 4 sustituciones en comparación con los semiobjetivos originales y luego identificamos los pares de semiobjetivos potenciales en una orientación cabeza a cabeza con un espaciador de 9 a 30 pb entre sí. Este análisis incluyó sitios potencialmente dirigidos por homodímeros de una molécula de seminucleasa TALE o heterodímeros formados por una seminucleasa TALE  $\beta$ 2m y una seminucleasa TALE TRAC. Los inventores puntuaron los objetivos potenciales fuera del sitio en función de los datos de especificidad teniendo en cuenta el costo de las sustituciones individuales y la posición de las sustituciones (donde los apareamientos erróneos se toleran mejor para las bases en el extremo 3' del semiobjetivo). Se obtuvieron 173 secuencias únicas con una puntuación que refleja una estimación de la probabilidad de escisión. Se seleccionaron las 15 puntuaciones más altas y se analizaron por

secuenciación profunda la frecuencia de mutaciones encontradas en estos loci en linfocitos T transfectados simultáneamente con  $\beta 2m$  y nucleasa TALE TRAC y se purificaron mediante separación magnética como negativos para  $\beta 2m$ , negativos para TCR $\alpha\beta$ . Los resultados mostraron que la frecuencia más alta de inserción/delección es  $7 \times 10^{-4}$ . Estos resultados hacen que el supuesto objetivo fuera del sitio sea al menos 600 veces menos propenso a ser mutado que los objetivos previstos. Los reactivos de nucleasa TALE utilizados en este estudio, por lo tanto, parecen extremadamente específicos.

#### Electroporación de linfocitos T con un ARNm monocistrónico que codifica un receptor de antígeno quimérico de cadena sencilla (CAR) anti-CD19:

Se resuspendieron  $5 \times 10^6$  linfocitos T varios días (3-5) con perlas recubiertas con anti-CD3/CD28 e IL2 en tampón T para citoporción y se realizó electroporación en cubetas de 0,4 cm sin ARNm o con 10  $\mu$ g de ARNm que codifica un CAR monocatenario (SEQ ID NO: 6) usando el programa descrito en la Tabla 7.

24 horas después de la electroporación, las células se tiñeron con un colorante de viabilidad reparable eFluor-780 y un fragmento de IgG F (ab')<sub>2</sub> de cabra anti-ratón conjugado con PE específico para evaluar la expresión en la superficie celular del CAR en las células vivas. Los datos se muestran en la figura 6. A indica que la gran mayoría de los linfocitos T vivos electroporados con el ARNm monocistrónico descrito anteriormente expresan el CAR en su superficie. 24 horas después de la electroporación, los linfocitos T se cultivaron conjuntamente con células Daudi (CD19+) durante 6 horas y se analizaron por citometría de flujo para detectar la expresión del marcador de desgranulación CD107a en su superficie (Betts, Brenchley et al., 2003).

Los datos mostrados en la figura 6 indican que la mayoría de las células electroporadas con el ARNm monocistrónico descrito anteriormente se desgranulan en presencia de células diana que expresan CD19. Estos resultados demuestran claramente que el CAR expresado en la superficie de los linfocitos T electroporados está activo.

En los ejemplos siguientes, para prolongar su supervivencia y mejorar su actividad terapéutica, los inventores describen un método para prevenir el rechazo mediado por células NK de los linfocitos T alogénicos terapéuticos mediante ingeniería de los linfocitos T alogénicos a través de la inactivación del gen de B2M usando TALEN específica, combinado con: i) la expresión de una molécula quimérica de cadena única compuesta por UL18 y  $\beta 2m$  B2M-UL18) o ii) la secreción de ligandos de NKG2D. La particularidad reside en aplicar a los linfocitos T primarios un mecanismo que ocurre normalmente en células tumorales o células infectadas por virus. Por tanto, el mecanismo de acción es potencialmente diferente: en células tumorales, la eliminación de ligandos de NKG2D conduce a su presencia disminuida en la superficie, mientras que en las células modificadas por ingeniería, la secreción del/los ligandos de NKG2D serviría como señuelo para varios otros ligandos de NKG2D que todavía podrían estar presentes en la superficie de los linfocitos T.

#### **Supresión del gen de B2M eficiente usando TALEN específica de B2M.**

Se ha producido una TALEN específica dirigida a una secuencia (T01, SEQ ID NO:81) dentro del primer exón codificante del gen de B2M (número de acceso de GenBank NC\_000015) (RVD de dominio de unión a ADN izquierda: NN-NN-HD-HD-NG-NG-NI-NN-HD-NG-NN-NG-NN-HD-NG-NG con SEQ ID NO: 82, y RVD del dominio de unión a ADN derecha: NI-NN-HD-HD-NG-HD-HD-NI-NN-NN-HD-HD-NI-NN-NI-NG con SEQ ID NO:83). La Tabla 9 a continuación informa las secuencias para la secuencia dirigida T01, así como para 2 objetivos adicionales T02 y T03 y sus correspondientes secuencias TALE izquierda y derecha.

**Tabla 9:** Descripción de secuencias adicionales de nucleasas TALE de  $\beta 2m$

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucleasa TALE
Objetivo T01 Beta2M	80	TCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCTA

(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucleasa TALE
T01 TALEN Beta2M IZQUIERDA	81	<p>ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATCGATA  TCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTCGTTCCGA  CAGTGGCGCAGCACACAGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCC  AACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGA  CACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCGCTTGCTCACGG  TGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTG  GCGCGGTGACCGCAGTGGAGGCGAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAACTTGA  CCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGG  CTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATG  GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC  CGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTG  TTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGC  GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCC  CAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT  GCGCGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGG  CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGA  GCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGC  CGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCA  AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGC  AGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG  GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAG  CAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAG  GTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT  GCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCA  GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGT  GGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGT  GTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGG  CGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGG  TGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGT  GCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGCGC  TGGAGAGCATGTTGCCAGTTATCTGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCTTGACCAACGACCACCTCGTC  GCCTTGGCTGCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGC  CGTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTG  CCCCAGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAG  GTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGAC  GGCGCATCTACCCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGACACCAAGGCTACTCCGGCG  GCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAAC  AAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTG  TGTCGGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCATCACCAACTGCAACGG  CGCGGTGTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGACCCCTGACCCTGGA  GGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA</p>

(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucleasa TALE
T01 TALEN Beta2M DERECHA	82	<p>ATGGGGGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAG  CACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATC  AAACCGAAGGTTCTGACAGTGGCGCAGCACACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCG  CACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCG  CAGCGTTGCCAGAGGCGACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTC  TGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTC  TCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCACTGCATGCGCGCAATGCACTGACG  GGTGGCCCGCTCAACTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCG  CTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTG  GCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCGCGTGCTGTGC  CAGGCCCAACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCT  GGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGG  CCATCGCCAGCCAGTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCGCGTGCTGTGCC  AGGCCCAACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTG  GAGACGGTCCAGCGGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCC  ATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCGCGTGCTGTGCCAG  GCCCAGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGA  GACGGTCCAGCGGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCAT  CGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGG  CCCAGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGA  CGGTCCAGCGGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCG  CCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGGCC  ACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACG  GTCCAGCGGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC  AGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGGCCA  CGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG  TGCAGGCGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCA  GCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGGCCACG  GCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTG  CAGGCGCTGTGCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGC  AATGGCGGCGGAGGCGGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCC  GCGTTGACCAACGACCACTCGTCGCTTGCCCTGCTCGGCGGCGCTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAA  AGGGATTGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGT  TGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCGGAACAGCACCC  AGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACC  TGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGT  GGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGT  GGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGAAGGTGTACCCCTCAGCGT  GACCGAGTTCAAGTTCTGTTCTGTGCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACAGGCTG  AACCACATCACCACCTGCAACGGCGCGTGTGCTGCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATC  AAGGCCGGCACCTGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGC  CGACTGATAA</p>
Objetivo T02 Beta2M	83	TCCAAAGATTCAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAAGTCAA

(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucléasa TALE
T02 TALEN Beta2M IZQUIERDA	84	ATGGGGGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATCGATA TCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCTGTCGA CAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACAGCGCACATCGTTGCGTTAAGCC AACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGA CACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGG TGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTG GCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCGATGTCATGTGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGA CCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGG CTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGAT GGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGAC CCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGC GTTGGCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTG TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGT GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCG GAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTT GCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGG CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGCA GCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGC
		CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAG CAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCA GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGC TGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCGCGG CGCTGGAGAGCATTGTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCTTGACCAACGACCACCT CGTCGCCTTGGCCTGCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAGGGATTGGGGGATCCTAT CAGCCGTTCCAGCTGCTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTA CGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGAT GAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGC CCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGACACCAAGGCCTACTC CGGCGGCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCA GGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGAAGGTGTACCCCTCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTT GTTCGTGTCGGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCACCTGC AACGGCGCGGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGCGCACCTGACC CTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucleasa TALE
T02 TALEN Beta2M DERECHA	85	<p>ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAG  CACATGGACAGCATCGATATCGCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATC  AAACCGAAGGTTTCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCAGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCG  CACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCG  CAGCGTTGCCAGAGGCGACACAGGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTC  TGGAGGCCCTTGCTCACGGTGGCGGAGAGTTGAGAGGTCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTC  TCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCACTGCATGCATGGCGCAATGCCTGACG  GGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCG  CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTG  GCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTCCGGTGCTGTGC  CAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCT  GGAGACGGTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGC  CATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCA  GGCCCCAGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGG  AGACGGTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCA  TCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAG  GCCCCAGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGA  GACGGTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCAT  CGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGG  CCCAGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGA  CGGTGCAGGCGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCG  CCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGGCC  CACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC  GGTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGC  CAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGGCC  ACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACG  GTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC  AGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGGCCCA  CGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG  TCCAGCGGCTGTTCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG  CAATGGCGGCGGCAAGGCCGCGCTGGAGACATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGC  CGCGTTGACCAACGACCACTCGTCGCTTGGCTGCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGAAA  AAGGGATTGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGA  GTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCACAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCAC  CCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCA  CCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATC  GTGGACACCAAGGCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAATGCAGAGGTAC  GTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAAGTGGTGGAAAGTGTACCCCTCAGC  GTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTCTGTCGGGCCACTTCAAGGGCACTACAAGGCCAGCTGACCAAGGC  TGAACCACATCACCACCTGCAACGGCGCGGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGA  TCAAGGCCGGCACCCCTGACCCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCG  GCCGACTGATAA</p>
Objetivo T03 Beta2M	86	TTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCTATCCA

(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucleasa TALE
T03 TALEN Beta2M IZQUIERDA	87	ATGGGGGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATCGATA TCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCTGTCGA CAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCC AACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGA CACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCCTTGCTCACGG TGGCGGGAGAGTTGAGAGGTTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTG GCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCACTGTCATGCTGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGA CCCCCGAGCAGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGCTGCAGGCG CTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTG TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGT GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCC CAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT GCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGG CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCA GCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGC CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAG CAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCA
		GCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCT GTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGG CGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGG TGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCCGGCGC TGGAGAGCATGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCTTGACCAACGACCACCTCGTC GCCTTGGCCTGCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGAGTGAAGGAGGATTGGGGGATCCTATCAGC CGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTG CCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAG GTGATGGAGTTCTCATGAAGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGAC GCGCCATCTACACGTGGGCTCCCCATCGACTACGCGGTGATCGTGACACCAAGGCCACTCCGGCG GCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAAC AAGCACATCAACCCACGAGTGGTGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTCG TGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAGTGAACCGG CGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCTGACCCTGGA GGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA



(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucleasa TALE
T03 TALEN Beta2M DERECHA	88	<p>ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAG  CACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATC  AAACCGAAGGTTCTGTCGACAGTGGCGCAGCACCAGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCG  CACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCG  CAGCGTTGCCAGAGGCGACACAGAAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTC  TGGAGGCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTC  TCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCACTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACG  GGTGCCCCGCTCAACTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCG  CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTG  GCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGC  CAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTG  GAGACGGTGAGGCGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCC  ATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGCCA  GGCCCCAGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGA  GACGGTGAGGCGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCAT  CGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGC  CCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGA  CGGTCCAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCG  CCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCC  ACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACG  GTCCAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC  AGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCCCA  CGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG  TCCAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCA  GCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCCAC  GGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT  CAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGC  AATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCCACGGC  TTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCA  GGCGCTGTTGCCGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAA  TGGCGGCGGAGGCGGCGCTGGAGAGCATTTGTTCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGC  GTTGACCAACGACCACTCGTCGCTTGCCCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAAGTGAAGAAAG  GGATTGGGGATCCTATCAGCGTTCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTG  AGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCAGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAG  GACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTG  GGCGGCTCCAGGAAGCCGACGGCGCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTG  GACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGACAGGTACGTG  GAGGAGAACAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAAGAGTGGTGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTG  ACCGAGTTCAAGTTCTGTTGCTGTCGGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGA  ACCACATCAACACTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCA  AGGCCGGCACCTGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCC  GACTGATAA</p>

Para probar la capacidad de esta TALEN específica de B2M para promover eventos de NHEJ propensos a errores en el locus de B2M, se electroporaron 2 o 10 µg de ARNm que codifica TALEN en linfocitos T primarios usando la tecnología Pulse Agile de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tres días después de la transfección, las células se recuperaron y se marcaron con un anticuerpo específico de β2-microglobulina acoplado al fluorocromo PhycoErythrin. A continuación, las células se analizan por citometría de flujo para determinar la viabilidad y la expresión de β2-m. Los resultados se muestran en la Figura 10. En el panel superior, casi el 100 % de los linfocitos T no transfectados expresan

$\beta$ 2-m (panel superior derecho). La transfección de linfocitos T con la TALEN específica de B2M reduce drásticamente la expresión de  $\beta$ 2-m, ya que el 38 % (centro derecha) y el 80 % de los linfocitos T (panel inferior derecho) se vuelven negativos para  $\beta$ 2-m cuando se transfectan con 2  $\mu$ g o 10  $\mu$ g de ARNm de TALEN respectivamente. Estos datos indican que la eliminación de B2M en los linfocitos T se puede lograr con alta eficacia.

5

#### **Producción y expresión de la molécula de cadena sencilla B2M-UL18 en linfocito T**

HCMV UL18 codifica una glucoproteína transmembrana de tipo I que comparte un alto nivel de identidad de secuencia AA con moléculas de MHC de clase I que se asocia con  $\beta$ 2-m y una péptidos endógenos. Dado que el objetivo de los inventores es expresar esta molécula en los linfocitos T en los que el gen B2M se ha anulado, la estrategia de los inventores es producir una molécula quimérica en la que  $\beta$ 2-m y UL18 se fusionen como un polipéptido de cadena única. La SEQ ID NO: 89 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica. Las partículas lentivirales que contienen el B2M-UL18 quimérico se transducen en linfocitos T. La expresión del transgén se controla mediante análisis FACS utilizando un anticuerpo frente a  $\beta$ 2-m. Los resultados de este experimento apuntan a mostrar que una proteína quimérica B2M-UL18 se expresa eficientemente en los linfocitos T.

10

15

#### **Producción y expresión de ligandos de NKG2D en linfocitos T**

Los ligandos naturales de NKG2D son proteínas transmembrana o ancladas a GPI. Para lograr la secreción de estas moléculas por los linfocitos T, los dominios extracelulares de los ligandos de NKG2D se han fusionado en su extremo N a una forma peptídica secretora. Las secuencias de aminoácidos de los ligandos quiméricos secretados de NKG2D se enumeran a continuación (SEQ ID NO: 90 a SEQ ID NO:97). Las partículas lentivirales que contienen los ligandos quiméricos de NKG2D se transducen en linfocitos T. La expresión del transgén en el sobrenadante del cultivo se controla mediante análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos. Los resultados de este experimento tienen como objetivo mostrar que las proteínas quiméricas del ligando de NKG2D se expresan eficientemente en los linfocitos T.

20

25

#### **Los linfocitos T CAR deficientes en $\beta$ 2-M no son reconocidos por los linfocitos T alogénicos.**

Las PBMC del donante A sano se cultivan conjuntamente con linfocitos T deficientes en  $\beta$ 2-m modificada por ingeniería irradiados o tratados con mitomicina del donante B. Como control, las PBMC del donante sano A se cultivan conjuntamente con linfocitos T positivos para  $\beta$ 2-m modificada por ingeniería irradiados o tratados con mitomicina del donante B. 7 días después, la proliferación celular del donante A se mide mediante un ensayo colorimétrico XTT o mediante dilución CFSE (análisis FACS). Aunque la proliferación celular se observa en el control, no se observa proliferación celular limitada o limitada cuando los linfocitos T modificados por ingeniería no expresan  $\beta$ 2-m. Los resultados de este experimento apuntan a mostrar que los linfocitos T alorreactivos no pueden reconocer y proliferar contra los linfocitos T deficientes en  $\beta$ 2-m.

30

35

#### **La inhibición eficiente de la lisis de linfocitos modificados por ingeniería mediada por NK**

Las células NK se purifican a partir de PBMC del donante sano A. Como objetivos, los linfocitos T modificados por ingeniería de donantes sanos B se producen y se enumeran a continuación. a) linfocitos T modificados por ingeniería (control negativo), b) linfocitos T modificados por ingeniería deficientes en  $\beta$ 2-m (control positivo), c) linfocitos T modificados por ingeniería deficientes en  $\beta$ 2-m que expresan B2M-UL18 (SEQ ID NO: 89), d-k) linfocitos T modificados por ingeniería deficientes en  $\beta$ 2-m que expresan, respectivamente, SP-MICAed (SEQ ID NO:90), SP-MICBed (SEC ID NO:91), SP-ULBP1ed (SEQ ID NO:92), SP-ULBP2ed (SEQ ID NO:93), SP-ULBP3ed (SEQ ID NO:94), SP-N2DL4ed (SEQ ID NO:95), SP-RET1Ged (SEQ ID NO:96), SP-RAET1Led (SEC ID NO:97). Estas secuencias se informan en la siguiente Tabla 10.

40

45

**Tabla 10:** Secuencia de polipéptidos de un homólogo vírica de MHC (UL18) y un panel de ligandos de NKGD2 que se expresarán de acuerdo con la presente invención.

	SEQ ID NO:	Secuencia polipeptídica
B2M-UL18 química	89	MALPVTALLLPALLLHAARPSRSVALAVLALLSLGLEAIQRTPKIQWSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHP5DIEVDLLK NGERIEKVEHSOLSF5KDW5FYLLYYTEFTPEKDEYACRVNHVTL5QPKIVKWDMDMG5GGGGGGGGGGGGGGG G5MTMWCLTLFVLWMLRVVGMHVLRYGTGIFDDTSHMTLTW5GIFDGQHFFTYHVNSSDKASSRANGTISWMA NV5AAYPTYLDGERAKGDLIFNQTEQNLELEIALGYRSQSVLTWTHECNTTENG5FVAGYEGF5GWDGETLMELKDNL TLWTGPNYEISWLKQNKTYDGIKINISEGDTTIQRN5LKGNCQW5VIVSGFQTPVTHPV5KGV5RNQNDNRAEAF CTS5GFFPGEINITFIHYGNKAPDD5EQCNPLLP5TFDGT5HQGCWAIFCNQNYTCRVTHGNW5TVEIPISVT5PDDSS5 GEVPDHP5TANKRYNTMTISSVLLALLCALLFAELHYFTLLKQ5LRLN5LAFAWRYRKVR55
SP-MICAed	90	MGGVLLTQRTLLSLVALLF5PSMASMEPH5SLRYNLT5L5WDG5VQ5GFLT5VHLDGQ5PLRC5DQ5KRAK5PQ5QWA EDVLGNK5TWDRETRDLTG5NGKDLRMTL5AHIKDQ5K5GLH5LQ5EIRVCEI5HEDN5STR5SQ5HFY5D5G5EL5F5L5QN5LET5KEWT MPQ5SRAQ5TLAMN5V5RN5FLKEDAMK5TK5TH5HAM5HAD5CLQ5ELR5RYL5K5GV5L5R5T5VPP5M5NV5TR5E5ASE5GN5IT5V5TCR AS5GF5PW5NIT5L5WRQ5D5GV5LS5HNT5QQ5W5GD5V5LP5D5G5NG5TYQ5TW5V5A5TR5I5R5Q5G5E5QR5TC5ME5H5GN5H5G5TH5PV5SG5VL LVLQ5SHW
SP-MICBed	91	MGGVLLTQRTLLSLVALLF5PSMASMAE5PH5SLRYNLMV5L5Q5DES5VQ5G5FLA5EG5HLDGQ5PLRY5DQ5K5RAK5PQ5QW AEDVLGAK5TWD5TETEDLTEN5GQ5DLR5RTL5HIK5DQ5GLH5LQ5EIRVCEI5HED5STR5SR5HFY5D5G5EL5F5L5QN5LET5QEST VPO5SRAQ5TLAMN5V5TN5FWKEDAMK5TK5TH5RAMQ5AD5CLQ5LQ5RYL5K5GV5AIR5TVPP5M5NV5TC5SE5V5EG5N5IT5V5TCR AS5FY5PR5NIT5L5TW5RQ5D5GV5LS5HNT5QQ5W5GD5V5LP5D5G5NG5TYQ5TW5V5A5TR5I5R5Q5G5E5QR5TC5ME5H5GN5H5G5TH5PV5SG5VL VLQ5SQR5TD
SP-ULBP1ed	92	MGGVLLTQRTLLSLVALLF5PSMASMGW5V5D5TH5CL5CYD5FI5TPK5R5PE5QW5CE5VQ5GL5V5DER5P5FL5HYD5CVN5HK5AK5AFAS LGKK5NV5TK5T5WEEQ5TET5LRD5V5D5FL5KG5QL5DI5Q5VEN5LI5PI5E5PL5T5Q5ARM5SCE5HEA5HG5H5GR5GS5W5Q5FL5NG5Q5K5FL5L5F5DSN NRK5WTAL5HPGAK5KM5TEK5WEK5NRD5VTM5FFQ5ISL5GD5CK5MW5LEE5FL5MY5WEQ5MLD5PT
SP-ULBP2ed	93	MGGVLLTQRTLLSLVALLF5PSMASMGRAD5PH5SLCYD5ITV5PK5FR5P5RW5CAV5QG5QV5DEK5T5FL5HYD5CG5NK5TV5PV5SPL GKK5LNV5TTAW5KAQ5NP5VL5REV5VD5IL5TEQ5LR5DI5Q5LEN5V5TP5KE5PL5T5Q5ARM5SCE5Q5KA5EG5H5SS5GS5W5Q5F5D5G5Q5IF5LL5PD5SEK RM5W5TTV5HPGAK5MK5KEK5W5END5KW5AM5SF5H5F5SM5G5D5C5IG5W5LED5FL5MG5MD5ST5LEPS5AG
SP-ULBP3ed	94	MGGVLLTQRTLLSLVALLF5PSMASMDA5H5L5W5YNFT5IHL5PR5HG5QQ5W5CE5VQ5SQ5D5Q5KN5FL5YD5CG5SD5KV5LSM5GH5LE EQ5LYAT5DAW5GK5Q5LEML5REV5GOR5L5RI5L5AD5TE5DFT5PS5GPL5TLQ5VR5MS5CE5AD5GY5R5GS5W5Q5F5D5GR5K5FL5L5F5DSNN RK5W5TV5HAGARR5MK5KEK5WEK5D5SGL5T5TFF5KM5SM5RD5CK5SW5LR5DF5LM5HR5KR5K5LEPT

(continuación)

	SEQ ID NO:	Secuencia polipeptídica
SP-N2DL4ed	95	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMHSLSLFCNFTIKSLSRPGQPWCEAQVFLNKNLFLQYNSDNNMVKPLGLLGKKVY ATSTWGELTQTLGEVGRDLRMILLCDIKPQIKTSDPSTLQVEMFCQREARCTGASWQFATNGEKSLFLDAMINMTWT VINHEASKIKETWKKDRGLEKYFRKLSKGDCHWLREFLGHWEAMPEPTVSPVNASDIHWSSSLPD
SP-RET1Ged	96	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMGLADPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGGQVDEKTELHYDCGSKTVPVSPL GKKLNVTTAWKAQNPVLREVVDILTQQLLDIQLENYIPKEPLTLQARMSCQKAEHGGSWQLSFDGQIFLLFDSEN RMWTTVHPGARKMIKEKVENDKDMTMSFHYISMGDCTGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPPTMSSGTAQPR
SP-RAETiLed	97	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMRRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGGQVDEKTELHYDCGNKTVTPVSPL GKKLNVTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENYTPKEPLTLQARMSCQKAEHSSGWSQFSIDGQTFLFDSEK RMWTTVHPGARKMIKEKVENDKDVAMSFHYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAG

La citotoxicidad mediada por células NK se determinó mediante un ensayo de marcado CFSE. Las células objetivo se marcaron con CFSE, se lavaron en PBS, se mezclaron las células NK a varias relaciones celulares E:T y se incubaron 4 horas a 37 °C. A continuación, las células se analizan mediante citometría de flujo y se midieron los porcentajes de linfocitos T modificados por ingeniería positivos para CFSE, indicativo de los linfocitos T modificados por ingeniería en presencia de células NK. Se pretende que aunque la lisis celular mediada por NK se observe en el control positivo (linfocitos T modificados por ingeniería deficientes en beta2-m), no se observa lisis celular mediada por NK o limitada cuando los linfocitos T modificados por ingeniería deficientes en beta2-m expresan B2M-UL18 (SEQ ID NO:89) o ligandos de NKG2D secretados (SP-MICAed (SEQ ID NO:90), SP-MICBed (SEQ ID NO:91), SP-ULBP1ed (SEQ ID NO:92), SP-ULBP2ed (SEQ ID NO: 93), SP-ULBP3ed (SEQ ID NO:94), SP-N2DL4ed (SEQ ID NO: 95), SP-RET1Ged (SEQ ID NO:96), SP-RAET1Led (SEC ID NO:97). Los resultados de este experimento tienen como objetivo mostrar que la actividad de citotoxicidad de las células NK alogénicas se ve afectada cuando las moléculas quiméricas, se expresan en linfocitos T modificados por ingeniería, actúan como señuelo para el receptor de señal inhibitoria (B2M-UL18) o para el receptor de señal estimuladora (ligandos de NKG2D).

#### 15 Lista de referencias citadas en la descripción

Ashwell, J. D. y R. D. Klusner (1990). "Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor". *Annu Rev Immunol* 8: 139-67.

Betts, M. R., J. M. Brenchley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation". *J Immunol Methods* 281(1-2): 65-78.

Bierer B.E. et al. (1993) "Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology". *Curr Opin Immunol* 5(5): 763-73.

Bix M. et al (1991). "Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice". *Nature* 349(6307):329-31.

Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors". *Science* 326 (5959): 1509-12.

Cambier, J. C. (1995). "Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)". *J Immunol* 155(7): 3281-5.

Carter L, et al. (2002). "PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2". *Eur. J. Immunol.* 32 (3): 634-43.

Cong, L., F. A. Ran, et al. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems". *Science* 339 (6121): 819-23.

Critchlow, S. E. y S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man". *Trends Biochem Sci* 23(10): 394-8.

Deltcheva, E., K. Chylinski, et al. (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III". *Nature* 471(7340): 602-7.

Figueiredo C. et al. (2007). « Regulating MHC expression for cellular therapeutics" *Transfusion* 47 17-27

Gasiunas, G. et al. (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria". *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39): E2579-86.

Haseloff y Gerlach (1988). "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities". *Nature* 334: 585-591.

Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor". *Blood* 116(7): 1035-44.

Jinek, M., K. Chylinski, et al. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity". *Science* 337 (6096): 816-21.

Liu L. et al. (1991). "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes". *Cell* 66(4): 807-15.

Ma, J. L., E. M. Kim, et al. (2003). "Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences". *Mol Cell Biol* 23(23): 8820-8.

Mach B., Steimle V, Reith W (1994). "MHC class II-deficient combined immunodeficiency: a disease of gene

regulation". Immunol. Rev. 138 (1): 207-21.

Mali, P., L. Yang, et al. (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9". Science 339 (6121): 823-6.

5 Moscou, M. J. y A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors". Science 326 (5959): 1501.

Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells". Trends Biotechnol 29(11): 550-7.

10 Riobobos L. et al. (2013) "HLA engineering of human pluripotent stem cells". Molecular Therapy 21(6) 1232-1241.

Stoddard, B. L. (2005). "Homing endonuclease structure and function". Q Rev Biophys 38(1): 49-95.

15 Torikai, H. et al. (2013) « Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors". Blood, 122 (8) 1341-1349

Urnov F.D. et al. (2010) "Genome editing with engineered zinc finger nucleases" Nature reviews Genetics 11:636-646

20

## REIVINDICACIONES

1. Un linfocito T modificado por ingeniería que expresa un Receptor de Antígeno Quimérico dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada, **caracterizado por que** i) la expresión de B2M está inhibida en dicha célula por una modificación genómica y ii) la expresión de al menos un gen que codifica un componente del receptor TCR está inactivada, para su uso alogénico para el tratamiento de cánceres, infecciones o enfermedades inmunitarias en un paciente.
2. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en combinación con agentes inmunosupresores o agentes inmunoablativos.
3. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que dichos agentes inmunosupresores o dichos agentes inmunoablativos son agentes quimioterapéuticos.
4. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dichos agentes inmunoablativos son fludarabina o ciclofosfamida.
5. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho uso sigue una terapia ablativa de linfocitos T usando cualquiera de agentes de quimioterapia, radioterapia de haz externo, ciclofosfamida o anticuerpos.
6. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que dicho componente del TCR que se está inactivando es TCR alfa.
7. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que dicho linfocito T expresa al menos un polipéptido inmunosupresor no endógeno.
8. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho polipéptido inmunosupresor se selecciona de un homólogo vírico de MHC y un ligando de NKG2D.
9. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho linfocito T tiene un fenotipo seleccionado de:
  - [b2m]-[TCR]-[CAR]+;
  - [b2m]-[TCR]-[PD1]-[CAR]+;
  - [b2m]-[TCR]-[PD1]-[PDL-1]-[CAR]+;
  - [b2m]-[TCR]-[homólogo vírico de MHC]+[CAR]+; o
  - [b2m]-[TCR]-[ligando de NKG2D]+[CAR]+.
10. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho linfocito T es un linfocito T citotóxico.
11. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho linfocito T es para el tratamiento de tumores sólidos.
12. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho linfocito T se administra de  $10^4$  a  $10^9$  células por kg de peso corporal, preferentemente de  $10^5$  a  $10^6$  células/kg de peso corporal
13. Un linfocito T modificado por ingeniería para su uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha modificación genómica se obtiene a través de la expresión en dicho linfocito T de una endonucleasa de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente mediante escisión de ADN el gen que codifica B2M.
14. Una composición farmacéutica que comprende una población de linfocitos T modificados por ingeniería que expresa un Receptor de Antígeno Quimérico dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada, **caracterizado por que** i) la expresión de B2M está inhibida en dicha célula por una modificación genómica y ii) la expresión de al menos un gen que codifica un componente del receptor TCR está inactivada, para su uso alogénico para el tratamiento de cánceres, infecciones o enfermedades inmunitarias en un paciente.

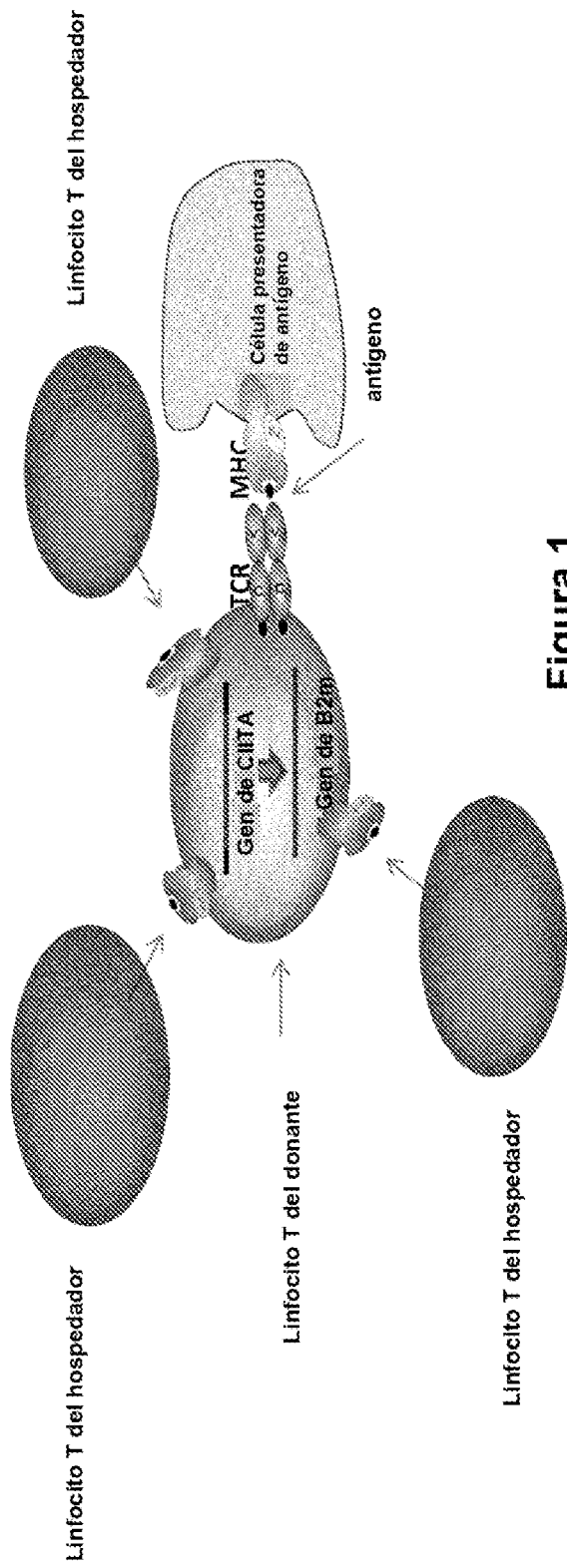


Figura 1

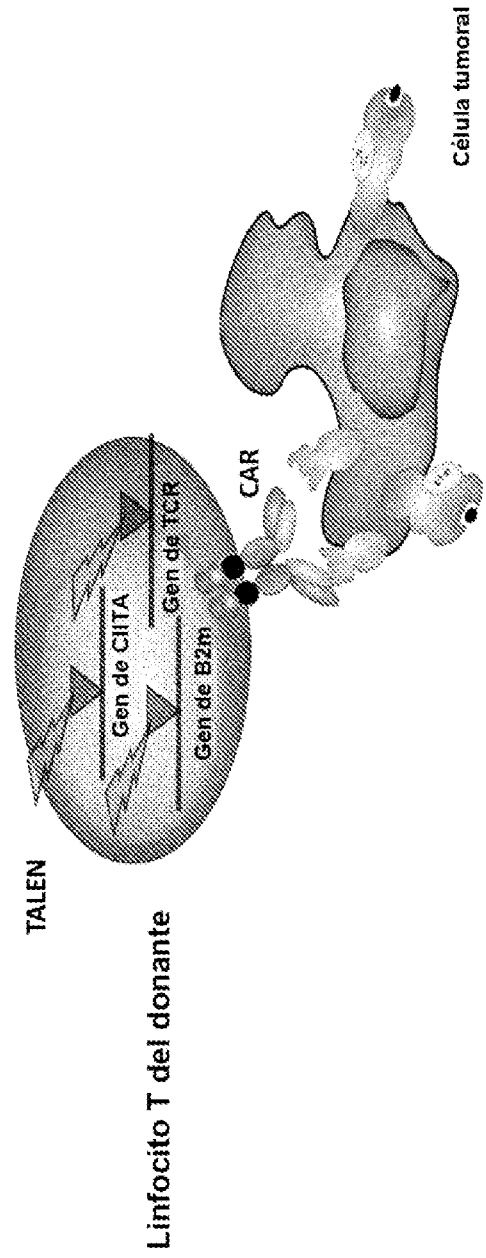


Figura 2



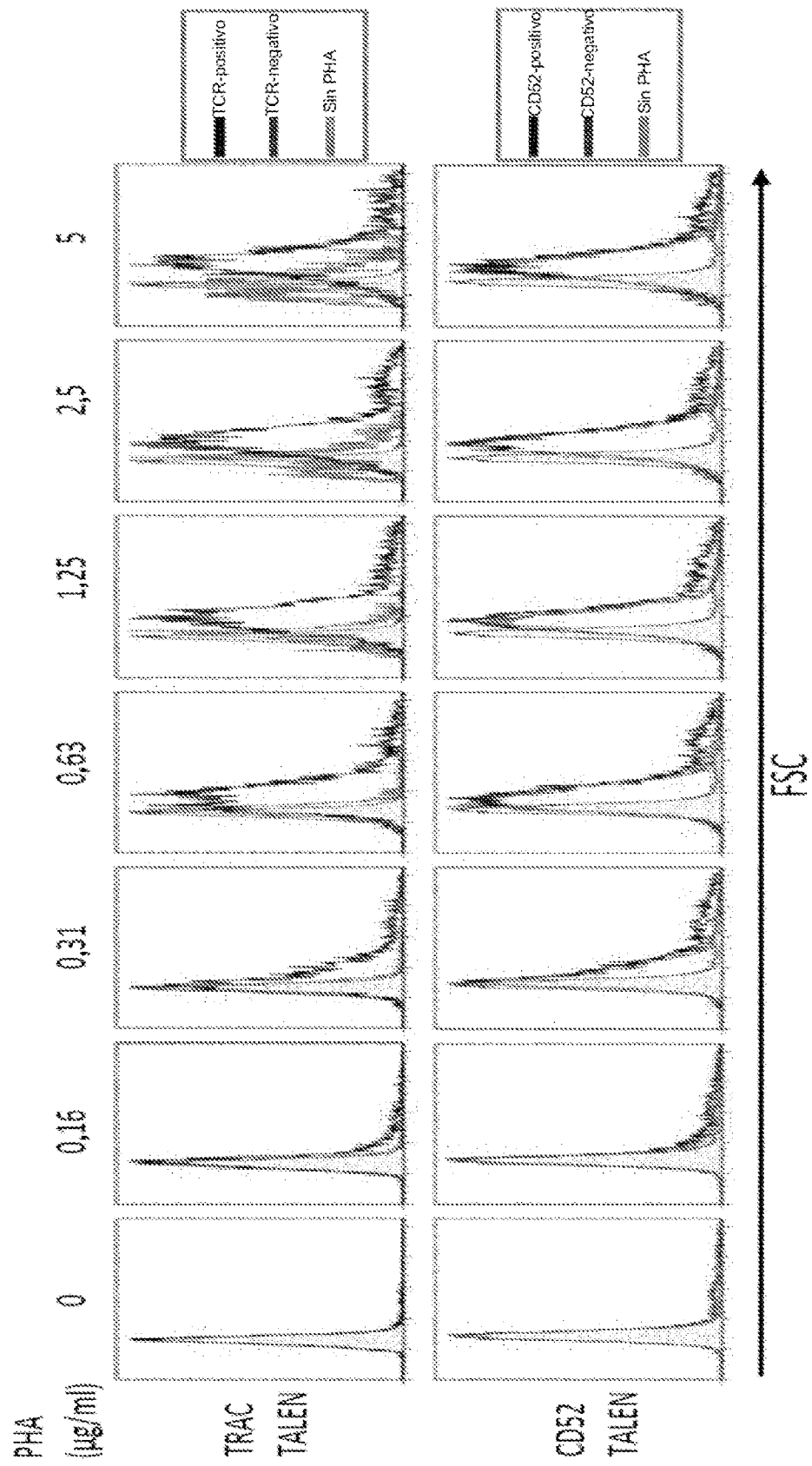


Figura 3

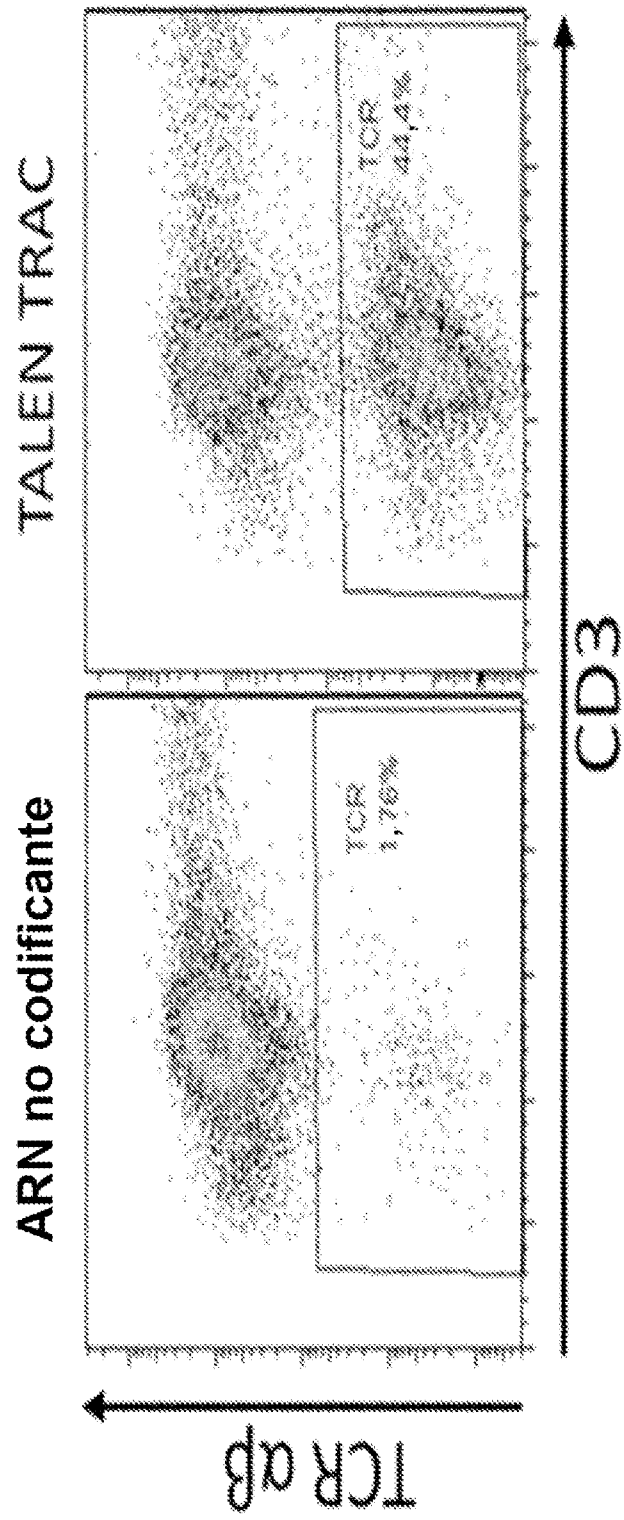


Figura 4

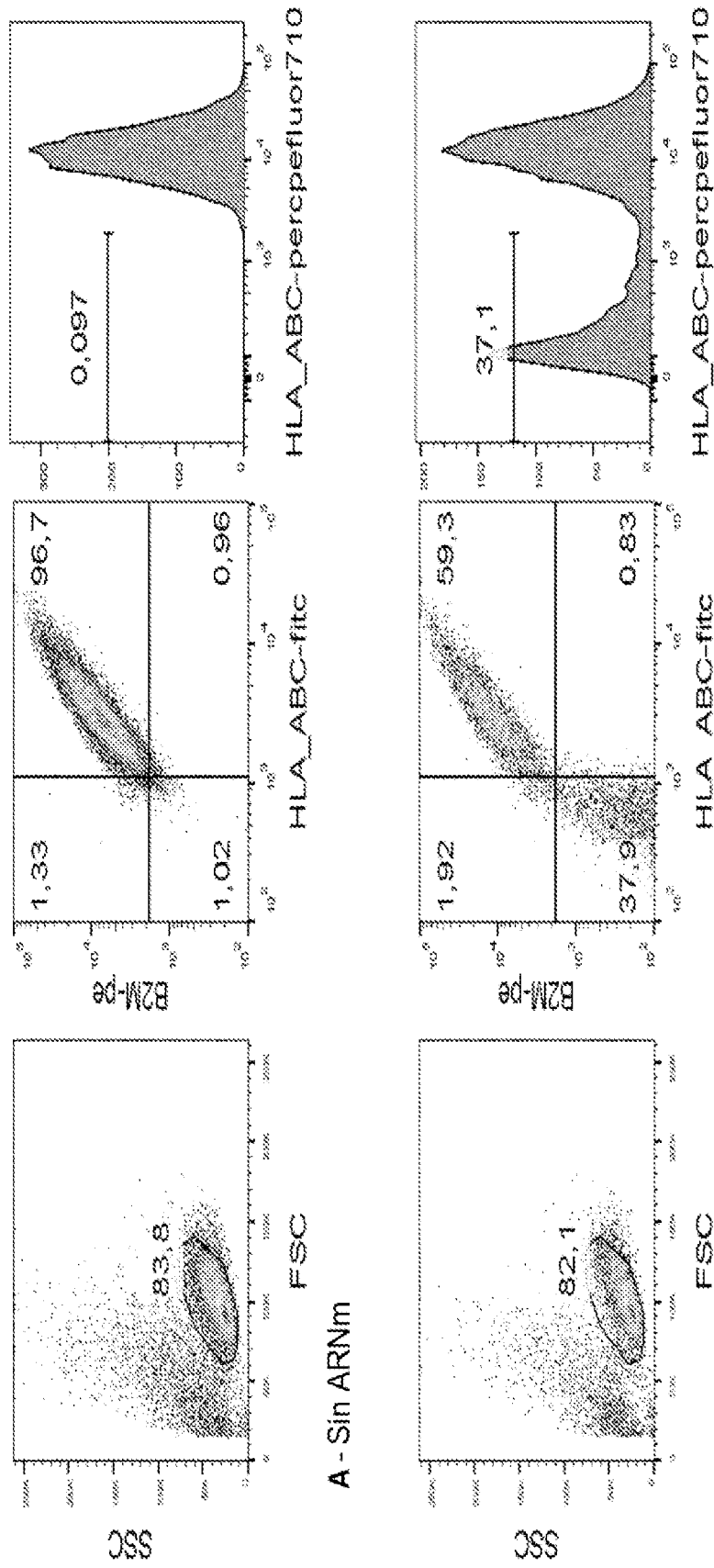


Figura 5

B - TALEN B2M\_T03

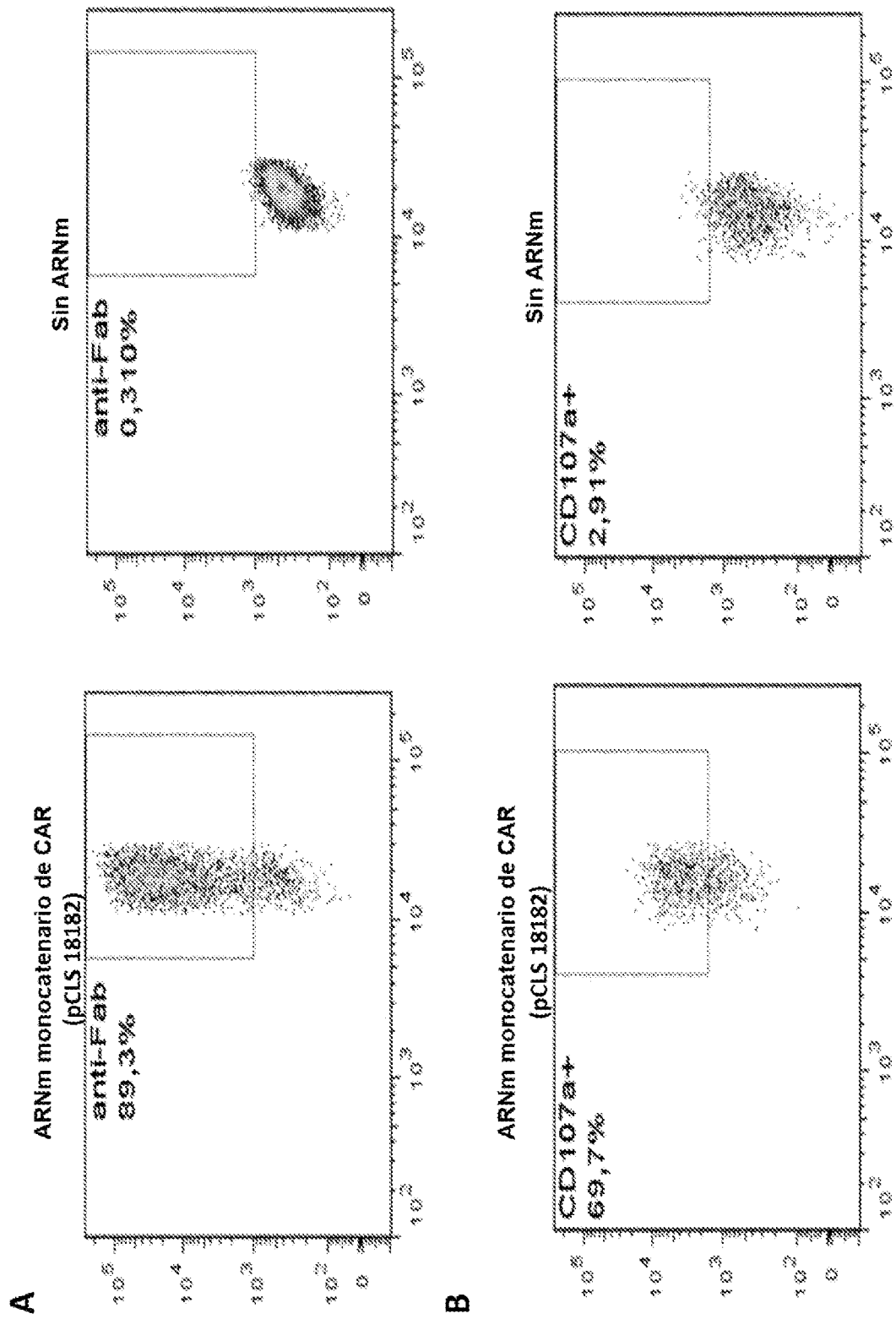


Figura 6

Linfocito T CAR sigiloso: el MHC I es inactivado por KO en el gen de beta2m

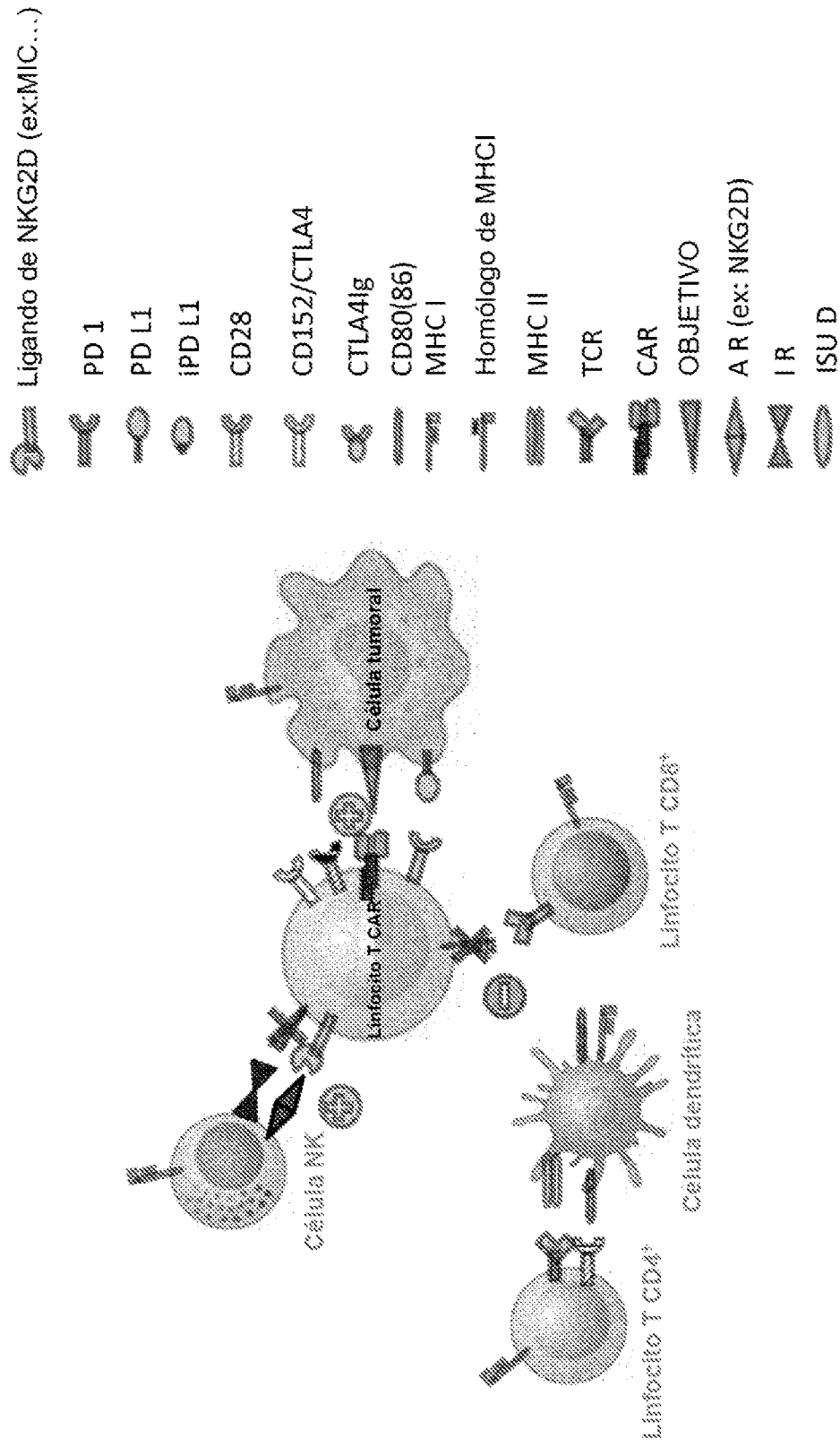
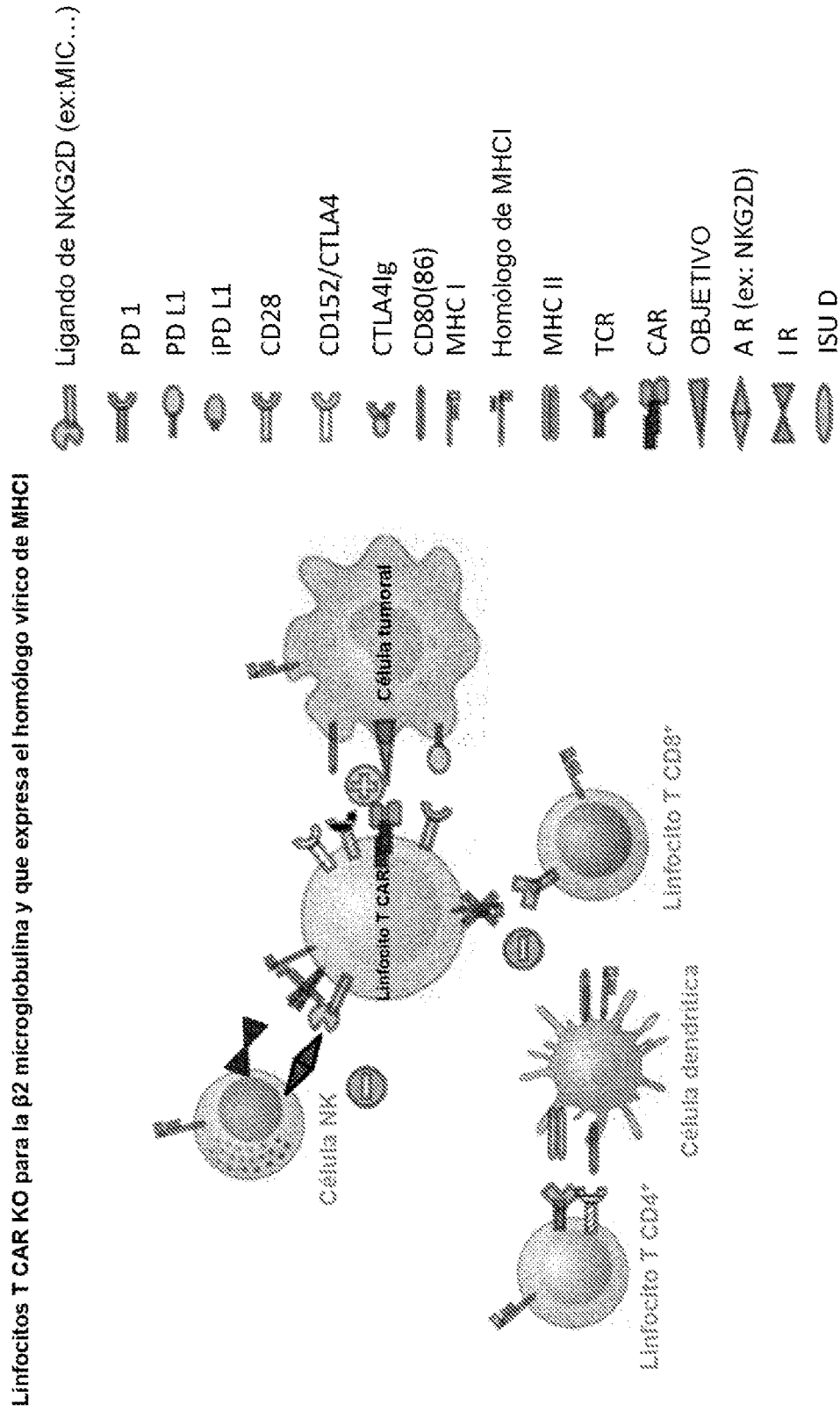


Figura 7



**Figura 8**

Linfocitos T CAR KO para la  $\beta 2$  microglobulina y que expresa el ligando NKG2D soluble

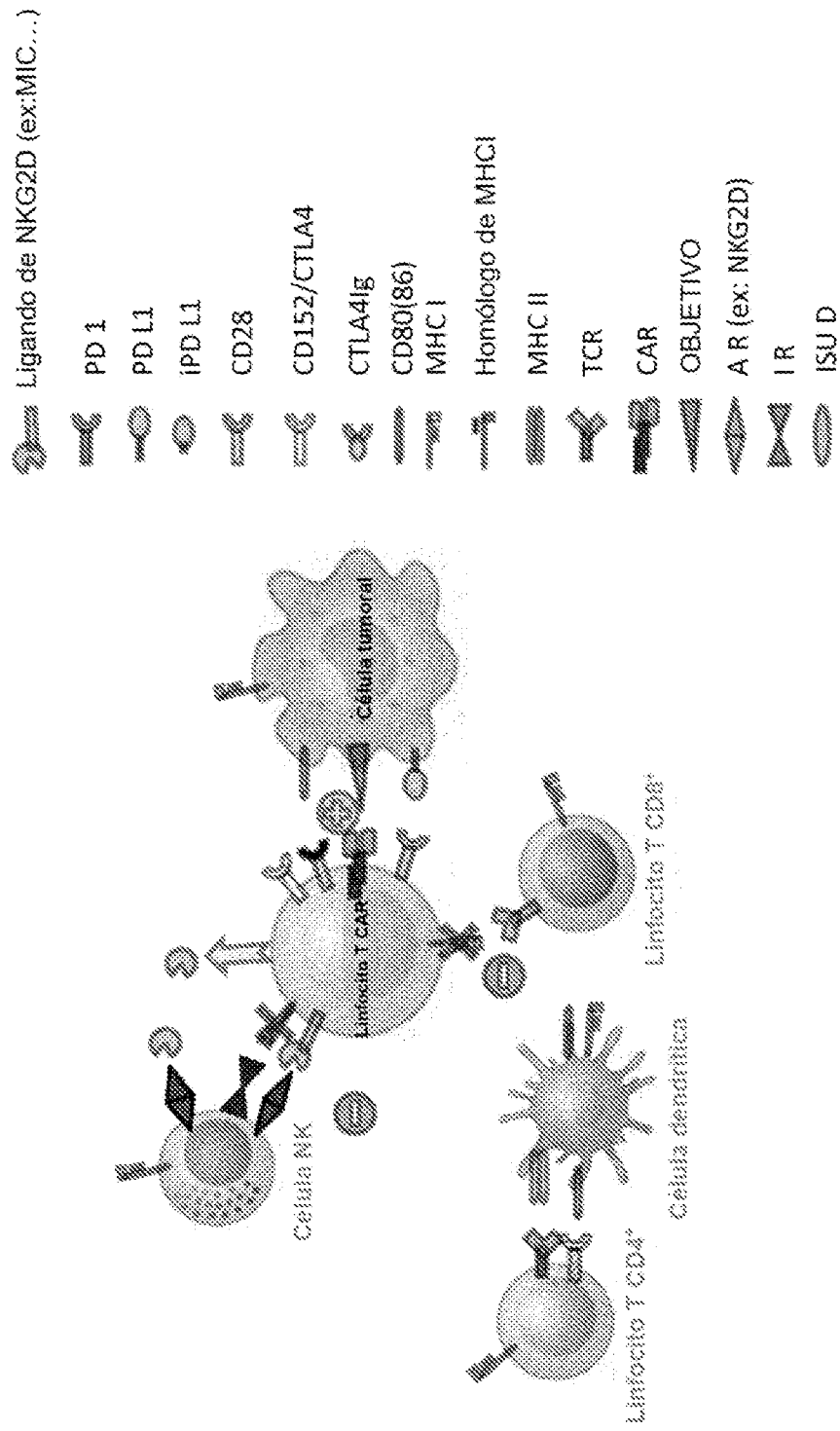


Figura 9

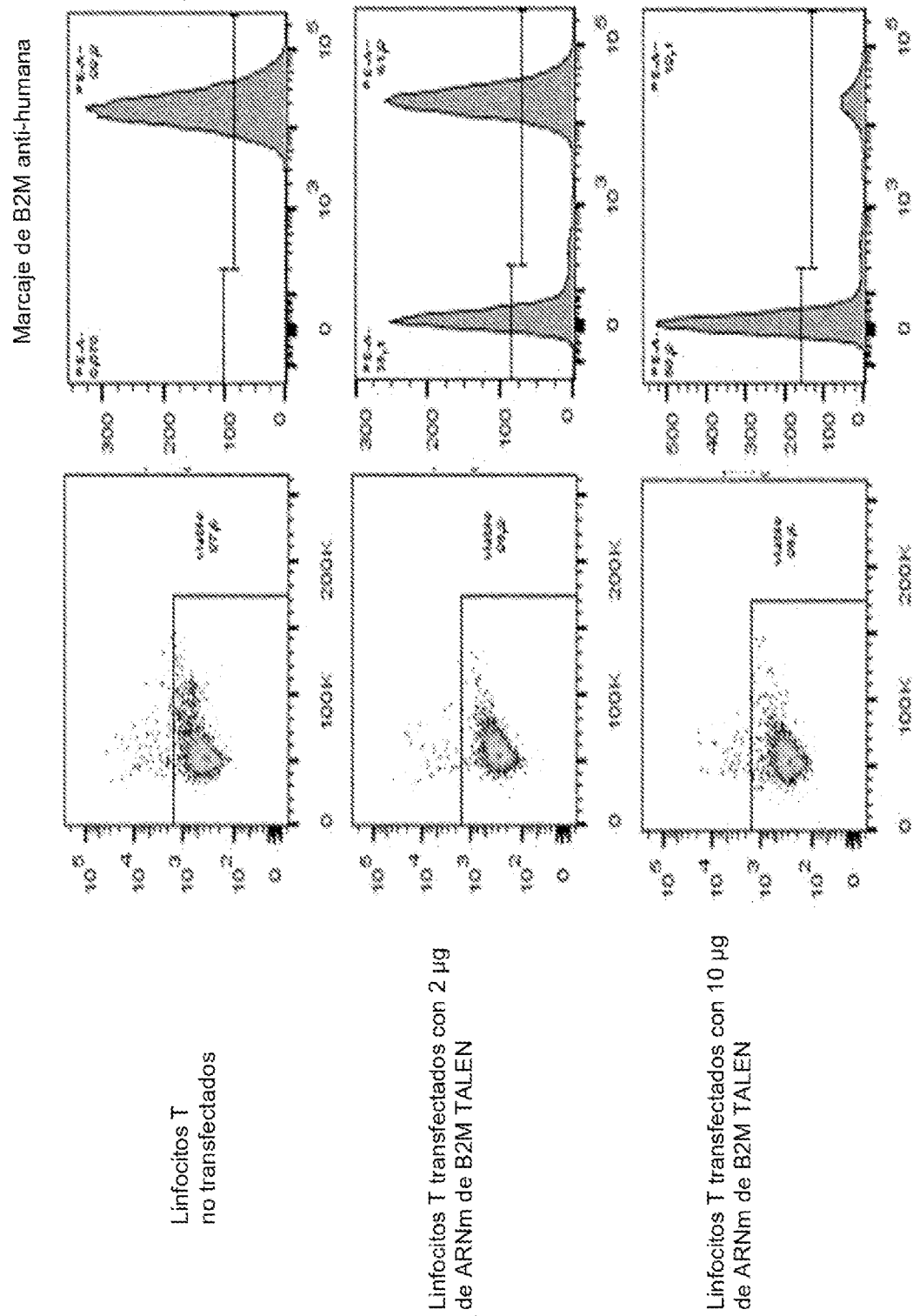


Figura 10