

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 946 332**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2018 PCT/CN2018/106636**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2019 WO19057102**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2018 E 18859478 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2023 EP 3682000**

54 Título: **Un ARNg dirigido a HPK1 y un método para editar el gen HPK1**

30 Prioridad:

20.09.2017 CN 201710853090

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

17.07.2023

73 Titular/es:

**BEIJING SYNTHETIC VACCINE BIOSCIENCES
CO., LTD (100.0%)
No. 017, 7th Floor, Block B Building No. 1 A38
Zhongguancun Avenue Haidian District
Beijing 100080, CN**

72 Inventor/es:

**LIAO, XUEBIN y
SI, JINGWEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 946 332 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

Un ARNg dirigido a HPK1 y un método para editar el gen HPK1

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad para la Solicitud China No. 201710853090.2, presentada el 20 de septiembre, 2017.

5 CAMPO TÉCNICO

En diversas realizaciones, la presente invención se refiere al campo técnico de la biología molecular y la inmunología, y más particularmente se refiere a la inmunoterapia del cáncer. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la presente invención se refiere generalmente a composiciones y métodos para editar el gen HPK1, células con un gen HPK1 editado, tales como células T, células NK y células NKT, composiciones farmacéuticas que comprenden las células y métodos para usar las mismas, p. ej., para el tratamiento del cáncer, todo definido como en las reivindicaciones adjuntas.

TÉCNICA ANTERIOR

El tumor es una de las principales enfermedades que amenazan la salud humana. En los últimos años, la inmunoterapia contra los tumores se ha convertido gradualmente en un foco de investigación en la terapia del cáncer. La terapia de células inmunes tumorales consiste en modificar, cultivar y expandir in vitro las células inmunes recogidas del cuerpo humano, y luego devolverlas al cuerpo del paciente para estimular y mejorar la función inmune del propio cuerpo, logrando así el efecto de inhibir el crecimiento tumoral y matar las células tumorales.

Entre muchos métodos de inmunoterapia contra el cáncer, el que tiene un mecanismo relativamente claro y un efecto efectivo es la terapia dirigida al tumor de células T con receptor de antígeno quimérico (terapia de células CAR-T) y la terapia con inhibidores de PD-1. La inmunoterapia celular, incluida CAR-T, ha logrado un éxito notable en el tratamiento de tumores hematológicos, pero ha habido obstáculos para conquistar tumores sólidos. La razón principal es la depleción de las células T, la disminución de la actividad y la capacidad insuficiente para matar tumores. Por lo tanto, encontrar nuevos sitios de modificación in vitro de células T y métodos de modificación, mejorar la actividad de las células T y la actividad de destrucción e inhibir la depleción de las células T es una dirección futura de la investigación y el desarrollo tecnológico.

La quinasa progenitora hematopoyética 1 (abreviada como hpk1, HPK1, HPK-1 o map4k1) es una proteína quinasa de serina/treonina específica hematopoyética que pertenece a la familia map4k de proteínas quinasas relacionadas con ste20 de mamíferos. Hpk1 se expresa principalmente en células y tejidos hematopoyéticos. Numerosos estudios han mostrado que hpk1 está implicada en muchas cascadas de señalización, incluida la señalización de mapk (proteína quinasa activada por mitógeno), la señalización del receptor de antígeno, la señalización apoptótica, la señalización de factores de crecimiento y la señalización de citoquinas, etc. Hay tres formas de activación de hpk1, a saber, fosforilación de serina, fosforilación de treonina o fosforilación de tirosina. Después de que la tecnología PCR se usara por primera vez para clonar hpk1 a partir de células progenitoras hematopoyéticas de ratón en 1996, los estudios han mostrado que hpk1 se expresa principalmente en células y tejidos hematopoyéticos. Actualmente, la investigación sobre hpk1 se centra principalmente en el sistema hematopoyético. Estudios recientes han mostrado que hpk1 puede estar asociado con el cáncer. El estudio de Sawasdikosol S. et al. de modelos de ratón encontró que la disrupción del gen hpk1 de las células T y las células DC ayuda a inhibir el crecimiento de las células de cáncer de pulmón, y se espera que hpk1 se convierta en una nueva diana para la inmunoterapia antitumoral.

US20160158360 divulga el uso de un antagonista de hpk1 que inhibe la actividad de la proteína quinasa de serina/treonina hpk1 en combinación con un antagonista de PD-1 para el tratamiento del cáncer. WO2016/090300A1 divulga el bloqueo o disrupción de HPK1 y PD-1 o PD-L1 para tratar el cáncer, pero en las realizaciones principales, esto se hace con antagonistas. WO2007/041511A2 divulga que los ratones HPK-1 KO se obtuvieron disrumpiendo el exón-1 del gen HPK-1 introduciendo una delección. Y los tumores se desarrollan más lentamente en animales HPK1 -/- y hay más infiltrados linfocíticos en tumores injertados en ratones HPK-1 -/-. SANSANA SAWASDIKOSOL ET AL: "HPK1 as a novel target for cancer immunotherapy" divulga que la disrupción génica dirigida del locus de HPK1 en las células T confiere a dicha célula T una producción elevada de citoquinas Th1 en respuesta a la unión de TCR. Jr-Wen Shui ET AL: "Hematopoietic progenitor kinase negatively regulates T cell receptor signaling and T cell-mediated immune responses" divulga que las células T HPK-1 -/- proliferan más que las células T wt, también aumentan la activación de las células T, la producción de citoquinas y la producción de anticuerpos mediada por células T. WO2016/069282A1 divulga una célula T modificada que comprende un ácido nucleico capaz de regular a la baja la expresión génica de un gen endógeno que puede ser PD1. WO2016/196388A1 divulga métodos para inhibir varios genes implicados en la regulación inmune, especialmente en células T y células CAR-T. WO2018/081531A2 divulga que la desactivación de HPK1 aumenta la activación de las células T. WO2018/085275A1 divulga un método para promover las funciones inmunes al inhibir, entre otros, MAP4K1, que incluye el uso del sistema CRISPR/Csa9 y ARNg. WO2019/178421A1 divulga una célula efectora inmune modificada que comprende un sistema regulador de genes capaz de reducir la expresión y/o función de uno o más genes diana endógenos que incluyen específicamente MAP4K1 y al menos otro gen que puede ser PDCD1. Pero en este estado de la técnica anterior no se ha divulgado que el agente comprende un ARNg.

BREVE RESUMEN

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En diversas realizaciones, la presente divulgación proporciona células inmunes, población celular, molécula de ácido nucleico y ARNg relacionados con la disrupción del gen HPK-1, así como métodos de preparación y métodos de uso de los mismos.

La presente divulgación está dirigida a células inmunes que tienen una disrupción genética (p. ej., un gen desactivado) de un gen HPK-1 y que comprenden un agente que induce o es capaz de inducir la disrupción genética. La disrupción genética puede comprender una deleción, mutación y/o inserción en el gen HPK-1 que da como resultado la inactivación del gen HPK-1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la disrupción genética puede comprender una deleción de al menos una parte de al menos un exón (p. ej., el primer o segundo exón) del gen HPK-1. En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, la disrupción genética también puede comprender la creación de una rotura de doble cadena (DSB) en el gen HPK-1 (p. ej., en el primer o segundo exón), que se repara mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) que efectúa inserciones y deleciones (indels) en el gen HPK-1. En algunas realizaciones, la disrupción genética también puede comprender la creación de una ruptura de doble cadena en el gen HPK-1, que se repara mediante reparación dirigida por homología (HDR) para insertar una secuencia donante (tal como una secuencia que codifica un CAR descrito en la presente memoria) después de la DSB. En algunas realizaciones, la disrupción genética puede incluir uno o más de los siguientes: las células inmunes no expresan el polipéptido HPK-1 endógeno, no contienen un gen HPK-1 contiguo, un gen HPK-1 y/o un gen HPK-1 funcional.

El agente comprende un ARNg que tiene un dominio de direccionamiento que es complementario con un dominio diana del gen HPK-1 en el primer o segundo exón, o un polinucleótido que codifica el ARNg, y el ARNg tiene un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia que es la misma o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15.

En algunas realizaciones, el agente puede comprender además un complejo de ribonucleoproteína (o complejo molecular o simplemente complejo o RNP) de una molécula Cas9 y un ARNg que tiene un dominio de direccionamiento que es complementario con un dominio diana del gen HPK-1. Y el ARNg puede tener una secuencia de direccionamiento que es igual o difiere en no más de 1, 2 o 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria a una secuencia diana seleccionada de las SEQ ID NO: 1 y 11-15. El ARNg puede ser quimérico o modular. En algunas realizaciones, la proteína Cas9 es una Cas9 de *S. pyogenes*. En algunas realizaciones, la proteína Cas9 se modifica aún más mediante la inserción de una secuencia de localización nuclear (p. ej., insertada en uno o ambos extremos C y N de la molécula Cas9) que puede facilitar la entrada de la molécula Cas9 en el núcleo de células inmunes de mamíferos, p. ej., humanas. En cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, el complejo ARNg/Cas9 puede escindir el dominio diana con una ruptura de doble cadena, lo que permite la reparación del gen HPK-1 a través de NHEJ o HDR.

La presente divulgación también está dirigida a una molécula de ácido nucleico, que es un casete de expresión, que codifica una o más moléculas que reducen o son capaces de reducir la expresión de un gen HPK-1 en una célula, en donde la una o más moléculas es o comprende o codifica un ARNg, en donde el ARNg comprende un dominio de direccionamiento que es complementario con un dominio diana del gen HPK-1 en el primer o segundo exón, y el ARNg comprende un dominio de direccionamiento que es el mismo o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15.

En algunas realizaciones, las células inmunes de la presente memoria también comprenden preferiblemente un receptor recombinante expresado en la superficie de la célula inmune o un polinucleótido que codifica el receptor recombinante. Típicamente, el receptor recombinante se une específicamente a un antígeno, y la célula inmune es capaz de inducir citotoxicidad, proliferar y/o secretar una citoquina tras la unión del receptor recombinante al antígeno. Son adecuados varios receptores recombinantes, incluidos los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el receptor recombinante es un receptor de células T recombinante. En algunas realizaciones, el receptor recombinante es un receptor de antígeno quimérico (CAR). En la presente memoria se describen TCR y CAR recombinantes útiles no limitantes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el receptor recombinante (p. ej., CAR) puede unirse específicamente a uno o más antígenos seleccionados independientemente de ROR1, Her2, LI-CAM, CD19, CD20, CD22, CEA, antígeno de superficie de la hepatitis B, antireceptor de folato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD276, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHA2, ErbB2, ErbB3, ErbB4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión celular LI (CD171), MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de la próstata, PSMA, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, efrinaB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, MAGE A3, CE7, Tumor de Wilms 1 (WT-1), ciclina A1 (CCNA1), BCMA e interleuquina 12. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el receptor recombinante se une específicamente a CD19, BCMA, Integrina α V β 6, MUC1, EGFRvIII, HER2, EGFR, GD2 y/o Mesotelina.

Se pueden usar diversas células inmunes para las composiciones y métodos de la presente divulgación. En algunas realizaciones, las células inmunes son células humanas. En algunas realizaciones, las células inmunes incluyen células T, tales como células Car-T, células NKT y células NK. En algunas realizaciones, las células inmunes pueden

usarse para inmunoterapia adoptiva. En algunas realizaciones, las células inmunes pueden derivar de células primarias de un sujeto que padece cáncer, tal como linfoma, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda de células B (B-ALL), leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma difuso de células grandes (DLCL), mieloma múltiple, carcinoma de células renales (RCC), neuroblastoma, 5 cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, sarcoma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, astrocitoma, mesotelioma, cáncer de cabeza y cuello y/o meduloblastoma.

Las células o población de células inmunes con la disrupción genética de HPK-1 de la presente memoria también se pueden caracterizar por ciertas características mejoradas en comparación con las células inmunes de control que no 10 tienen la disrupción genética. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células o la población de células inmunes con la disrupción genética de HPK-1 se pueden caracterizar por una citotoxicidad mejorada, apoptosis reducida, persistencia mejorada y/o agotamiento reducido.

La presente divulgación proporciona una población celular que comprende las células inmunes (p. ej., células T tales como células Car-T) de la presente memoria, que se caracteriza por uno o más de los siguientes: (1) al menos 15 aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de las células de la población celular no expresan el polipéptido HPK-1 endógeno; no contiene un gen HPK-1 contiguo, un gen HPK-1 y/o un gen HPK-1 funcional; (2) una eficiencia de inactivación genética de HPK-1 de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, según lo determinado por un método de acuerdo con el método de Transferencia Western. En algunas realizaciones, la población celular se caracteriza además porque al menos aproximadamente un 20 50 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de las células comprende un receptor recombinante (p. ej., un receptor de antígeno quimérico, p. ej., como se describe en la presente memoria)) en la superficie celular.

La presente divulgación está dirigida a un método que altera una célula T que comprende poner en contacto la célula T con un agente que induce o es capaz de inducir una disrupción genética de un gen HPK1, en donde el contacto con 25 el agente es *in vitro* o *ex vivo*, en donde el agente comprende (i) el ARNg que comprende un dominio de direccionamiento que es complementario con, se une a, reconoce o hibrida con un dominio diana de un gen HPK-1 en el primer o segundo exón, en donde el dominio de direccionamiento es el mismo o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15 o (ii) un ácido nucleico que codifica el ARNg. En algunas realizaciones, el método comprende introducir en una célula inmune (p. ej., una célula T) de un agente que induce o es capaz de inducir una disrupción genética (p. ej., la 30 inactivación del gen) de un gen HPK1. En algunas realizaciones, el método comprende (a) obtener una célula inmune (p. ej., célula T) de un paciente humano (p. ej., como se describe en la presente memoria); (b) introducir el agente que induce o es capaz de inducir la disrupción genética de HPK-1 en la célula inmune (p. ej., célula T); y (c) incubar y, opcionalmente, expandir la célula inmune (p. ej., célula T) con el agente para proporcionar una población de células inmunes (p. ej., célula T) con disrupción en el gen HPK-1. En algunas realizaciones, el método comprende además 35 introducir en la célula inmune (p. ej., célula T) un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante, tal como un CAR como se describe en la presente memoria, o un producto del mismo. Las células inmunes y agentes adecuados incluyen los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células inmunes pueden introducirse en cualquiera de los complejos de ARNg/Cas9, por ejemplo, que pueden escindir el dominio diana con una rotura de doble cadena en el gen HPK-1, lo que permite la reparación del gen HPK-1 a través de NHEJ o HDR en 40 las células inmunes. La célula o población de células inmunes producida por los métodos de la presente memoria se puede caracterizar por cualquiera de las características tales como la eficiencia de inactivación del gen HPK-1, la expresión de marcadores de agotamiento, PD-1, TIM-3 y/o Lag-3, expresión del marcador de apoptosis Anexina V, expresión del marcador de citotoxicidad CD107a, como se describe en la presente memoria.

La presente divulgación proporciona un método para mejorar la citotoxicidad, inhibiendo el agotamiento, de una población 45 de células T, comprendiendo el método poner en contacto la población de células T con un agente que induce o es capaz de inducir una disrupción genética (p. ej., inactivación génica) de un gen HPK1, en donde el contacto con el agente es *in vitro* o *ex vivo*, en donde el agente comprende (i) el ARNg que comprende un dominio de direccionamiento que es complementario con, se une a, reconoce o hibrida con un dominio diana de un gen HPK-1 en el primer o segundo exón, o (ii) un ácido nucleico que codifica el ARNg que comprende un dominio de direccionamiento que es complementario 50 con, se une a, reconoce o hibrida con un dominio diana de un gen HPK-1 en el primer o segundo exón;

en donde el ARNg tiene un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia que es igual o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15. En algunas realizaciones, el método comprende (a) obtener una población de células inmunes (p. ej., células T) de un paciente humano (p. ej., como se describe en la presente memoria); (b) introducir el agente 55 que induce o es capaz de inducir la disrupción genética de HPK-1 en la población de células inmunes (p. ej., células T); y (c) incubar y, opcionalmente, expandir la célula inmune (p. ej., célula T) con el agente para proporcionar una población de células inmunes (p. ej., célula T) con disrupción en el gen HPK-1 que tiene una citotoxicidad mejorada, un agotamiento reducido y/o una infiltración mejorada. en bazo y/o tumores en comparación con la población celular antes de introducir el agente. En algunas realizaciones, el método comprende además introducir en la célula inmune 60 (p. ej., célula T) un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante, tal como un CAR como se describe en la presente memoria, o un producto del mismo. Las células inmunes y agentes adecuados incluyen los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células inmunes pueden introducirse en cualquiera de

los complejos de ARNg/Cas9, por ejemplo, que pueden escindir el dominio diana con una rotura de doble cadena en el gen HPK-1, lo que permite la reparación del gen HPK-1 a través de NHEJ o HDR en las células inmunes.

Algunas realizaciones de la presente divulgación están dirigidas a composiciones farmacéuticas que comprenden las células inmunes con la disrupción genética en HPK-1 o la población celular de la presente memoria.

5 La solución técnica de la presente invención tiene al menos las siguientes ventajas: (1) La operación es fácil y la eficiencia de inactivación es alta. En la presente invención, se diseña un ARNg capaz de dirigirse de forma eficiente a HPK1 mediante la obtención de una secuencia diana localizada en el segundo exón de HPK1 genómico de células T a través de múltiples experimentos. El método de la invención es fácil de operar y adecuado para la modificación de las células T cultivadas in vitro en comparación con otros métodos de inactivación. En comparación con las otras
10 secuencias diana, la secuencia diana de la presente invención es particularmente adecuada para la tecnología de edición de genes CRISPR/Cas9, y puede inactivar HPK1 de manera eficiente de las células T mediante la tecnología CRISPR/Cas9. (2) El grado de activación de las células T es alto, y el efecto de destrucción de tumores es bueno. Las células T modificadas de la invención no solo proliferan más rápido, sino que también tienen una actividad más fuerte de matar tumores por célula. El resultado experimental de la actividad de matar tumores muestra que la actividad de matar tumores de las células T modificadas de la invención es mayor o incluso significativamente mayor que la de las células T modificadas con PD1. (3) Puede combinarse con otra tecnología de modificación de células T para lograr una actividad sinérgica para matar tumores. En la presente invención, la tecnología de modificación de células T de la inactivación por CRISPR/Cas9 del gen HPK1 se combina con la tecnología CAR-T para tener un efecto sinérgico. A través del análisis del experimento de muerte in vitro, la invención no solo es superior al efecto técnico del CAR-T
15 único, sino también superior al efecto técnico del CAR-T combinado con la inactivación de PD-1. Y (4) Puede suprimir la depleción de las células T. En la presente invención, CRISPR/Cas9 inactiva el gen HPK1 de las células T y el análisis de citometría de flujo muestra que la inactivación de HPK1 puede conducir a una regulación a la baja de los niveles de expresión de PD1 y TIM3. Por tanto, se puede ver que la inactivación de HPK1 puede aumentar la capacidad de las células T para matar células diana y secretar citoquinas al inhibir la depleción de las células T.

25 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Otras diversas ventajas y beneficios resultarán evidentes para los expertos en la técnica al leer las descripciones detalladas de las siguientes realizaciones preferidas. Los dibujos tienen únicamente el propósito de ilustrar las realizaciones preferidas y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

30 La Figura 1 muestra una imagen representativa de electroforesis en gel de ARNg transcrito in vitro purificado, de izquierda a derecha: el carril 1 es un control en blanco NC; El carril 2 es el ARNm de ARNg de HPK1 purificado; y el carril 3 es el ARNm de ARNg de PD1 purificado.

La Figura 2 muestra una imagen representativa de electroforesis en gel de proteína Cas9 recombinante expresada purificada, de izquierda a derecha: el carril 1 es un marcador de peso molecular de proteína; el carril 2 es la proteína Cas9 recombinante (con etiqueta GST) después de la concentración; el carril 3 es la proteína Cas9 después de la escisión de la etiqueta GST por trombina; el carril 4 es la proteína Cas9 recombinante (con etiqueta GST) antes de la concentración.
35

La Figura 3 presenta imágenes de electroforesis en gel de agarosa que muestran la eficiencia de inactivación génica representativa en diferentes condiciones, detectada por digestión enzimática con T7E1 como se detalla en el Ejemplo 4, de izquierda a derecha: el carril 1 es 4×10^6 células T + 8 μ g de proteína Cas9 + 8 μ g de ARNm de ARNg de HPK1; el carril 2 es 4×10^6 células T + 8 μ g de proteína Cas9 + 16 μ g de ARNm de ARNg de HPK1; el carril 3 es 4×10^6 células T + 16 μ g de proteína Cas9 + 8 μ g de ARNm de ARNg de HPK1; el carril 4 es 4×10^6 células T + 16 μ g de proteína Cas9 + 16 μ g de ARNm de ARNg de HPK1; el carril 5 es 4×10^6 células T + 8 μ g de proteína Cas9 + 8 μ g de ARNm de ARNg de PD1; el carril 6 es 4×10^6 células T + 8 μ g de proteína Cas9 + 16 μ g de ARNm de ARNg de PD1; el carril 7 es 4×10^6 células T + 16 μ g de proteína Cas9 + 8 μ g de ARNm de ARNg de PD1; el carril 8 es 4×10^6 células T + 16 μ g de proteína Cas9 + 16 μ g de ARNm de ARNg de PD1.
40
45

La Figura 4 presenta imágenes de Transferencia Western que muestran la eficiencia de inactivación génica representativa. Los resultados muestran que el nivel de expresión de HPK1 en las células T CAR19+HPK1+/- se reduce significativamente en comparación con los otros tres grupos. Se usó β -actina como referencia interna.

La Figura 5 muestra los resultados de la citometría de flujo que detectan los marcadores de superficie CAR19 y el receptor PD1 para las células CD19+, las células T CAR 19+HPK1+/- y las células T CAR19+PD1+/- . Las imágenes muestran que el receptor PD1 en la superficie de la célula T CAR19+HPK1+/- se reduce significativamente en comparación con la célula T CAR19+ de control. El nivel de expresión del receptor PD1 en la superficie de la célula T CAR19+HPK1+/- es similar al de la célula T CAR19+PD1+/- .
50

Las Figuras 6A-6C presentan gráficos de barras que comparan la actividad de muerte de células T de diferentes composiciones celulares: células T, células T CD19+, células T CAR19+HPK1+/- y células T CAR19+PD1+/- . La Figura 6A compara el efecto de muerte en la línea K562 de células de leucemia mieloide crónica humana; la Figura 6B compara el efecto de muerte en la línea celular linfoblastoide Raji; y la Figura 6C compara el efecto de muerte en la línea celular de linfoma de Burkitt humano Daudi.
55

Las Figuras 7A y 7B presentan gráficos de barras que comparan el nivel de producto de citoquinas de diferentes composiciones celulares: células T (células T CD19-), células T CD19+, células T CAR19+HPK1+/- y células T CAR19+PD1+/- la Figura 7A compara el nivel de producción de IFN- γ ; y la Figura 7B compara el nivel de producción de IL-2.

- 5 La Figura 8 presenta un gráfico que muestra la comparación del volumen tumoral en ratones entre diferentes grupos de tratamiento: grupo de tratamiento con células T, grupo de tratamiento con Car-T WT, grupo de tratamiento con Car-T HPK1 KO y grupo de tratamiento con Car-T PD1 KO. ($n = 6$ ratones por grupo). *** $P < 0,001$, prueba t no pareada.

10 La Figura 9 presenta imágenes de ratones tratados con células T, Car-T WT, Car-T HPK1 KO y Car-T PD1 KO. En la Figura 9, se inocularon ratones NSG con células Raji-ffluc y siete días después se trataron con 1×10^6 células T que expresaban CD19-CAR que contenían un módulo de señalización 4-1BB/CD3 ζ o con células T que expresaban solo EGFRt (4-5 ratones por grupo). Las flechas marcan el día de la transferencia de las células T. El crecimiento tumoral se analizó mediante imagenología de bioluminiscencia y los resultados de ratones individuales se representan gráficamente para diferentes CAR. Se muestran imágenes desde el día siete después de la transferencia de las células T (d7) hasta veintiocho días después de la transferencia (d28) para ratones que habían recibido diferentes células CART.

15 La Figura 10 presenta un gráfico que muestra la persistencia de células T, células Car-T WT, Car-T HPK1 KO y Car-T PD1 KO en ratones después del tratamiento durante un período de 40 días. La cuantificación de las células T en la sangre se realizó después de la transferencia adoptiva de células T a ratones. $n = 3$ ratones por grupo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ por prueba t no pareada. Los gráficos de barras y los diagramas de dispersión representan la media \pm s.e.m.

20 Las Figuras 11A-11C presentan una evaluación representativa de los niveles de expresión de varios marcadores de superficie, Anexina V/CD107a/PD1/Tim3/Lag3 para células que se infiltran en tejidos tumorales de ratones de cada uno de los grupos, células T, Car-T WT, Car-T HPK1 KO y células Car-T PD1 KO. Las figuras evalúan la apoptosis, la citotoxicidad y la expresión del marcador de agotamiento de las células CAR T desde el día 14 después de la transferencia adoptiva. La Figura 11A presenta gráficos que muestran los niveles de expresión de Anexina V/CD107a/PD1/Tim3/Lag3 en células que se infiltran en los tejidos tumorales. La Figura 11B presenta gráficos de barras que muestran los niveles de expresión de Anexina V y CD107a en células Car-T que se infiltran en tejidos tumorales; y la Figura 11C presenta gráficos de barras que muestran los niveles de expresión de PD1, Tim3 y Lag3 en células Car-T que se infiltran en los tejidos tumorales. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ prueba t no pareada.

La Figura 12 muestra un diagrama de flujo general de estudios con animales.

30 Las Figuras 13A-13D muestran el agotamiento de células CAR T her2 durante la expansión *ex vivo*. A. Expresión de Her2 Car en células T; B. Transferencia Western que evalúa la expresión de HPK1 en células T desde el día 0 de células T sin tratamiento previo hasta el día 10 después de la activación inicial, y Her2 CAR se transdujo el día 3; C. Facs que evalúa la expresión de células T HPK1 activo desde el día 0 de células T sin tratamiento previo hasta el día 10 después de la activación inicial, y Her2 CAR se transdujo el día 3; D. Microscopía de fluorescencia de la expresión de HPK1 (rojo) en diferentes células T Her2 Car (expresión de PD1 alta y baja)

35 Las Figuras 14 A-C presentan gráficos e imágenes que muestran la eficacia de escisión de HPK1 usando ARNg con proteína Cas9. A. Análisis FACS de la expresión de Her2 Car en células T (día 3 después de la transducción); B. Transferencia Western que evalúa la expresión de HPK1 después de CRISPR/Cas9 dirigido a HPK1 o PD-1; C. Análisis FACS de la expresión de PD-1 después de CRISPR/Cas9- dirigido a HPK1 o PD-1.

40 Las Figuras 15A-C presentan imágenes y gráficos que muestran la mejora de la eficacia *in vivo* de las células T CAR Her2 con la inactivación del gen HPK-1. En la Figura 15A, se inocularon ratones NSG con células SKOV3-ffluc y, siete días después, se trataron con 1×10^6 células T que expresaban HER2-CAR que contenían un módulo de señalización 4-1BB/CD3 ζ o con células T que expresaban solo EGFRt (4-5 ratones por grupo). Las flechas marcan el día de la transferencia de las células T. El crecimiento tumoral se analizó mediante imagenología de bioluminiscencia y los resultados de ratones individuales se representan gráficamente para diferentes CAR. Se muestran imágenes desde el día siete después de la transferencia de las células T (d7) hasta veintiocho días después de la transferencia (d28) para ratones que habían recibido diferentes células CART. La Figura 15B presenta gráficos que muestran el crecimiento tumoral durante 28 días de los ratones tratados ($n = 6$ ratones por grupo). *** $P < 0,001$, prueba t no pareada. La Figura 15C muestra un análisis de Kaplan-Meier de supervivencia de ratones. Los ratones portadores de SKOV-3 se trataron con 1×10^6 células CAR T ($n = 6$ por grupo; punto = un ratón).

45 La Figura 16 presenta imágenes y gráficos que muestran que la inactivación de HPK-1 mejora la infiltración de células CAR T en el tumor. El día 10 después del tratamiento con 1×10^6 células T que expresaban HER2-CAR, se extirparon tejidos tumorales de los ratones y cada tejido se usó para inmunohistoquímica (IHC). En el análisis IHC, se usaron combinaciones de anticuerpos anti-CD3 para la tinción primaria. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). El examen microscópico de las muestras de IHC se realizó con un aumento de $\times 100$. Se cuantificaron las células CAR-T en el tumor y el gráfico de la Figura 16 también muestra la relación de células CAR-T a tumor. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ prueba t no pareada.

Las Figuras 17A-C presentan imágenes y gráficos que muestran que la inactivación de HPK-1 mejora la infiltración de células CAR T en el bazo. Se analizaron células Her2 Car-t infiltrantes de tumor y células Her2 Car-t de bazo 25 días después de tratarlas con 1×10^6 células T que expresaban HER2-CAR. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ por prueba t no pareada.

- 5 Las Figuras 18A y B muestran que la inactivación de HPK-1 mejora el agotamiento de las células T Car Her2 *in vivo*. La Figura 18A muestra el análisis del marcador de citotoxicidad y la Figura 18B muestra el análisis de la expresión del marcador de agotamiento de las células CAR T de ratones el día 14 después de la transferencia adoptiva. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, NS: no significativo. prueba t no pareada.

- 10 Las Figuras 19A y 19B muestran la eficiencia de inactivación e infección de las células T Car BCMA. La Figura 19A muestra la eficiencia de la infección después de transducir lentivirus CAR-BCMA 72 h. La Figura 19B es una imagen de Transferencia Western, que muestra que el gen HPK-1 se inactivó eficientemente después de la electroporosis, con una relación de ARNg:proteína Cas9 de aproximadamente 1:3.

La Figura 20 muestra la expresión de PD1 en células T Car BMCA antes (arriba) y después (abajo) de la inactivación de PD-1.

- 15 Las Figuras 21A-21D presentan gráficos que muestran que las células Car T editadas con HPK-1 exhiben una eficacia antitumoral mejorada. *in vitro*. Las células T y células T CAR-BCMA se cocultivaron con U266 (21A), RPMI8226 (21B), K562 (21C) y K562-BCMA (21D), después de 12 h, se ensayó la citotoxicidad. ***: $P < 0,001$, **: $P < 0,01$, *: $P < 0,05$.

- 20 La Figura 22 presenta imágenes que muestran que las células CAR T editadas con HPK1 exhiben una eficacia de proliferación mejorada *in vitro*. Las células T y las células T CAR-BCMA se incubaron con CSFE y luego se cocultivaron con U266 y RPMI8226, después de 48 h, las células se analizaron mediante citometría de flujo.

La Figura 23 presenta gráficos que muestran que las células T transducidas con CAR anti-BCMA redujeron significativamente los tamaños de los tumores en el modelo PDX de mieloma múltiple. Para este estudio, las células T se inyectaron por vía intravenosa después de que el tamaño del tumor inoculado alcanzara 100 mm^3 . A continuación, se midió el volumen del tumor en el transcurso de 29 días.

- 25 Las Figuras 24A-24C son gráficos de barras que muestran que las células T CAR editadas con HPK-1 muestran un agotamiento reducido de las células T *in vivo*. Los gráficos se basan en el análisis de citometría de flujo de los marcadores de agotamiento de las células T 7 días después de la inyección intravenosa de las células T.

La Figura 25 muestra la eficiencia de inactivación de HPK-1 usando varios ARNg con diferentes secuencias de direccionamiento.

- 30 La Figura 26 muestra una cuantificación representativa de la eficiencia de inactivación medida por Transferencia Western.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 35 Las células tumorales y/o las células en el microentorno tumoral a menudo regulan al alza los ligandos para PD-1 (tales como PD-L1 y PD-L2), lo que a su vez conduce a la unión de PD-1 en las células T específicas del tumor que expresan PD-1, administrando una señal inhibitoria. PD-1 a menudo también se regula al alza en las células T en el microentorno del tumor, p. ej., en las células T que se infiltran en el tumor, lo que puede ocurrir después de la señalización a través del receptor de antígeno o ciertas otras señales de activación. En algunos casos, dichos eventos pueden contribuir al agotamiento de las células T, lo que a su vez puede conducir a una funcionalidad reducida. El agotamiento de las células T puede conducir a una pérdida progresiva de las funciones de las células T y/o a la depleción de las células (Yi et al. (2010) *Immunology*, 129:474-481). El agotamiento de las células T y/o la falta de persistencia de las células T pueden ser una barrera para la eficacia y los resultados terapéuticos de la terapia celular adoptiva. Los ensayos clínicos han revelado una correlación entre un mayor y/o grado más duradero de exposición a las células que expresan el receptor de antígeno (p. ej., CAR) y los resultados del tratamiento. WO2016196388 y WO2017193107 describen métodos y composiciones para reducir la expresión de PD-1 o PDL-1 en células T
- 45 disruptiendo genéticamente el gen PD-1.

- Antes de esta divulgación, se desconoce en gran medida el papel de la HPK-1 en la afectación de las funciones de las células inmunes, tales como en la inmunoterapia. En varias realizaciones, los presentes inventores descubrieron inesperadamente que la disrupción, p. ej., la inactivación, del gen HPK-1 de una célula inmune (p. ej., una célula T) puede aumentar su citotoxicidad y/o mejorar su persistencia con agotamiento reducido, con una eficacia similar o mejor que la disrupción (p. ej., inactivación) del gen PDCD1. Por ejemplo, como se muestra en detalle en la presente memoria, la inactivación del gen HPK-1 en varias células Car-T inesperadamente también redujo los niveles de expresión de los marcadores de agotamiento, tales como PD-1, Lag3 y Tim3. Además, la inactivación del gen HPK-1 también conduce inesperadamente a niveles de expresión aumentados del marcador de citotoxicidad CD107a en varias superficies de células Car-T. La inactivación del gen HPK-1 también disminuyó inesperadamente la apoptosis de las células Car-T, como lo demuestra el nivel reducido del marcador de superficie Anexina V. Estas características son útiles en la inmunoterapia adoptiva, tal como para tratar el cáncer. Por ejemplo, como se muestra en los ejemplos de la presente
- 55

memoria, las células Car-T con la inactivación del gen HPK-1 superaron inesperadamente a las células Car-T de tipo salvaje en diferentes modelos de tumores en animales, y con una eficacia similar o mejor que las células Car-T correspondientes con inactivación del gen PD-1. Además, cuando se ensayan *in vivo*, las células Car-T con el gen HPK-1 inactivado están presentes en un nivel plasmático significativamente más alto con una duración más prolongada en comparación con la de las células Car-T de tipo salvaje y las células Car-T con inactivación de PD-1.

Por consiguiente, en diversas realizaciones, la presente invención proporciona nuevas células y poblaciones celulares, incluidas células inmunes tales como células T y células NK, y métodos para producir y usar las células y la población celular. En algunas realizaciones, las células de la presente memoria se caracterizan por tener una disrupción genética de un gen de HPK-1 que codifica un polipéptido de HPK-1 y/o que contienen un agente que induce o es capaz de inducir la disrupción genética. En algunas realizaciones, las células son células humanas tales como células T humanas (p. ej., células Car-T) o células NK, p. ej., derivadas de un paciente con cáncer. En la presente memoria se proporcionan secuencias ejemplares para el gen HPK-1 humano (véanse las SEQ ID NO: 16 y 17; véanse también los No. de Acceso de NCBI: NM_007181 y NM_001042600). En cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, la disrupción genética puede ser una inactivación génica. En algunas realizaciones, la disrupción genética también puede ser una disminución génica. En algunas realizaciones, las células con la disrupción genética no expresan el polipéptido HPK-1 endógeno; no contienen un gen HPK-1 contiguo, un gen HPK-1 y/o un gen HPK-1 funcional. En cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, las células de la presente memoria también pueden comprender un receptor recombinante, tal como un receptor de células T (TCR) transgénico o diseñado por ingeniería y/o un receptor de antígeno quimérico (CAR), que se puede diseñar por ingeniería introduciendo una o más moléculas de ácido que codifican dichos receptores recombinantes o productos de los mismos. En algunas realizaciones, los receptores recombinantes pueden ser TCR modificados por ingeniería y receptores de antígenos no TCR funcionales, tales como receptores de antígenos quiméricos (CAR), que incluyen CAR activadores, estimuladores y coestimuladores, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el receptor recombinante se une específicamente a un antígeno (p. ej., como se describe en la presente memoria), y la célula inmune es capaz de inducir citotoxicidad, proliferar y/o secretar una citoquina tras la unión del receptor recombinante al antígeno. En algunas realizaciones, las células y composiciones de la presente memoria se pueden usar en terapia celular adoptiva, p. ej., inmunoterapia adoptiva.

Disrupción Genética de HPK-1

La presente divulgación está dirigida a células inmunes que tienen una disrupción genética de un gen HPK-1 y que contienen un agente que induce o es capaz de inducir la disrupción genética. El agente comprende un ARNg que tiene un dominio de direccionamiento que es complementario con un dominio diana del gen HPK-1 en el primer o segundo exón, o un polinucleótido que codifica el ARNg, y el ARNg tiene un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia que es la misma o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15.

Aunque en ciertas realizaciones específicas, se prefiere la inactivación del gen HPK-1, en algunas realizaciones, cualquier disrupción genética que reduzca la expresión de un gen HPK-1 funcional también puede ser útil y se contempla en la presente memoria.

La disrupción genética en la presente memoria puede comprender una reducción, delección, eliminación, inactivación o disrupción en la expresión de HPK-1 en las células inmunes (p. ej., células T tales como células Car-T). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la disrupción genética comprende una delección de al menos una parte de al menos un exón (p. ej., el primer y/o segundo exón) de HPK-1. En algunas realizaciones, la disrupción genética del gen HPK-1 puede ser una mutación de inactivación, inserción, cambio de sentido o cambio de marco, tal como una mutación de cambio de marco bialélico, delección de todo o parte del gen, p. ej., uno o más exones o una parte del mismo, y/o activación.

En algunas realizaciones preferidas, la disrupción genética es una inactivación génica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el locus del gen HPK-1 de las células inmunes se puede editar usando una nucleasa guiada por ARN tal como un sistema de ácido nucleico palindrómico corto agrupado intercalado regularmente (CRISPR)-Cas, tal como el sistema CRISPR-Cas9 (p. ej., como se describe en la presente memoria), específico para el gen HPK-1. En algunas realizaciones, dicha edición génica da como resultado una inserción o una delección en el locus diana (locus HPK-1), o una "inactivación" del locus diana y la eliminación de la expresión de la proteína codificada.

Sin desear la vinculación a teorías, en algunas realizaciones, la edición del gen HPK-1 en la presente memoria (p. ej., para inactivación) puede llevarse a cabo con modificaciones genéticas precisas al inducir roturas de cadena doble o roturas de cadena sencilla dirigidas, estimulando los mecanismos de reparación del ADN celular, que incluyen la unión de extremos no homólogos (NHEJ) propensa a errores y la reparación dirigida por homología (HDR). En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico donante, p. ej., un plásmido o ácido nucleico donante que codifica un receptor de antígeno sometido a ingeniería genética y se inserta por HDR en el sitio de edición génica después de la introducción de las DSB. Por tanto, en algunas realizaciones, la disrupción del gen y la introducción del receptor de antígeno, p. ej., CAR, pueden llevarse a cabo simultáneamente, por lo que el gen se disrumpe en parte mediante la activación o inserción del ácido nucleico que codifica CAR. Sin embargo, en algunas realizaciones, no se proporciona ácido nucleico donante. En algunas realizaciones, la reparación mediada por NHEJ después de la introducción de DSB da como resultado mutaciones de inserción o delección que pueden causar la disrupción del gen, p. ej., mediante

la creación de mutaciones sin sentido y/o cambios de marco. En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, el sistema CRISPR/Cas9 puede crear una rotura de cadena doble que se repara mediante la unión de extremos no homólogos para efectuar inserciones y deleciones (indels) en el gen HPK-1.

5 En algunas realizaciones, además del gen HPK-1, no se disrumpe sustancialmente ningún otro gen en las células inmunes. Sin embargo, en algunas realizaciones, la presente divulgación también contempla la disrupción adicional de uno o más genes en las células inmunes, por ejemplo, mediante la introducción de un agente adicional dirigido a un gen que codifica polipéptidos PD-1 o PDL-1 en las células inmunes. Se conocen ciertos agentes para disrumper genes que codifican polipéptidos PD-1 o PDL-1, por ejemplo, como se describe en WO2016/196388 y WO2017/193107.

10 La eficiencia de disrupción genética de HPK-1 de las células inmunes de la presente memoria puede ser generalmente alta. Por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de las células en una composición de células en las que se introduce un agente (p. ej., ARNg/Cas9) para la inactivación o disrupción genética de un gen HPK1 contiene la disrupción genética; no expresan el polipéptido HPK-1 endógeno; no contienen un gen HPK-1 contiguo, un gen HPK-1 y/o un gen HPK-1 funcional. En algunas realizaciones, 15 las células inmunes, las composiciones celulares y los métodos de la presente memoria se pueden caracterizar por una eficiencia de escisión mediada por Cas9 (% indel) en o cerca del gen HPK-1 (p. ej., en o aproximadamente en 100 pares de bases, en o aproximadamente en 50 pares de bases, o en o aproximadamente en 25 pares de bases o en o aproximadamente en 10 pares de bases en 5' o 3' del sitio de corte) de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % en células de una composición de células en las que se ha introducido un 20 agente (p. ej., ARNg/Cas9) para la inactivación o disrupción genética de un gen HPK-1. En realizaciones preferidas, las células inmunes, las composiciones celulares y los métodos de la presente memoria se pueden caracterizar por una eficiencia de inactivación del gen HPK-1 de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, p. ej., según lo determinado por un método de acuerdo con el ensayo T7E1 como se describe en el Ejemplo 4 y/o el método de Transferencia Western en el Ejemplo 5.

25 En algunas realizaciones, las células con la disrupción genética (p. ej., inactivación génica) de HPK-1 se pueden caracterizar adicionalmente por el nivel de expresión de ciertos péptidos. Por ejemplo, cuando se compara con una célula inmune de control que es sustancialmente la misma excepto sin la disrupción genética del gen HPK-1 o sin que se le haya introducido ningún agente que induzca o sea capaz de inducir la disrupción genética, las células inmunes de la presente memoria típicamente pueden tener un nivel reducido de PD-1, TIM-3 y/o Lag-3; un nivel mejorado de 30 CD107a; y/o nivel reducido de Anexina V, p. ej., según lo determinado por citometría de flujo.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células, las composiciones celulares y los métodos de la presente memoria también se pueden caracterizar porque el porcentaje de células en la población celular que expresa PD-1, TIM-3 y/o Lag-3 en la superficie celular, según lo determinado por citometría de flujo, es menor que en una población de células de control; el porcentaje de células en la población celular que expresa Anexina V en la superficie celular, según lo 35 determinado por citometría de flujo, es menor que en una población celular de control; y/o el porcentaje de células en la población celular que expresa CD107a en la superficie celular, según lo determinado por citometría de flujo, es mayor que en una población celular de control.

Tal y como se usa en la presente memoria, la referencia a una "célula (inmune) de control" o "población de células (inmunes) de control" (también denominada "composición correspondiente" o "población de células correspondiente", 40 una "composición de referencia" o una "población de células de referencia") se refiere a las células inmunes (p. ej., células T, tales como las células Car-T) obtenidas, aisladas, generadas, producidas y/o incubadas en las mismas o sustancialmente las mismas condiciones, excepto que las células tales como las células T o población de células T no se introdujeron con el agente que induce o es capaz de inducir la disrupción genética (p. ej., inactivación génica) de un gen HPK-1 en las células inmunes (p. ej., Cas9/ARNg). En algunas realizaciones, excepto por no contener la 45 introducción del agente, dichas células o células T se tratan de manera idéntica o sustancialmente idéntica a las células T o células a las que se ha introducido el agente, de modo que una cualquiera o más condiciones que pueden influir en la actividad o las propiedades de la célula, incluida la regulación al alza o la expresión de una o más moléculas relacionadas con la actividad de las células inmunes y/o marcadores de agotamiento tales como PD-1, HPK-1, TIM-3, LAG-3, no varía o no varía sustancialmente entre las células además de la introducción del agente. Por ejemplo, con el fin de evaluar la reducción en la expresión y/o la inhibición de la regulación al alza de una o más moléculas (p. ej., 50 PD-1, HPK-1, TIM-3 y LAG-3), las células T que contienen la introducción del agente y las células T que no contienen la introducción del agente se incuban en las mismas condiciones que se sabe que conducen a la expresión y/o regulación al alza de una o más moléculas en las células T.

Los métodos y técnicas para evaluar la expresión y/o los niveles de marcadores de células T, incluidas moléculas tales como PD-1, HPK-1, TIM-3 y LAG-3, se conocen en la técnica y se ejemplifican en la presente memoria. Los anticuerpos y reactivos para la detección de dichos marcadores son bien conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Los ensayos y métodos para detectar dichos marcadores incluyen, pero no se limitan a, citometría de flujo, incluida la citometría de flujo intracelular, ELISA, ELISPOT, matriz de perlas citométricas u otros métodos multiplex, Transferencia Western y otros métodos basados en inmunofluorescencia. En algunas realizaciones, la evaluación de la expresión 60 superficial de los marcadores en las células T incluye la detección de células que expresan el receptor de antígeno administrado (p. ej., CAR) en el sujeto después de la administración. Está dentro del nivel de un experto en la técnica

detectar células que expresan receptor de antígeno (p. ej., CAR) en un sujeto y evaluar los niveles de un marcador de superficie. En algunas realizaciones, las células que expresan el receptor de antígeno (p. ej., CAR), tales como las células obtenidas de la sangre periférica de un sujeto, pueden detectarse mediante citometría de flujo u otro método basado en la inmunofluorescencia para la expresión de un marcador exclusivo de dichas células, y luego dichas células se puede cotejar para otro marcador o marcadores de superficie de células T. En algunas realizaciones, las células T que expresan un receptor de antígeno (p. ej., CAR) se pueden generar para que contengan un EGFR truncado (EGFRt) como un epítopo de selección no inmunogénico, que luego se puede usar como marcador para detectar dichas células (véase, p. ej., la Patente de EE, UU, No. 8.802.374).

Células Inmunes con Receptor(es) Recombinante(s)

10 Las células de la presente memoria son típicamente células inmunes (p. ej., células T) que se van a someter a transferencia adoptiva (tales como células diseñadas por ingeniería para expresar un CAR o un TCR transgénico) para tratar enfermedades o trastornos tales como el cáncer. En algunas realizaciones, las células son células humanas. En algunas realizaciones, las células se derivan de células primarias de un sujeto, tales como células inmunes primarias (p. ej., células T) de un sujeto, que pueden modificarse ex vivo introduciendo un agente (p. ej., descrito en la presente memoria) que es capaz de inducir una disrupción genética de HPK-1 en la presente memoria. En algunas realizaciones, las células se aíslan de un sujeto, se modifican por ingeniería y se administran al mismo sujeto. En algunas realizaciones, se aíslan de un sujeto, se modifican por ingeniería y se administran a otro sujeto. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "introducir" abarca una variedad de métodos para introducir ADN en una célula, ya sea in vitro o in vivo, incluyendo dichos métodos transformación, transducción, transfección (p. ej., electroporación) e infección. Los vectores son útiles para introducir moléculas que codifican ADN en las células. Los posibles vectores incluyen vectores plasmídicos y vectores virales. Los vectores virales incluyen vectores retrovirales, vectores lentivirales u otros vectores tales como vectores adenovirales o vectores adeno-asociados.

25 En algunas realizaciones, las células inmunes, tales como las células T, se modifican por ingeniería mediante la introducción de uno o más ácidos nucleicos sometidos a ingeniería genética o productos de los mismos, tales como receptores de antígenos sometidos a ingeniería genética, incluidos los receptores de células T (TCR) sometidos a ingeniería genética y receptores de antígenos no TCR funcionales, tales como receptores de antígenos quiméricos (CAR), que incluyen CAR activadores, estimuladores y coestimuladores, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las células también se introducen, ya sea simultánea o secuencialmente en cualquier orden, con el agente que induce o es capaz de reducir, suprimir o disrumpir el gen HPK-1 en las células.

30 Como se ejemplifica en la presente memoria, la disrupción genética, tal como la inactivación génica del gen HPK-1, no interfiere con la propiedad funcional del receptor recombinante (p. ej., CAR) o la expresión de dicho receptor recombinante descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente memoria que comprenden células modificadas por ingeniería con un receptor recombinante y con una disrupción genética, tal como una inactivación, del gen HPK-1, retienen la propiedad funcional o las actividades del receptor recombinante (p. ej., CAR) en comparación con el receptor recombinante expresado en células modificadas por ingeniería de una composición correspondiente o de referencia en las que se modifican por ingeniería con el receptor recombinante, pero que no comprenden la disrupción genética de un gen HPK-1 cuando se evalúan en las mismas condiciones. En algunas realizaciones, el receptor recombinante (p. ej., CAR) retiene la unión específica al antígeno. En algunas realizaciones, el receptor recombinante (p. ej., CAR) retiene la actividad activadora o estimuladora, tras la unión al antígeno, para inducir citotoxicidad, proliferación, supervivencia o secreción de citoquinas en las células. En algunas realizaciones, las células modificadas por ingeniería de las composiciones proporcionadas retienen una propiedad o actividad funcional en comparación con una composición correspondiente o de referencia que comprende células modificadas por ingeniería en las que se modifican por ingeniería con el receptor recombinante, pero no comprenden la disrupción genética de un gen HPK-1 o expresan el polipéptido HPK-1 cuando se evalúa en las mismas condiciones. En algunas realizaciones, las células retienen (o mejoran) la citotoxicidad, la proliferación, la supervivencia o la secreción de citoquinas en comparación con dicha composición correspondiente o de referencia.

50 En algunas realizaciones, las células con disrupción del HPK-1 en la composición retienen un fenotipo de la célula o células inmunes en comparación con el fenotipo de las células en una composición correspondiente o de referencia cuando se evalúan en las mismas condiciones. En algunas realizaciones, las células en la composición incluyen células sin tratamiento previo, células de memoria efectoras, células de memoria central, células de memoria central madre, células de memoria efectoras y células de memoria efectoras de larga duración. En algunas realizaciones, el porcentaje de células T, o células T que expresan el receptor recombinante (p. ej., CAR), y que comprenden la disrupción genética de un gen HPK-1 exhiben un fenotipo de memoria central o de memoria de larga duración no activado que es el igual o sustancialmente igual que una población o composición de células de referencia o correspondiente modificada por ingeniería con el receptor recombinante, pero que no contiene la disrupción genética ni expresa el polipéptido HPK-1. En algunas realizaciones, la composición de la presente divulgación comprende células T que comprenden el receptor recombinante (p. ej., CAR) y uno o más marcadores fenotípicos seleccionados de CCR7+, 4-1BB+ (CD137+), TIM3+, CD27+, CD62L+, CD127+, CD45RA+, CD45RO-, t-betlow, IL-7Ra+, CD95+, IL-2Rp+, CXCR3+ o LFA-1+.

60 Los métodos para medir dicha propiedad, actividad o fenotipo son conocidos en la técnica, por ejemplo, se pueden medir en un ensayo in vitro, tal como por incubación de las células a aproximadamente 37 °C + 2 °C durante hasta o

5 hasta aproximadamente 12, 24, 36, 48 o 60 horas, por ejemplo, en presencia del antígeno y/o una o más citoquinas (p. ej., IL-2, IL-15 y/o IL-17). En algunas realizaciones, cualquiera de las actividades, propiedades o fenotipos evaluados puede evaluarse varios días después de la electroporación u otra introducción del agente, tal como después o hasta 3, 4, 5, 6, 7 días. En algunas realizaciones, dicha actividad, propiedad o fenotipo es retenido por al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de las células en la composición en comparación con una composición correspondiente que contiene células modificadas por ingeniería con el receptor recombinante, pero que no comprenden la disrupción genética de un gen HPK-1 cuando se evalúan en las mismas condiciones.

Células

10 Las células se derivan de la sangre, la médula ósea, la linfa o los órganos linfoides, son células del sistema inmune, tales como células de la inmunidad innata o adaptativa, p. ej., células mieloides o linfoides, incluidos linfocitos, típicamente células T y/o células NK. Otras células ejemplares incluyen células madre, tales como células madre multipotentes y pluripotentes, incluidas células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En algunas realizaciones, las células son células humanas. Las células son típicamente células primarias, tales como las que se aíslan directamente de un sujeto y/o se aíslan de un sujeto y se congelan. En algunas realizaciones, las células incluyen uno o más subconjuntos de células T u otros tipos de células, tales como poblaciones de células T completas, células CD4+, 15 células CD8+ y subpoblaciones de las mismas, tales como las definidas por función, estado de activación, madurez, potencial para la diferenciación, capacidades de expansión, recirculación, localización y/o persistencia, especificidad de antígeno, tipo de receptor de antígeno, presencia en un órgano o compartimento particular, marcador o perfil de secreción de citoquinas y/o grado de diferenciación. Con referencia al sujeto a tratar, las células pueden ser alogénicas y/o autólogas. Entre los métodos se incluyen métodos estándar. En algunas realizaciones, tales como en el caso de las tecnologías estándar, las células son pluripotentes y/o multipotentes, tales como las células madre, tales como las células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En algunas realizaciones, los métodos incluyen aislar células del sujeto, prepararlas, procesarlas, cultivarlas y/o diseñarlas por ingeniería, como se describe en la presente memoria, y reintroducirlas en el mismo paciente, antes o después de la crioconservación.

25 Entre los subtipos y subpoblaciones de células T y/o de células T CD4+ y/o de células T CD8+ se encuentran las células T sin tratamiento previo (T_N), células T efectoras (T_{FEF}), células T de memoria y subtipos de las mismas, tales como células T de memoria de células madre (TSCMX T de memoria central (TCM), T de memoria efectora (TEM) o células T de memoria efectoras diferenciadas terminalmente, células infiltrantes de tumores (TIL), células T inmaduras, células T maduras, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T NK, células T invariantes asociadas a la mucosa (MAIT), células T reguladoras (Treg) naturales y adaptativas, células T auxiliares, tales como células TH1, células TH2, células TH3, células TH17, células TH9, células TH22, células T auxiliares foliculares, células T alfa/beta y células T delta/gamma.

35 En algunas realizaciones, una o más de las poblaciones de células T se enriquecen o se deplecionan en células que son positivas para (marcador¹) o expresan niveles altos (marcador^{alto}) de uno o más marcadores particulares, tales como marcadores de superficie, o que son negativas para (marcador⁻) o expresan niveles relativamente bajos (marcador^{bajo}) de uno o más marcadores. En algunos casos, dichos marcadores son los que están ausentes o se expresan en niveles relativamente bajos en ciertas poblaciones de células T (tales como las células sin memoria), pero están presentes o se expresan en niveles relativamente más altos en ciertas otras poblaciones de células T (tales como células de memoria). En una realización, las células (tales como las células CD8+ o las células T, p. ej., células CD3+) están enriquecidas para (es decir, seleccionadas positivamente para) células que son positivas o que expresan altos niveles en superficie de CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD127 y/o CD62L y/o deplecionadas de (p. ej., seleccionadas negativamente para) células que son positivas o expresan altos niveles en superficie de CD45RA. En algunas realizaciones, las células se enriquecen para o se deplecionan en células positivas o que expresan altos niveles en superficie de CD122, CD95, CD25, CD27 y/o IL7-Ra (CD 127). En algunos ejemplos, las células T CD8+ se enriquecen para células positivas para CD45RO (o negativas para CD45RA) y para CD62L.

45 En algunas realizaciones, las células pueden ser una población de células T CD4+ o una subpoblación de células T CD8+, p. ej., una subpoblación enriquecida para células de memoria central (T_{CM}).

50 En algunas realizaciones, las células son células asesinas naturales (NK). En algunas realizaciones, las células son monocitos o granulocitos, p. ej., células mieloides, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y/o basófilos.

Receptores Recombinantes

55 Para la inmunoterapia adoptiva, las células de la presente memoria contienen típicamente receptores recombinantes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células pueden comprender uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante ingeniería genética y productos sometidos a ingeniería genética de dichos ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, normalmente no están presentes en una célula o muestra obtenida de la célula, tal como la obtenida de otro organismo o célula, que, por ejemplo, no se encuentra normalmente en la célula que se está sometiendo a ingeniería y/o un organismo del que se deriva dicha célula. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos no son naturales, tales como un ácido nucleico que no se encuentra en la

naturaleza, incluido uno que comprende combinaciones quiméricas de ácidos nucleicos que codifican varios dominios de múltiples tipos de células diferentes.

Las células generalmente expresan receptores recombinantes, tales como receptores de antígenos que incluyen receptores de antígenos no TCR funcionales, p. ej., receptores de antígenos quiméricos (CAR) y otros receptores de unión a antígenos, tales como receptores de células T transgénicas (TCR). También entre los receptores hay otros receptores quiméricos.

Los receptores de antígeno ejemplares, incluidos los CAR, y los métodos para diseñar por ingeniería e introducir dichos receptores en las células incluyen los descritos, por ejemplo, en los números de publicación de solicitudes de patentes internacionales WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061 números de publicación de solicitudes de patentes de EE. UU. US2002131960, US2013287748, US20130149337, Patentes de EE. UU. Nos.: 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353, y 8.479.118, y solicitud de patente europea número EP2537416, y/o los descritos por Sadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 abril; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opinión Immunol.* octubre de 2012; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, marzo de 2012 18(2): 160-75. En algunas realizaciones, los receptores de antígeno incluyen un CAR como se describe en la Patente de EE. UU. No.: 7.446.190, y los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No.: WO/2014055668 A1. Los ejemplos de los CAR incluyen los CAR divulgados en cualquiera de las publicaciones mencionadas anteriormente, tales como WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, Patente de EE. UU. No.: 7.446.190, Patente de EE. UU. No.: 8.389.282, Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; y Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177). Véanse también WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, Patente de EE. UU. No.: 7.446.190, y Patente de EE. UU. No.: 8.389.282. Los receptores quiméricos, tales como los CAR, generalmente incluyen un dominio de unión a antígeno extracelular, tal como una porción de una molécula de anticuerpo, generalmente una región de cadena pesada variable (VH) y/o una región de cadena ligera variable (VL) del anticuerpo, p. ej., un fragmento de anticuerpo scFv.

En algunas realizaciones, el antígeno al que se dirige el receptor es un polipéptido. En algunas realizaciones, es un carbohidrato u otra molécula. En algunas realizaciones, el antígeno se expresa selectivamente o se sobreexpresa en células de la enfermedad o afección, p. ej., células tumorales o patogénicas, en comparación con células o tejidos normales o no diana. En otras realizaciones, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en células modificadas por ingeniería.

Los antígenos a los que se dirigen los receptores (p. ej., CAR) en algunas realizaciones incluyen el receptor huérfano de tirosina quinasa ROR1, tEGFR, Her2, LI-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA y antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD276, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHA2, ErbB2, 3 o 4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión celular L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de la próstata, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, efrinaB2, CD123, c-Met, GD-2 y MAGE A3, CE7, Tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, tal como la ciclina A1 (CCNA1), y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos.

En algunas realizaciones, el receptor recombinante, p. ej., CAR, se une específicamente a uno o más antígenos seleccionados independientemente de ROR1, Her2, LI-CAM, CD19, CD20, CD22, CEA, antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD276, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHA2, ErbB2, ErbB3, ErbB4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión celular LI (CD171), MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de la próstata, PSMA, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, efrinaB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, MAGE A3, CE7, Tumor de Wilms 1 (WT-1), ciclina A1 (CCNA1), BCMA e interleuquina 12. En algunas realizaciones, el receptor recombinante (p. ej., CAR) se une específicamente a CD19, BCMA, integrina $\alpha V\beta 6$, MUC1, EGFRvIII, HER2, EGFR, GD2 y/o mesotelina. En algunas realizaciones, el receptor recombinante (p. ej., CAR) se une a un antígeno específico de patógeno. En algunas realizaciones, el receptor recombinante (p. ej., CAR) es específico para antígenos virales (tales como VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parasitarios.

En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo del receptor recombinante, p. ej., CAR, incluye además al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, tal como una región bisagra, p. ej., una región bisagra de IgG4, y/o CH1/CL y/o región Fc. En algunas realizaciones, la porción o región constante es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG1. En algunas realizaciones, la parte de la región constante sirve como región espaciadora entre el componente de reconocimiento de antígeno, p. ej., scFv, y el dominio transmembrana. El espaciador puede tener una longitud que proporcione una mayor capacidad de respuesta de la célula después de la unión al antígeno, en comparación con la ausencia del espaciador. Los espaciadores ejemplares, p. ej., regiones de bisagra, incluyen los descritos en el número de publicación de la solicitud de patente internacional WO2014031687. En algunos ejemplos, el espaciador tiene o tiene aproximadamente 12 aminoácidos de longitud o no tiene más de 12 aminoácidos de longitud. Los espaciadores

- ejemplares incluyen aquellos que tienen al menos aproximadamente 10 a 229 aminoácidos, aproximadamente 10 a 200 aminoácidos, aproximadamente 10 a 175 aminoácidos, aproximadamente 10 a 150 aminoácidos, aproximadamente 10 a 125 aminoácidos, aproximadamente 10 a 100 aminoácidos, aproximadamente 10 a 75 aminoácidos, aproximadamente 10 a 50 aminoácidos, aproximadamente 10 a 40 aminoácidos, aproximadamente 10 a 30 aminoácidos, aproximadamente 10 a 20 aminoácidos, o aproximadamente 10 a 15 aminoácidos, e incluyendo cualquier número entero entre los puntos finales de cualquiera de los rangos enumerados. En algunas realizaciones, una región espaciadora tiene aproximadamente 12 aminoácidos o menos, aproximadamente 119 aminoácidos o menos, o aproximadamente 229 aminoácidos o menos. Los espaciadores ejemplares incluyen la bisagra de IgG4 sola, la bisagra de IgG4 unida a los dominios CH2 y CH3, o la bisagra de IgG4 unida al dominio CH3.
- Este dominio de reconocimiento de antígeno generalmente está unido a uno o más componentes de señalización intracelular, tales como componentes de señalización que imitan la activación a través de un complejo receptor de antígeno, tal como un complejo TCR, y opcionalmente señales coestimuladoras asociadas, en el caso de un CAR, y/o señal a través de otro receptor de la superficie celular. Por tanto, en algunas realizaciones, el componente de unión a antígeno (p. ej., un anticuerpo) está unido a uno o más dominios transmembrana y de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana se fusiona con el dominio extracelular. En una realización, se usa un dominio transmembrana que está asociado naturalmente con uno de los dominios en el receptor, p. ej., CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se selecciona o modifica por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de la superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo del receptor.
- El dominio transmembrana en algunas realizaciones se deriva de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio en algunas realizaciones se deriva de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana incluyen las derivadas de (es decir, comprenden al menos la o las regiones transmembranas de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Alternativamente, el dominio transmembrana en algunas realizaciones es sintético. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana sintético comprende residuos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. En algunas realizaciones, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. En algunas realizaciones, el enlace es mediante enlazadores, espaciadores y/o dominio(s) transmembrana.
- Entre los dominios de señalización intracelular se encuentran aquellos que imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural (p. ej., señal de CD3), una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador (p. ej., señal de CD3/CD28) y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo. En algunas realizaciones, está presente un enlazador oligopeptídico o polipeptídico corto, por ejemplo, un enlazador de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, tal como uno que contiene glicinas y serinas, p. ej., doblete de glicina-serina, y forma un enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplásmico del CAR.
- El receptor, p. ej., el CAR, generalmente incluye al menos un componente o componentes de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el receptor incluye un componente intracelular de un complejo TCR, tal como una cadena CD3 de TCR que media en la activación y citotoxicidad de las células T, p. ej., la cadena zeta de CD3. Por tanto, en algunas realizaciones, la porción de unión a antígeno está unida a uno o más módulos de señalización celular. En algunas realizaciones, los módulos de señalización celular incluyen el dominio transmembrana de CD3, los dominios de señalización intracelular de CD3 y/u otros dominios transmembrana de CD. En algunas realizaciones, el receptor, p. ej., CAR, incluye además una porción de una o más moléculas adicionales, tales como el receptor Fc γ , CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el CAR u otro receptor quimérico incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta o receptor Fc γ y CD8, CD4, CD25 o CD16.
- En algunas realizaciones, tras la unión del CAR u otro receptor quimérico, el dominio citoplásmico o el dominio de señalización intracelular del receptor activa al menos una de las funciones o respuestas efectoras normales de la célula inmune, p. ej., célula T diseñada por ingeniería para expresar el CAR. Por ejemplo, en algunos contextos, el CAR induce una función de una célula T, tal como la actividad citolítica o la actividad T auxiliar, tal como la secreción de citoquinas u otros factores. En algunas realizaciones, se usa una porción truncada de un dominio de señalización intracelular de un componente receptor de antígeno o molécula coestimuladora en lugar de una cadena inmunoestimuladora intacta, por ejemplo, si transduce la señal de la función efectora. En algunas realizaciones, el dominio o dominios de señalización intracelular incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de células T (TCR) y, en algunas realizaciones, también las de correceptores que en el contexto natural actúan en conjunto con dichos receptores para iniciar la transducción de señales después de la unión al receptor de antígeno.
- En el contexto de un TCR natural, la activación completa generalmente requiere no solo la señalización a través del TCR, sino también una señal coestimuladora. Por tanto, en algunas realizaciones, para promover la activación completa, también se incluye en el CAR un componente para generar una señal secundaria o coestimuladora. En otras realizaciones, el CAR no incluye un componente para generar una señal coestimuladora. En algunas realizaciones, se expresa un CAR adicional en la misma célula y proporciona el componente para generar la señal secundaria o coestimuladora.

- 5 En algunas realizaciones, la activación de las células T se describe como mediada por dos clases de secuencias de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias). En algunas realizaciones, el CAR incluye uno o ambos de dichos componentes de señalización.
- 10 En algunas realizaciones, el CAR incluye una secuencia de señalización citoplasmática primaria que regula la activación primaria del complejo TCR. Las secuencias de señalización citoplasmática primaria que actúan de forma estimuladora pueden contener restos de señalización que se conocen como restos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores o ITAM. Los ejemplos de secuencias de señalización citoplasmática primaria que contienen ITAM incluyen las derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CDS, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunas realizaciones, la o las moléculas de señalización citoplasmática en el CAR contienen un dominio de señalización citoplasmático, una parte del mismo o una secuencia derivada de CD3 zeta.
- 15 En algunas realizaciones, el CAR incluye un dominio de señalización y/o una porción transmembrana de un receptor coestimulador, tal como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. En algunas realizaciones, el mismo CAR incluye tanto el componente activador como el coestimulador.
- 20 En algunas realizaciones, el dominio de activación se incluye dentro de un CAR, mientras que el componente coestimulador lo proporciona otro CAR que reconoce otro antígeno. En algunas realizaciones, los CAR incluyen CAR activadores o estimuladores, CAR coestimuladores, ambos expresados en la misma célula (véase WO2014/055668). En algunas realizaciones, las células incluyen uno o más CAR estimuladores o activadores y/o un CAR coestimulador.
- 25 En algunas realizaciones, las células incluyen además CAR inhibidores (iCAR, véase Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (diciembre, 2013), tal como un CAR que reconoce un antígeno distinto del asociado y/o específico de la enfermedad o afección, por lo que una señal de activación enviada a través del CAR que se dirige a la enfermedad se reduce o inhibe mediante la unión del CAR inhibidor a su ligando, p. ej., para reducir los efectos fuera de la diana.
- En determinadas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende una transmembrana de CD28 y un dominio de señalización unido a un dominio intracelular de CD3 (p. ej., CD3-zeta). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende dominios coestimuladores quiméricos CD28 y CD 137 (4-1BB, TNFRSF9), unidos a un dominio intracelular CD3 zeta.
- 30 En algunas realizaciones, el CAR abarca uno o más, p. ej., dos o más, dominios coestimuladores y un dominio de activación, p. ej., dominio de activación primario, en la porción citoplásmica. Los CAR ejemplares incluyen componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 y 4-1BB.
- 35 En algunas realizaciones, el CAR u otro receptor de antígeno incluye además un marcador, tal como un marcador de superficie celular, que puede usarse para confirmar la transducción o ingeniería de la célula para expresar el receptor, tal como una versión truncada de un receptor de superficie celular, tal como EGFR truncado (tEGFR). En algunas realizaciones, el marcador no cumple ninguna función terapéutica y/o no produce ningún otro efecto que no sea el de ser usado como marcador para la ingeniería genética, p. ej., para seleccionar células modificadas por ingeniería con éxito. En otras realizaciones, el marcador puede ser una molécula terapéutica o una molécula que ejerza de otro modo algún efecto deseado, tal como un ligando para que una célula que se encuentre in vivo, tal como una molécula coestimuladora o de punto de control inmune para mejorar y/o amortiguar las respuestas de las células tras la transferencia adoptiva y el encuentro con el ligando.
- 40 Los CAR pueden denominarse CAR de primera, segunda y/o tercera generación. En algunas realizaciones, un CAR de primera generación es uno que proporciona únicamente una señal inducida por la cadena de CD3 tras la unión al antígeno; en algunas realizaciones, un CAR de segunda generación es uno que proporciona dicha señal y una señal coestimuladora, tal como una que incluye un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador tal como CD28 o CD137; en algunas realizaciones, un CAR de tercera generación es uno que incluye múltiples dominios coestimuladores de diferentes receptores coestimuladores.
- 45 En algunas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento y un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv y el dominio intracelular contiene un ITAM. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular incluye un dominio de señalización de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta. En algunas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio transmembrana que une el dominio extracelular y el dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD28. En algunas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de células T. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora de células T es CD28 o 4-1BB.
- 50 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima. Los polipéptidos, incluidos los receptores proporcionados y otros polipéptidos, p. ej., enlazadores o péptidos, pueden incluir residuos de aminoácidos que incluyen residuos de
- 55

aminoácidos naturales y/o no naturales. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación y fosforilación. En algunas realizaciones, los polipéptidos pueden contener modificaciones con respecto a una secuencia nativa o natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.

En algunas realizaciones, los receptores de antígeno sometidos a ingeniería genética incluyen receptores de células T recombinantes (TCR) y/o TCR clonados a partir de células T naturales. En algunas realizaciones, se identifica un clon de células T de alta afinidad para un antígeno diana (p. ej., un antígeno de cáncer), se aísla de un paciente y se introduce en las células. En algunas realizaciones, el clon de TCR para un antígeno diana se ha generado en ratones transgénicos modificados por ingeniería con genes del sistema inmune humano (p. ej., el sistema de antígenos leucocitarios humanos o HLA). Véase, p. ej., antígenos tumorales (véase, p. ej., Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15: 169-180 y Cohen et al. (2005) Immunol. 175:5799-5808. En algunas realizaciones, la presentación en fagos se usa para aislar TCR contra un antígeno diana (véase, p. ej., Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14: 1390-1395 y Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354).

En algunas realizaciones, después de obtener el clon de células T, las cadenas alfa y beta de TCR se aíslan y se clonan en un vector de expresión génica. En algunas realizaciones, los genes alfa y beta de TCR están unidos a través de un péptido de salto ribosómico 2A de picornavirus de modo que ambas cadenas se coexpresan. En algunas realizaciones, la transferencia genética del TCR se logra mediante vectores retrovirales o lentivirales, o mediante transposones (véase, p. ej., Baum et al. (2006) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 13: 1050-1063; Frecha et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18: 1748- 1757; y Hackett et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:674-683).

Sistema CRISPR/Cas9

Se pueden usar varios sistemas CRISPR/Cas9 para inducir la disrupción genética, tal como la inactivación del gen HPK-1 en las células inmunes de la presente memoria. Se introduce en las células inmunes un agente que comprende una molécula de Cas9 y un ARNg que tiene un dominio de direccionamiento que es complementario, se une, reconoce o hibrida con un dominio diana del gen HPK-1 (p. ej., en el primer o segundo exón) o uno o más polinucleótidos que codifican Cas9 y ARNg. Y el ARNg tiene un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia que es igual o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15. En algunas realizaciones, el agente introducido en la célula inmune es o comprende un complejo de ribonucleoproteína (RNP) de Cas9 y ARNg que contiene el dominio de direccionamiento dirigido a HPK-1 (Cas9/ARNg RNP). En alguna realización, la introducción incluye poner en contacto el agente o una parte del mismo con las células inmunes, in vitro, lo que puede incluir cultivar o incubar las células y el agente durante hasta 24, 36 o 48 horas o 3, 4, 5, 6, 7, o 8 días o más. En diversas realizaciones, Cas9 y ARNg o los polinucleótidos codificantes pueden introducirse directamente en las células, por ejemplo, mediante electroporación.

En algunas realizaciones, antes, durante o después de poner en contacto el agente con las células y/o antes, durante o después de efectuar la administración (p. ej., electroporación), las células se pueden incubar en presencia de una citoquina, un agente estimulador y /o un agente que sea capaz de inducir la proliferación de las células inmunes (p. ej., células T). En algunas realizaciones, al menos una parte de la incubación se realiza en presencia de un agente estimulador que es o comprende un anticuerpo específico para CD3, un anticuerpo específico para CD28 y/o una citoquina. En algunas realizaciones, al menos una parte de la incubación se realiza en presencia de una citoquina, tal como una IL-2, IL-7 e IL-15. En algunas realizaciones, la incubación es durante hasta 8 días antes o después de la electroporación, tal como hasta 24 horas, 36 horas o 48 horas o 3, 4, 5, 6, 7 u 8 días o más. En algunas realizaciones, la incubación en presencia de un agente estimulador (p. ej., anti-CD3/anti-CD28) y/o una citoquina (p. ej., IL-2, IL-7 y/o IL-15) es durante hasta 24 horas, 25 horas o 48 horas antes de la electroporación.

ARNg

El agente introducido en las células comprende un ARNg que se dirige a una región del locus de HPK-1 o un ácido nucleico que codifica el ARNg. Y el ARNg tiene un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia que es igual o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15. En algunas realizaciones, la molécula de ARNg puede ser unimolecular (que tiene una sola molécula de ARN), a veces denominada en la presente memoria ARNg "quimérico", o modular (que comprende más de una, y típicamente dos, moléculas de ARN separadas).

En algunas realizaciones, el ARNg es un ARNg quimérico que comprende, de 5' a 3': un dominio de direccionamiento que es complementario a un ácido nucleico diana, tal como una secuencia del gen HPK-1 (las secuencias ejemplares se proporcionan en las SEQ ID NO: 16 y 17; véanse también los No. de Acceso de NCBI: NM_007181 y NM_001042600)), un primer dominio de complementariedad; un dominio de unión; un segundo dominio de complementariedad (que es complementario al primer dominio de complementariedad); un dominio proximal; y opcionalmente, un dominio de cola.

5 En algunas realizaciones, el ARNg es un ARNg modular que comprende una primera y una segunda cadena. En estos casos, la primera cadena incluye preferiblemente, de 5' a 3': un dominio de direccionamiento (que es complementario a un ácido nucleico diana, tal como una secuencia del gen HPK-1 (la secuencia ejemplar se proporciona en las SEQ ID NO: 16 y 17; véanse también los No. de Acceso de NCBI: NM_007181 y NM_001042600)) y un primer dominio de complementariedad. La segunda cadena generalmente incluye, de 5' a 3': opcionalmente, un dominio de extensión 5'; un segundo dominio de complementariedad; un dominio proximal; y opcionalmente, un dominio de cola.

10 El dominio de direccionamiento es parte de una molécula de ARN y, por lo tanto, comprende la base uracilo (U), mientras que cualquier ADN que codifique la molécula de ARNg comprenderá la base timina (T). Sin pretender la vinculación a la teoría, en una realización, se cree que la complementariedad del dominio de direccionamiento con la secuencia diana contribuye a la especificidad de la interacción del complejo molécula de ARNg/molécula de Cas9 con un ácido nucleico diana. Se entiende que en un par de dominio de direccionamiento y secuencia diana, las bases de uracilo en el dominio de direccionamiento se emparejarán con las bases de adenina en la secuencia diana. En una realización, el dominio de direccionamiento tiene una longitud de 5 a 50 nucleótidos. La cadena del ácido nucleico diana con la que el dominio de direccionamiento es complementario se denomina en la presente memoria la cadena complementaria. Algunos o todos los nucleótidos del dominio pueden tener una modificación, p. ej., para hacerlo menos susceptible a la degradación, mejorar la biocompatibilidad, etc. Como ejemplo no limitativo, el núcleo del dominio de direccionamiento puede modificarse con un fósforotioato u otra u otras modificaciones. En algunos casos, un nucleótido del dominio de direccionamiento puede comprender una modificación en 2', p. ej., una acetilación en 2', p. ej., una metilación en 2', u otra u otras modificaciones.

20 En varias realizaciones, el dominio de direccionamiento del ARNg en la presente memoria tiene una longitud de 16-26 nucleótidos (es decir, tiene una longitud de 16 nucleótidos, o una longitud de 17 nucleótidos, o una longitud de 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 nucleótidos).

En algunas realizaciones, la secuencia diana (ácido nucleico diana) está en o cerca del locus de HPK-1, tal como cualquier parte de la secuencia codificante de HPK-1 en las SEQ ID NO: 16 y 17.

25 En algunas realizaciones, el dominio diana para la inactivación o silenciamiento de HPK-1 es o comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y 11-15.

Secuencia del Dominio Diana	Localización en el gen HPK-1 humano
SEQ ID NO: 1: GACCTGGTGGCACTGAAGA	Segundo exón
SEQ ID NO: 11 GCTCGAGACAAGGTGTCAG	Segundo exón
SEQ ID NO: 12 AAGGTGTCAGGGGACCTGG	Segundo exón
SEQ ID NO: 13 ACCACTATGACCTGCTACAG	Primer exón
SEQ ID NO: 14 GACCTGCTACAGCGGCTGGG	Primer exón
SEQ ID NO: 15 GCTGGGTGGCGGCACGTATG	Primer exón

30 En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento del ARNg es el mismo o difiere en no más de 1, 2 o 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria a una secuencia diana seleccionada de las SEQ ID NO: 1 y 11-15.

Cas9

35 En algunas realizaciones, el agente puede comprender una molécula de Cas9 o un ácido nucleico que codifica Cas9. En algunas realizaciones, el agente puede comprender un complejo molecular Cas9/ARNg (p. ej., formado por cualquiera de los ARNg de la presente memoria con cualquiera de los Cas9 de la presente memoria), o una o más moléculas de ácido nucleico que codifican Cas9 y ARNg. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína Cas9 y el ARNg se pueden separar e incubar, p. ej., en una relación de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10 (Cas9 a ARNg, en masa) para formar un complejo ARNg/Cas9, que luego se puede administrar a las células inmunes, tal como por electroporación. Típicamente, la cantidad de complejo ARNg/Cas9 usada para la disrupción genética puede ser de aproximadamente 1-100 ug/1 × 10⁶ células.

40 Como entienden los expertos en la técnica, una molécula de Cas9 o polipéptido Cas9 es un polipéptido que puede interactuar con una molécula de ARN guía (ARNg) y, junto con la molécula de ARNg, se localiza en un sitio que comprende un dominio diana y una secuencia PAM (p. ej., en el caso de *S. pyogenes*, una NGG PAM, en el caso de *S. aureus*, NNGRR (p. ej., un PAM NNGRRT o NNGRRV), y en el caso de *N. meningitidis*, un PAM NNNNGATT o NNNNGCTT).

45 Pueden usarse las moléculas de Cas9 de una variedad de especies en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, la molécula de Cas9 es una Cas9 de *S. pyogenes*, *S. aureus*, o *N. meningitidis*. Las moléculas de Cas9 útiles no limitantes incluyen aquellas derivadas de especies que incluyen *S.*

pyogenes, *S. aureus*, *N. meningitidis*, *S. thermophilus*, *Acidovorax avenae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus suis*, *Actinomyces* sp., *Cycliphilus denitrificans*, *Aminomonas paucivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacteroides* sp., *Blastopirellula marina*, *Bradyrhizobium* sp., *Brevibacillus laterosporus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, *Candidatus puniceispirillum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Coxynebacterium accolens*, *Coxynebacterium diphtheria*, *Coxynebacterium matruchothii*, *Dinoxoseobacter shibae*, *Eubacterium dolichum*, *Gammaproteobacterium*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus sputorum*, *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter mustelae*, *Ilyobacter polytropus*, *Kingella kingae*, *Lactobacillus crispatus*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeriaceae bacterium*, *Methylocystis* sp., *Methylosinus trichosporium*, *Mobiluncus mulieris*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria* sp., *Neisseria wadsworthii*, *Nitrosomonas* sp., *Parvibaculum lavamentivorans*, *Pasteurella multocida*, *Phascolarctobacterium succinatutens*, *Ralstonia syzygii*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodovulum* sp., *Simonsiella muelleri*, *Sphingomonas* sp., *Spoxolactobacillus vineae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus* sp., *Subdoligranulum* sp., *Tistrella mobilis*, *Treponema* sp., o *Verminephrobacter eiseniae*.

En algunas realizaciones, las moléculas de Cas9 usadas para los métodos de la presente memoria son moléculas de Cas9 de tipo salvaje. Típicamente, las moléculas de Cas9 de tipo salvaje escinden ambas cadenas de una molécula de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, también se pueden usar moléculas de Cas9 modificadas y polipéptidos Cas9 con propiedades alteradas de escisión por nucleasa (u otras propiedades), p. ej., una nickasa, o que carece de la capacidad de escindir el ácido nucleico diana. Para la expresión en mamíferos, en algunas realizaciones, el ADNc de Cas9 bacteriano puede optimizarse por codones, por ejemplo, en un ADNc de Cas9 humanizado.

Las moléculas de Cas9 de origen natural ejemplares se describen en Chylinski et al., RNA Biology 2013 10:5, 727-737. Dichas moléculas de Cas9 incluyen moléculas de Cas9 de una familia bacteriana del grupo 1-78. Las moléculas de Cas9 de origen natural ejemplares incluyen una molécula de Cas9 de una familia bacteriana del grupo 1. Los ejemplos incluyen una molécula de Cas9 de *S. pyogenes* (p. ej., cepa SF370, MGAS 10270, MGAS 10750, MGAS2096, MGAS315, MGAS5005, MGAS6180, MGAS9429, NZ131 y SSI-1), *S. thermophilus* (p. ej., cepa LMD-9), *S. pseudoporcinus* (p. ej., cepa SPIN 20026), *S. mutans* (p. ej., cepa UA159, NN2025), *S. macacae* (p. ej., cepa NCTC11558), *S. gallolyticus* (p. ej., cepa UCN34, ATCC BAA-2069), *S. equines* (p. ej., cepa ATCC 9812, MGCS 124), *S. dysdactylae* (p. ej., cepa GGS 124), *S. bovis* (p. ej., cepa ATCC 700338), *S. anginosus* (p. ej., cepa F0211), *S. agalactiae* (p. ej., cepa NEM316, A909), *Listeria monocytogenes* (p. ej., cepa F6854), *Listeria innocua* (*L. innocua*, p. ej., cepa Clipi I262), *Enterococcus italicus* (p. ej., cepa DSM 15952), o *Enterococcus faecium* (p. ej., cepa 1,231,408). Otra molécula de Cas9 ejemplar es una molécula de Cas9 de *Neisseria meningitidis* (Hou et al., PNAS Early Edition 2013, 1-6).

En algunas realizaciones, la molécula de Cas9 adecuada puede modificarse incorporando una o más secuencias humanas tales como secuencias de localización nuclear (p. ej., insertadas en uno o ambos extremos C y N de la molécula de Cas9) que pueden facilitar la entrada de la molécula de Cas9 en el núcleo de las células inmunes humanas. Una señal o secuencia de localización nuclear (NLS) es una secuencia de aminoácidos que "etiqueta" una proteína para importarla al núcleo celular mediante transporte nuclear. Típicamente, esta señal consiste en una o más secuencias cortas de lisinas o argininas cargadas positivamente expuestas en la superficie de la proteína. Diferentes proteínas localizadas en el núcleo pueden compartir la misma NLS. La actividad de Cas9 en el núcleo se mantiene típicamente mediante la introducción de dichas NLS, de modo que puede crear una rotura de cadena doble para la reparación por NHEJ o HDR. En algunas realizaciones, para facilitar la expresión en células de mamíferos tales como células humanas, típicamente, se puede usar ADNc de Cas9 con codones optimizados. Se conocen ejemplos de dichas "Cas9 humanizadas", por ejemplo, como se describe en Chang, N. et al., Cell Research 25: 465-472 (2013), incluida la Secuencia del ADNc de Cas9 humanizado con codones optimizados y la secuencia de proteína indicada en el mismo. Otras NLS también pueden ser adecuadas para facilitar la entrada de Cas9 en el núcleo celular y se han informado, por ejemplo, como en US 8.795.965.

Ácidos Nucleicos, Vectores y Administración

La disrupción genética del gen HPK-1 en la presente memoria se efectúa introduciendo el agente que induce o es capaz de inducir la disrupción genética de HPK-1 en las células inmunes, lo que puede ir seguido de incubación, cultivo, expansión y/o selección de las células que contienen la disrupción genética (p. ej., inactivación genética).

El agente para disrupción del gen HPK-1 puede administrarse en las células inmunes a través de diferentes métodos conocidos por los expertos en la técnica. El agente comprende un ARNg que tiene un dominio de direccionamiento que es complementario con un dominio diana del gen HPK-1 en el primer o segundo exón, o un polinucleótido que codifica el ARNg, y el ARNg tiene un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia que es la misma o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15. Dichos agentes pueden, en algunas realizaciones, administrarse directamente en las células inmunes, p. ej., mediante electroporación, liposomas o nanopartículas, etc.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico que codifican la una o más moléculas pueden administrarse en las células inmunes. En algunas realizaciones, dichas moléculas de ácido nucleico o complejos de las mismas

5 pueden introducirse en células, tales como células T, mediante métodos bien conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, la introducción en forma de vectores virales recombinantes (p. ej., retrovirus, lentivirus, adenovirus), liposomas o nanopartículas. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir microinyección, electroporación, bombardeo de partículas, transfección con fosfato de calcio, compresión celular, a presión. En algunas realizaciones, los polinucleótidos pueden incluirse en vectores, más particularmente plásmidos o virus, con vistas a expresarse en las células. En algunas realizaciones, el vector puede ser un plásmido o un vector viral, tal como un vector retroviral, un vector gammaretroviral, un vector de herpesvirus, un vector lentiviral, un vector adenoviral o un vector adeno-asociado, que se puede introducir en una célula diana (p. ej., las células inmunes de la presente memoria o células para producir el ARNg para introducirlo en las células inmunes) mediante métodos bien conocidos y expresarse.

10 El sistema ARNg/Cas9 de la presente memoria se puede introducir en las células diana mediante varios métodos, típicamente *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ADN que codifica moléculas de Cas9 y/o moléculas de ARNg puede administrarse en células mediante métodos conocidos en la técnica, p. ej., mediante vectores (p. ej., vectores virales o no virales), métodos no basados en vectores (p. ej., usando ADN desnudo o complejos de ADN), o una combinación de los mismos.

15 En algunas realizaciones, el ADN que codifica Cas9 y/o ARNg puede administrarse mediante un vector (p. ej., vector viral/virus o plásmido). El vector puede comprender una secuencia que codifica una molécula de Cas9 y/o una molécula de ARNg. En algunas realizaciones, el vector puede incluir además un elemento regulador/de control, tal como un promotor, por ejemplo, un promotor U6 o T7. El vector (p. ej., un vector plasmídico) comprende una secuencia que codifica un ARNg que comprende un dominio de direccionamiento que es el mismo, o difiere en no más de 1, 2 o 3 nucleótidos, de una secuencia completamente complementaria a una secuencia diana seleccionada de las SEQ ID NO: 1 y 11-15. En algunas realizaciones, el vector es un vector plasmídico que comprende secuencias como se muestra en las SEQ ID NO: 3 y 4. En algunas realizaciones, el vector plasmídico es un pUC57kan-T7-ARNg.

20 En algunas realizaciones, el vector o vehículo de administración es un vector viral (p. ej., para la generación de virus recombinantes). En algunas realizaciones, el virus es un virus de ADN (p. ej., virus de ADNds o ADNss). En algunas realizaciones, el virus es un virus de ARN (p. ej., un virus de ARNss). Los vectores virales/virus ejemplares incluyen, p. ej., retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus vaccinia, poxvirus y virus del herpes simple. En algunas realizaciones, el vector viral puede ser competente para la replicación. En algunas realizaciones, el vector viral puede ser defectivo para la replicación.

25 En algunas realizaciones, el ARNg y la proteína Cas9 pueden prepararse y aislarse y luego introducirse en una célula diana, p. ej., mediante electroporación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico y/o el vector de la presente memoria que codifica el ARNg se puede usar para preparar el ARNg. A continuación, el ARNg se puede aislar y/o purificar para administrarlo en las células inmunes de la presente memoria. El ARNg puede administrarse en las células inmunes junto con una proteína Cas9, por ejemplo, como un complejo ARNg/Cas9. En algunas realizaciones, el ARNg puede administrarse en las células inmunes por separado de la proteína Cas9, que puede introducirse en las células como una proteína separada o como un ácido nucleico/vector que codifica la proteína Cas9.

30 En algunas realizaciones, el agente introducido en la célula inmune es o comprende un complejo de ribonucleoproteína (RNP) de Cas9 y ARNg que contiene el dominio de direccionamiento dirigido a HPK-1 (Cas9/ARNg RNP). En alguna realización, la introducción incluye poner en contacto el agente o una parte del mismo con las células inmunes, *in vitro*, lo que puede incluir cultivar o incubar las células y el agente durante hasta 24, 36 o 48 horas o 3, 4, 5, 6, 7, o 8 días o más. En diversas realizaciones, el Cas9 y ARNg o los polinucleótidos codificantes pueden introducirse directamente en las células, por ejemplo, mediante electroporación.

35 En algunas realizaciones, antes, durante o después de poner en contacto el agente con las células y/o antes, durante o después de efectuar la administración (p. ej., electroporación), las células se pueden incubar en presencia de una citoquina, un agente estimulador y/o un agente que sea capaz de inducir la proliferación de las células inmunes (p. ej., células T). En algunas realizaciones, al menos una parte de la incubación se realiza en presencia de un agente estimulador que es o comprende un anticuerpo específico para CD3, un anticuerpo específico para CD28 y/o una citoquina. En algunas realizaciones, al menos una parte de la incubación se realiza en presencia de una citoquina, tal como una IL-2, IL-7 e IL-15. En algunas realizaciones, la incubación es durante hasta 8 días horas antes o después de la electroporación, tal como hasta 24 horas, 36 horas o 48 horas o 3, 4, 5, 6, 7 u 8 días o más. En algunas realizaciones, la incubación en presencia de un agente estimulador (p. ej., anti-CD3/anti-CD28) y/o una citoquina (p. ej., IL-2, IL-7 y/o IL-15) es durante hasta 24 horas, 25 horas o 48 horas antes de la electroporación.

Otros métodos para administrar el agente, tal como el ARNg y la proteína Cas9, incluyen los conocidos en la técnica.

55 En algunas realizaciones, las células inmunes de la presente memoria comprenden además un receptor recombinante, y la introducción del agente (p. ej., complejo ARNg/Cas9) puede ocurrir simultánea o secuencialmente con la introducción del ácido nucleico que codifica el receptor recombinante, tal como un CAR como se describe en la presente memoria, o producto del mismo.

En algunas realizaciones, el grado de inactivación de un gen (p. ej., HPK-1), denominado alternativamente como eficiencia de inactivación, en varios puntos de tiempo, p. ej., de 24 a 72 horas después de la introducción del agente, se puede evaluar usando cualquiera de una serie de ensayos bien conocidos para evaluar la disrupción genética en células, por ejemplo, el método descrito en la sección de Ejemplos de la presente memoria. El grado de silenciamiento de un gen en varios puntos de tiempo, p. ej., de 24 a 72 horas después de la introducción del agente, se puede evaluar usando cualquiera de una serie de ensayos bien conocidos para evaluar la expresión génica en las células, tales como los ensayos para determinar el nivel de transcripción o expresión de proteínas o expresión en la superficie celular.

Composiciones de Células T y Métodos

Ciertas realizaciones específicas están dirigidas a células T, más específicamente, células T que tienen un CAR (p. ej., como se describe en la presente memoria). En algunas realizaciones, las células T tienen una disrupción genética (p. ej., inactivación génica) del gen HPK-1. En algunas realizaciones, las células T contienen (a) uno cualquiera o más del ARNg de la presente memoria, o un polinucleótido o vector que codifica el ARNg, (b) una cualquiera o más de las proteínas Cas9 de la presente memoria, o un polinucleótido o vector que codifica la proteína Cas9, o una combinación de (a) y (b). En algunas realizaciones, las células T contienen un complejo ARNg/Cas9 de la presente memoria.

En algunas realizaciones, una composición de células T puede comprender una célula T y un medio para inactivar el gen HPK-1 en la célula T. En algunas realizaciones, la célula T es una célula primaria de un paciente humano con cáncer. En algunas realizaciones, el paciente humano sufre de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: linfoma, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda de células B (B-ALL), leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda, linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma difuso de células grandes (DLCL), mieloma múltiple, carcinoma de células renales (RCC), neuroblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, sarcoma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, astrocitoma, mesotelioma, cáncer de cabeza y cuello, meduloblastoma y combinaciones de los mismos. El medio para inactivar el gen HPK-1 es un complejo ARNg/Cas9, en donde el ARNg comprende una secuencia de direccionamiento que es igual o difiere en no más de 1, 2 o 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria a una secuencia diana seleccionada de las SEQ ID NO: 1 y 11-15. En algunas realizaciones, el medio para inactivar el gen HPK-1 es un complejo ARNg/Cas9 como se muestra en la sección de Ejemplos de la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula T comprende además un receptor recombinante, tal como un CAR como se describe en la presente memoria.

La presente divulgación proporciona una población de células T (p. ej., una población de células Car-T) que comprende la célula inmune de la presente memoria, que se caracteriza por uno o más de los siguientes: (1) al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de las células de la población celular no expresan el polipéptido HPK-1 endógeno; no contienen un gen HPK-1 contiguo, un gen HPK-1 y/o un gen HPK-1 funcional; (2) una eficiencia de inactivación del gen HPK-1 en la población celular de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, según se determina mediante un método de acuerdo con el método de Transferencia Western. En algunas realizaciones específicas, la población de células T al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de las células comprende un receptor recombinante (p. ej., un receptor de antígeno quimérico, p. ej., como se describe en la presente memoria) en la superficie celular; y una eficiencia de inactivación del gen HPK-1 de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %. En algunas realizaciones, la población de células T (p. ej., población de células Car-T) se puede caracterizar porque el porcentaje de células en la población celular que expresa PD-1, TIM-3 y/o Lag-3 en la superficie celular, como se determina por citometría de flujo, es menor que en una población de células de control; el porcentaje de células en la población celular que expresan Anexina V en la superficie celular, como se determina por citometría de flujo, es menor que en una población celular de control; y/o el porcentaje de células en la población celular que expresa CD107a en la superficie celular, como se determina por citometría de flujo, es mayor que en una población celular de control. La población de células T con estas características puede prepararse por los expertos en la técnica a la vista de la presente divulgación. Como entenderán los expertos en la técnica, el término "población de células T" o "población de células Car-T" y términos similares en la presente memoria no significa que la población celular no contenga ningún otro tipo de células, aunque preferiblemente, dicha población debe contener en su mayoría (p. ej., al menos aproximadamente el 50 %) células T o células Car-T, respectivamente. Es bien sabido que las dos terapias Car-T comercializadas, Kymriah (tisagenlecleucel) o Yescarta (axicabtagene ciloleucel), además de las células Car-T, también pueden contener células NK, células NK-T, células B, etc.

La presente divulgación proporciona un método para alterar una célula T que comprende poner en contacto la célula T con un agente que induce o es capaz de inducir una disrupción genética (p. ej., inactivación génica) de un gen HPK1. Y el agente comprende (i) el ARNg que tiene un dominio de direccionamiento que es complementario con un dominio diana del gen HPK-1 en el primer o segundo exón, o un polinucleótido que codifica el ARNg, y el ARNg tiene un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia que es igual o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15 o (ii) un ácido nucleico que codifica el ARNg. En algunas realizaciones, el método comprende (a) obtener una célula T de un paciente humano (p. ej., como se describe en la presente memoria); (b) introducir el agente que induce o es capaz de inducir la disrupción genética de HPK-1 en la célula T; y (c) incubar y opcionalmente expandir la célula T con el agente para proporcionar una población de células T con el gen HPK-1 disrumpido. En algunas realizaciones, la incubación se puede realizar en presencia de una citoquina tal como IL-2 o un anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28. En

- algunas realizaciones, el método comprende además (d) introducir en la célula T un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante, tal como un CAR como se describe en la presente memoria, o un producto del mismo. Los agentes adecuados incluyen cualquiera de los descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el método comprende introducir en la célula T (a) uno cualquiera o más de los ARNg de la presente memoria, o un polinucleótido o vector que codifica el ARNg, (b) una cualquiera o más de las proteínas Cas9 de la presente memoria, o un polinucleótido o vector que codifica la proteína Cas9, o una combinación de (a) y (b). En algunas realizaciones, el método comprende introducir en la célula T un complejo ARNg/Cas9. En algunas realizaciones, la población de células T con disrupción del gen HPK-1 producida por los métodos de la presente memoria se puede caracterizar por cualquiera de las características tales como la eficiencia de inactivación del gen HPK-1, la expresión de marcadores de agotamiento, PD-1, TIM-3, y/o Lag-3, expresión del marcador de apoptosis Anexina V, expresión del marcador de citotoxicidad CD107a, como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la eficiencia de inactivación del gen HPK-1 puede ser de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, p. ej., como se determina por un método de acuerdo con el ensayo T7E1 como se describe en el Ejemplo 4 y/o el método de Transferencia Western en el Ejemplo 5.
- La célula T o la población de células T puede incluir células que se han obtenido de un sujeto (p. ej., un sujeto humano, p. ej., que tiene cáncer), tales como células primarias, células obtenidas de una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una muestra no fraccionada de células T, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis o un producto de leucoféresis. En algunas realizaciones, las células T pueden separarse o seleccionarse para enriquecer las células T en la población usando métodos de selección y enriquecimiento positivos o negativos. En algunas realizaciones, la población contiene células T CD4+, CD8+ o CD4+ y CD8+. Otros tipos adecuados de células T incluyen cualquiera de los descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula T es una célula primaria de un paciente humano con cáncer. En algunas realizaciones, el paciente humano sufre de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: linfoma, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda de células B (B-ALL), leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma difuso de células grandes (DLCL), mieloma múltiple, carcinoma de células renales (RCC), neuroblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, sarcoma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, astrocitoma, mesotelioma, cáncer de cabeza y cuello, meduloblastoma y combinaciones de los mismos.
- En algunas realizaciones, la introducción en las células de la población de células T de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante (p. ej., receptor de antígeno sometido a ingeniería genética) y el agente para disrumpir el gen HPK-1 (p. ej., Cas9/ARNg RNP en la presente memoria) puede ocurrir simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden. En algunas realizaciones, después de la introducción del receptor recombinante (p. ej., CAR) y el agente (p. ej., Cas9/ARNg RNP en la presente memoria), las células se cultivan o incuban en condiciones para estimular la expansión y/o proliferación de células, p. ej., como se describe en la presente memoria.
- En algunas realizaciones, la presente divulgación también proporciona métodos para mejorar la función de las células inmunes, tales como las células T, en la terapia celular adoptiva, incluidas aquellas que ofrecen una eficacia mejorada, tal como aumentando la actividad y la potencia de las células modificadas por ingeniería (p. ej., CAR+) administradas, mientras se mantiene la persistencia o la exposición a las células transferidas a lo largo del tiempo. En algunas realizaciones, el método comprende disrumpir el gen HPK-1 en las células inmunes, p. ej., introduciendo en las células inmunes un agente que induce o es capaz de inducir una disrupción genética (p. ej., inactivación génica) de un gen HPK-1. En algunas realizaciones, el método comprende introducir en las células inmunes (a) uno cualquiera o más del ARNg de la presente memoria, o un polinucleótido o vector que codifica el ARNg, (b) una cualquiera o más de las proteínas Cas9 de la presente memoria, o un polinucleótido o vector que codifica la proteína Cas9, o una combinación de (a) y (b). En algunas realizaciones, el método comprende introducir en las células inmunes un complejo de ARNg/Cas9 de la presente memoria. En algunas realizaciones, las células inmunes con un gen HPK-1 disrumpido, tales como las células T que expresan CAR, exhiben una mayor expansión y/o persistencia cuando se administran in vivo a un sujeto, en comparación con ciertos métodos disponibles.
- En algunas realizaciones, la presente divulgación también proporciona métodos para mejorar la citotoxicidad, inhibir el agotamiento y/o mejorar la infiltración en el bazo y/o los tumores de una población de células inmunes (p. ej., población de células T tales como células Car-T), comprendiendo el método poner en contacto la población de células inmunes con un agente que induce o es capaz de inducir una disrupción genética (p. ej., inactivación génica) de un gen HPK1. En algunas realizaciones, el método comprende (a) obtener una población de células inmunes (p. ej., célula T) de un paciente humano (p. ej., como se describe en la presente memoria); (b) introducir el agente que induce o es capaz de inducir la disrupción genética de HPK-1 en la población de células inmunes (p. ej., célula T); y (c) incubar y, opcionalmente, expandir la célula inmune (p. ej., célula T) con el agente para proporcionar una población de células inmunes (p. ej., célula T) con disrupción del gen HPK-1 que tiene una citotoxicidad mejorada, un agotamiento reducido y/o una infiltración mejorada en bazo y/o tumores en comparación con la población celular antes de introducir el agente. En algunas realizaciones, el método comprende además introducir en la célula inmune (p. ej., célula T) un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante, tal como un CAR como se describe en la presente memoria, o un producto del mismo. Los agentes adecuados incluyen cualquiera de los descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el método comprende introducir en la célula inmune (p. ej., célula T) (a) uno cualquiera o más del ARNg de la presente memoria, o un polinucleótido o vector que codifica el ARNg, (b) una cualquiera o más de las proteínas Cas9 de la presente memoria, o un polinucleótido o vector que codifica la proteína Cas9, o una combinación de (a) y

- (b). En algunas realizaciones, el método comprende introducir en las células inmunes un complejo de ARNg/Cas9 de la presente memoria. En algunas realizaciones, la población de células T con disrupción del gen HPK-1 producida por los métodos de la presente memoria se puede caracterizar por cualquiera de las características tales como la eficiencia de inactivación del gen HPK-1, la expresión de marcadores de agotamiento, PD-1, TIM-3, y/o Lag-3, expresión del marcador de apoptosis Anexina V, expresión del marcador de citotoxicidad CD107a, como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la eficiencia de inactivación del gen HPK-1 puede ser de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, p. ej., como se determina por un método de acuerdo con el ensayo T7E1 como se describe en el Ejemplo 4 y/o el método de Transferencia Western en el Ejemplo 5.
- En algunas realizaciones, la población de células inmunes es una población de células Car-T. En algunas realizaciones, la población de Car-T se caracteriza porque al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de las células comprenden un receptor recombinante (p. ej., un receptor de antígeno quimérico, p. ej., como se describe en la presente memoria) en la superficie celular. En algunas realizaciones, el método produce una población de células Car-T con una eficiencia de inactivación del gen HPK-1 de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, p. ej., según lo determinado por un método de acuerdo con el ensayo T7E1 como se describe en el Ejemplo 4 y/o el método de Transferencia Western en el Ejemplo 5.

Como se detalla en la presente memoria, es inesperado que la disrupción del gen HPK-1 en las células inmunes, tales como las células Car-T, las células inmunes muestren una citotoxicidad mejorada, una mayor persistencia y un agotamiento reducido, y/o una infiltración mejorada en el bazo y/o en los tumores. Dichos efectos también se han observado *in vivo* cuando se administra a un sujeto. Por ejemplo, en un estudio con animales, se encontró que las células Car-T con inactivación de HPK-1 permanecían en el plasma de los animales tratados a un nivel mucho más alto en comparación con las células Car-T de tipo salvaje o las células Car-T con inactivación de PD-1. El grado o extensión de la persistencia de las células administradas se puede detectar o cuantificar después de la administración a un sujeto, tal como mediante qPCR, ensayos de citometría de flujo o ensayos basados en células. Esto ilustra adicionalmente las ventajas asociadas con las composiciones y métodos de la presente memoria, por ejemplo, en inmunoterapia adoptiva.

Como entenderán los expertos en la técnica a la vista de esta divulgación, los métodos de la presente memoria no se limitan a ninguna célula inmune particular o CAR particulares. En algunas realizaciones, las células Car-T disponibles comercialmente también se pueden modificar usando los métodos de la presente memoria, por ejemplo, para inactivar el gen HPK-1 para mejorar aún más su función de inmunoterapia, tal como para reducir el agotamiento de las células T. Por ejemplo, las células Car-T para Kymriah (tisagenlecleucel) o Yescarta (axicabtagene ciloleucel) pueden modificarse mediante los métodos de la presente memoria para inactivar el gen HPK-1. Como se analiza en la presente memoria, en dichas realizaciones, la introducción de agentes para la modificación genética del gen HPK-1 puede ocurrir de forma simultánea o secuencial en cualquier orden con la introducción de ácidos nucleicos que codifican el CAR CD19 para Kymriah o Yescarta.

Por ejemplo, de acuerdo con el prospecto, para preparar YESCARTA, las células T del propio paciente se recogen y se modifican genéticamente *ex vivo* mediante transducción retroviral para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) anti-CD19 murino unido a los dominios coestimuladores CD28 y CD3-zeta. Las células T CAR anti-CD19 se expanden y se vuelven a infundir en el paciente, donde pueden reconocer y eliminar las células diana que expresan CD19.

Más específicamente, YESCARTA se puede preparar a partir de células mononucleares de sangre periférica del paciente, que se obtienen mediante un procedimiento estándar de leucoféresis. Las células mononucleares se enriquecen para células T y se activan con anticuerpos anti-CD3 en presencia de IL-2, luego se transducen con el vector retroviral incompetente para la replicación que contiene el transgén CAR anti-CD 19. Las células T transducidas se expanden en cultivo celular, se lavan, se formulan en una suspensión y se crioconservan. El producto debe pasar una prueba de esterilidad antes de liberarse para su envío como suspensión congelada en una bolsa de infusión específica para el paciente.

KYMRIAH™ (tisagenlecleucel) es una inmunoterapia de células T autólogas modificadas genéticamente dirigida a CD19 compuesta por células T autólogas que se modifican genéticamente usando un vector lentiviral para codificar un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19. El CAR se compone de un fragmento de anticuerpo de cadena única (scFv) murino específico para CD19, seguido de una región transmembrana y bisagra de CD8 que se fusiona con los dominios de señalización intracelular para 4-1BB (CD137) y CD3 zeta.

KYMRIAH se puede preparar a partir de células mononucleares de sangre periférica del paciente, que se obtienen mediante un procedimiento estándar de leucoféresis. Las células mononucleares se enriquecen para células T, luego se transducen con el vector lentiviral que contiene el transgén CAR anti-CD19 y se activan con perlas recubiertas de anticuerpos anti-CD3/CD28. Las células T transducidas se expanden en cultivo celular, se lavan y se formulan en una suspensión, que luego se crioconserva. El producto debe pasar una prueba de esterilidad antes de liberarse para su envío como suspensión congelada en una bolsa de infusión específica para el paciente. El producto se descongela antes de la administración.

En algunas realizaciones, las células Car-T para Kymriah (tisagenlecleucel) o Yescarta (axicabtagene ciloleucel) se pueden modificar mediante la introducción de un agente (p. ej., como se describe en la presente memoria, tal como el ARNg/Cas9 como se describe en la presente memoria) que puede inactivar el gen HPK-1, ya sea simultánea o secuencialmente con la introducción del vector retroviral que contiene el transgén CAR antiCD19. Las células obtenidas pueden luego expandirse en cultivo celular, lavarse y formularse de manera similar a los procedimientos para preparar Kymriah o Yescarta.

Composiciones Farmacéuticas y Métodos de Tratamiento

Las células inmunes modificadas, tales como las células Car-T, se han aprobado recientemente para tratar ciertos cánceres. Por ejemplo, YESCARTA es una inmunoterapia de células T autólogas modificadas genéticamente dirigida a CD19 indicada para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma de células B grandes recidivante o refractario después de dos o más líneas de terapia sistémica, incluido el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) no especificado de otro modo, linfoma primario de células B grandes del mediastino, linfoma de células B de alto grado y DLBCL que surge del linfoma folicular. De manera similar, KYMRIAH es una inmunoterapia de células T autólogas modificadas genéticamente dirigida a CD19 indicada para el tratamiento de: pacientes de hasta 25 años de edad con leucemia linfoblástica aguda (ALL) de precursores de células B que es refractaria o en una segunda o posterior recidiva; Pacientes adultos con linfoma de células B grandes recidivante o refractario (r/r) después de dos o más líneas de terapia sistémica, incluido el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) no especificado de otro modo, linfoma de células B de alto grado y DLBCL derivado de linfoma folicular.

Como se analiza en la presente memoria, la disrupción genética del gen HPK-1 en las células inmunes, tales como las células Car-T (tales como las de Yescarta o Kymriah), puede mejorar aún más la función de la inmunoterapia, tal como una mayor citotoxicidad y un agotamiento reducido.

Por consiguiente, en la presente memoria también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden las células, poblaciones celulares, tales como células y poblaciones producidas mediante cualquiera de los métodos de la presente memoria, por ejemplo, para su uso en inmunoterapia adoptiva tal como para tratar el cáncer. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas generalmente incluyen uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales. En algunas realizaciones, la composición incluye al menos un agente terapéutico adicional.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en ella sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administrará la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante. Los vehículos se describen, p. ej., en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980). En algunas realizaciones, la elección del vehículo está determinada en parte por la célula particular y/o por el método de administración.

Los conservantes adecuados incluyen, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. En algunas realizaciones, se usa una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o mezclas de los mismos están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 2 % en peso de la composición total.

Los agentes tamponadores adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y varios otros ácidos y sales. En algunas realizaciones, se usa una mezcla de dos o más agentes tamponadores. El agente tamponador o mezclas de los mismos están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 4 % en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Los métodos ejemplares se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21^a edición (1 de mayo, 2005).

La composición farmacéutica en algunas realizaciones contiene las células en cantidades efectivas para tratar o prevenir la enfermedad o afección, tal como una cantidad terapéuticamente efectiva o profilácticamente efectiva. La eficacia terapéutica o profiláctica en algunas realizaciones se monitoriza mediante la evaluación periódica de los sujetos tratados. La dosificación deseada puede administrarse mediante la administración en bolo único de las células, mediante administraciones en bolo múltiple de las células o mediante la administración por infusión continua de las células.

Las células y las composiciones se pueden administrar usando técnicas, formulaciones y/o dispositivos de administración estándar. La administración de las células puede ser autóloga o heteróloga. Por ejemplo, las células o progenitores inmunosensibles pueden obtenerse de un sujeto y administrarse al mismo sujeto o a un sujeto compatible diferente. Las células inmunosensibles derivadas de sangre periférica o su progenie (p. ej., derivadas in vivo, ex vivo o in vitro) pueden administrarse mediante inyección localizada, incluida la administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica (p. ej., una composición farmacéutica que contiene una célula inmunosensible modificada

genéticamente), generalmente se formulará en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, emulsión).

5 Las composiciones en algunas realizaciones se proporcionan como preparaciones líquidas estériles, p. ej., soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que en algunas realizaciones pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando las células en un disolvente, tal como mezcladas con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (p. ej., metilcelulosa), agentes tamponadores del pH, aditivos gelificantes o que mejoran la viscosidad, conservantes, agentes saborizantes y/o colorantes, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Los textos estándar pueden consultarse en algunas realizaciones para preparar preparaciones adecuadas.

Pueden añadirse varios aditivos que mejoran la estabilidad y esterilidad de las composiciones, incluidos conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones.

15 La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol y ácido sórbico. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las formulaciones que se van a usar para la administración in vivo son generalmente estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, p. ej., mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

20 Las enfermedades o trastornos adecuados para ser tratados por los métodos de la presente memoria incluyen tumores, incluidos tumores sólidos, malignidades hematológicas y melanomas, y enfermedades infecciosas, tales como infección por un virus u otro patógeno, p. ej., VIH, VHC, VHB, CMV y enfermedades parasitarias. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es un tumor, cáncer, malignidad, neoplasia u otra enfermedad o trastorno proliferativo. Dichas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad o condición que es un cáncer o tumor, que puede ser leucemia, linfoma, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma no de Hodgkin, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, linfoma folicular refractario, linfoma de células del manto, linfoma indolente de células B, malignidades de células B, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de melanoma, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cánceres epiteliales, carcinoma de células renales, adenocarcinoma pancreático, linfoma de Hodgkin, carcinoma de cuello uterino, cáncer colorrectal, glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, meduloblastoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial y/o mesotelioma.

35 En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno está asociado con un antígeno seleccionado del grupo que consiste en receptor huérfano de tirosina quinasa ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA y antígeno de superficie de hepatitis B, anti-receptor de folato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD276, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHa2, ErbB2, 3 o 4, FBP, receptor fetal de acetilcolina e, GD2, GD3, HMW- MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión celular L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, ROR1, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de la próstata, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, efrinaB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 y MAGE A3 y/o moléculas biotiniladas y/o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno pueden estar asociados con células que expresan CD19, BCMA, Integrina α V β 6, MUC1, EGFRvIII, HER2, EGFR, GD2 y/o Mesotelina.

45 Para la prevención o tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada puede depender del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de células o receptores recombinantes, la gravedad y evolución de la enfermedad, si las células se administran con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del sujeto y la respuesta a las células, y la discreción del médico tratante. En algunas realizaciones, las composiciones y las células se administran adecuadamente al sujeto en un momento o durante una serie de tratamientos.

50 Las células se pueden administrar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por infusión en bolo, por inyección, p. ej., inyecciones intravenosas o subcutáneas, inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección trans-septal, inyección subescleral, inyección intracoroidea, inyección intracameral, inyección subconjuntival, inyección subconjuntival, inyección sub-Tenon, inyección retrobulbar, inyección peribulbar o administración yuxtaescleral posterior. En algunas realizaciones, se administran por vía parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea.

55 En algunas realizaciones, las células se administran como parte de un tratamiento de combinación, tal como de forma simultánea o secuencial con, en cualquier orden, otra intervención terapéutica, tal como un anticuerpo o una célula modificada por ingeniería o un receptor o agente, tal como un agente citotóxico o terapéutico. Las células en algunas realizaciones se coadministran con uno o más agentes terapéuticos adicionales o en conexión con otra intervención terapéutica, ya sea de forma simultánea o secuencial en cualquier orden. En algunos contextos, las células se

coadministran con otra terapia lo suficientemente próxima en el tiempo como para que las poblaciones de células potencien el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunas realizaciones, las células se administran antes que uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, las células se administran después de uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, el uno o más agentes adicionales incluyen una citoquina, tal como IL-2, por ejemplo, para mejorar la persistencia. En algunas realizaciones, los métodos comprenden la administración de un agente quimioterapéutico.

Después de la administración de las células, la actividad biológica de las poblaciones de células modificadas por ingeniería en algunas realizaciones se puede medir, p. ej., mediante cualquiera de varios métodos conocidos. Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de una célula T natural o diseñada por ingeniería u otra célula inmune al antígeno, in vivo, p. ej., mediante imagenología, o ex vivo, p. ej., mediante ELISA o citometría de flujo. En determinadas realizaciones, la capacidad de las células modificadas por ingeniería para destruir las células diana se puede medir usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como los ensayos de citotoxicidad descritos, por ejemplo, en Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009), y Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). En ciertas realizaciones, la actividad biológica de las células se mide analizando la expresión y/o secreción de una o más citoquinas, tales como CD107a, IFN γ , IL-2 y TNF. En algunas realizaciones, la actividad biológica se mide evaluando el resultado clínico, tal como la reducción de la carga o carga tumoral.

En ciertas realizaciones, las células modificadas por ingeniería se modifican adicionalmente de varias formas, de manera que se aumenta su eficacia terapéutica o profiláctica. Por ejemplo, el CAR o TCR modificado por ingeniería expresado por la población se puede conjugar directa o indirectamente a través de un conector a un resto de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos, p. ej., el CAR o el TCR, con restos de direccionamiento es conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Wadwa et al., *J. Drug Targeting* 3: 111 (1995), y la Patente de EE. UU. 5.087.616.

Definiciones

El término "aproximadamente" tal y como se usa en la presente memoria se refiere al rango de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente memoria incluye (y describe) realizaciones que están dirigidas a ese valor o parámetro per se.

Tal y como se usa en la presente memoria, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, "un" o "una" significa "al menos uno" o "uno o más".

A lo largo de esta divulgación, varias realizaciones de la materia reivindicada se presentan en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la materia reivindicada. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un rango ha divulgado específicamente todos los posibles subrangos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese rango establecido, está incluido dentro de la materia reivindicada. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños, y también están abarcados dentro de la materia reivindicada, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango establecido incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la materia reivindicada. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango. Para abreviar, tal y como se usa en la presente memoria, cuando el término "al menos aproximadamente", "aproximadamente" o similar va seguido de una serie de números, debe entenderse que cada uno de estos números está precedido por dicho término. Por ejemplo, al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 % u 80 % debe entenderse como al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 % o al menos aproximadamente un 80 %. También por brevedad, el símbolo "%" puede omitirse a veces cuando es obvio por el contexto que se pretende el mismo denominador. Por ejemplo, cuando se describen porcentajes, aproximadamente un 50, 60, ... o 90 % debe entenderse como aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, ... o aproximadamente un 90 %.

Tal y como se usa en la presente memoria, "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" y "porcentaje de identidad" cuando se usa con respecto a una secuencia de aminoácidos (secuencia polipeptídica de referencia) se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata (p. ej., un mutante de estreptavidina) que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando software disponible públicamente tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluidos cualesquiera algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando.

Los cálculos de homología o identidad de secuencia entre dos secuencias (los términos se usan indistintamente en la presente memoria) se realizan como sigue. Las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (p. ej., se pueden introducir huecos en uno o ambos de una primera y segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas se pueden descartar para fines de comparación). La alineación óptima se determina como la mejor puntuación usando el programa GAP en el paquete de software GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4 y una penalización por hueco de cambio de marco de 5. Posteriormente, se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

Una sustitución de aminoácidos puede incluir el reemplazo de un aminoácido en un polipéptido por otro aminoácido. Los aminoácidos generalmente se pueden agrupar de acuerdo con las siguientes propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófoba: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, He;
- (2) hidrófila neutra: Cys, Ser, Thr, Asn, Gin;
- (3) ácida: Asp, Glu;
- (4) básica: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromática: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones de aminoácidos no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

"Unión de extremos no homólogos" o "NHEJ", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a reparación mediada por ligación y/o reparación no mediada por molde que incluye, p. ej., NHEJ canónica (cNHEJ), NHEJ alternativa (altNHEJ), unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ), hibridación de cadena única (SSA) y unión de extremos mediada por microhomología dependiente de síntesis (SD-MMEJ).

Una "molécula de ARNg" se refiere a un ácido nucleico que promueve el direccionamiento específico o el guiado de un complejo de molécula de ARNg/molécula de Cas9 a un ácido nucleico diana, tal como un locus en el ADN genómico de una célula.

"Reemplazo" o "reemplazado", tal y como se usa en la presente memoria con referencia a una modificación de una molécula, no requiere una limitación del proceso, sino que simplemente indica que la entidad de reemplazo está presente.

Tal y como se usa en la presente memoria, un sujeto incluye cualquier organismo vivo, tales como seres humanos y otros mamíferos. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos y animales no humanos, incluidos animales de granja, animales deportivos, roedores y mascotas. El término incluye, pero no se limita a, mamíferos (p. ej., seres humanos, otros primates, cerdos, roedores (p. ej., ratones y ratas o hámsteres), conejos, conejillos de indias, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras). En una realización, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto son aves de corral.

Tal y como se usa en la presente memoria, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos, sustancias o compuestos, incluidas las células. Puede ser una solución, suspensión, líquido, polvo, pasta, acuoso, no acuoso o cualquier combinación de los mismos.

Tal y como se usa en la presente memoria, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la mejora o reducción completa o parcial de una enfermedad o afección o trastorno, o un síntoma, efecto adverso o resultado, o fenotipo asociado con ello. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad y la remisión o pronóstico mejorado. Los términos no implican la curación completa de una enfermedad o la eliminación completa de cualquier síntoma o efecto(s) en todos los síntomas o resultados.

"Prevenir", tal y como se usa en la presente memoria, incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o recurrencia de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que aún no ha sido diagnosticado con la enfermedad. En algunas realizaciones, las células y composiciones proporcionadas se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

Tal y como se usa en la presente memoria, "suprimir" una función o actividad es reducir la función o actividad en comparación con las mismas condiciones excepto por una condición o parámetro de interés, o alternativamente, en comparación con otra condición. Por ejemplo, las células que suprimen el crecimiento del tumor reducen la tasa de crecimiento del tumor en comparación con la tasa de crecimiento del tumor en ausencia de células.

- 5 Una "cantidad efectiva" de un agente, p. ej., una formulación farmacéutica, células o composición, en el contexto de la administración, se refiere a una cantidad efectiva, en las dosificaciones/cantidades y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado deseado, tal como como un resultado terapéutico o profiláctico.

10 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un agente, p. ej., una formulación farmacéutica o células, se refiere a una cantidad efectiva, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado, tal como para el tratamiento de una enfermedad, afección, o trastorno, y/o efecto farmacocinético o farmacodinámico del tratamiento. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto y las poblaciones de células administradas. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados implican la administración de células y/o composiciones en cantidades efectivas, p. ej., cantidades terapéuticamente efectivas.

15 Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva. En el contexto de una menor carga tumoral, la cantidad profilácticamente efectiva en algunas realizaciones será mayor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, "enriquecer" cuando se refiere a uno o más tipos de células o poblaciones de células en particular, se refiere a aumentar el número o porcentaje del tipo de células o población, p. ej., en comparación con el número total de células en o el volumen de la composición. o en relación con otros tipos de células, tal como por selección positiva basada en marcadores expresados por la población o célula, o por selección negativa basada en un marcador no presente en la población celular o célula que se va a deplecionar. El término no requiere la eliminación completa de otras células, tipos de células o poblaciones de la composición y no requiere que las células así enriquecidas estén presentes al o incluso cerca del 100 % en la composición enriquecida.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, una afirmación de que una célula o población de células es "positiva" para un marcador particular se refiere a la presencia detectable sobre o dentro de la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la presencia de expresión superficial detectada por citometría de flujo, por ejemplo, por tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detección de dicho anticuerpo, en donde la tinción es detectable por citometría de flujo en un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada al llevar a cabo el mismo procedimiento con un control de coincidencia de isotipo o un control de selección de fluorescencia menos uno (FMO) en condiciones idénticas y/o a un nivel sustancialmente similar al de las células que se sabe que son positivas para el marcador, y/o a un nivel sustancialmente más alto que el de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, una afirmación de que una célula o población de células es "negativa" para un marcador particular se refiere a la ausencia de la presencia detectable sustancial sobre o dentro de la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la ausencia de expresión superficial detectada por citometría de flujo, por ejemplo, por tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detección de dicho anticuerpo, en donde la tinción no es detectable por citometría de flujo en un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada al llevar a cabo el mismo procedimiento con un control de coincidencia de isotipo o un control de selección de fluorescencia menos uno (FMO) en condiciones idénticas y/o a un nivel sustancialmente más bajo al de las células que se sabe que son positivas para el marcador, y/o a un nivel sustancialmente similar en comparación con el de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

35 El término "vector", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se refieren en la presente memoria como "vectores de expresión".

40 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos o terminología técnica y científica usados en la presente memoria pretenden tener el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece la materia reivindicada. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en la presente memoria para mayor claridad y/o para facilitar la referencia, y la inclusión de dichas definiciones en la presente memoria no debe interpretarse necesariamente como que representan una diferencia sustancial sobre lo que generalmente se entiende en la técnica.

EJEMPLOS

5 Las realizaciones ejemplares de la presente divulgación se describirán con más detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos. Aunque las realizaciones ejemplares de la presente divulgación se muestran en los dibujos, debe entenderse que la divulgación puede realizarse de varias formas y no debe estar limitada por las realizaciones mostradas en la presente memoria. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación se entienda mejor y el alcance de la divulgación pueda transmitirse completamente a los expertos en la técnica.

EJEMPLOS**Métodos Generales y Material**

10 Los reactivos usados para los Ejemplos de la presente memoria generalmente están disponibles comercialmente o pueden prepararse mediante técnicas estándar en la técnica. Por ejemplo, los diversos anticuerpos usados para los ejemplos están disponibles comercialmente como sigue:

REACTIVO o RECURSO	FUENTE	IDENTIFICADOR
Anticuerpos		
HPK1, mAb de conejo	Cell Signaling Technology	4472
PD-1 (D4W2J), mAb de conejo	Cell Signaling Technology	86163
β-actina (13E5), mAb de conejo	Cell Signaling Technology	4970
Ultra-LEAF™ Anticuerpo anti-CD3 humano purificado	Biolegend	317326
Ultra-LEAF™ Anticuerpo anti-CD28 humano purificado	Biolegend	302934
Anexina V, PE/Cy7	Biolegend	640949
Anti-IgG de Conejo de Cabra, FITC	BD Biosciences	554020
CD3, eFlour 660 (clon OKT3)	eBioscience	50-0037-42
TIM-3, FITC (clon F38-2E2)	eBioscience	11-3109-41
PD-1, APC-eFlour 780 (clon eBioJ105)	eBioscience	47-2279-42
LAG-3, PE (clon 3DS223H)	eBioscience	12-2239-42
CD107a, APC (clon H4A3)	eBioscience	328619
CD62L, PE-eFluor 610 (clon DREG-56)	eBioscience	61-0629-42
CD45RO, eFluor 450 (clon UCHL1)	eBioscience	48-0457-42
Etiqueta de anticuerpo THETM NWSHPQFEK, FITC	GeneScript	A01736-100
CD269, PE/Cy7 (clon 19F2)	Biolegend	357508
CFSE	BD Biosciences	565082

15 **Líneas celulares:** Las líneas celulares Raji, Daudi, K562, U266, RPMI8226 y células Jurkat se cultivaron en RPMI 1640 y 293T se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % en un incubador con CO₂ al 5 % a 37 °C. Se cultivaron PBMC humanas en X-VIVO15 en un incubador con CO₂ al 5 % a 37 °C.

Producción y transducción de vectores lentivirales: Se produjeron sobrenadantes lentivirales que codifican CAR CD19, CAR Her2 y CAR BCMA mediante transfección transitoria de la línea celular lenti-293T. Brevemente, las células lenti-293T se transfectaron mediante Lipofectamina 2000 (Life Technologies) con los plásmidos que codifican las CAR y la proteína de la cubierta del Lentivirus. Los sobrenadantes se recogieron 48 y 72 h después de la transfección.

20 **Aislamiento y modificación de células T:** Las células T humanas se activaron y transdujeron como se ha descrito previamente. Brevemente, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre periférica de donantes sanos o leucopacks (hospital de xijing). Todos los experimentos se realizaron de conformidad con todas las regulaciones éticas pertinentes y de acuerdo con IRB 095091. Las PBMC se activaron con 5 µg/ml de anticuerpo de CD3, 3 µg/ml de anticuerpo de CD28 y 100 UI/ml de IL-2 durante 2 d antes de la transducción. Las células T de ratón se aislaron mecánicamente de los bazos y se activaron usando IL-2 y 5 µg/ml de anticuerpo de CD3, 3 µg/ml de

25

anticuerpo de CD28. La transducción se logró mediante la centrifugación de las PBMC activadas y el sobrenadante retroviral en placas recubiertas con RetroNectin durante 3 días consecutivos (TakaraBio).

Transcripción in vitro de ARNm y purificación de proteína Cas9: Se usó el kit de sistemas T7 mscript (Ambion) para generar ARN de transcripción in vitro. Purificación de la proteína Cas9: el gen Cas9 se clonó en un plásmido pGEX4T-1 (Invitrogen) siguiendo un procedimiento conocido. El plásmido pGEX4T-1-Cas9 se construyó usando un kit de clonación de una sola etapa (vazyme). Las proteínas se expresaron en *E. coli* BL21 Rosetta 2 (DE3). Los cultivos (2 L) se cultivaron a 37 °C en medio Caldo Terrific que contenía 50 µg/ml de kanamicina y 34 µg/ml de cloranfenicol hasta que la A600 alcanzó 0,6. Los cultivos se suplementaron con isopropil-1-tio-β-d-galactopiranosido 0,2 mM y se continuó la incubación durante 16 h a 16 °C con agitación constante. Las células se recogieron por centrifugación y los sedimentos se almacenaron a -80 °C. Todas las etapas posteriores se realizaron a 4 °C. Las bacterias descongeladas se resuspendieron en 30 ml de tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, Li₂SO₄ 200 mM, imidazol 10 mM) suplementado con una tableta completa de inhibidor de proteasa libre de EDTA (Roche). Se añadió Tritón X-100 a concentraciones finales del 0,1 %. Después de 30 min, el lisado se sonicó para reducir la viscosidad. El material insoluble se eliminó por centrifugación durante 1 h a 17.000 rpm en un rotor Beckman JA-3050. El extracto soluble se unió por lotes para mezclado durante 1 h con 5 ml de resina de agarosa con ácido nitrilotriacético Ni²⁺ (Qiagen) que se había equilibrado previamente con el tampón A. La resina se recuperó por centrifugación y luego se lavó abundantemente con el tampón A. La proteína unida se eluyó por etapas con alícuotas de tampón IMAC (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 250 mM, glicerol al 10 %) que contenía concentraciones crecientes de imidazol. Los eluatos de imidazol 200 mM que contenían el polipéptido Cas9 etiquetado con His6-MBP se agruparon. La etiqueta de afinidad His6-MBP se eliminó mediante escisión con proteasa TEV durante la diálisis de toda la noche frente a Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol al 10 %. La proteína Cas9 sin etiqueta se separó de la etiqueta de fusión usando una columna SP Sepharose HiTrap de 5 ml (GE Life Sciences). La proteína se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando un Superdex 200 10/300 GL en Tris HCl 20 mM pH 7,5, KCl 150 mM, TCEP 1 mM y glicerol al 5 %. El pico de elución de la exclusión por tamaño se dividió en alícuotas, se congeló y se mantuvo a -80 °C.

Direccionamiento génico: 48 h después de iniciar la activación de las células T, y las células T se transfectaron mediante electrotransferencia de proteína Cas9 y ARNg usando un BTX EM830 (Harvard Apparatus BTX). Se mezclaron 1×10⁶ células con 3 µg de Cas9 y 2 µg de ARNg en una cubeta de 0,2 cm. Después de la electroporación, las células se diluyeron en medio de cultivo y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se añadió CAR-Lentivirus al cultivo de 2 a 4 h después de la electroporación, a la multiplicidad de infección indicada (rango de 1×10⁵ a 1×10⁶). Posteriormente, las células editadas se cultivaron usando condiciones estándar (37 °C y se expandieron en medio de crecimiento de células T, reabastecidas según fuera necesario para mantener una densidad de ~1 × 10⁶ células por ml cada 2 o 3 días).

Estudios en ratones in vivo: Los ratones NOD-SCIDg/(NSG) se pueden obtener de Charles River Laboratories, China. Todos los ratones se alojaron de acuerdo con las directrices del centro de investigación de animales de laboratorio de la Universidad de Tsinghua y el Comité de Cuidado y Uso de Animales. Todos los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y se cuidaron de acuerdo con las políticas y la certificación de la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio.

Imagenología por bioluminiscencia in vivo: Se inyectó D-luciferina (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.) suspendida en PBS (15 mg/ml) (150 mg/kg) i.p. 5 min antes de las adquisiciones. Las imágenes de bioluminiscencia se recogieron en un Sistema de Imagenología de Espectro IVIS Xenogen (Xenogen, Alameda, CA, EE. UU.). Se usó el software Living Image versión 3.0 (Xenogen) para adquirir y cuantificar los conjuntos de datos de imagenología por bioluminiscencia.

Citometría de flujo: Los tumores separados de los ratones se picaron con tijeras y luego se digirieron con un Kit de Disociación de Tumores y se trituraron usando gentleMACS (Miltenyi Biotec) para generar suspensiones de células individuales. Las células de los bazo se aislaron triturando los bazo a través de filtros de 70 µm. Las células se lavaron y luego se tiñeron con anticuerpos durante 15 min en la oscuridad y luego se detectaron por citometría de flujo. Para la tinción intracelular, las células se permeabilizaron aún más usando un kit de Fijación y Permeabilización (BD Bioscience) y se tiñeron con anticuerpos. Todas las muestras se analizaron con un LSR Fortessa o FACS Ariall (BD Bioscience) y los datos se analizaron usando el software FlowJo. Las CAR CD19 se detectaron con el Anticuerpo de Etiqueta THETM NWSHPQFEK, FITC y el anticuerpo de CD3 humano. Las CAR Her2 y BCMA CAR se detectaron con proteína L biotinilada (Pierce Protein Biology) y anticuerpo de CD3 humano. Todos los gráficos FACS que presentaban datos de fenotipo de células CAR T se realizaron en células CAR+ clasificadas. Para las células T transducidas de forma simulada, se usaron poblaciones de células T completas para el análisis.

Ensayos de citotoxicidad de células CAR-T humanas: La capacidad de las células CAR-T para matar dianas se ensayó en un Ensayo de Citotoxicidad no Radiactivo CytoTox 96[®] de 12 h. Las células T transducidas y las células T UTD se descongelaron y se dejaron en reposo durante 24 h a 37 °C en una placa de 6 pocillos en medio de células T. Los efectores y las dianas se mezclaron entre sí en las relaciones indicadas de efector:diana (E:T) y se cultivaron en placas de fondo plano de 96 pocillos de pared negra con 3 × 10⁴ células diana en un volumen total de 200 µl por pocillo en medio de células T. Después de 12 h, transferir alícuotas de 50 µl de todos los pocillos de ensayo y de control a una placa de fondo transparente plana de 96 pocillos nueva, y se añadieron 50 µl del reactivo CytoTox 96[®]

(Promega) a cada alícuota de muestra. Cubra la placa con papel aluminio o una caja opaca para protegerla de la luz e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente. Añada 50 µl de Solución de Parada a cada pocillo de la placa de 96 pocillos, por último, haga estallar las burbujas grandes con una aguja de jeringa y registre la absorbancia a 490nm o 492nm en 1 hora después de añadir la Solución de Parada. Use los valores corregidos en la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de citotoxicidad: Porcentaje de citotoxicidad = 100 × Liberación Experimental de LDH (DO490) / Liberación Máxima de LDH (DO490).

Ensayos ELISA: Las células diana se lavaron y suspendieron a 110⁶ células/mL en medio x-vivo15. Cabe destacar que se añadieron 100 mL de cada tipo de célula diana por triplicado a una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Corning). Las células T efectoras se lavaron y se resuspendieron a 1 10⁶ células/mL en medio x-vivo15 y luego se combinaron 100 mL de células T con células diana en los pocillos indicados. Las placas se incubaron a 37 °C durante 6 a 12 horas. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante y se sometió a un ensayo ELISA (eBioscience).

Todos los ratones fueron sacrificados por eutanasia; se recogió sangre completa y se dejó coagular durante 1 h a temperatura ambiente. Los sueros se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm y se almacenaron congelados (-80 °C). El ensayo Luminex para interleuquina 2 (IL-2), IFN-γ, TNF-α, IL-6 e IL-10 se realizó de acuerdo con las instrucciones del producto del kit de ensayo Luminex (R&D Systems).

Transferencia Western: Se generaron lisados de células completas de células CAR T mediante la lisis de 5 × 10⁶ células lavadas en 150 µl de tampón RIPA (PBS, NP40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,5 %, dodecilsulfato de sodio al 0,1 % [SDS]) con 1X Cóctel Inhibidor de Proteasa/Fosfatasa (CST) y vanadato de sodio 0,5 mM (New England BioLabs) y luego se incubó durante 30 min en hielo. Las muestras se sonicaron a 4 °C durante 5 min para cortar el ADN. Se realizaron entonces transferencias Western en sobrenadantes de muestras centrifugadas, usando un anticuerpo anti-HPK1 o un anticuerpo primario anti-PD-1.

Ejemplo 1. Diseño y Síntesis de ARNg

1. Diseño de ARN Guía

El plásmido cargado con ARNg fue pUC57kan-T7-ARNg, y se diseñó el ARNg dirigido a HPK1, y el ARNg dirigido a PD1 se usó como control. La secuencia del ARNg que se dirige específicamente a HPK1 que está emparejado con el genoma es GACCTGGTGGCACTGAAGA (localizado en el segundo exón de HPK1, SEQ ID NO: 1); y la secuencia del ARNg dirigido específicamente a PD1 que se empareja con el genoma es GGCCAGGATGGTTCTTAGGT (localizado en el primer exón de PD1, SEQ ID NO: 2).

ARNg de HPK1: F: 5'-TAGG GACCTGGTGGCACTGAAGA -3' (SEQ ID NO: 3)

R: 5'-AAAC TCTTCAGTGCCACCAGGTC-3' (SEQ ID NO: 4)

ARNg de PD1: F: 5'-TAGG GGCCAGGATGGTTCTTAGGT -3' (SEQ ID NO: 5)

R: 5'-AAAC ACCTAAGAACCATCCTGGCC-3' (SEQ ID NO:6).

Se sintetizaron la cadena de codificación de ARNg y la cadena complementaria, el molde de ADN bicatenario se formó hibridando las dos cadenas de ADN de ARNg de HPK1 y ARNg de PD1, que se insertó en el vector del plásmido pUC57 bajo el control del promotor T7 para construir pUC57kan-T7-HPK1ARNg y pUC57kan-T7-PD1ARNg, que contiene el promotor T7, la secuencia de direccionamiento de ARNg y el soporte químico de ARNg.

2. Transcripción in vitro de ARN Guía a ARN Mensajero

Los plásmidos correctos pUC57kan-T7-HPK1ARNg y pUC57kan-T7-PD1ARNg verificados con secuenciación se digirieron con Dral para obtener un molde de transcripción de ARNg y luego se realizó la purificación del molde de transcripción de ARNg usando un kit de purificación. El producto purificado se sometió a la transcripción in vitro de HPK1ARNg/HPK1ARNg usando el kit de transcripción T7RNakit (Ambion_mMESSAGE_mMA-CHINE_T7) y el producto de transcripción se purificó usando un kit de purificación de ARN (MEGAclean™ ki, Ambión). El ARNg purificado se identificó mediante electroforesis en gel de agarosa y los resultados se muestran en la Figura 1. La concentración y la pureza del ARNg se detectaron con el espectrofotómetro ultramicro NanoDrop 2000, y el ARNg se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C para su uso.

Se diseñaron, sintetizaron y purificaron ARNg adicionales. Estos ARNg tienen secuencias que se dirigen a las siguientes secuencias diana en el gen HPK-1:

Secuencia del Dominio Diana	Localización en el gen HPK-1 humano
SEQ ID NO: 11_GCTCGAGACAAGGTGTCAG	Segundo exón
SEQ ID NO: 12_AAGGTGTCAGGGGACCTGG	Segundo exón
SEQ ID NO: 13ACCACTATGACCTGCTACAG	Primer exón

Secuencia del Dominio Diana	Localización en el gen HPK-1 humano
SEQ ID NO: 14_GACCTGCTACAGCGGCTGGG	Primer exón
SEQ ID NO: 15 GCTGGGTGGCGGCACGTATG	Primer exón

Estos ARNg pueden usarse en algunos ejemplos en sustitución del ARNg dirigido a la SEQ ID NO: 1 como se describió anteriormente. La Figura 25 muestra una eficiencia de edición del gen HPK-1 representativa usando cada uno de estos ARNg, ensayados por el método del Ejemplo 4. En la Figura 25, NC es el control, 3# muestra los resultados de ARNg dirigidos a la SEQ ID NO: 15; 4# muestra los resultados de ARNg dirigidos a la SEQ ID NO: 11; 5# muestra los resultados de ARNg dirigidos a la SEQ ID NO: 12; 6# muestra los resultados de ARNg dirigidos a la SEQ ID NO: 1; 1# muestra los resultados de ARNg dirigidos a la SEQ ID NO: 13; y 2# muestra los resultados de ARNg dirigidos a la SEQ ID NO: 14.

Ejemplo 2. Expresión Recombinante y Purificación de la Proteína Cas9

Se preparó un Cas9 humanizado de acuerdo con el procedimiento reportado en la bibliografía (las secuencias se proporcionan en las SEQ ID NO: 18 y 19). Chang, N. *et al.*, *Cell Research* 23: 465-472 (2013), incluida la Secuencia del ADNc de Cas9 humanizado con codones optimizados y la secuencia de proteína reportada en el mismo. Brevemente, el plásmido para cargar Cas9 fue PGEX4T-1, y el ADNc de cas9 humano de longitud completa con codones optimizados se obtuvo mediante PCR. El molde fue el plásmido PUC19-T7-CAS9. Las señales de localización nuclear (NLS) se añadieron a los extremos 5' y 3' de la secuencia de Cas9 para facilitar la importación nuclear de la proteína cas9.

Después de que el plásmido se construyó con éxito, la proteína CAS9 se expresó mediante *E. coli*, se purificó por columna GST, y la proteína se concentró y recogió, y la etiqueta GST se escindió con trombina, y se observó una sola banda de proteína alrededor de la banda de 160 kd (Fig. 2).

Ejemplo 3. Expansión y transfección in vitro de células mononucleares de sangre periférica humana

Se extrajeron células mononucleares de sangre periférica humana mediante centrifugación y método de separación rápida usando Ficoll® solución de metrizoato de sodio. Las células mononucleares de sangre periférica positivas para CD3 se separaron con perlas magnéticas de CD3, las células T se activaron con el anticuerpo de CD3/28 y la transfección del virus y la electroporación de las células se realizaron después de 2 días de cultivo en el medio LONZA-X-VIVO 15 que contiene 100 U/ml de IL-2 en condiciones de 37 °C/CO₂ al 5 %.

La proteína cas9 y el ARNm de ARNg se mezclaron en cierta proporción y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, mientras tanto, se transfirieron 4,0×10⁶ células T CD3+ (activadas in vitro con anticuerpo de CD3/CD28 durante 48 horas) a un tubo de centrifuga de 15 ml. Las células se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos y se resuspendieron con 400 ul de medio óptimo (que contenía la mezcla de cas9 y ARNg). La mezcla de células se transfirió a una cubeta BTX con un hueco de 4 mm, se colocó en hielo durante 10 minutos y la cubeta se colocó en un electroporador BTX Gemini X2 para la electrotransformación. La condición de electrotransformación es de 500V y 1ms. Inmediatamente después de finalizar la electroporación, la suspensión celular se añadió a un medio (LONZA-X-VIVO 15) que contenía IL-2 (100 UI/ml) precalentado a 37 °C. 4 horas después de la electrotransformación, se añadió el virus portador de CAR CD19 de origen humano con un valor de MOI de 10, y se añadió polibreno al medio con una concentración final de 10 mg/ml. 24 horas después de añadir el virus, se intercambié el medio y luego se realizó el subcultivo de las células en días alternos.

Ejemplo 4. Identificación de la eficiencia de inactivación génica mediante digestión enzimática (Ensayo T7E1)

Después de 3 días de electrotransformación celular, se recogieron las células y se extrajo el genoma celular. Se amplificó mediante PCR un fragmento de ADN que tenía un sitio de mutación (un sitio diana de CRISPR/Cas9). Se diseñaron dos pares de cebadores 1# y 2#, en donde se usaron cebadores 1# para amplificar por PCR el genoma celular transformado con HPK1ARNg, y se usaron cebadores 2# para amplificar por PCR el genoma celular transformado con PD1ARNg. Los dos pares de secuencias de cebadores son los siguientes:

1#: F:5'-agcgagagtggaggggg-3'(SEQ ID NO:7)

R:5'-ttcatcaccagagataactccc-3'(SEQ ID NO:8)

2#: F:5'-ccacctctccccagtcctacccccctctcaccctct-3'(SEQ ID NO:9)

R:5'-ggctccctccagaccctcctccgggaccctgggctgc-3'(SEQ ID NO:10)

El producto de PCR obtenido por amplificación se somete a un tratamiento de desnaturalización por calor, hibridación y renaturalización usando un instrumento de PCR, y el procedimiento de configuración es el siguiente:

95 °C 3 min,

85 °C 1,5 min (tasa de disminución de temperatura 0,1 °C/s),

75 °C 1,5 min (0,1 °C/s),

65 °C 1,5 min (0,1 °C/s)

25 °C 1,5 min (0,1 °C/s),

5 4 °C.

A la mezcla de productos de PCR tratada se le añadió endonucleasa 1 T7 (NEB), se dejó a 37 °C durante 15 minutos y se sometió a electroforesis en gel de agarosa (gel de agarosa al 2 %) para determinar la eficiencia de la digestión. Los resultados se muestran en la Fig. 3.

Ejemplo 5. Identificación de la eficiencia de inactivación génica mediante el método de transferencia Western

10 3 días después de la electrotransformación de las células, se recogieron las células, se extrajeron las proteínas celulares y se detectaron las expresiones de HPK1 y β-actina mediante transferencia Western. Los resultados se muestran en la Fig. 4. Las agrupaciones específicas se muestran en la siguiente tabla:

	Célula T	Célula T CD19+	Célula T CD19+ HPK1-/-	Célula T CD19+ PD1-/-
ARNg	-	-	HPK1ARNg (1#ARNg)	PD1ARNg (2#ARNg)
Proteína Cas9	-	-	+	+
Virus Car CD19	-	+	+	+

15 Las etapas de expansión in vitro, electrotransformación y transfección viral de células mononucleares de sangre periférica humana se detallan en el Ejemplo 3.

La Fig. 4 muestra que el nivel de expresión de HPK1 en las células T CAR19+HPK1+/- se reduce significativamente en comparación con las células T, las células T CAR19+ y las células T CAR19+PD1+/- . La Figura 26 muestra una cuantificación representativa de la eficiencia de inactivación medida por Transferencia Western.

Ejemplo 6. Detección de la eficiencia de transfección de CAR19 y la expresión de PD1 por citometría de flujo

20 7 días después de la transfección de las células con virus, se tomaron 1×10^6 células de cada grupo y se detectaron las expresiones de Car y HPK1 después de incubar con el anticuerpo a 4 °C protegidas de la luz. Los resultados se muestran en la Fig. 5. Las agrupaciones específicas se muestran en la siguiente tabla:

	Célula T	Célula T CD19+	Célula T CD19+ HPK1-/-	Célula T CD19+ PD1-/-
ARNg	-	-	HPK1ARNg (1#ARNg)	PD1ARNg (2#ARNg)
Proteína Cas9	-	-	+	+
Virus Car CD19	-	+	+	+

25 Las etapas de expansión in vitro, electrotransformación y transfección viral de células mononucleares de sangre periférica humana se detallan en el Ejemplo 3.

La Fig. 5 muestra que las expresiones del receptor PD1 en la superficie de las células T CAR19+HPK1+/- y las células T CAR19+PD1+/- se redujeron significativamente respecto a las de las células T CAR19 simples. Los niveles de expresión del receptor PD1 en la superficie de las células T CAR19+HPK1+/- y las células T CAR19+PD1+/- fueron similares, sin diferencias significativas.

30 Ejemplo 7. Experimento de muerte por células T

35 Las células efectoras son células T CD3+ humanas transfectadas mediante la electrotransformación y la transfección de virus anteriores, y las células diana son líneas celulares de linfoma maligno humano Raji, Daudi, K562, respectivamente. Se sembraron 100 µl de las células diana en placas de 96 pocillos, y después de 24 horas, se añadieron 100 µl de células efectoras (1×10^6 células/ml) y se hicieron 3 réplicas de pocillos para cada muestra. El sobrenadante se recogió incubando las células durante 12 h en un incubador con CO₂ a 37 °C con una fracción de volumen del 5 %. El contenido de lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante celular se midió usando un Kit de

Ensayo de Muerte Celular no Radiactivo CytoTox 96® de promega. Después de agitar durante 5 minutos en el microoscilador, se detectó por un lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm y la función de muerte celular se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = \frac{\text{Experimental} - \text{Espontánea Efector} - \text{Espontánea Diana} \times 100}{\text{Máxima Diana} - \text{Espontánea Diana}}$$

5 Las agrupaciones específicas se muestran en la siguiente tabla:

	Célula T	Célula T CD19+	Célula T CD19+ HPK1-/-	Célula T CD19+ PD1-/-
ARNg	-	-	HPK1ARNg (1#ARNg)	PD1ARNg (2#ARNg)
Proteína Cas9	-	-	+	+
Virus Car CD19	-	+	+	+

Las etapas de expansión in vitro, electrotransformación y transfección viral de células mononucleares de sangre periférica humana se detallan en el Ejemplo 3.

10 Los efectos de muerte de las células T en tres líneas celulares de linfoma maligno humano se muestran en la Fig. 6. En la Fig. 6, las células T CAR19+HPK1+/- tienen el mejor efecto de muerte en tres líneas celulares de linfoma maligno humano con casi todas las relaciones efector a diana (excepto para la línea celular K562 con una relación efector a diana de 5:1). Para las líneas celulares Raji y Daudi, en las relaciones efector a diana de 1:1 y 5:1, el efecto de muerte de las células T CAR19+HPK1+/- es significativamente diferente al de otros grupos; y en la relación efector a diana de 10:1, el efecto de muerte de las células T CAR19+HPK1+/- es extremadamente significativamente diferente en comparación con los de otros grupos.

Ejemplo 8. Detección de citoquinas secretadas por las células T

Se cocultivaron células T CAR19+CD3+ humanas y tres células diana (Raji, Daudi, K562) durante 12 horas en una relación 2:1, y luego se recogió el sobrenadante y se detectó el contenido de IFN-γ y IL-2 en el sobrenadante usando el kit de detección Elisa de eBIOSCIENCE respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 7.

20 En la Fig. 7, el efecto de muerte de las células T CAR19+HPK1+/- en Raji y Daudi es superior al de los otros grupos. Los efectos de muerte de las células T CAR19+HPK1+/- y las células T CAR19+PD1+/- en Raji son extremadamente significativamente diferentes de los de los otros grupos. El efecto de muerte de las células T CAR19+HPK1+/- en Daudi es extremadamente significativamente diferente al de los otros grupos, y el efecto de muerte de las células T CAR19+PD1+/- en Daudi es significativamente diferente al de los otros grupos.

25 Ejemplo 9. Efecto de las células T en un modelo de ratón de linfoma humano

Animales de ensayo: ratones hembra NOD SCID. Todos los ratones se alojaron de acuerdo con las directrices del centro de investigación de animales de laboratorio de la Universidad de Tsinghua y el Comité de Cuidado y Uso de Animales. Todos los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y se cuidaron de acuerdo con las políticas y la certificación de la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio.

30 Método de ensayo: La Figura 12 muestra un esquema general de los estudios de animales *in vivo*. Brevemente, a ratones NOD-SCIDg/(NSG) de 6 a 10 semanas de edad se les inyectaron por vía subcutánea 1×10^6 células de tumores Raji en el flanco derecho en el día 0. Los ratones fueron tratados con 1×10^6 células T o células CAR-T CD19 a través de la vena de la cola en el día 4 después de la inoculación del tumor Raji de manera que ambos tumores tenían un volumen de aproximadamente 100 mm³. Los tumores se midieron cada 7 días. Los ratones que no tenían tumores visibles o palpables que pudieran medirse en días de medición consecutivos se consideraron como "regresiones completas". Los animales fueron sacrificados por eutanasia si mostraban signos de angustia o cuando el tamaño total del tumor alcanzaba 2.500 mm³.

40 Se dividieron aleatoriamente 40 ratones hembra NOD SCID en 6 grupos, 8 ratones en cada grupo. Cada grupo de ratones se inoculó con células Raji mediante inyección subcutánea para construir un modelo de ratón de linfoma humano. El grupo Ctrl fue un grupo de control en blanco y se usaron 200 μL de solución salina fisiológica en lugar de las células administradas. El grupo de tratamiento con células T fue un grupo de control negativo y las células administradas fueron 1×10^6 células T. Las células para administrar al grupo de tratamiento Car-T WT fueron 1×10^6 células CAR-T. Las células para administrar al grupo de tratamiento Car-T HPK1 KO fueron 1×10^6 células CAR-T HPK1-/. Las células para administrar al grupo de tratamiento Car-T PD1 KO fueron 1×10^6 células CAR-T PD1-/. Se administró a cada grupo de ratones una sola dosis.

(1) Medición del volumen tumoral

Los volúmenes tumorales de los ratones se midieron antes de la administración, y el diámetro largo y el diámetro corto de los tumores de los ratones se midieron dos veces por semana después de la administración, mediante lo que se calcularon y registraron los volúmenes tumorales. El volumen tumoral puede reflejar la proliferación del tumor en ratones. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor se midieron con un calibrador vernier: volumen del tumor (mm^3) = diámetro largo del tumor (mm) \times diámetro corto del tumor² (mm^2) \times 0,5. Se compararon las diferencias entre los diversos grupos de dosis y las diferencias entre cada grupo de dosis y el grupo de control negativo.

(2) Detección por imagenología in vivo

Los ratones se sometieron a detección por imagenología in vivo. Los ratones se afeitaron antes de la detección y se anestesiaron con inyección intraperitoneal de solución de pentobarbital sódico (15 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal). A cada grupo de ratones se le inyectó por vía intraperitoneal 200 μl de una solución de fluoresceína de 15 g/L y 5 minutos más tarde, se realizó la observación por imagenología in vivo.

(3) Ensayo de proliferación CAR-T

Se extrajo sangre periférica de los ratones antes de la administración y se midió el porcentaje de células positivas para CD3 en la sangre periférica de los ratones, y se extrajo sangre periférica de los ratones cada 10 días después de la administración para determinar las células positivas para CD3 en la sangre periférica de los ratones. La cantidad de células positivas para CD3 refleja la proliferación de células CAR-T en sangre periférica de ratones. El porcentaje de células positivas para CD3 en sangre periférica de ratones se determinó mediante citometría de flujo. Se cortó la vena de la cola del ratón con un bisturí quirúrgico para recoger sangre y se recogieron aproximadamente 100 μL de sangre periférica en un tubo EP de 1,5 ml que contenía 20 μL de solución anticoagulante EDTA 0,5 M. Después de mezclar concienzudamente, se añadieron 100 μL de PBS y se centrifugó a 400 g durante 5 min, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento con 1 mL de lisado de glóbulos rojos y se puso en un refrigerador a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 min para lisar completamente los glóbulos rojos. Después de centrifugar a 400 g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con 200 μL de PBS, se resuspendió en 200 μL de PBS, se mezcló concienzudamente y luego se detectó mediante citometría de flujo. Se compararon las diferencias entre los distintos grupos de dosis y las diferencias entre cada grupo de dosis y el grupo de control negativo.

(4) Determinación del fenotipo de las células CAR-T del tejido tumoral infiltrante

La expresión de PD1/Tim3/Lag3/CD107a/AnexinaV en células car-t que se infiltran en el tejido tumoral se detectó mediante citometría de flujo el día 28 después de la inoculación del tumor.

30 Resultados del ensayo

(1) Medición del volumen tumoral

La Fig. 8 muestra los volúmenes tumorales de cada grupo de ratones. Como se muestra en la Fig. 8, los volúmenes tumorales del grupo de tratamiento con Car-T WT, el grupo de tratamiento con Car-T HPK1 KO y el grupo de tratamiento con Car-T PD1 KO están todos reducidos en comparación con el grupo de tratamiento con células T, mientras que el volumen tumoral de los ratones en el grupo de tratamiento con Car-T HPK1 KO es el más pequeño.

(2) Detección por imagenología in vivo

La Fig. 9 muestra los resultados de la imagenología in vivo de cada grupo de ratones. En la Fig. 9 se puede ver que los efectos terapéuticos del grupo de tratamiento con Car-T WT, el grupo de tratamiento con Car-T HPK1 KO y el grupo de tratamiento con Car-T PD1 KO son mejores en comparación con los del grupo de tratamiento con células T, mientras que el efecto terapéutico de los ratones en el grupo de tratamiento con Car-T HPK1 KO es el mejor.

(3) Ensayo de proliferación de CAR-T

La Fig. 10 muestra los porcentajes de células CD19CART en sangre periférica de ratones después de la administración de ratones en cada grupo. Como se muestra en la Fig. 10, los porcentajes de células CART de sangre periférica en el grupo de tratamiento con Car-T WT, el grupo de tratamiento con Car-T HPK1 KO, el grupo de tratamiento con Car-T PD1 KO son todos mayores que los del grupo de tratamiento con células T, lo que indica que las células Car-T proliferan en ratones. Sin embargo, como se muestra en la Fig. 10, en el día 10, el número de células Car-T en los grupos de tratamiento con T PD1 KO y Car-T HPK1 KO es significativamente mayor que en el grupo de tratamiento con Car-T WT. Después de 20, 30 y 40 días de tratamiento, el número de células Car-T en la sangre periférica de los ratones en el grupo de tratamiento con Car-T WT y el grupo de tratamiento con Car-T PD1 KO disminuye significativamente en comparación con el de 10 días después del tratamiento. Aunque el número de células en el grupo de tratamiento con Car-T HPK1 KO está regulado a la baja, es significativamente mayor que el del grupo de tratamiento con Car-T WT y el grupo de tratamiento con Car-T PD1 KO.

(4) Detección del fenotipo y la función de las células CAR-T

La Fig. 11 muestra el fenotipo de las células Car-T en el tumor de los ratones 28 días después de la administración en cada grupo de ratones. Como se muestra en la Fig. 10, en los experimentos de muerte celular y apoptosis de células T, en comparación con el grupo de tratamiento con Car-T WT, el grupo de tratamiento con Car-T HPK1 KO exhibe menos apoptosis y una función de muerte mejorada, mientras que el grupo de tratamiento con Car-T PD1 KO no tiene una diferencia significativa en comparación con el grupo de tratamiento con Car-T WT. La molécula marcadora de superficie PD1/Tim3/Lag3 de depleción de las células T está significativamente regulada a la baja en el grupo de tratamiento con Car-T HPK1 KO en comparación con el grupo de tratamiento con Car-T WT, mientras que solo PD1 en el grupo de tratamiento con Car-T PD1 KO disminuyó significativamente en comparación con el grupo de tratamiento con Car-T WT, y no hay una diferencia significativa para los demás.

10 Ejemplo 10. Inactivación del gen HPK-1 en células Car T Her2

Las células T CAR Her2 también experimentan agotamiento durante un estudio de expansión *ex vivo*. Véanse las Figuras 13A-13D. Este ejemplo muestra el efecto de la inactivación del gen HPK-1 en las células T CAR Her2.

La preparación de las células T CAR Her2 con inactivación del gen HPK-1 siguió el procedimiento descrito en la sección Métodos Generales y Material descrito en la presente memoria. El ARNg usado para esta inactivación comprende una secuencia dirigida al dominio diana del gen HPK-1 (con la SEQ ID NO: 1). La proteína Cas9 se preparó y aisló siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Se prepararon células T CAR Her2 con inactivación de PD-1 usando el mismo ARNg que se muestra en el Ejemplo 1 y se usaron como control. Las células T CAR Her2 expresan HER2-CAR que contienen un módulo de señalización 4-1BB/CD3 ζ . La expansión celular sigue un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 3.

La eficiencia de la inactivación de HPK-1 se evaluó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 5 por Transferencia Western y la expresión de Car Her2 se evaluó por FACS. Como se muestra en las Figuras 14A-C, la inactivación de HPK-1 no afecta a la transducción y expresión de CAR Her2 en las células T. La Figura 14B también muestra que el ARNg/Cas9 fue efectivo para inactivar el gen HPK1 en las células T Car Her2. Similar a los observados en las células T CAR CD19, la inactivación del gen HPK1 también redujo significativamente la expresión de PD1 en la superficie de las células T, y es sustancialmente el mismo que las células T CAR con inactivación de PD-1.

Ejemplo 11. Eficacia *in vivo* eficacia de las células T Car Her2 con inactivación del gen HPK-1

Este ejemplo estudia el comportamiento *in vivo* de las células T CAR Her2 con inactivación de HPK-1.

Se inocularon ratones NSG de 6 a 10 semanas de edad i.p. con 5×10^6 células tumorales SKOV-3 en el día 0. Los ratones fueron tratados con 1×10^6 células T o células CAR-T Her2 a través de la vena de la cola el día 10 después de la inoculación del tumor SKOV-3 de manera que ambos tumores tenían un volumen de aproximadamente 100 mm³. Los tumores se midieron cada 3-4 días. Los ratones que no tenían tumores visibles o palpables que pudieran medirse en días de medición consecutivos se consideraron como "regresiones completas". Los animales fueron sacrificados por eutanasia si mostraban signos de angustia o cuando el tamaño total del tumor alcanzaba 2.500 mm³.

Los resultados se muestran en las Figuras 15-18. Como se muestra en la Figura 15, la inactivación de HPK1 mejora significativamente la eficacia de las células T CAR Her2 en este modelo de tumor. Los ratones tratados con células T Car Her2 HPK1⁻ experimentan el crecimiento tumoral más bajo durante el período de 28 días y también prolongaron significativamente la supervivencia de los ratones. Por otro lado, la mejora de las células T Car Her2 PD1⁻ sobre las células T Car Her2 de tipo salvaje fue menos significativa. Otros estudios también muestran que la inactivación de HPK1 mejora la capacidad de las células T Car Her2 para infiltrarse en los tumores (véase la Figura 16) y el bazo (véase la Figura 17).

Similar a los estudios de marcadores de agotamiento *in vitro* observados para las células T Car CD19, también se encontró que la inactivación de HPK1 mejora el agotamiento de las células T Car Her2 *in vivo*. Véase la Figura 18.

Ejemplo 12. Inactivación del gen HPK-1 en células T Car BCMA

Este ejemplo estudia la inactivación del gen HPK-1 en células T CAR BCMA.

La preparación de células T CAR BCMA con el gen HPK-1 inactivado siguió el procedimiento descrito en la sección de Métodos Generales y Material descrito en la presente memoria. El ARNg usado para esta inactivación comprende una secuencia dirigida al dominio diana del gen HPK-1 (con la SEQ ID NO: 1). La proteína Cas9 se preparó y aisló siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Se prepararon células T CAR BCMA con inactivación de PD-1 usando el mismo ARNg que se muestra en el Ejemplo 1 y se usaron como control. La expansión celular sigue un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 3.

La eficiencia de la inactivación de HPK-1 se evaluó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 5 por Transferencia Western y la expresión de Car BCMA se evaluó por FACS. Como se muestra en la Figura 19A, la transducción de BCMA usando lentivirus fue exitosa. La Figura 19B también muestra que el ARNg/Cas9 fue efectivo para inactivar el gen HPK1 en células T Car BCMA. Similar a los observados en las células T CAR CD19, la inactivación

del gen HPK1 también redujo significativamente la expresión de PD1 en la superficie de las células T, y es sustancialmente igual que las células T CAR con inactivación de PD-1. Véase la Figura 20.

Ejemplo 13. Eficacia *in vitro* de las células T Car BCMA con inactivación del gen HPK-1

Este ejemplo estudia el comportamiento *in vitro* de las células T CAR BCMA con inactivación de HPK-1.

- 5 Este estudio de citotoxicidad se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7. Brevemente, las células T y las células T CAR-BCMA se cocultivaron con U266, RPM18226, K562 y K562-BCMA, después de 12 h de cultivo, se midió la citotoxicidad. Los resultados se muestran en la Figura 21. Como se muestra en la Figura 21, la inactivación de HPK1 mejora significativamente la citotoxicidad de las células T CAR BCMA en varias líneas celulares. También se observa que la mejora de la citotoxicidad es mayor que la inactivación de PD-1. La Figura 22 también muestra que las células T Car BCMA editadas en HPK1 exhiben una proliferación mejorada *in vitro*.
- 10

Ejemplo 14. Eficacia *in vivo* de las células T Car BCMA con inactivación del gen HPK-1

Este ejemplo estudia el comportamiento *in vivo* de las células T CAR BCMA con inactivación de HPK-1.

- 15 Se trasplantaron a ratones NSG de 6 semanas de edad 10 mm^3 de tejido tumoral de mieloma múltiple. Los ratones fueron tratados con 2×10^6 células T o células CAR-T BCMA a través de la vena de la cola el día 30 después de que el tumor alcanzara 100 mm^3 . Los tumores se midieron cada 3-4 días. Los ratones que no tenían tumores visibles o palpables que pudieran medirse en días de medición consecutivos se consideraron como "regresiones completas". Los animales fueron sacrificados por eutanasia si mostraban signos de angustia o cuando el tamaño total del tumor alcanzaba 2.500 mm^3 .

- 20 Los resultados se muestran en la Figura 23. Como se muestra en la Figura 23, la inactivación de HPK1 mejora significativamente la eficacia de las células T CAR BCMA en este modelo de tumor. Los ratones tratados con células T Car BCMA HPK1⁻ experimentan el crecimiento tumoral más bajo durante el período de 33 días. La Figura 23 también muestra que la inactivación de HPK1 es más efectiva que la inactivación de PD1 para potenciar el efecto antitumoral de las células T CAR BCMA.

- 25 De manera similar a los estudios de marcadores de agotamiento observados para las células T Car T Her2, también se encontró que la inactivación de HPK1 mejora el agotamiento de las células T Car BCMA *in vivo*. Véase la Figura 24.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula inmune que tiene una disrupción genética de un gen HPK-1 y que comprende un agente que induce o es capaz de inducir una disrupción genética, en donde el agente comprende un ARNg que tiene un dominio de direccionamiento que es complementario con un dominio diana del gen HPK-1 en el primer o segundo exón, o un polinucleótido que codifica el ARNg, y el ARNg tiene un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia que es igual o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15.
2. La célula inmune de la reivindicación 1, en donde la disrupción genética comprende una delección, mutación y/o inserción en el gen HPK-1.
- 10 3. La célula inmune de la reivindicación 1 o 2, en donde la disrupción genética comprende una delección de al menos una parte de al menos un exón del gen HPK-1.
4. La célula inmune de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el agente comprende un complejo de una molécula de Cas9 y un ARNg que tiene un dominio de direccionamiento que es complementario con un dominio diana del gen HPK-1.
- 15 5. La célula inmune de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la Cas9 es una Cas9 de *S. pyogenes*, modificada mediante la inserción de una secuencia de localización nuclear.
6. La célula inmune de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además una disrupción genética de un gen que codifica un polipéptido PD-1 o PD-L1 en la célula inmune.
7. La célula inmune de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es una célula primaria de un sujeto.
- 20 8. La célula inmune de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que es una célula humana, tal como un glóbulo blanco o una célula mononuclear de sangre periférica humana.
9. La célula inmune de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que es positiva para CD3.
10. La célula inmune de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que es una célula T o una célula NK.
- 25 11. La célula inmune de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que se deriva de células primarias de un sujeto que padece de cáncer, en donde el cáncer es linfoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda de células B, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, linfoma no de Hodgkin, linfoma difuso de células grandes, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, neuroblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, sarcoma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, astrocitoma, mesotelioma, cáncer de cabeza y cuello, y/o meduloblastoma.
- 30 12. La célula inmune de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además un receptor recombinante expresado en la superficie de la célula inmune o un polinucleótido que codifica el receptor recombinante, en donde el receptor recombinante se une específicamente a un antígeno, y en donde la célula inmune es capaz de inducir citotoxicidad, proliferar y/o secretar una citoquina tras la unión del receptor recombinante al antígeno.
- 35 13. La célula inmune de la reivindicación 12, en donde el receptor recombinante es un receptor recombinante de células T o un receptor de antígeno quimérico.
- 40 14. La célula inmune de la reivindicación 12 o 13, en donde el receptor recombinante se une específicamente a uno o más antígenos seleccionados independientemente de ROR1, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, CEA, antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD276, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHa2, ErbB2, ErbB3, ErbB4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión celular L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de la próstata, PSMA, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, efrinaB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, MAGE A3, CE7, Tumor de Wilms 1, ciclina A1, BCMA e interleuquina 12.
- 45 15. La célula inmune de la reivindicación 12 o 13, en donde el receptor recombinante se une específicamente a CD19, BCMA, Integrina α V β 6, MUC1, EGFRvIII, HER2, EGFR, GD2 y/o Mesotelina.
- 50 16. Una población celular que comprende la célula inmune de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, caracterizada por uno o más de los siguientes: (1) al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de las células de la población celular no expresan el polipéptido HPK-1 endógeno; no contienen un gen HPK-1 contiguo, un gen HPK-1 y/o un gen HPK-1 funcional; (2) una eficiencia de inactivación del gen HPK-1 en la población celular de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, según se determina mediante un método de acuerdo con el método de Transferencia Western.

- 5 17. Una molécula de ácido nucleico, que es un casete de expresión, que codifica una o más moléculas que reducen o son capaces de reducir la expresión de un gen de HPK-1 en una célula, en donde la una o más moléculas son o comprenden o codifican un ARNg, en donde el ARNg comprende un dominio de direccionamiento que es complementario con un dominio diana del gen HPK-1 en el primer o segundo exón, y el ARNg comprende un dominio de direccionamiento que es el mismo o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15.
18. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17, que es una molécula de ADN bicatenaria que comprende las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4.
- 10 19. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17 o 18, que comprende además un segundo ácido nucleico, que es un segundo casete de expresión, que codifica un receptor de antígeno.
20. Un ARNg que comprende un dominio de direccionamiento que es complementario a, se une a, reconoce o hibrida con un dominio diana de un gen HPK-1 en el primer o segundo exón, en donde el dominio de direccionamiento es el mismo o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15.
- 15 21. Un método para alterar una célula T que comprende poner en contacto la célula T con un agente que induce o es capaz de inducir una disrupción genética de un gen HPK1, en donde el contacto con el agente es *in vitro* o *ex vivo*, en donde el agente comprende (i) el ARNg de la reivindicación 20 o (ii) un ácido nucleico que codifica el ARNg.
- 20 22. El método de la reivindicación 21, en donde la célula T es de un sujeto que padece de cáncer, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: linfoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda de células B, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, linfoma no de Hodgkin, linfoma difuso de células grandes, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, neuroblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, sarcoma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, astrocitoma, mesotelioma, cáncer de cabeza y cuello y meduloblastoma.
- 25 23. El método de la reivindicación 21 o 22, que comprende además poner en contacto la célula T con un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en condiciones para introducir el ácido nucleico en la célula T.
- 30 24. Un método para mejorar la citotoxicidad, inhibir el agotamiento, de una población de células T, comprendiendo el método poner en contacto la población de células T con un agente que induce o es capaz de inducir una disrupción genética de un gen HPK1, en donde el contacto con el agente es *in vitro* o *ex vivo*, en donde el agente comprende (i) el ARNg que comprende un dominio de direccionamiento que es complementario con, se une a, reconoce o hibrida con un dominio diana de un gen HPK-1 en el primer o segundo exón, o (ii) un ácido nucleico que codifica el ARNg que comprende un dominio de direccionamiento que es complementario con, se une a, reconoce o hibrida con un dominio diana de un gen HPK-1 en el primer o segundo exón;
- 35 en donde el ARNg tiene un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia que es la misma o difiere en no más de 3 nucleótidos de una secuencia completamente complementaria con una secuencia diana seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y 11-15.

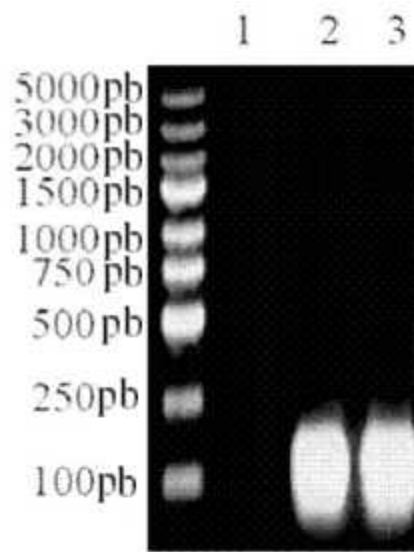


Figura 1.

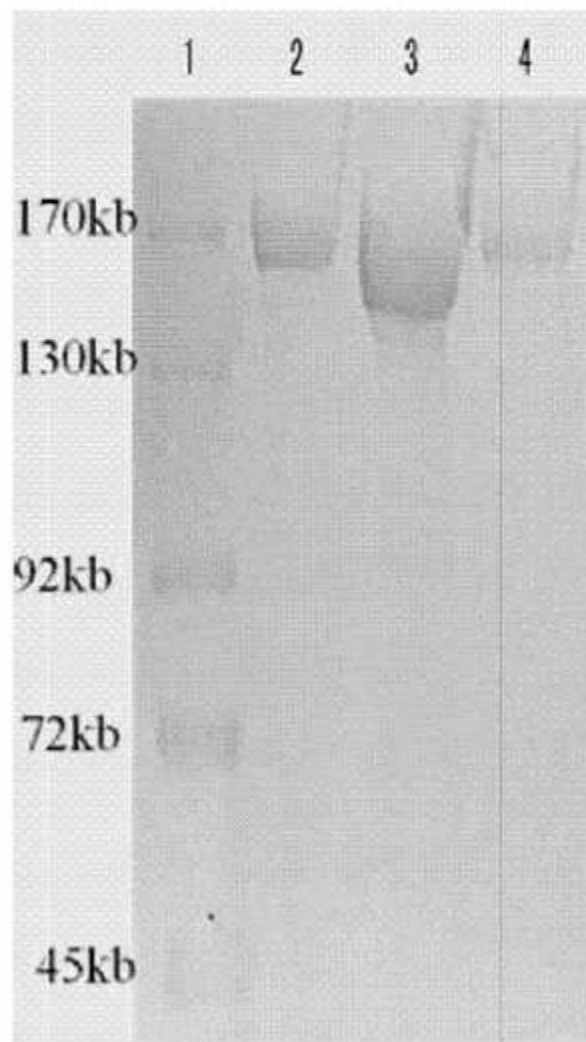


Figura 2.

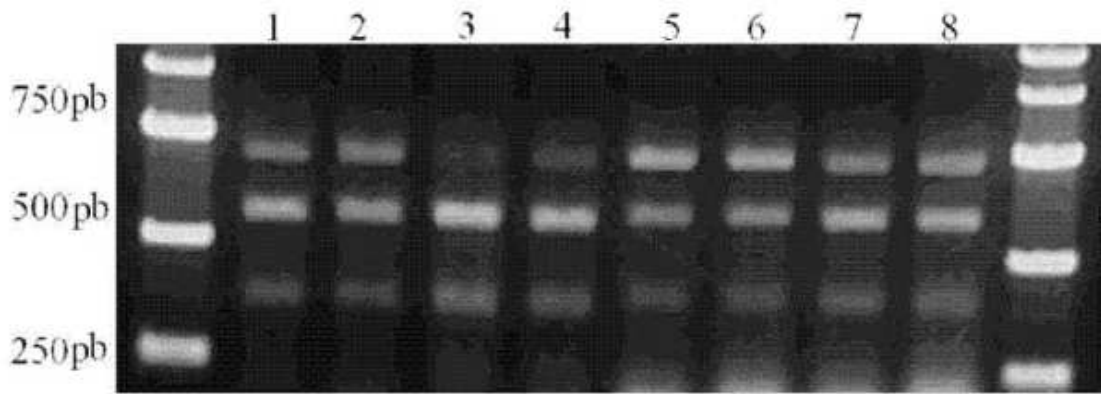


Figura 3.

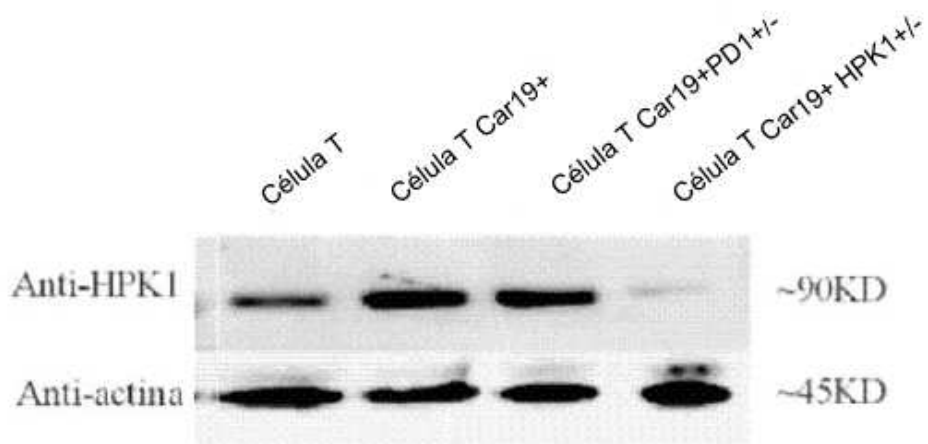


Figura 4.

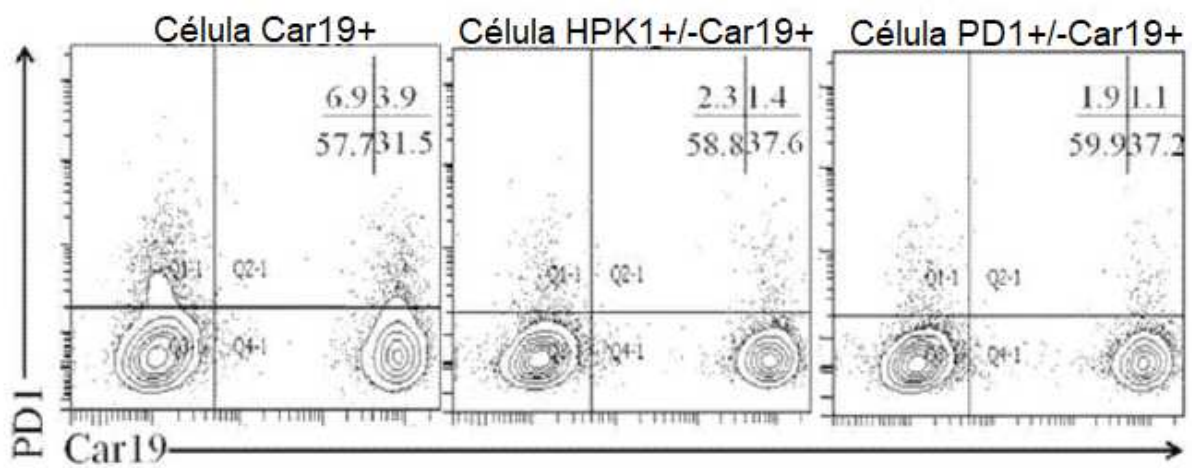


Figura 5.

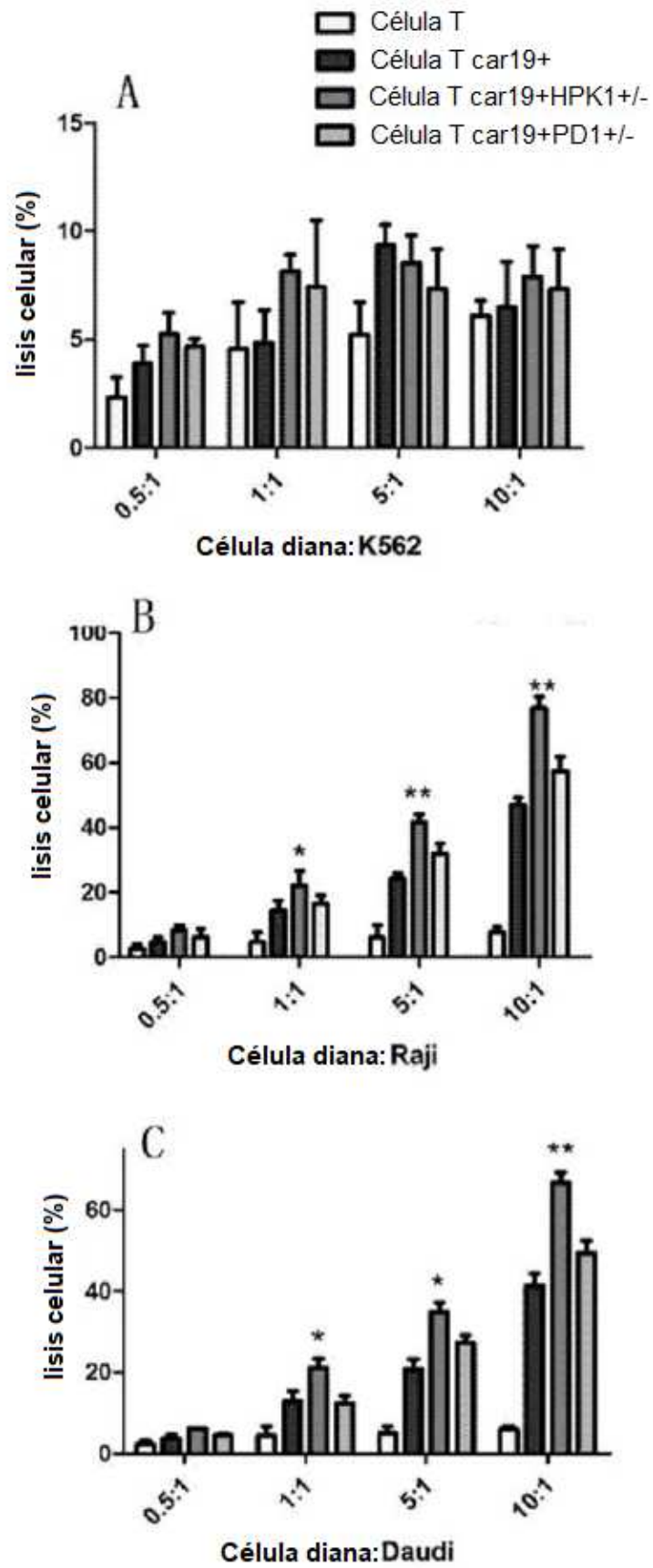


Figura 6.

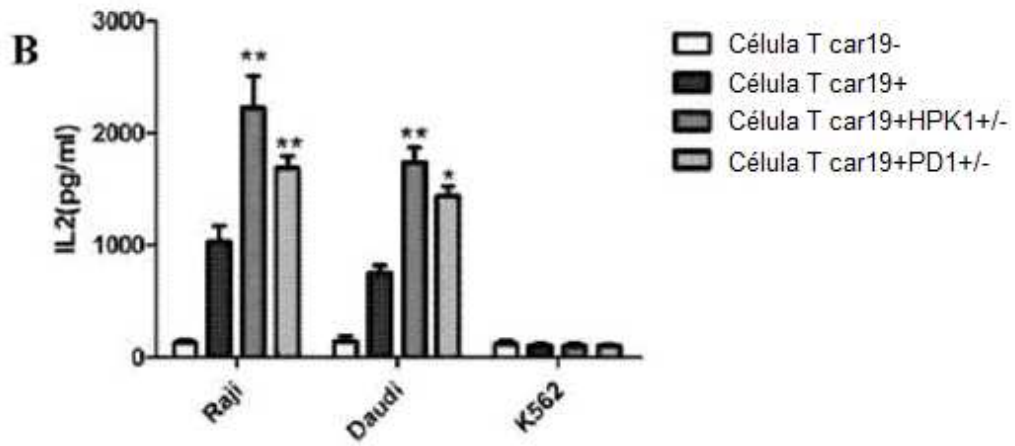
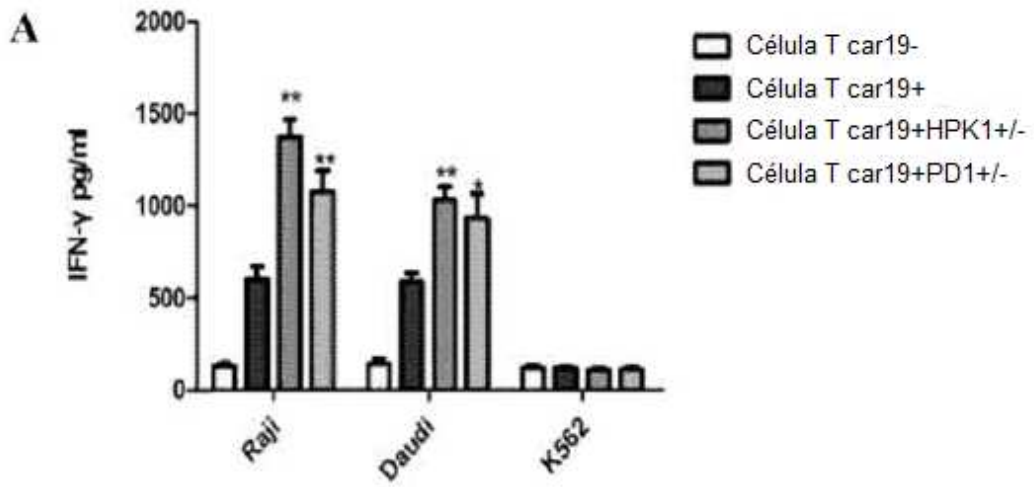


Figura 7.

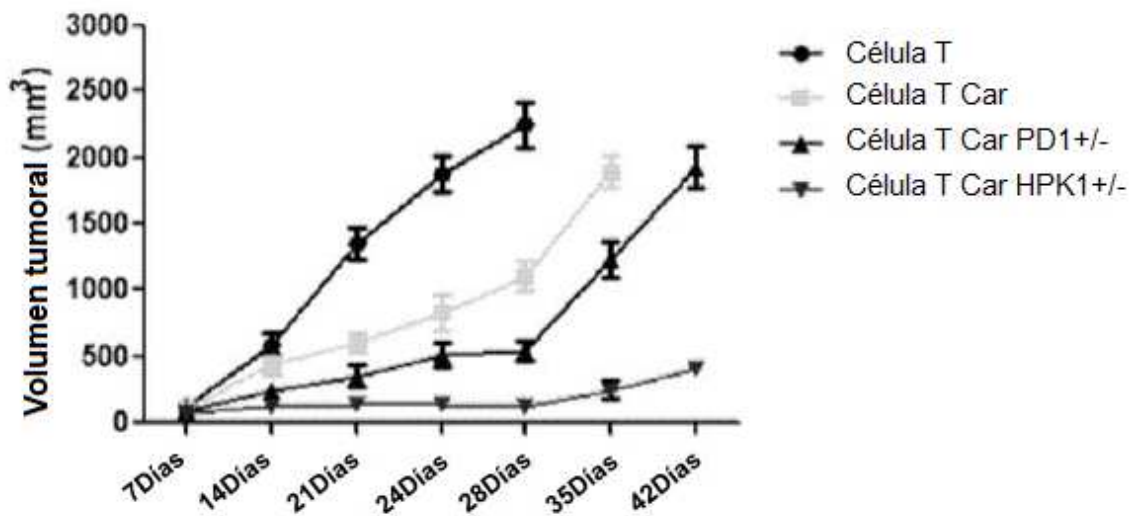


Figura 8.



Figura 9.

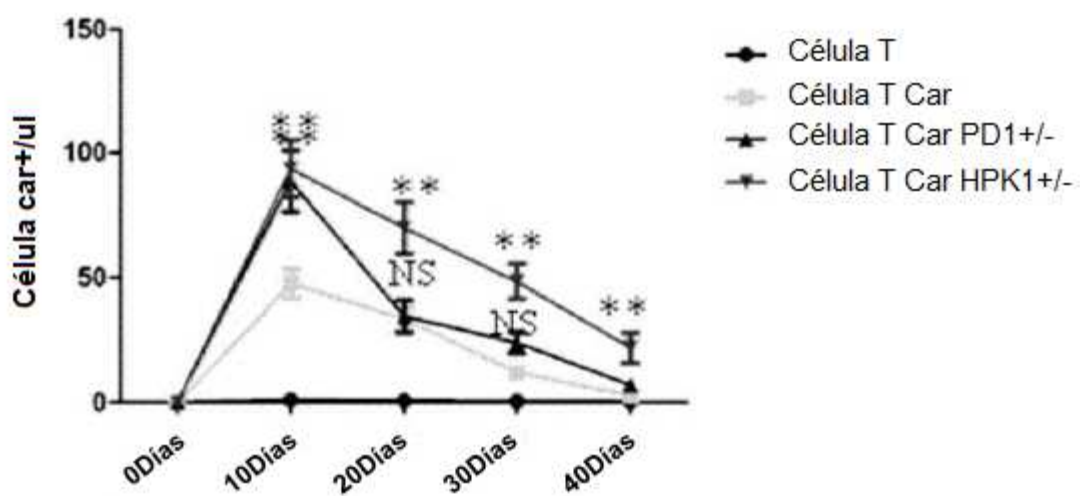
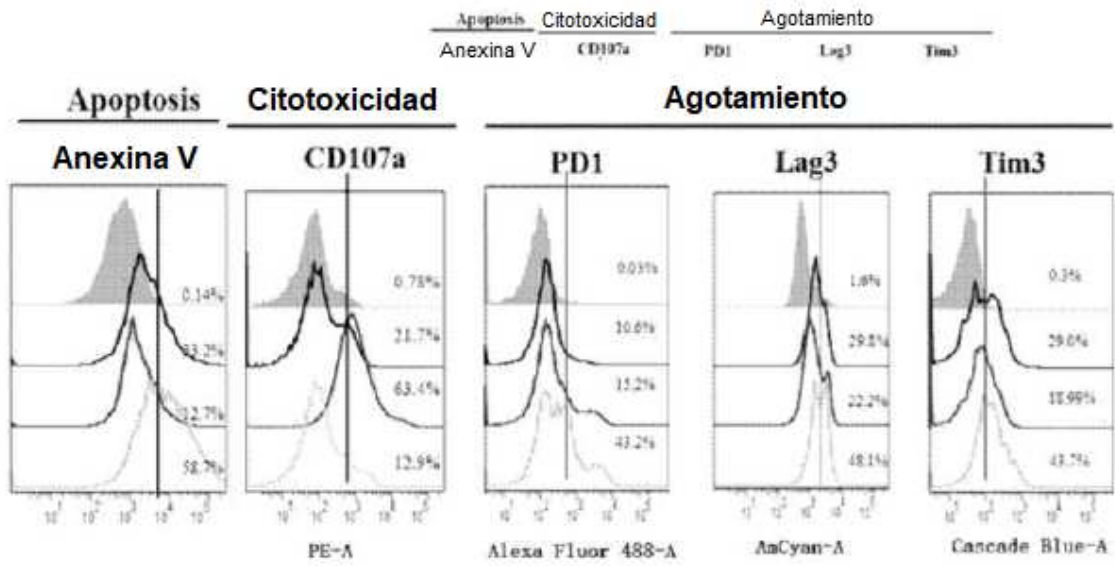
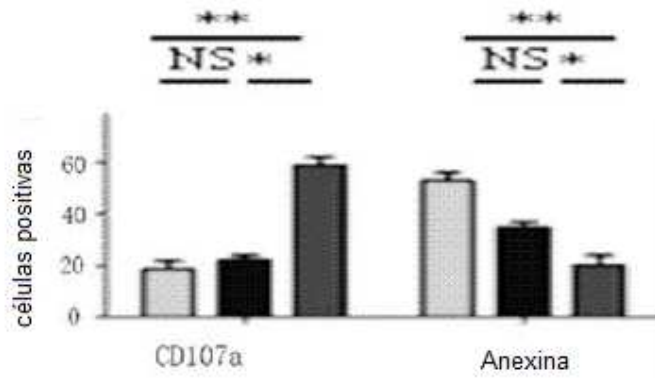


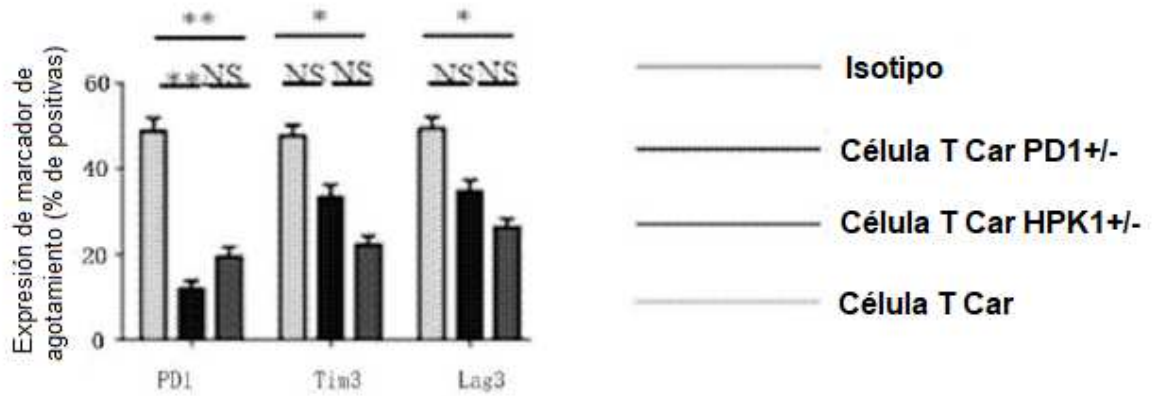
Figura 10.



A



B



C

Figura 11.

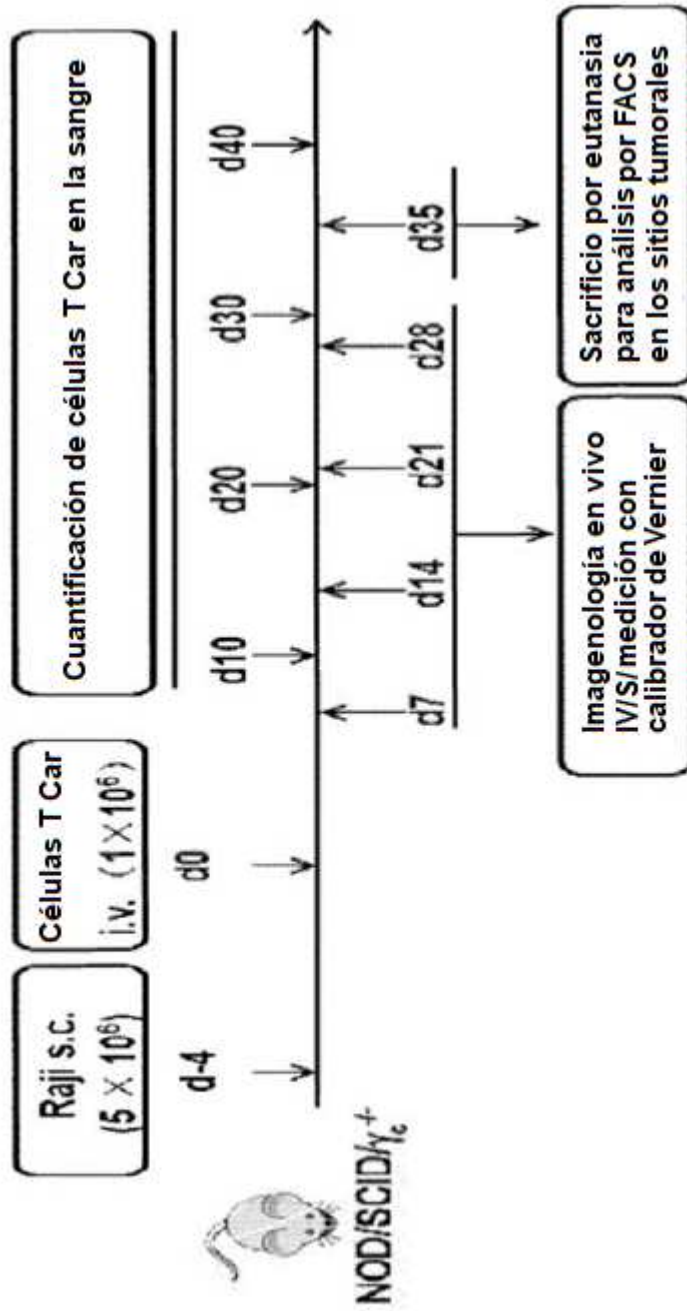


Figura 12.

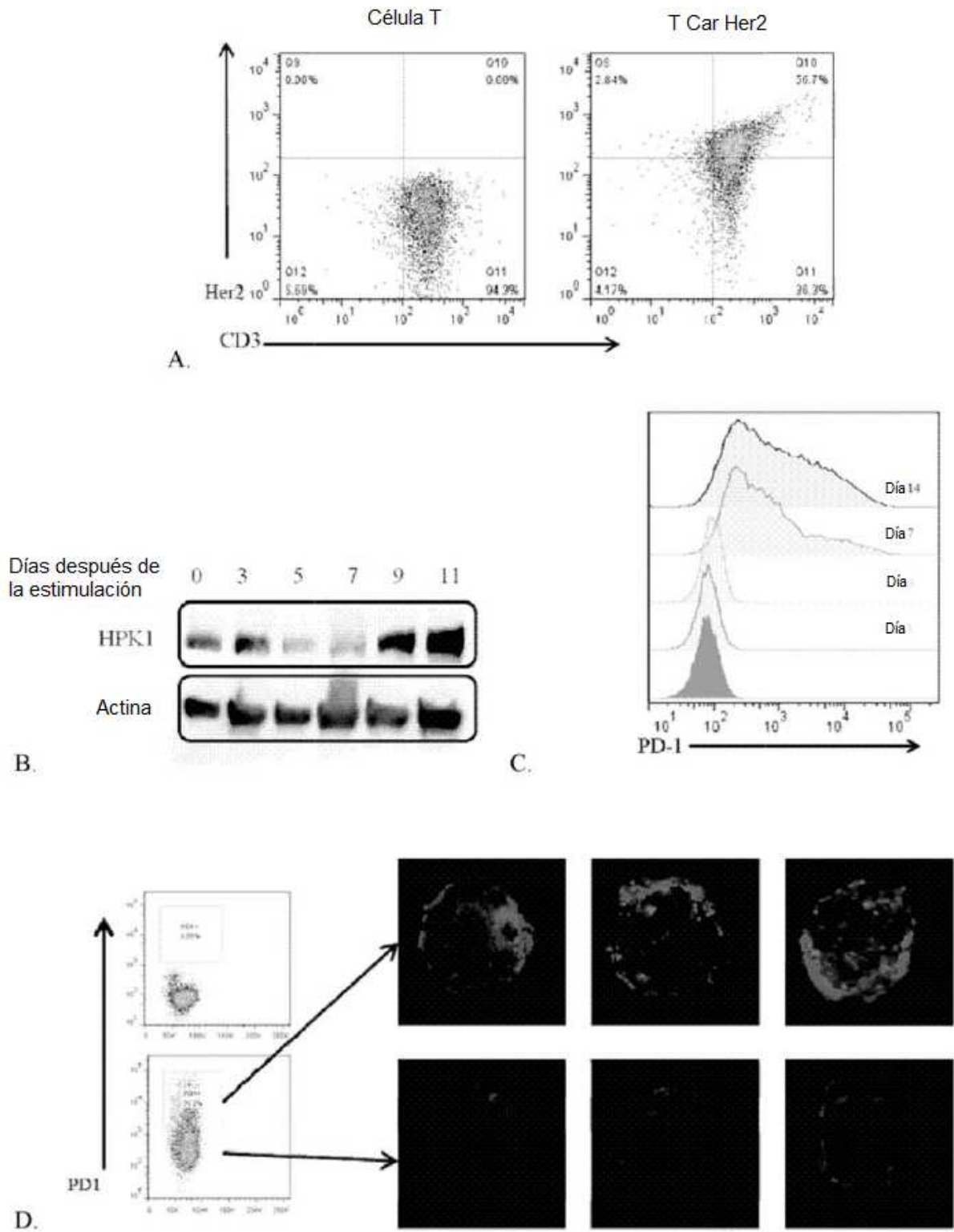


Figura 13.

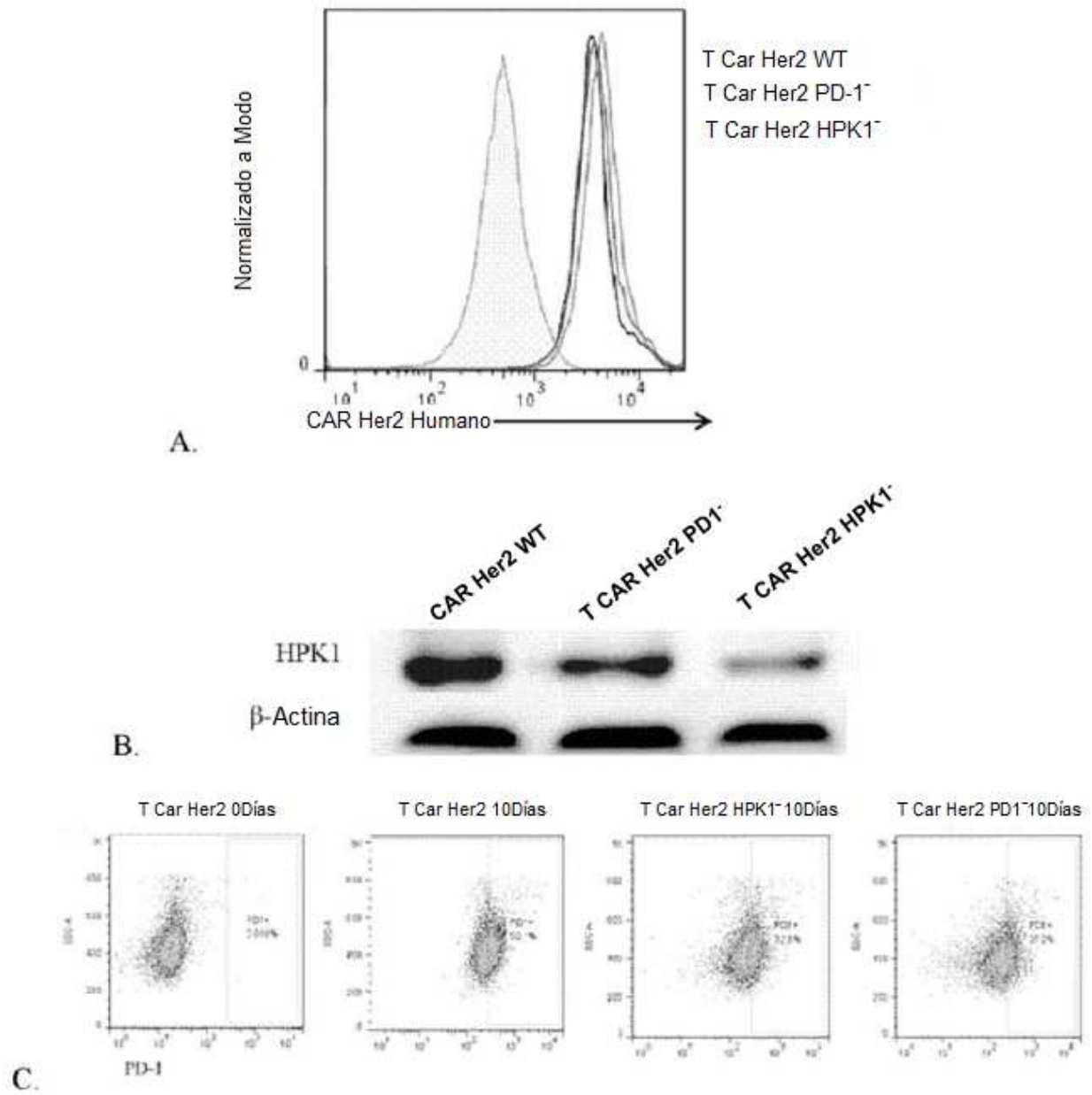


Figura 14.

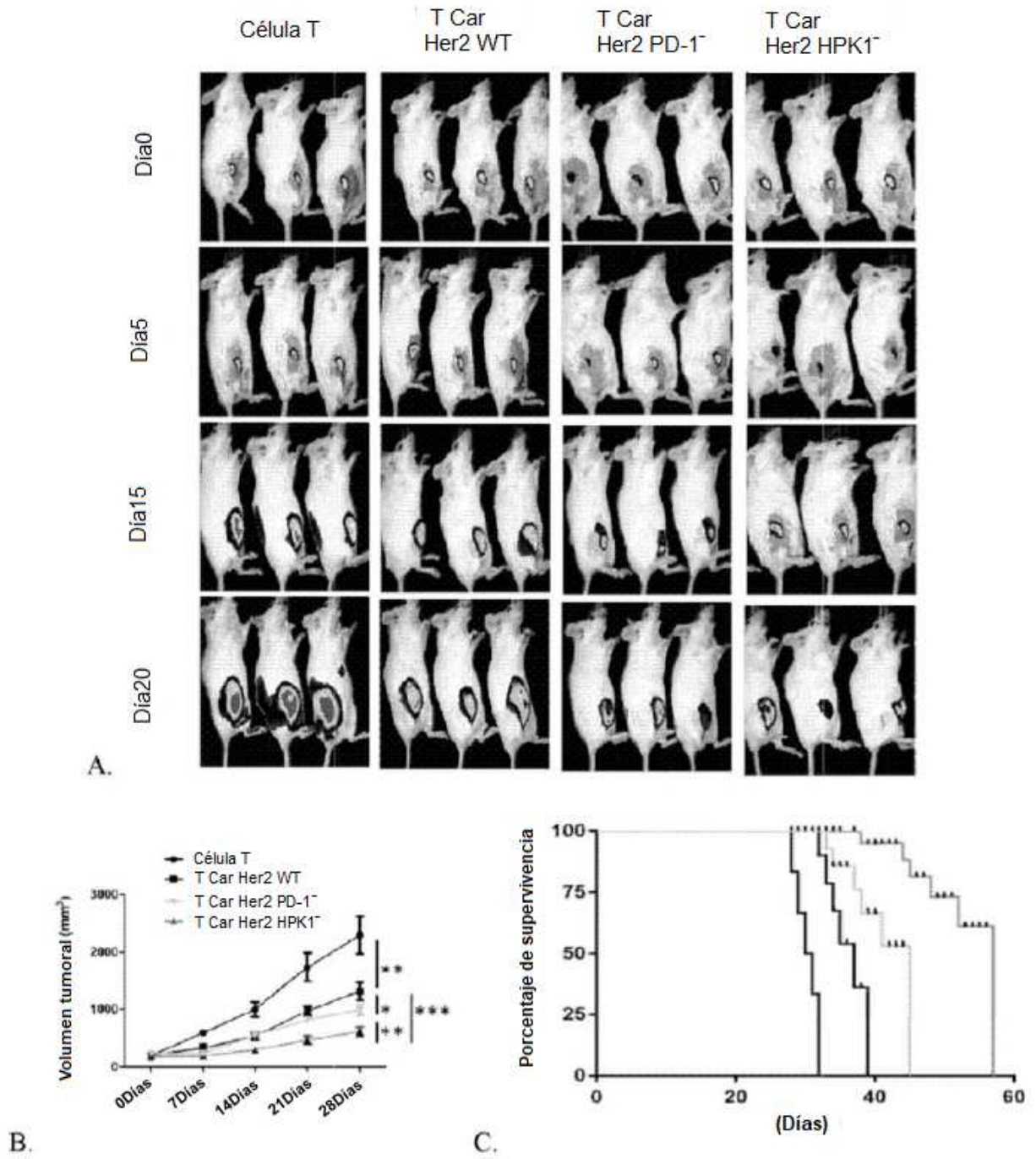


Figura 15.

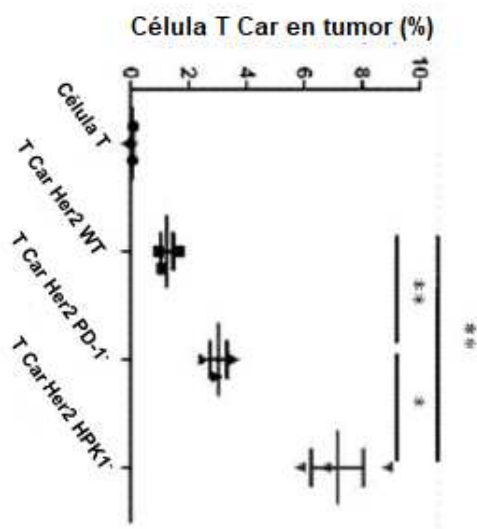
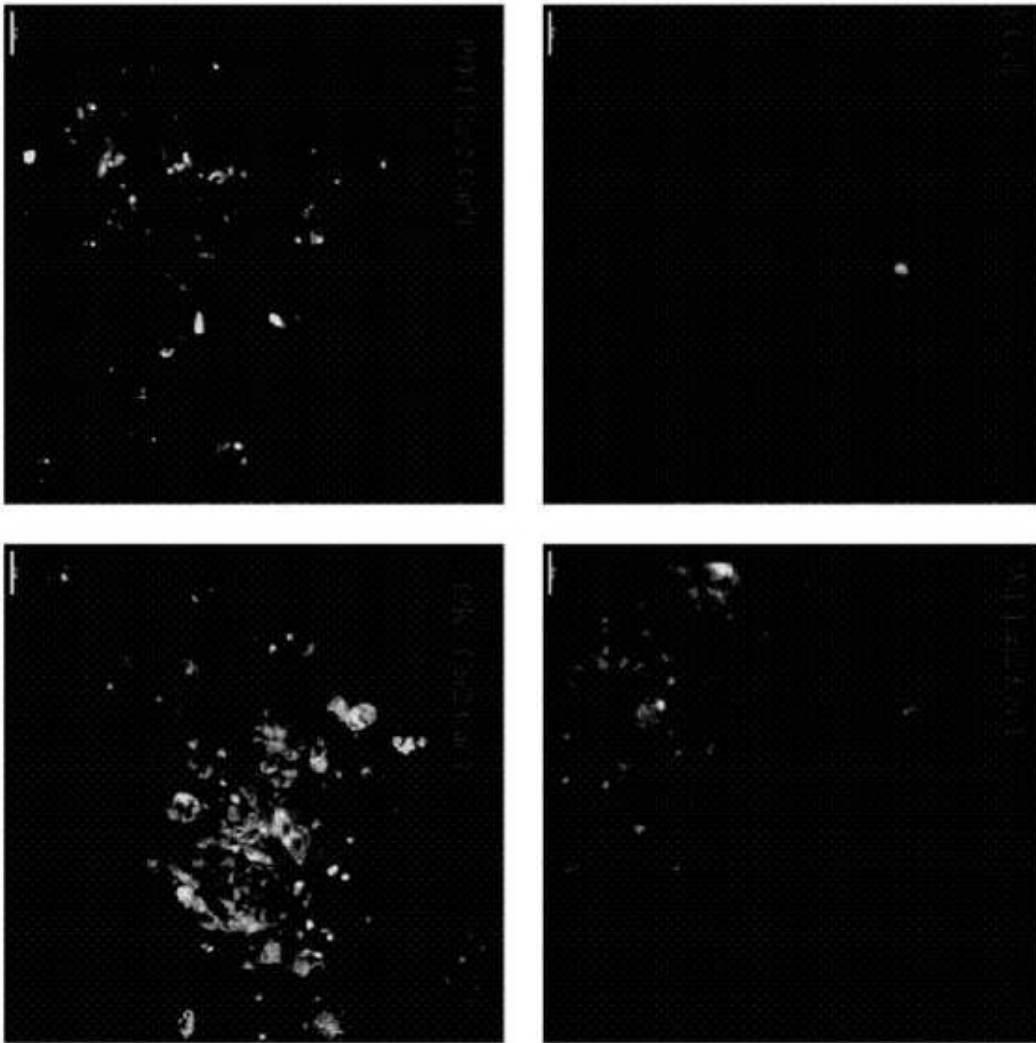


Figura 16.

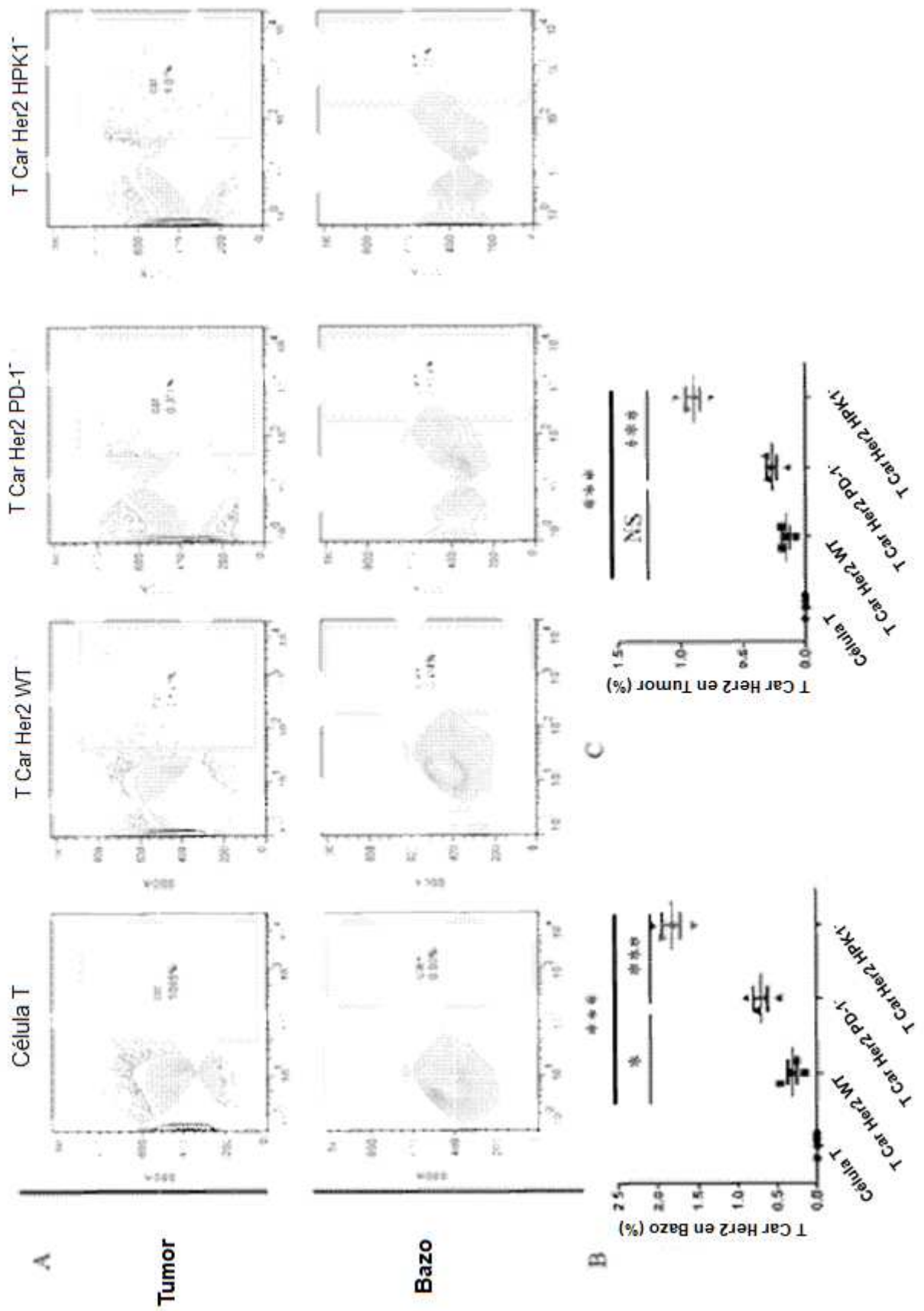


Figura 17.

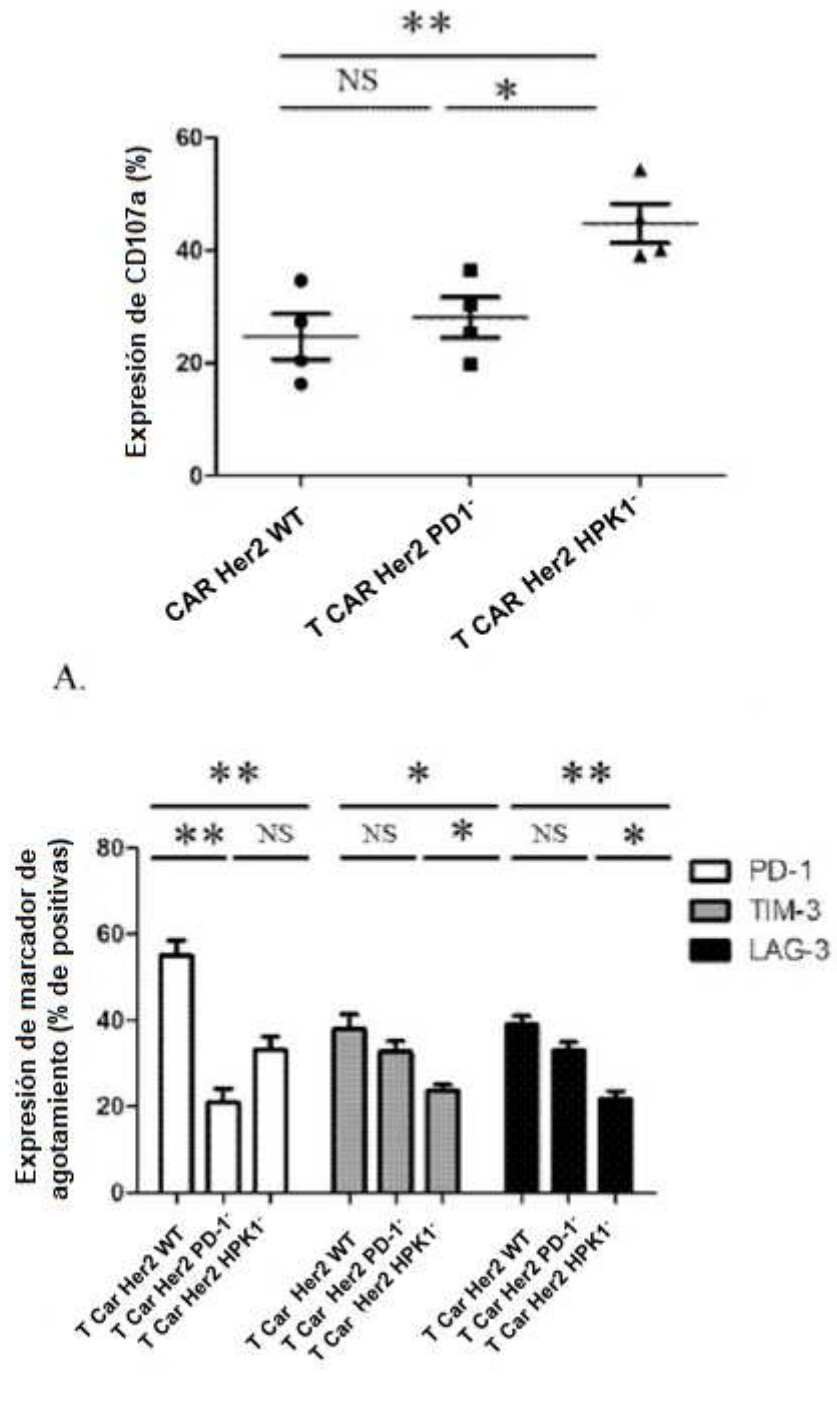
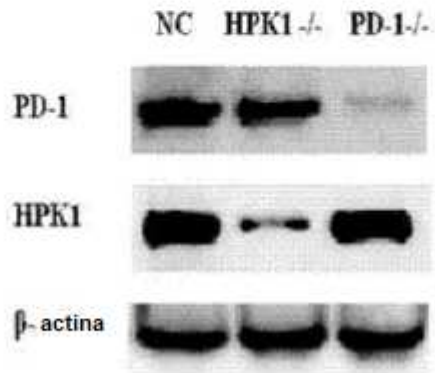
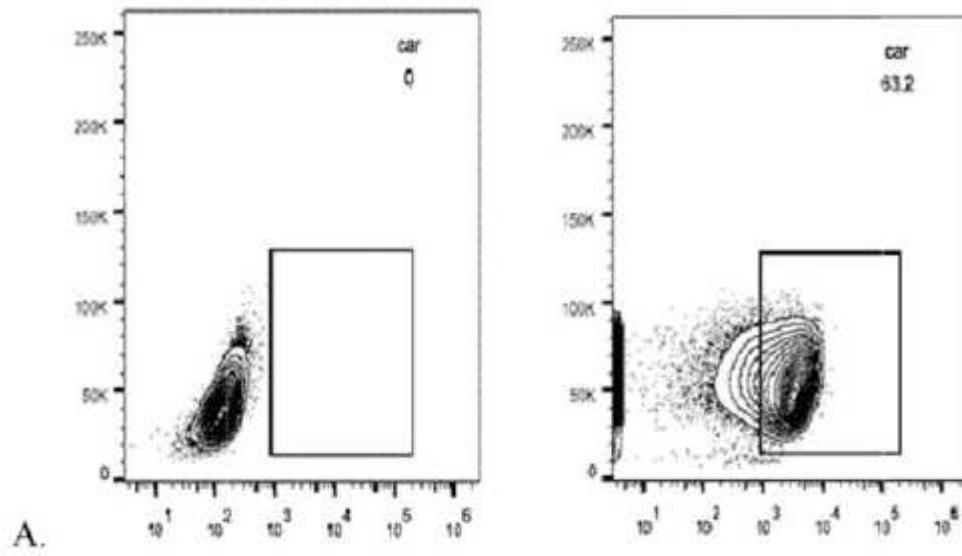


Figura 18.



B.

Figura 19.

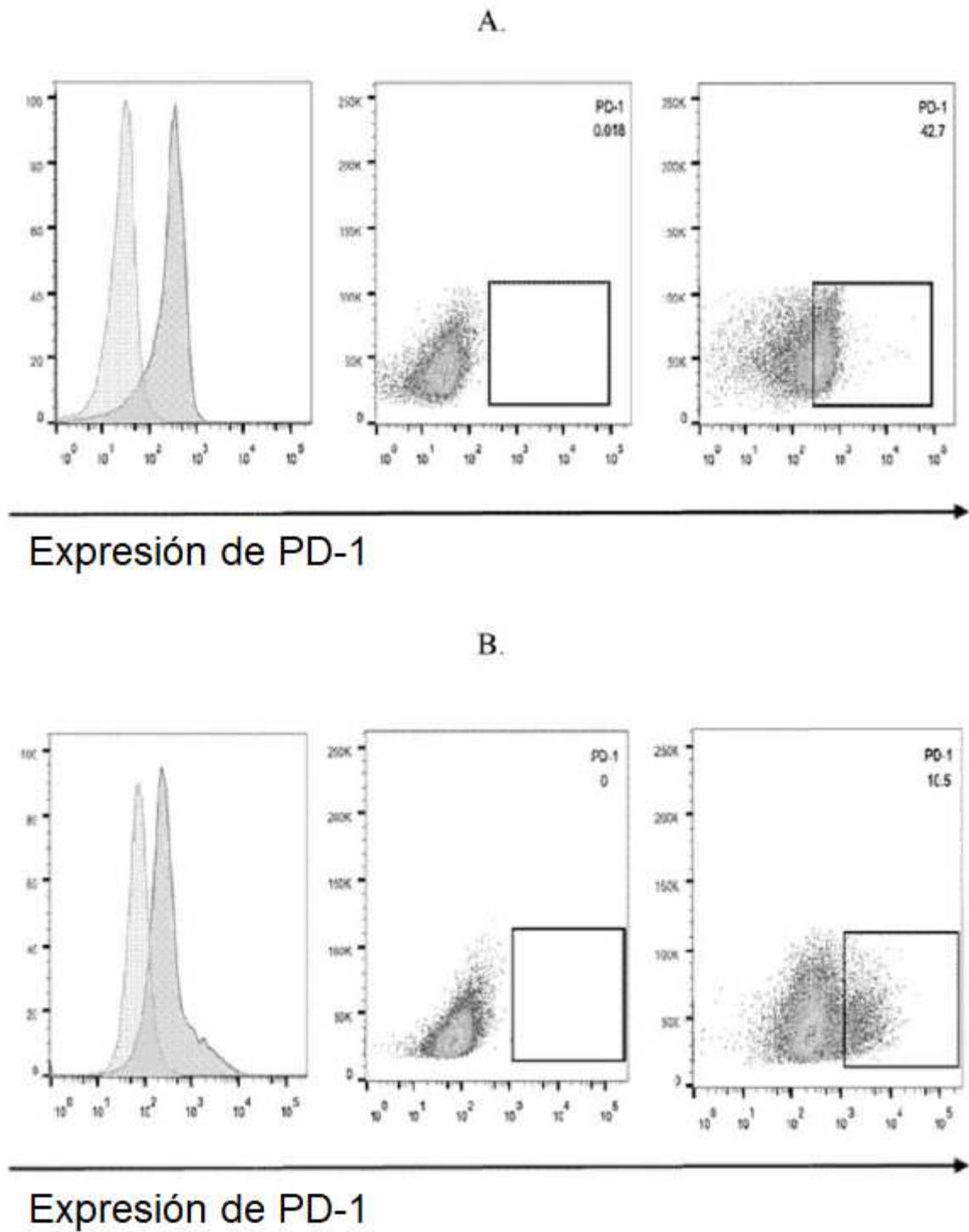


Figura 20.

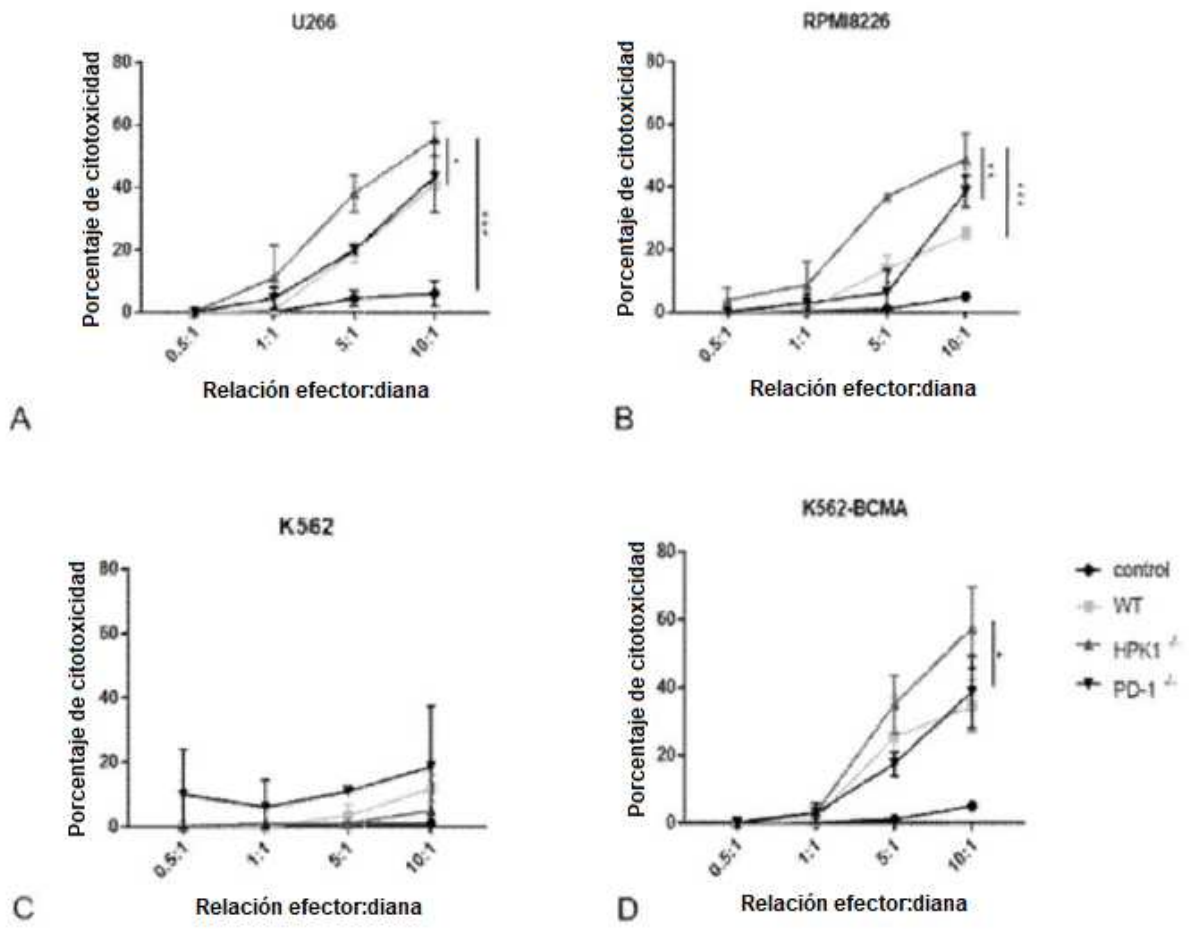


Figura 21.

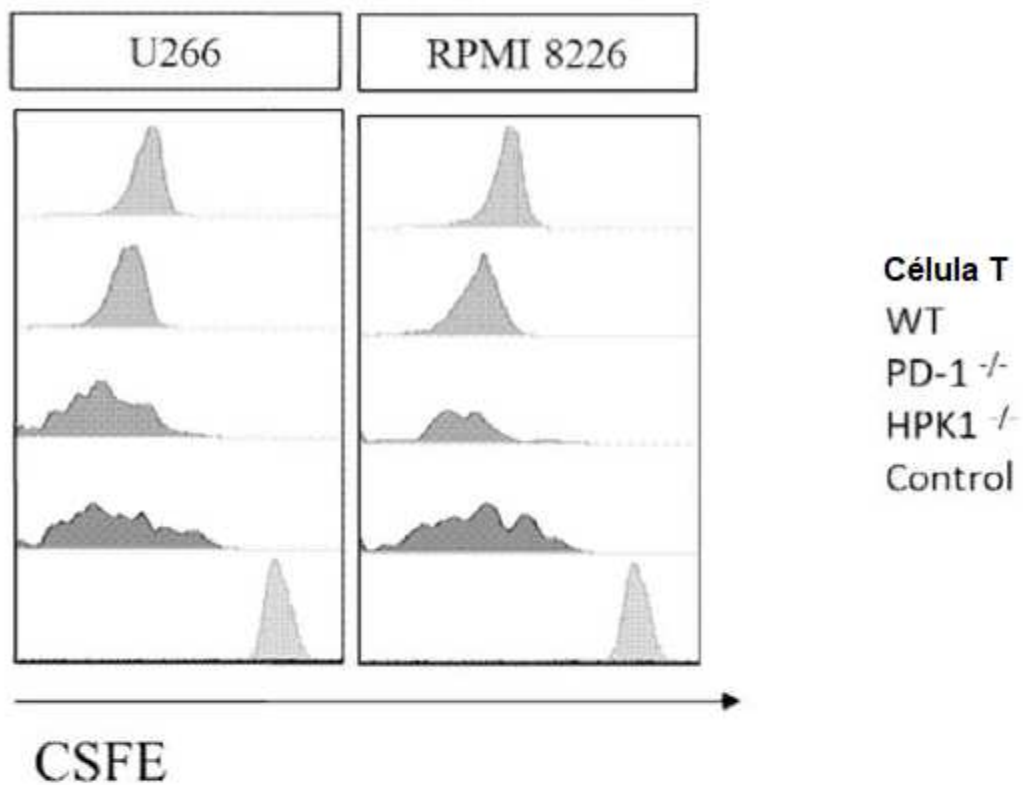


Figura 22.

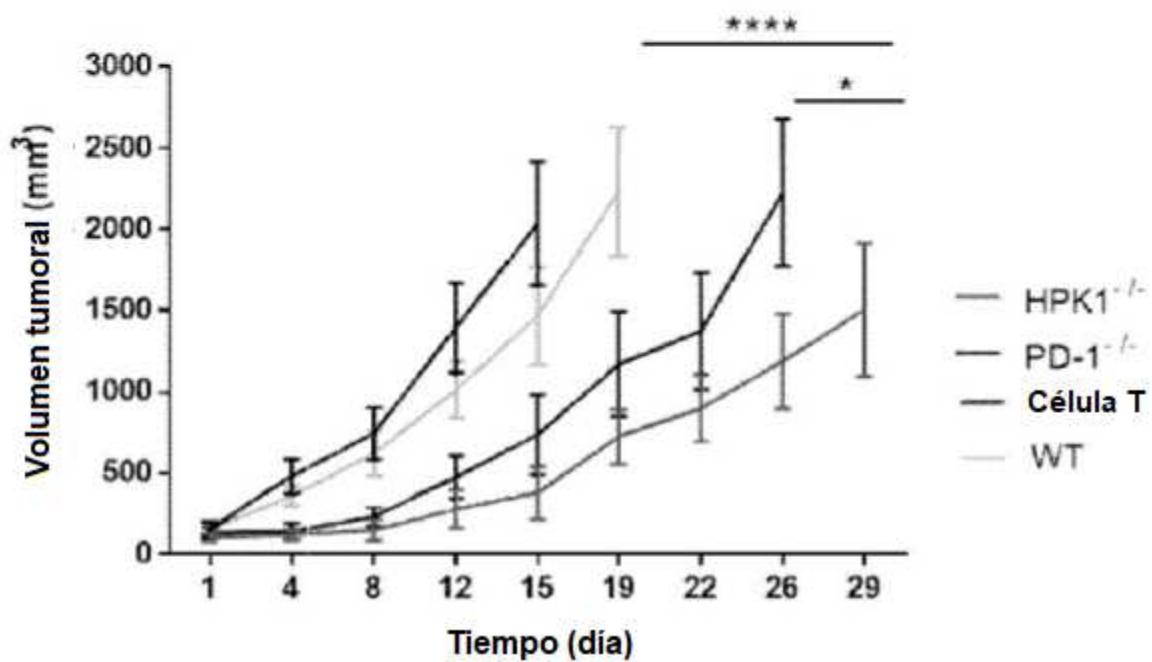


Figura 23.

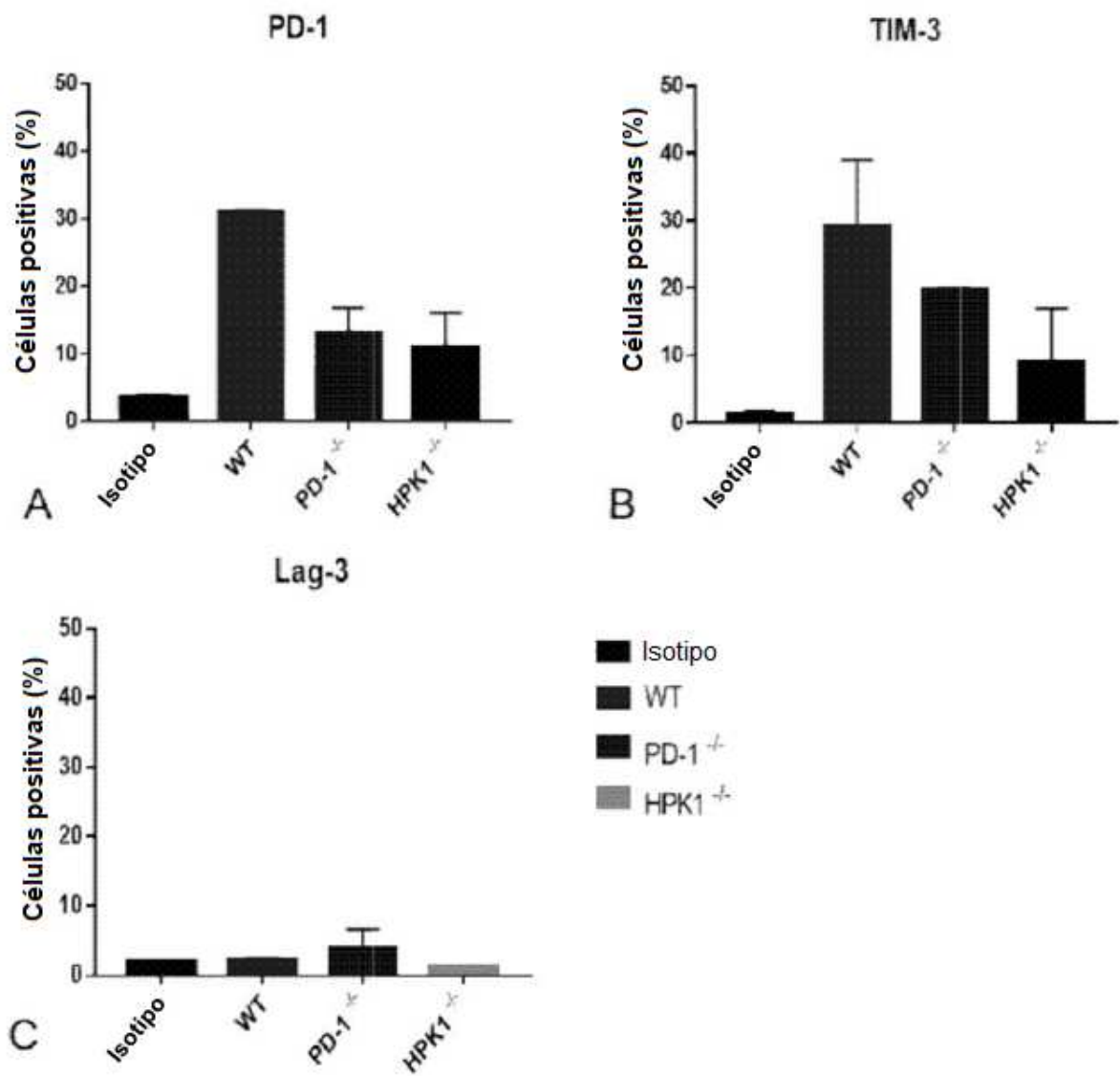


Figura 24.

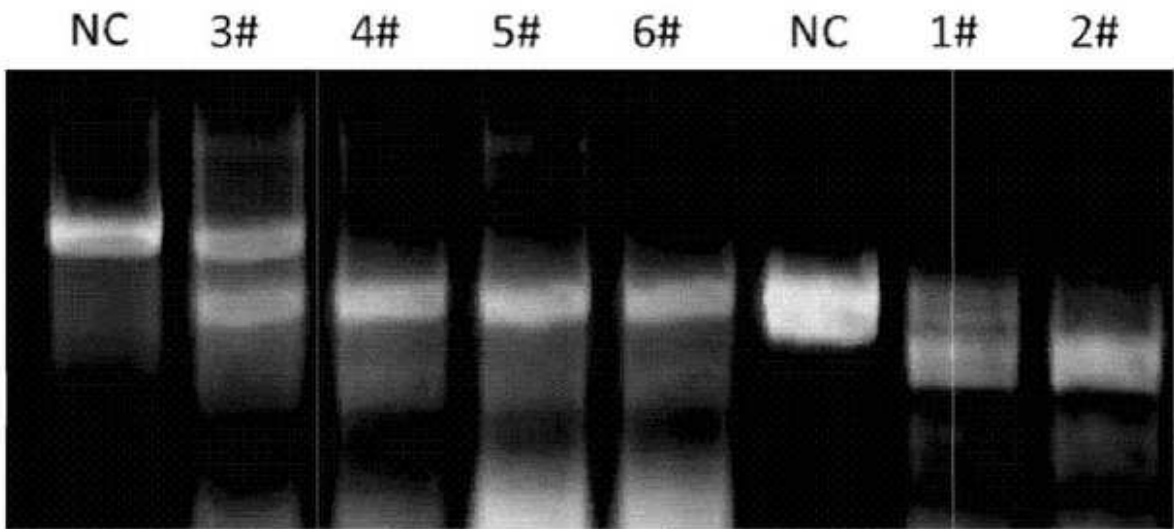


Figura 25.

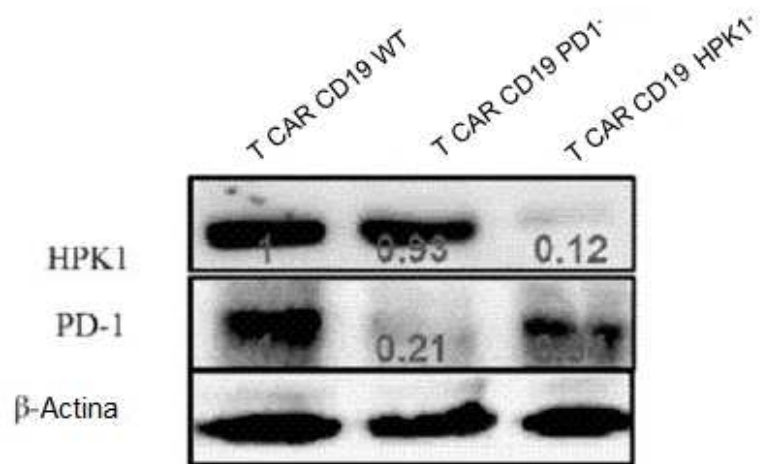


Figura 26.