

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 908 324**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2019 PCT/IB2019/050194**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2019 WO19138354**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2019 E 19738866 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **22.01.2025 EP 3737765**

(54) Título: **Células inmunes mejoradas utilizando ARNsh doble y composición que las incluye**

(30) Prioridad:

12.01.2018 KR 20180004238

(73) Titular/es:

CUROCELL INC. (50.00%)
11, Gukjegwahak 16-ro, Yuseong-gu
Daejeon, 34002, KR y
KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE
AND TECHNOLOGY (50.00%)

(72) Inventor/es:

KIM, CHAN HYUK;
LEE, YOUNG-HO;
LEE, YUJEAN;
LEE, HYEONGJI y
LEE, SANG HOON

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

DESCRIPCIÓN

Células inmunes mejoradas utilizando ARNsh doble y composición que las incluye

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere en términos generales al campo de la inmunoterapia contra el cáncer. Por ejemplo, la presente invención se refiere en general a una célula inmune que comprende un receptor de antígeno modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno diana y a un agente de alteración genética que reduce o es capaz de reducir en la célula inmune la expresión de un gen que debilita la función de la célula inmune.

Antecedentes

10 Las terapias contra el cáncer que utilizan células inmunes aislando linfocitos T o células NK (linfocitos citolíticos naturales) procedentes del cuerpo de un paciente o de un donante, cultivando esas células *in vitro*, y luego volviéndolas a introducir en el cuerpo de un paciente, están recibiendo mucha atención actualmente como un nuevo método de terapia contra el cáncer. En particular, las células inmunes que han sido sometidas a un procedimiento de inyección de nueva información genética mediante virus, etc., seguido de un cultivo en un procedimiento de cultivo *in vitro*, de ellas se ha descrito que el procedimiento de cultivo tiene un mayor efecto anticancerígeno que sobre las células que no han sido sometidas. En ese caso, la información genética inyectada en los linfocitos T suele ser un receptor de

15 antígeno quimérico (en adelante, CAR, por sus siglas del inglés "Chimeric Antigen Receptor") o un receptor de linfocitos T monoclonal (en adelante, mTCR, por sus siglas en inglés "monoclonal T cell receptor") modificado para tener una afinidad elevada hacia el antígeno diana. Esas células inmunes modificadas reconocen y atacan las células cancerosas que expresan el antígeno diana e inducen la muerte celular sin estar limitadas por sus especificidades de antígeno inherentes. Un método para modificar genéticamente los linfocitos T utilizando CAR fue propuesto por primera vez por Eshhar et al. en 1989, y se denominó con el nombre de "T-body". El documento WO 2017/040945 A1 se refiere al tratamiento del cáncer y, más específicamente, a una inmunoterapia para el tratamiento del cáncer utilizando células inmunes recombinantes que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR), que se une a un antígeno del cáncer, y a una forma negativa dominante de un inhibidor de una respuesta inmune mediada por células.

20 25 En el presente documento se proporcionan composiciones y métodos de células inmunes que abordan los problemas con terapias de células inmunes concurrentes convencionales, señaladas anteriormente, en donde dichos problemas suponen una gran carga económica para los pacientes debido a su alto coste, actúan sobre linfocitos T distintos de CAR-T y plantean un riesgo de síntomas autoinmunes y síndrome de liberación de citocinas. Brevemente, por ejemplo, en este documento se describen métodos de preparación con tasas de rendimiento elevadas y costos de producción 30 bajos. Además, mediante la inhibición de moléculas que inhiben la función de las células inmunes con mayor probabilidad y eficacia, la descripción del presente documento satisface la necesidad en la tecnología de proporcionar una terapia celular eficaz. El problema técnico que la presente descripción trata de resolver, no se limita al problema técnico mencionado anteriormente, y otros problemas técnicos no mencionados serán evidentes a partir de lo siguiente para las personas con experiencia ordinaria en la técnica.

35 **Compendio**

En este documento se describen en general vectores, células inmunes, composiciones farmacéuticas que comprenden las células inmunes y composiciones que comprenden las células inmunes. También se describen en este documento métodos para producir las células inmunes y métodos de tratamiento y de uso de las células inmunes.

40 Se describe un vector que comprende una secuencia de bases que codifica dos tipos de ARN de horquilla corta (ARNsh), que inhiben la expresión de genes que debilitan la función de las células inmunes, y una secuencia de bases que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de linfocitos T (TCR), p. ej., un receptor de linfocitos T monoclonal (mTCR). La diana del CAR o TCR, p. ej., del mTCR, puede ser un antígeno tumoral humano seleccionado entre antígenos incrementados que muestran un aumento de la expresión en el cáncer o de formas mutadas de antígenos que se encuentran en el cáncer, por ejemplo, células cancerosas, tejido canceroso y/o 45 microentorno tumoral.

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la expresión de los dos tipos de ARNsh se caracteriza porque están regulados respectivamente por dos promotores diferentes.

50 En algunas realizaciones, los dos promotores son promotores de la ARN polimerasa III. En algunas realizaciones, los dos promotores son promotores U6, por ejemplo, promotores U6 obtenidos a partir de diferentes especies. En algunas realizaciones, los dos promotores están orientados en la misma dirección en relación uno con otro, en el vector. En algunas realizaciones, los dos promotores están orientados en diferentes direcciones en relación uno con otro en el vector. Por ejemplo, en una determinada realización, los promotores están orientados con una orientación de cabeza a cabeza. En otra realización, los promotores están orientados con una orientación de cola a cola.

55 Tal y como se describe en el presente documento, el gen que debilita la función de las células inmunes puede ser un receptor o un ligando de un punto de control inmune.

En algunos ejemplos, el receptor o el ligando de un punto de control inmune se selecciona a partir de un grupo que consiste en PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 o CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK y 2B4.

5 En algunos ejemplos, el gen que debilita la función de las células inmunes se selecciona a partir de un grupo que consiste en FAS, CD45, PP2A, SHIP1, SHIP2, DGK alfa, DGK zeta, Cbl-b, CD147, LRR1, TGFRB1, IL10R alfa, KLGR1, DNMT3A y A2aR. Para los fines de la invención, los ejemplos de genes que debilitan la función de las células inmunes son PD-1 y TIGIT.

10 En algunos ejemplos, se utilizan dos tipos de ARNsh que se dirigen a un gen o a genes que debilitan la función de las células inmunes. En algunos ejemplos, los dos tipos de ARNsh se dirigen a un solo gen que debilita la función de las células inmunes o se dirigen a diferentes genes que debilitan la función de las células inmunes. De acuerdo con la invención, el vector proporcionado en este documento comprende dos tipos de ARNsh, un ARNsh se dirige a PD-1 y el segundo ARNsh se dirige a TIGIT.

15 El ARNsh forma una estructura de horquilla que comprende una secuencia de ARNsh con sentido (codificante) y una secuencia de ARNsh antisentido (no codificante). En algunas realizaciones, una secuencia de bases que codifica un ARNsh descrito en el presente documento comprende una secuencia seleccionada a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-219. En ciertas realizaciones, una secuencia de bases que codifica un ARNsh descrito en el presente documento comprende una secuencia seleccionada a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-219, en donde dicha secuencia codifica una secuencia de ARNsh con sentido. En ciertas realizaciones, una secuencia de bases que codifica un ARNsh descrito en el presente documento comprende una secuencia seleccionada a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-219, en donde dicha secuencia codifica una secuencia de ARNsh antisentido.

20 En algunas realizaciones, el vector comprende una cualquiera de las secuencias de bases SEQ ID NO: 220 o 221. En algunas realizaciones, el vector es un vector plasmídico o un vector vírico, por ejemplo, un vector de lentivirus, p. ej., un vector retrovírico, un vector de adenovirus o un vector de virus adenoasociado.

25 En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan células inmunes que comprenden el vector de la invención. La expresión de los genes diana de los dos tipos de ARNsh puede reducirse hasta un 40% o menos que la de un grupo de control que no expresa ARNsh para el gen diana. En algunas realizaciones, la célula inmune se selecciona entre linfocitos T obtenidos a partir de seres humanos y células NK.

30 También se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende la célula inmune de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas para uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto humano. En algunas realizaciones, la célula inmune se obtiene originalmente a partir del paciente. En algunas realizaciones, el paciente tiene un tumor o un cáncer en el que se detecta un aumento o una variación de los niveles de antígeno del cáncer al que se dirigen el CAR o TCR, por ejemplo, el mTCR expresado en la célula.

35 En otro aspecto, en el presente documento se proporciona una célula inmune que comprende el vector de la invención que expresa un receptor de antígeno modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno diana y un agente de alteración genética, a saber, dos tipos de ARNsh, que reducen o pueden reducir la expresión en la célula inmune de los genes que debilitan la función de la célula inmune, a saber, PD-1 y TIGIT.

Según la invención, el receptor de antígeno manipulado genéticamente es un receptor de antígeno quimérico (CAR).

40 En algunas realizaciones, el CAR comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembranal y un dominio de transducción de señales intracelular. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno extracelular del CAR se une específicamente al antígeno diana.

45 En algunas realizaciones, el dominio de transducción de señales intracelular del CAR comprende un dominio intracelular de una cadena CD3 zeta (CD3 ζ). En algunas realizaciones, el dominio de transducción de señales intracelular del CAR comprende además una molécula coestimuladora. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora se selecciona a partir del grupo que consiste en ICOS, OX40, CD137 (4-1BB), CD27 y CD28. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora es CD137 (4-1BB). En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora es CD28.

En algunos ejemplos, el receptor de antígeno modificado genéticamente es un TCR. En algunos ejemplos, el TCR es un TCR monoclonal (mTCR).

50 En algunas realizaciones, el antígeno diana se expresa en o sobre la superficie de una célula cancerosa, un tejido canceroso y/o un microentorno tumoral.

55 En algunas realizaciones, el antígeno diana se selecciona a partir del grupo que consiste en: 5T4 (glicoproteína de trofoblasto), 707-AP, 9D7, AFP (α -fetoproteína), AlbZIP (bZIP inducida por andrógenos), HPG1 (gen 1 específico de próstata humana), α 5 β 1-integrina, α 5 β 6-integrina, α -metilacil-coenzima A racemasa, ART-4 (ADPribosiltransferasa-4), B7H4 (inhibidor 1 de la activación de linfocito T que contiene el dominio v-set), BAGE-1 (antígeno 1 de melanoma B),

BCL-2 (CLL de linfocito B/linfoma-2), BING-4 (dominio de repetición de WD 46), CA 15-3/CA 27-29 (mucina 1), CA 19-9 (antígeno del cáncer 19-9), CA 72-4 (antígeno del cáncer 72-4), CA125 (antígeno del cáncer 125), calreticulina, CAMEL (antígeno reconocido por CTL en melanoma), CASP-8 (caspasa 8), catepsina B, catepsina L, CD19 (agrupación de diferenciación 19), CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA (antígeno 5 carcinoembrionario SG8), CLCA2 (accesorio 2 del canal de cloruro), CML28 (antígeno tumoral 28 de la leucemia mielógena crónica), proteína similar a la coactosina, colágeno XXIII, COX-2 (ciclooxygenasa-2), CT-9/BRD6 (cáncer/antígeno testicular 9), Cten (proteína similar a la tensina c-terminal), ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1 (miembro 1 de la subfamilia b de la familia 1 de citocromo p450), DAM-10/MAGE-B1 (antígeno B1 asociado con melanoma), DAM-6/MAGE-B2, EGFR/Her1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico), EMMPRIN (basigina), 10 EpCam, EphA2 (receptor A2 de EPH), EphA3, ErbB3 (receptor de tirosina cinasa 3 Erb-B2), EZH2 (potenciador de la subunidad 2 del complejo represivo zeste 2 polycomb), FGF-5 (factor de crecimiento de fibroblastos 5), FN (fibronectina), Fra-1 (antígeno 1 relacionado con Fos), G250/CAIX (anhidrasa carbónica 9), GAGE-1 (antígeno G 1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP (gen expresado diferencialmente en la próstata), GnT-V (glucuronato cinasa), gp100 (antígeno específico de linaje de melanocitos GP100), GPC3 (glipcano 3), HAGE (antígeno helicoidal), HAST-2 (miembro 1 de la familia de sulfotransferasa 1A), hepsina, Her2/neu/ErbB2 (receptor de tirosina cinasa 2 de Erb-B2), HERV-K-MEL, HNE (medulasina), homeobox NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, 15 HPV-E7, HST-2 (sirtuina 2), hTERT, iCE (caspasa 1), IGF-1R (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1), IL-13Ra2 (subunidad α 2 del receptor de interleucina-13), IL-2R (receptor de interleucina 2), IL-5 (interleucina 5), receptor de laminina inmaduro, calicreína 2, calicreína 4, Ki67, KIAA0205 (lisofosfatidilglicerol aciltransferasa 1), KK-LC-1 (antígeno 1 de cáncer de pulmón kita-kyushu), KM-HN-1, LAGE-1 (miembro 1 de la familia del antígenos L), Livina, 20 MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGEA2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGEB17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2 (familia L2 de antígenos de melanoma), mamaglobina A, MART-1/Melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T 1), MART-2, proteína 25 matricial 22, MC1R (receptor de melanocortina 1), M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos), mesotelina, MG50/PXDН (peroxidasa), MMP 11 (metaloproteasa matricial 11), antígeno MN/CA IX (anhidrasa carbónica 9), MRP-3 (proteína 3 asociada a la resistencia a múltiples fármacos), MUC1 (mucina 1), MUC2, NA88-A (seudogén 1 de homeobox 2 similar a VENT), N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP (Neo-poli (A) polimerasa), NGEP (gen nuevo expresado en la próstata), NMP22 (proteína matricial nuclear 22), NPM/ALK (nucleofosmina), NSE (enolasa específica de neuronas), 30 NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1 (osteoartritis QTL 1), OFA-iLRP (proteína del receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal), OGT (O-GlcNAc transferasa), OS-9 (lectina del retículo endoplásmico), osteocalcina, osteopontina, p15 (inhibidor de CDK 2B), p53, PAGE-4 (miembro 4 de la familia del antígeno P), PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno 1), PAI-2, PAP (fosfatasa ácida prostática), PART-1 (transcrito 1 regulado por andrógenos prostáticos), PATE (antígeno expresado en próstata y testículo 1), PDEF (factor Ets obtenido de la próstata), Pim-1-cinasa (sitio de 35 integración proviral 1), Pin1 (peptidil-prolil cis-trans isomerasa 1 que interacciona con NIMA), POTE (antígeno expresado en próstata, ovario, testículo y placenta), PRAME (antígeno expresado preferentemente en melanoma), prosteína, proteinasa-3, PSA (antígeno específico prostático), PSCA (antígeno de células madre prostáticas), PSGR (receptor acoplado a la proteína G específico de próstata), PSM, PSMA (antígeno de la membrana específica de próstata), RAGE-1 (antígeno de carcinoma tumoral renal), RHAMM/CD168, RU1 (proteína ubicua renal 1), RU2, SAGE (antígeno de 40 sarcoma), SART-1 (antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por linfocitos T 1), SART-2, SART-3, Sp17 (proteína de esperma 17), SSX-1 (miembro 1 de la familia SSX), SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1 (metaloreductasa STEAP2), STEAP, survivina, survivina-213, TA-90 (antígeno 90 asociado a tumor), TAG-72 (glicoproteína 72 asociada a tumor), TARP (proteína de marco de lectura alternativo de TCRγ), TGFb (factor de crecimiento transformante β), TGFbr11 (receptor 11 del factor de crecimiento transformante β), TGM-4 (transglutaminasa 4), TRAG-3 (gen 3 asociado a la resistencia al taxol), TRG (locus y del receptor de linfocitos T), TRP-1 (potencial de receptor transitorio 1), TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, tirosinasa, UPA (activador de plasminógeno U), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular A), VEGFR-2/FLK-1 y WT1 (tumor de Wilms 1). En algunas realizaciones, el antígeno diana es CD19 o CD22. En algunas realizaciones, el antígeno diana es CD19.

50 En algunas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno canceroso cuya expresión se incrementa en o sobre la superficie de una célula cancerosa, un tejido canceroso y/o un microentorno tumoral.

En algunas realizaciones, el antígeno diana se selecciona a partir del grupo que consiste en: α-actinina-4/m, ARTC1/m, bcrabl, beta-catenina/m, BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN, EFTUD2/m, ELF2/m, ETV6-AML1, FN1/m, GPNMB/m, HLA-A·0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-2M, KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT, MART2/m, ME1/m, MUM-1/m, MUM-2 /m, MUM-3/m, Miosina clase 1/m, neo-PAP/m, NYFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RARa, PRDX5 /m, PTPRX/m, RBAF600/m, 55 SIRT2/m, SYTSSX-1, SYT-SSX-2, TEL-AML1, TGFbRII y TPI/m; y en donde el antígeno diana es una forma mutada de un antígeno canceroso expresado en o sobre la superficie de una célula cancerosa, un tejido canceroso y/o un microentorno tumoral.

60 En algunas realizaciones, la expresión del gen que debilita la función de la célula inmune provoca uno o varios de los siguientes:

- i) inhibición de la proliferación de la célula inmune;
- ii) inducción de la muerte celular de la célula inmune;

- iii) inhibición de la capacidad de la célula inmune para reconocer el antígeno diana y/o activarse;
- iv) inducción de la diferenciación de la célula inmune en una célula que no induce una respuesta inmune frente al antígeno diana;

5 v) disminución de las reacciones de la célula inmune frente a una molécula que favorece la respuesta inmune de la célula inmune; o

- vi) aumento de las reacciones de la célula inmune frente a una molécula que inhibe la respuesta inmune de la célula inmune.

Según la invención, los genes que debilitan la función de la célula inmune son PD-1 y TIGIT. Tal y como se describe en este documento, un gen que debilita la función de la célula inmune puede seleccionarse a partir del grupo que consiste en: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 o CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 2B4, FAS, CD45, PP2A, SHP1, SHP2, DGK alfa, DGK zeta, Cbl-b, Cbl-c, CD148, LRR1, TGFBR1, IL10RA, KLGR1, DNMT3A y A2aR.

En algunas realizaciones, el gen que debilita la función de la célula inmune aumenta las reacciones de la célula inmune frente a una molécula que inhibe la respuesta inmune de la célula inmune.

15 En algunas realizaciones, el gen que aumenta las reacciones de la célula inmune frente a una molécula que inhibe la respuesta inmune de la célula inmune, codifica un ligando o un receptor de un punto de control inmune.

De acuerdo con la invención, el agente de alteración genética es ARNsh. En algunas realizaciones, el agente de alteración genética reduce la expresión de un gen en la célula inmune que debilita la función de la célula inmune en al menos un 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95%, en comparación con la célula inmune en ausencia del agente de alteración genética.

20 En algunas realizaciones, el agente de alteración genética reduce la expresión de un gen que aumenta las reacciones de la célula inmune frente a una molécula que inhibe la respuesta inmune de la célula inmune.

En algunas realizaciones, el agente de alteración genética reduce la expresión de un gen que codifica un ligando o un receptor de un punto de control inmune.

25 De acuerdo con la invención, el agente de alteración genética (es decir, ARNsh) reduce la expresión de PD-1 y TIGIT. Tal y como se describe en este documento, un agente de alteración genética puede reducir la expresión de un gen seleccionado a partir del grupo que consiste en: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK y 2B4.

30 El agente de alteración genética reduce la expresión del gen que debilita la función de la célula inmune mediante ARN interferente (ARNi). En algunas realizaciones, más de un agente de alteración genética reduce la expresión del gen que debilita la función de la célula inmune en la célula inmune mediante ARNi.

En algunas realizaciones, los agentes de alteración genética se dirigen a un único gen que debilita la función de la célula inmune, o se dirigen a diferentes genes que debilitan la función de la célula inmune, en donde un primer agente de alteración genética se dirige a un primer gen y un segundo agente de alteración genética se dirige a un segundo gen, o cualquier combinación de los mismos.

35 El ARNi está mediado por un ARN de horquilla corta (ARNsh). El ARNi puede estar mediado por más de un ARNsh. Según la invención, el ARNi está mediado por dos ARNsh.

40 En algunos ejemplos, dos ARNsh se dirigen a PD-1. En algunos ejemplos, un primer ARNsh se dirige a PD-1 y un segundo ARNsh se dirige a TIM-3. En algunos ejemplos, un primer ARNsh se dirige a PD-1 y un segundo ARNsh se dirige a CTLA-4. En algunos ejemplos, un primer ARNsh se dirige a PD-1 y un segundo ARNsh se dirige a LAG-3. De acuerdo con la invención, un primer ARNsh se dirige a PD-1 y un segundo ARNsh se dirige a TIGIT.

La célula inmune comprende secuencias de nucleótidos que codifican ARNsh. La célula inmune comprende un vector de la invención que comprende secuencias de nucleótidos que codifican dos ARNsh. A menos que se indique lo contrario, tal y como se usa en el presente documento, las expresiones "secuencia de bases" y "secuencia de nucleótidos" son intercambiables.

45 En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos que codifican el ARNsh comprenden secuencias seleccionadas a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-219 y 238-267.

Las secuencias de nucleótidos que codifican el ARNsh están en un vector.

50 En algunas realizaciones, la expresión de diferentes ARNsh está regulada respectivamente por diferentes promotores. En algunas realizaciones, la expresión de dos ARNsh diferentes está regulada respectivamente por dos promotores diferentes. En algunas realizaciones, los dos promotores diferentes son promotores de ARN polimerasa III. En algunas realizaciones, los dos promotores son promotores U6. En algunas realizaciones, los promotores U6 se obtienen a partir

de diferentes especies. En algunas realizaciones, los dos promotores están orientados con diferentes direcciones en relación uno con otro. Por ejemplo, en una determinada realización, los promotores están orientados con una orientación de cabeza a cabeza. En otra realización, los promotores están orientados con una orientación de cola con cola.

5 El receptor de antígeno modificado genéticamente y el agente de alteración genética se expresan cada uno a partir de un vector. De acuerdo con la invención, el receptor de antígeno quimérico modificado genéticamente y el ARNsh se expresan a partir del mismo vector.

En algunas realizaciones, el vector es un vector plasmídico o un vector vírico. En algunas realizaciones, el vector vírico es un vector de lentivirus o un vector de adenovirus. En algunas realizaciones, el vector de lentivirus es un vector de retrovirus.

10 En algunas realizaciones, la célula inmune se selecciona a partir del grupo que consiste en un linfocito T y un linfocito citolítico natural (NK). En algunas realizaciones, la célula inmune es un linfocito T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T CD4+ o un linfocito T CD8+.

15 La célula inmune comprende secuencias de nucleótidos que codifican dos ARNsh y un CAR en el mismo vector. En algunas realizaciones, los dos ARNsh están regulados por dos promotores de ARN polimerasa III diferentes, orientados con direcciones diferentes en relación uno con otro. Por ejemplo, en una realización determinada, los promotores están orientados con una orientación de cabeza a cabeza. En otra realización, los promotores están orientados con una orientación de cola a cola. En algunas realizaciones, el CAR se dirige a CD19, el primer ARNsh se dirige a PD-1 y el segundo ARNsh se dirige a TIGIT.

20 En el presente documento se describe un método para producir una célula inmune que comprende introducir en una célula inmune, simultánea o secuencialmente en cualquier orden:

- (1) un gen que codifica un receptor de antígeno modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno diana; y
- (2) un agente de alteración genética que reduce o es capaz de reducir la expresión en la célula inmune de un gen que debilita la función de la célula inmune,

25 produciendo de este modo una célula inmune en la que se expresa un receptor de antígeno modificado genéticamente y se reduce la expresión del gen que debilita la función de la célula inmune.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende la célula inmune de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 En otro aspecto, en el presente documento se proporciona una célula inmune de la invención o una composición de la misma para uso en un método de tratamiento, en donde el método comprende administrar a un sujeto que tiene una enfermedad o una afección, la célula inmune o la composición. En algunas realizaciones, el receptor de antígeno modificado genéticamente se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o la afección. En algunas realizaciones, la enfermedad o la afección es un cáncer o un tumor.

35 Se describe el uso de una célula inmune o de la composición en la producción de un medicamento para tratar una enfermedad o una afección.

Breve descripción de los dibujos

FIGs. 1A-1E. Generación de linfocitos T CAR bloqueadores de PD-1 intrínseco de la célula. (FIG. 1A) Representación esquemática de vectores CAR de dos en uno. (FIGs. 1B-C) La expresión de LNGFR y CAR se analizó 4 días después de la transducción. (FIG. 1D) Los linfocitos T CAR se clasificaron utilizando perlas magnéticas LNGFR y se sembraron 2×10^5 /ml. Los recuentos acumulativos de linfocitos T CAR se evaluaron mediante tinción con azul de tripano. (FIG. 1E) Se mezclaron linfocitos T CAR LNGFR+ con células NALM-6 irradiadas con γ , sin citocinas exógenas.

FIG. 2. Efecto de los tipos de promotor Pol III sobre el bloqueo intrínseco de PD-1 en las células.

FIGs. 3A-3B. Citotoxicidad *in vitro* y proliferación bajo estimulación con CD19 y PD-L1 con bloqueo de PD-1. (FIG. 3A) Los linfocitos CAR T LNGFR+ se mezclan con NALM-6 o NALM-6-PDL1 vivas con una relación E:T (célula efectora:célula diana) de 1:1, 0,3:1, 0,1:1. (FIG. 3B) Se mezclaron linfocitos T CAR LNGFR+ con NALM-6-PDL1, NALM-6-PDL1-CD80 o K562-CD19-PDL1 irradiadas con γ y en una relación E:T de 1:1, sin citocinas exógenas.

FIG. 4. Función antitumoral de los linfocitos T CAR *in vivo* con bloqueo de PD-1 intrínseco en la célula.

Figura 5A. Producción reducida de citocinas *in vivo* en la alteración de PD-1 intrínseca en la célula, de linfocitos T CAR. La FIG. 5B muestra una expansión retrasada *in vivo* de los linfocitos T CAR con alteración de PD-1 intrínseca en la célula.

FIGs. 6A-6B. Función de los linfocitos T CAR CD28/CD3ζ o 4-1BB/CD3ζ en la alteración de PD-1 intrínseca en la

célula. (FIG. 6A) Representación esquemática de los vectores G28z, GBBz, P28z y PBBz. (FIG. 6B) Análisis con citometría de flujo que muestra la expresión de LNGFR en linfocitos T transducidos, 4 días después de la transducción.

FIGs. 7A-7B. Nivel de expresión de PD-1 cuando se coestimula con CD28 o 4-1BB. (FIG. 7A) Se incubaron linfocitos CAR T LNGFR+ con NALM- o K562-CD19 6 irradiadas con γ , sin citocinas exógenas. La expresión de PD-1 de los linfocitos CAR T LNGFR+ se analizó 3 días después de la incubación. (FIG. 7B) Resultados cuantitativos de una PCR en tiempo real realizada con cebadores PD-1.

FIGs. 8A-8B. Establecimiento de un sistema indicador con NFAT o NF- κ B. (FIG. 8A) Representación esquemática de los vectores indicadores NFAT-RE 3x-eGFP y NF- κ B-RE 5x-eGFP. (FIG. 8B) Número de veces de cambio de la actividad indicadora calculada usando eGFP gMFI de linfocitos T CAR LNGFR+.

FIGs. 9A-9B. Activación de la señalización de NFAT con la coestimulación de CD28 pero no con la coestimulación de 4-1BB. (FIG. 9A) Los linfocitos T transducidos con el indicador se volvieron a estimular y se transdijeron usando G28z o GBBz. (FIG. 9B) El nivel de ARNm de los genes diana de NFAT en los linfocitos T CAR se evaluó mediante qPCR.

FIG. 10. Señalización activada con NF- κ B con la coestimulación de CD28 y 4-1BB.

FIGs. 11A-11C. La intensidad de la señalización con TGF- β de G28z CART es ligeramente superior a BBz CART. (FIG. 11A) SMAD2/3 fosforilado en los linfocitos T CAR se analizó mediante citometría de flujo intracelular después de la incubación con NALM-6 con una relación de células E:T de 1:1, durante 4 horas o 24 horas. (FIG. 11B) Análisis con citometría de flujo que muestra la expresión de PD-1 en linfocitos T CAR G28z y GBBz con 10 ng/ml de TGF- β 1 humano recombinante. (FIG. 11C) El nivel de ARNm de TGF- β 1, TGFBR1 y TGFBR2 en los linfocitos T CAR se evaluó mediante qPCR.

FIGs. 12A-12B. Citotoxicidad retenida y capacidad proliferativa *in vitro* de linfocitos T CAR PBBz bajo una estimulación repetida con CD19 y PD-L1. (FIG. 12A) Citotoxicidad. Parte superior, después de una clasificación magnética con LNGFR, los linfocitos CAR T LNGFR+ primarios de 12 días se mezclaron con NALM-6-PDL1 con una relación E:T de 1:1, 0,3:1, 0,1:1. Parte inferior, los linfocitos T CAR LNGFR+ se estimularon con K562-CD19-PDL1 irradiadas con γ en una relación E:T de 1:1. (FIG. 12B) Se estimularon repetidamente los linfocitos T CAR LNGFR+ mezclados con NALM-6-PDL1-CD80 o K562-CD19-PDL1 irradiadas con γ en una relación E:T de 1:1, sin citocinas exógenas.

FIGs. 13A-13C. Linfocitos T reguladores obtenidos a partir de CAR menos sensibles a una disfunción mediada por TGF-beta y con baja generación *in vitro* en linfocitos T CAR PBBz. (FIG. 13A) Supresión mediada por TGF-beta de la proliferación de CAR-T. (FIG. 13B) Sensibilidad de TGF-beta frente a una inducción de Treg. (FIG. 13C) Efecto de PDL1/PD-1 para la inducción de Treg.

FIG. 14. Inhibición continua de la progresión de leucemia a través de linfocitos T CAR PBBz.

FIG. 15. Diagrama de la composición de dos tipos de vectores que codifican dos tipos de ARNsh, uno de los cuales inhibe la expresión de PD-1 y el segundo inhibe la expresión de TIM-3, y un casete de expresión de CD19 CAR.

FIG. 16. Diagrama del procedimiento de preparación de linfocitos T CAR, en donde se prepararon células Δ LNGFR-CART19/mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1-hU6 y células Δ LNGFR-CART19/shTIM-3-mU6 $\leftarrow\rightarrow$ hU6-shPD-1 y se aislaron como se describe en este documento.

FIG. 17. Datos de una citometría de flujo de linfocitos T CAR que comprenden los vectores ilustrados en la FIG. 15 (células Δ LNGFR-CART19/mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1-hU6 y células Δ LNGFR-CART19/shTIM-3-mU6 $\leftarrow\rightarrow$ hU6-shPD-1).

FIGs. 18A-18B. FIG. 18A. Datos de una citometría de flujo para células Δ LNGFR-CART19/mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1-hU6 y células Δ LNGFR-CART19/shTIM-3-mU6 $\leftarrow\rightarrow$ hU6-shPD-1 producidas utilizando los métodos del Ejemplo 8. FIG. 18B. Expresión de PD-1 y TIM-3 en los linfocitos T CAR.

FIG. 19. Datos de una citometría de flujo en donde los linfocitos T CAR se estimularon repetidamente usando las células diana, después de lo cual se confirmó el grado de diferenciación celular usando anticuerpos CD45RA y CCR7.

FIG. 20A-20C. Evaluación de linfocitos T CAR producidos utilizando los métodos del Ejemplo 8. FIG. 20A: Eficacia de la transducción. FIG. 20B: Capacidad de proliferación. FIG. 20C: Viabilidad.

FIGs. 21A-21C. Selección de ARNsh dirigidos a CTLA-4, LAG-3, TIGIT y TIM-3. FIG. 21A: linfocitos T estimulados 2 días con CD3/CD28 se someten a una electroporación con ARNsi de 21 unidades dirigidos a CTLA-4, LAG-3, TIGIT y TIM-3. La eficacia de las inactivaciones mediadas por ARNsi se confirmaron 2 días después de la transfección. Sombreado: en función de la secuencia de los ARNsi seleccionados, se construyeron vectores de dos en uno que expresaban CAR y ARNsh. El sombreado indica los ARNsi seleccionados inicialmente. FIG. 21B: Los linfocitos T se transdijeron con vectores de dos en uno que contenían ARNsh de CTLA-4, LAG-3, TIGIT o TIM-3 y se clasificaron con perlas magnéticas LNGFR. Los recuentos de linfocitos CAR T LNGFR+ se realizaron cada 3 días después de sembrar 2×10^5 /ml. FIG. 21C: Expresión de Tim3 (%).

FIGs. 22A-22E. Generación de linfocitos T CAR con alteración en puntos de control inmunes dobles. (FIG. 22A)

5 Representación esquemática de vectores dobles de dos en uno. FIG. 22B: Se analizó el porcentaje de linfocitos T LNGFR+ 4 días después de la transducción doble de dos en uno. (FIG. 22C) Los linfocitos T CAR KD dobles (desactivados) se clasificaron y sembraron 2×10^5 /ml. Los recuentos acumulados de linfocitos T CAR se realizaron mediante tinción con azul de tripano. (FIGs. 22D-22E) Se analizó la expresión de LAG-4, PD-1, TIGIT o TIM-3 de los linfocitos T CAR LNGFR+, 3 días después del cocultivo con NALM-6 o K562-CD19 irradiadas con γ . La expresión de CTLA-4 se analizó mediante citometría de flujo intracelular.

10 FIG. 23. Tratamiento de un cáncer de sangre CD19+ *in vivo* utilizando linfocitos T CAR KD dobles dirigidos a dos puntos de control inmunes.

15 FIG. 24. Tratamiento de un cáncer en un modelo de tumor sólido utilizando linfocitos T CAR KD dobles dirigidos a PD-1 y TIGIT.

Descripción detallada

15 Las características de la presente descripción se exponen específicamente en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y beneficios de la presente descripción haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que describe realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la descripción. Para facilitar una comprensión completa de la descripción a la que se hace referencia en este documento, se definen a continuación una serie de términos.

20 Brevemente, en un aspecto, en el presente documento se describen vectores que comprenden: una secuencia de bases que codifica dos tipos de ARN de horquilla corta (ARNsh) que inhiben la expresión de uno o varios genes que debilitan la función de las células inmunes, incluyendo los receptores y ligandos del punto de control inmune, y una secuencia de bases que codifica un receptor de antígeno, tal como un receptor de antígeno químérico (CAR) o un receptor de linfocitos T (TCR), por ejemplo, un receptor de linfocitos T monoclonal (mTCR); una célula inmune que comprende un receptor de antígeno modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno diana y uno o varios agentes de alteración genética que reducen o son capaces de reducir la expresión en la célula inmune de un gen o genes que debilitan la función de la célula inmune; métodos para producir la célula inmune; una composición o una composición farmacéutica que comprende la célula inmune, p. ej., para la inmunoterapia de pacientes humanos; y un método de tratamiento que comprende administrar la célula inmune a un sujeto que tiene una enfermedad o una afección. Ya que la célula inmune, la composición o la composición farmacéutica comprende uno o varios agentes de alteración genética, por ejemplo, codifica dos ARNsh que reducen la expresión de dos genes de moléculas de puntos de control inmunes que pueden ser activados por células cancerosas para debilitar la función de las células inmunes, 25 es posible eliminar las reacciones adversas graves y sistémicas, como el síndrome de liberación de citocinas o los síntomas autoinmunes que pueden dar como resultado el uso de un inhibidor distinto para esos genes, así como reducir la carga debido al aumento de los costes del tratamiento resultante con terapias concurrentes costosas, al tiempo que proporciona una terapia celular más eficaz que en los casos en los que solo se expresa un ARNsh.

30

1. Técnicas Generales

35 Las técnicas y los procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento, incluyen aquellos que generalmente se conocen bien y/o se emplean comúnmente, utilizando una metodología convencional por parte de los expertos en la materia, como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4^a ed. 2012); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. compiladores, 2003); Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An compilador 2009); Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols (Albitar compilador 2010); y Antibody Engineering vols. 1 y 2 (Kontermann y Dübel compiladores, 2^a ed. 2010). Molecular Biology of the Cell (6^a ed., 2014).

2. Definiciones

40 A menos que se describa de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia. Con el fin de interpretar esta memoria descriptiva, se aplicará la siguiente descripción de los términos y, cuando corresponda, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa.

45 Los términos usados en la presente descripción se usan solo para explicar realizaciones específicas y no pretenden limitar el alcance de la presente invención. Las expresiones en singular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, incluyen las expresiones en plural. Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos, etc., particulares, descritos en el presente documento y, como tales, pueden variar. La terminología utilizada en este documento tiene únicamente la finalidad de describir realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define solamente con las reivindicaciones.

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

55 El uso de una alternativa (por ejemplo, "o") debe entenderse como una, ambas o cualquier combinación de las

alternativas.

Debe entenderse que el término "y/o" significa una o ambas alternativas.

Tal y como se usan en este documento, la expresión "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía tanto como un

5 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%, en comparación con una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En una realización, la expresión o el término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a un intervalo de cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud \pm 15%, \pm 10%, \pm 9%, \pm 8%, \pm 7%, \pm 6%, \pm 5%, \pm 4%, \pm 3%, \pm 2% o \pm 1% de una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

10 15 La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a "1 realización", "una realización", "una realización particular", "una realización relacionada", "una determinada realización", "una realización adicional" o "una realización más" o combinaciones de las mismas o similares, significa que una característica, estructura o característica particular descrita en relación con la realización, está incluida en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, la aparición de las expresiones anteriores en diversos lugares a lo largo de esta memoria descriptiva, no se refieren necesariamente todas a la misma realización. Además, las características, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

20 Una "estructura artificial" se refiere a una macromolécula o un complejo de moléculas que comprende un polinucleótido que se va a administrar a una célula diana, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Un "vector", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier estructura artificial de ácido nucleico capaz de dirigir la liberación o la transferencia de un material genético extraño a las células diana, en donde puede replicarse y/o expresarse. El término "vector", tal y como se usa en el presente documento, comprende la estructura artificial que se va a administrar. Un vector puede ser una molécula lineal o circular. Un vector puede ser integrante o no integrante. Los principales tipos de vectores incluyen, entre otros, plásmidos, vectores episomales, vectores víricos, cósmidos y cromosomas artificiales. Los vectores víricos incluyen, pero no se limitan a, vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado, vector de retrovirus, vector de lentivirus, vector de virus Sendai y similares.

25 30 35 Un "vector de dos en uno", tal y como se describe en el presente documento, es un vector que comprende una secuencia de bases que codifica uno o varios ARNs de horquilla corta (ARNsh) que inhiben la expresión de un gen o genes que debilitan la función de las células inmunes, y una secuencia de bases que codifica un receptor de antígeno químérico (CAR) o un receptor de linfocitos T, p. ej., un receptor de linfocitos T monoclonal (mTCR). Un "vector doble de dos en uno" tal y como se describe en este documento, es un vector que comprende una secuencia de bases que codifica dos tipos de ARN de horquilla corta (ARNsh) que inhiben la expresión de genes que debilitan la función de las células inmunes, y una secuencia de bases que codifica uno cualquiera entre un receptor de antígeno químérico (CAR) y un receptor de linfocitos T, p. ej., un receptor de linfocitos T monoclonal (mTCR). Los vectores dobles de dos en uno descritos en el presente documento, son una forma de vector de dos en uno.

40 45 "ARNi" (también conocido como silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés), extinción o cosupresión) es un procedimiento de silenciamiento génico postranscripcional en el que las moléculas de ARN, de una manera específica de secuencia, inhiben la expresión génica, normalmente provocando la destrucción de moléculas específicas de ARNm. Los componentes activos del ARNi son ARNs de doble cadena cortos/pequeños (ARNds), denominados ARN interferentes pequeños (ARNsi), que normalmente contienen 15-30 nucleótidos (p. ej., 19 a 25, 19 a 24 o 19-21 nucleótidos) y 2 nucleótidos sobresalientes en 3' y que coinciden con la secuencia de ácido nucleico del gen diana. Esas especies de ARN corto pueden producirse naturalmente *in vivo* mediante una escisión mediada por Dicer de ARNd más grandes y son funcionales en las células de mamífero. Los plásmidos de expresión de ADN se pueden usar para expresar de manera estable los dúplex de ARNsi o ARNd de la presente descripción, en las células y lograr una inhibición a largo plazo de la expresión del gen diana. En un aspecto, las hebras sentido y antisentido de un dúplex de ARNsi normalmente están unidas por una secuencia espaciadora corta que conduce a la expresión de una estructura de tallo y bucle denominada ARN de horquilla corta (ARNsh). La horquilla es reconocida y escindida por Dicer, generando así moléculas de ARNsi maduras.

50 55 El término "ARNsh" se refiere a una molécula de ARN en la que algunas secuencias autocomplementarias crean una estructura de horquilla estrecha con su tallo. La molécula de ARN puede tener una longitud de aproximadamente 80 pb. Cuando el ARNsh se expresa en una célula, se procesa a través de una serie de etapas para convertirse en un pequeño ARN interferente (ARNsi) que actúa como guía para el silenciamiento génico. En pocas palabras, cuando se expresa el ARNsh, los complejos Drosha lo procesan en la célula para convertirlo en pre-ARNsh, que luego se transporta fuera del núcleo, en donde se somete a un procesamiento adicional por un Dicer para convertirse en ARNsi, y luego se vuelve monocatenario y se carga mediante un complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). En este documento, la hebra antisentido del ARNsi actúa como una guía para que el complejo RISC se una al ARNm del gen diana, y el silenciamiento del gen ocurre cuando el complejo RISC, que se ha unido de esta manera, corta el ARNm. Ya que el ARNsh en un gen diana permite el silenciamiento génico que es duradero y específico de un determinado gen, se incluye en el vector con el fin de inhibir el gen diana.

El término "promotor" se refiere a la región aguas arriba de un gen implicado en el comienzo de la transcripción de un gen. Los dos tipos de ARNsh descritos anteriormente también hacen que el promotor regule la expresión. En este documento, la expresión de los dos tipos de ARNsh se puede caracterizar porque están regulados por dos promotores diferentes, respectivamente. Si la clonación se produce con secuencias de bases idénticas utilizando insertos repetidos, se considera muy probable que no se produzca una clonación adecuada debido a la unión entre esas secuencias de bases idénticas, lo que da como resultado una recombinación o una delección. Los promotores pueden ser el promotor de ARN polimerasa I, el promotor de ARN polimerasa II o el promotor de ARN polimerasa III, dependiendo de qué ARN polimerasa se fija al promotor y comienza la transcripción. Los dos promotores anteriores se pueden caracterizar porque son promotores de ARN polimerasa III (de aquí en adelante, promotor de pol III). Se puede hacer que los promotores de pol III transcriban con precisión desde el extremo terminal 5' al extremo terminal 3', sin fijar el casquete en el extremo terminal 5' o la cola poli (A) en el extremo terminal 3' del ARN que se transcribe con regulación mediante el promotor. Los tipos de promotor de pol III incluyen, pero no se limitan a, promotor U6, promotor H1 y promotor 7SK, etc.

El término "G28z" utilizado en el presente documento se refiere a una estructura artificial que incluye un casete de expresión de shGFP, un dominio de coestimulación CD28 y un dominio CD3 ζ (FIG. 6A). Más específicamente, en el término "G28z", la "G" representa shGFP; el "28" representa CD28; la "z" representa CD3 ζ . Siguiendo el mismo patrón, el término "P28z" utilizado en el presente documento, se refiere a una estructura artificial que incluye un casete de expresión de shPD-1, un dominio de coestimulación CD28 y un dominio CD3 ζ (FIG. 6A), en donde "P" representa shPD-1, "28" representa "CD28" y "z" representa CD3 ζ . El término "GBBz" utilizado en el presente documento se refiere a una construcción que incluye un casete de expresión de shGFP, un dominio de coestimulación 4-1BB y un dominio CD3 ζ (FIG. 6A), en donde la "G" representa shGFP; el "BB" representa 4-1BB; la "z" representa CD3 ζ . El término "PBBz" utilizado en este documento se refiere a una estructura artificial que incluye un casete de expresión shPD-1, un dominio de coestimulación 4-1BB y un dominio CD3 ζ (FIG. 6A), en donde la "P" representa shPD-1; "BB" representa 4-1BB; y "z" representa CD3 ζ .

CAR es generalmente un conjunto de polipéptidos que, cuando existen en una célula inmune, hacen que la célula inmune tenga especificidad para una célula diana (normalmente una célula cancerosa) al mismo tiempo que provocan la transducción de señales en la célula. CAR comprende como mínimo un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular que reconoce el antígeno diana que se describirá a continuación, un dominio transmembranal y un dominio de transducción de señales intracelular, en donde el dominio de transducción de señales intracelular se obtiene a partir de las moléculas promotoras o moléculas coestimuladoras que se describirán a continuación. El conjunto que comprende los polipéptidos se puede fijar, o puede estar en una forma en la que se fija a través de un conmutador que se dimeriza mediante estimulación. La molécula promotora puede ser la cadena zeta del TCR descrito anteriormente. "CD19 CAR" es un CAR que se dirige al antígeno del cáncer CD19.

La expresión "receptor de linfocitos T (TCR)", tal y como se usa en este documento, se refiere a un receptor proteico en los linfocitos T que está compuesto por un heterodímero de una cadena alfa (α) y una beta (β), aunque en algunas células el TCR consiste en cadenas gamma y delta (γ/δ). En ciertas realizaciones, el TCR puede modificarse en cualquier célula que comprenda un TCR, incluyendo un linfocito T colaborador, un linfocito T citotóxico, un linfocito T de memoria, un linfocito T regulador, un linfocito T citolítico natural y un linfocito T gamma delta, por ejemplo.

La expresión "receptor de linfocitos T monoclonal (mTCR)" utilizada en el presente documento, se refiere a un receptor de linfocitos T (TCR) que está modificado genéticamente para dirigirse específicamente a un antígeno particular. También puede denominarse TCR específico de antígeno. Se ha descrito que los linfocitos T que tienen mTCR se usan en inmunoterapia, como la terapia de linfocitos T adoptiva, para una infección vírica y el cáncer. En algún aspecto, la transferencia con retrovirus de estructuras artificiales de anticuerpos de cadena sencilla químéricos (scFv) se ha utilizado como una estrategia para producir linfocitos T con una especificidad de antígeno definida. En su mayor parte, las estructuras artificiales químéricas de scFv se unían a los dominios de señalización intracelular de FcR-gamma o CD3 zeta para desencadenar la función efectora de los linfocitos T. El dominio zeta de CD3 se ha combinado con los dominios de señalización de moléculas coestimuladoras tales como CD28, 4-1BB u OX40. Los receptores de linfocitos T monoclonales (mTCR) y sus aplicaciones en la terapia del cáncer se describen en Stauss et al., 2007, Molecular Therapy, 15(10): 1744-50, Zhang y Morgan, 2012, Advanced Drug Delivery Reviews, 64(8): 756-762, y Liddy et al., 2012, Natural Medicine, 18(6):980-7.

El término " Δ LNGFR" utilizado en el presente documento se refiere a un LNGFR (receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad) sin un dominio citoplásico, utilizado para la purificación de células en las que ha tenido lugar la inserción descrita anteriormente.

Una "célula inmune" puede caracterizarse en este documento como seleccionada a partir de, pero no limitada a, linfocitos, tales como linfocitos T citolíticos, linfocitos T auxiliares, linfocitos T gamma delta y linfocitos B, linfocitos T citolíticos naturales, mastocitos, eosinófilos, basófilos; y las células fagocíticas incluyen macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Los linfocitos T incluyen linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+.

Tal y como se usa en este documento, los términos "linfocito T" y "célula T" se usan indistintamente y se refieren a un tipo principal de glóbulo blanco que completa su maduración en el timo y tiene varias funciones en el sistema inmune, incluyendo la identificación de antígenos extraños específicos en el cuerpo y la activación y desactivación de otras

células inmunes. Un linfocito T puede ser cualquier linfocito T, tal como un linfocito T cultivado, por ejemplo, un linfocito T primario, o un linfocito T procedente de una línea de linfocitos T cultivados, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc., o un linfocito T obtenido a partir de un mamífero. El linfocito T puede ser una célula CD3+. El linfocito T puede ser cualquier tipo de linfocito T y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, incluidos, entre otros, linfocitos T CD4+/CD8+ dobles positivos, linfocitos T auxiliares CD4+ (p. ej., linfocitos Th1 y Th2), linfocitos T CD8+ (p. ej., linfocitos T citotóxicos), células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), leucocitos de sangre periférica (PBLs), linfocitos infiltrantes de tumores (TILs), linfocitos T de memoria, linfocitos T vírgenes, linfocitos T reguladores, linfocitos T gamma delta (linfocitos T γδ) y similares. Los tipos adicionales de linfocitos T auxiliares incluyen células tales como los linfocitos Th3 (Treg), Th17, Th9 o TfH. Los tipos adicionales de linfocitos T de memoria incluyen células tales como linfocitos T de memoria central (linfocitos Tcm), linfocitos T de memoria efectores (linfocitos Tem y linfocitos TEMRA). El linfocito T también puede referirse a un linfocito T modificado genéticamente, tal como un linfocito T modificado para expresar un receptor de linfocitos T (TCR) o un receptor de antígeno químérico (CAR). El linfocito T también se puede diferenciar a partir de una célula madre o una célula progenitora.

"Linfocitos T CD4+" se refiere a un subconjunto de linfocitos T que expresan CD4 en su superficie y están asociados con una respuesta inmune mediada por células. Se caracterizan por los perfiles de secreción posteriores a la estimulación, que pueden incluir la secreción de citocinas tales como IFN-gamma, TNF-alfa, IL2, IL4 e IL10. "CD4" son glicoproteínas de 55 kD definidas originalmente como antígenos de diferenciación en los linfocitos T, pero también se encuentran en otras células, incluidos los monocitos/macrófagos. Los antígenos CD4 son miembros de la familia de supergenes de inmunoglobulina y están implicados como elementos de reconocimiento asociativo en las respuestas inmunes restringidas por la clase II del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad). En los linfocitos T, definen el subconjunto auxiliar/inductor.

"Linfocitos T CD8+" se refiere a un subconjunto de linfocitos T que expresan CD8 en su superficie, están restringidos por la clase I del MHC y actúan como linfocitos T citotóxicos. Las moléculas "CD8" son antígenos de diferenciación que se encuentran en los timocitos y en los linfocitos T citotóxicos y supresores. Los antígenos CD8 son miembros de la familia de supergenes de inmunoglobulina y son elementos de reconocimiento asociativo en interacciones restringidas por la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad.

Tal y como se usa en este documento, la expresión "célula NK" o "linfocito citolítico natural" se refiere a un subconjunto de linfocitos de sangre periférica definidos por la expresión de CD56 o CD16 y la ausencia del receptor de linfocitos T (CD3). Tal y como se usa en el presente documento, las expresiones "célula NK adaptativa" y "célula NK de memoria" son intercambiables y se refieren a un subconjunto de células NK que son fenotípicamente CD3- y CD56+, que expresan al menos uno entre NKG2C y CD57 y, opcionalmente, CD16, pero carecen de expresión de uno o varios de los siguientes: PLZF, SYK, FcεRγ y EAT-2. En algunas realizaciones, subpoblaciones aisladas de células NK CD56+ comprenden la expresión de CD16, NKG2C, CD57, NKG2D, ligandos de NCR, NKp30, NKp40, NKp46, KIRs activadores e inhibidores, NKG2A y/o DNAM-1. CD56+ puede tener una expresión tenue o brillante.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "puntos de control inmunes" se refiere a moléculas que existen en el sistema inmune y que son capaces de activar o desactivar la respuesta inmune. Originalmente, son dispositivos de seguridad para regular una activación excesiva de las células inmunes, lo que provoca una muerte celular o una respuesta autoinmune. Esas moléculas de punto de control inmune pueden clasificarse ampliamente en moléculas de punto de control inmune estimulantes que aumentan la respuesta inmune y moléculas de punto de control inmune inhibidoras que inhiben la respuesta inmune. Por ejemplo, el receptor del punto de control inmune y los ligandos pueden seleccionarse a partir de un grupo que consiste en PD1 (proteína 1 de muerte celular programada), PD-L1 (ligando 1 de muerte programada), CTLA4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos), TIM-3 (inmunoglobulina de linfocito T y que contiene dominio de mucina 3), CEACAM (molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario, incluidos los tres subtipos CEACAM-1, CEACAM-3 o CEACAM-5), LAG3 (gen 3 de activación de linfocitos), VISTA (supresor del dominio V de Ig de la activación de linfocitos T), BTLA (atenuador de linfocitos B y T), TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios de Ig e ITIM), LAIR1 (receptor 1 similar a inmunoglobulina asociado a leucocitos), CD160 (agrupación de diferenciación 160), CD96 (agrupación de diferenciación 96), MerTK (Proto-oncogén de tirosina-proteína cinasa MER) y 2B4 (ligando inductor de la activación de células NK), y, por ejemplo, se puede seleccionar entre PD1 y TIM3.

El término "cultivo" o "cultivo celular" se refiere al mantenimiento, crecimiento y/o diferenciación de células en un entorno *in vitro*. "Medios de cultivo celular", "medios de cultivo" (singular "medio" en cada caso), "complemento" y "complemento de medios", se refieren a composiciones nutritivas en donde se cultivan cultivos celulares. El término "cultivar" o "mantener" se refiere al mantenimiento, propagación (crecimiento) y/o diferenciación de células fuera del tejido o del cuerpo, por ejemplo, en una placa o matraz de cultivo celular de plástico estéril (o plástico recubierto). "Cultivo" o "mantenimiento" puede utilizar un medio de cultivo como fuente de nutrientes, hormonas y/u otros factores útiles para propagar y/o mantener las células.

Una "composición farmacéutica" para inmunoterapia en pacientes humanos descrita en el presente documento comprende las células inmunes. Como es evidente, además de las células, a la composición farmacéutica se pueden añadir otras sales, soportes, excipientes, vehículos y otros aditivos, etc., farmacéuticamente aceptables que pueden mejorar aún más la respuesta inmune, se omitirá una explicación detallada de los mismos.

El término "sujeto" se refiere a cualquier animal (p. ej., un mamífero), que incluye, entre otros, seres humanos, primates no humanos, animales caninos, felinos, roedores y similares, que serán el destinatario de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en este documento haciendo referencia a un sujeto humano.

5 Los términos "tratando" o "tratar" se refieren a suprimir, eliminar, reducir y/o mejorar un síntoma, la gravedad de un síntoma y/o la frecuencia de un síntoma de la enfermedad que se está tratando. Tal y como se usa en este documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" también se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de una enfermedad o afección, como resultado de la administración de una o varias terapias.

10 "Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, como los linfocitos T, tal y como se describe en el presente documento, eficaz para lograr un resultado biológico particular. Esos resultados pueden incluir, entre otros, la inhibición del cáncer tal y como se determina por cualquier medio adecuado en la técnica.

15 "Administrar" o "administración" se refiere al acto de inyectar o suministrar físicamente una sustancia tal como existe fuera del cuerpo a un paciente, como por vía mucosa, intradérmica, intravenosa, intramuscular y/o cualquier otro método de administración física descrito en el presente documento o conocido en la técnica.

3. Vectores de dos en uno dirigidos a uno o varios puntos de control inmune

Las células tumorales expresan diversos puntos de control inmunes, por ejemplo, ligandos de punto de control. Por lo tanto, incluso si se inhibe un punto de control inmune, podría ser difícil esperar un efecto sostenido de los CAR-T a través de la activación de otros puntos de control inmunes. La combinación de anticuerpos monoclonales se ha utilizado principalmente para inhibir múltiples puntos de control inmunes y su efecto antitumoral se describe con continuidad (J Clin Invest., 2015, Chauvin JM; PNAS, 2010, Curran MA; Blood, 2018, Wierz M; Cancer cell. 2014, Johnston RJ). Sin embargo, se sabía que los anticuerpos terapéuticos podían inducir una respuesta inmune sistémicamente excesiva. Además, la terapia con linfocitos T CAR también se asocia con el síndrome de liberación de citocinas (SRC) potencialmente mortal y con neurotoxicidad (Nat Rev Clin Oncol, 2017, Neelapu SS), lo que sugiere que la combinación de CAR-T y una terapia con anticuerpos podría maximizar el potencial de los efectos secundarios. Además, las terapias con células inmunes concurrentes convencionales imponen una carga económica aún mayor a los pacientes debido a su alto costo y a que también actúan sobre linfocitos T distintos de CAR-T y presentan un riesgo de síntomas autoinmunes y síndrome de liberación de citocinas. La presente invención se ha ideado para abordar los problemas anteriores.

30 El vector de la invención es un vector de dos en uno, es decir, un vector que comprende: una secuencia de bases que codifica dos tipos de ARN de horquilla corta (ARNsh) que inhiben la expresión de genes que debilitan la función de las células inmunes, y una secuencia de bases que codifica un receptor de antígeno químérico (CAR), tal y como se define en las reivindicaciones.

35 El vector puede seleccionarse entre ADN, ARN, plásmido, vector de lentivirus, vector de adenovirus y vector de retrovirus. Por ejemplo, el vector de lentivirus y los vectores de retrovirus pueden insertar genes en el ADN genómico de las células, lo que permite una expresión estable de los genes. En algunas realizaciones, por ejemplo, un vector de lentivirus de dos en uno, por ejemplo, un vector doble de dos en uno, puede usarse para introducir genes sobre el vector en el genoma de las células.

40 Se proporciona un vector que comprende una secuencia de bases que codifica dos tipos de ARN de horquilla corta (ARNsh) que inhiben la expresión de PD-1 y TIGIT, y una secuencia de bases que codifica un receptor de antígeno químérico (CAR).

45 En algunas realizaciones, la expresión de los dos tipos de ARNsh se caracteriza porque están regulados respectivamente por dos promotores diferentes. En algunas realizaciones, los dos promotores son promotores de ARN polimerasa III. En algunas realizaciones, los dos promotores son promotores U6 obtenidos a partir de diferentes especies. En algunas realizaciones, los dos promotores están orientados en diferentes direcciones en relación uno con otro en el vector. Por ejemplo, en una determinada realización, los promotores están orientados con una orientación de cabeza a cabeza. En otra realización, los promotores están orientados con una orientación de cola con cola.

50 Los dos tipos de ARNsh se dirigen a diferentes genes que debilitan la función de las células inmunes. En algunas realizaciones, las secuencias de bases que codifican los dos tipos de ARNsh comprenden diferentes secuencias seleccionadas a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-219.

55 En algunas realizaciones, la diana de CAR es un antígeno tumoral humano seleccionado a partir de antígenos cancerosos incrementados en el cáncer, o a partir de formas mutadas de antígenos cancerosos que se encuentran en el cáncer.

En algunas realizaciones, el vector comprende una cualquiera entre las secuencias de bases SEQ ID NO: 220 o 221. En algunas realizaciones, el vector se selecciona entre ADN, ARN, plásmido, vector de lentivirus, vector de adenovirus y vector de retrovirus.

3.1 ARN interferente y ARN de horquilla corta

El ARNi (también conocido como silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés), extinción o cosupresión) es un procedimiento de silenciamiento génico postranscripcional en el que las moléculas de ARN, de una manera específica de secuencia, inhiben la expresión génica, normalmente provocando la destrucción de

5 moléculas específicas de ARNm. Los componentes activos del ARNi son ARNs de doble cadena cortos/pequeños (ARNds), denominados ARNs interferentes pequeños (ARNsi), que normalmente contienen 15-30 nucleótidos (p. ej., 19 a 25, 19 a 24 o 19-21 nucleótidos) y 2 nucleótidos sobresalientes en 3' y que coinciden con la secuencia de ácido nucleico del gen diana. Esas especies de ARN corto pueden producirse naturalmente *in vivo* mediante una escisión mediada por Dicer de ARNds más grandes y son funcionales en las células de mamífero. Los plásmidos de expresión 10 de ADN se pueden utilizar para expresar de forma estable los dúplex de ARNsi o ARNds descritos en este documento en las células y lograr una inhibición a largo plazo de la expresión del gen diana. En un aspecto, las hebras sentido y antisentido de un dúplex de ARNsi normalmente están unidas por una secuencia espaciadora corta que conduce a la expresión de una estructura de bucle denominada ARN de horquilla corta (ARNsh). La horquilla es reconocida y escindida por Dicer, generando así moléculas de ARNsi maduras.

15 El ARN de horquilla corta (ARNsh), tal y como se usa en el presente documento, es una molécula de ARN en la que algunas secuencias autocomplementarias crean una estructura de horquilla estrecha con su tallo. Las moléculas de ARNsh descritas en este documento pueden tener entre 40 y 120 nucleótidos de longitud, p. ej., alrededor de 70 a 90 nucleótidos de longitud. En una realización ejemplar, el ARNsh puede tener una longitud de 80 nucleótidos. El ARNsh se diseña sobre micro ARN interferente (miARN), un desencadenante endógeno de la vía del ARNi (Lu et al., 2005, 20 Advances in Genetics 54: 117-142, Fewell et al., 2006, Drug Discovery Today 11: 975-982). Cuando el ARNsh se expresa en una célula, se procesa a través de una serie de etapas para convertirse en un ARN interferente pequeño (ARNsi) que actúa como guía para el silenciamiento génico. En pocas palabras, cuando se expresa el ARNsh, los complejos Drosha lo procesan en la célula para convertirlo en pre-ARNsh, que luego se transporta fuera del núcleo, en donde se somete a un procesamiento adicional mediante Dicer para convertirse en ARNsi, y luego RISC lo carga y lo 25 vuelve monocatenario (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Entonces, la hebra antisentido del ARNsi actúa como guía para que el complejo RISC se une al ARNm del gen diana, y el silenciamiento del gen ocurre cuando el complejo RISC, que se ha unido de esa manera, corta el ARNm. Como el ARNsh en un gen diana permite el silenciamiento génico que es duradero y específico para un determinado gen, se incluye en el vector con el fin de inhibir el gen diana.

30 Las pequeñas moléculas de ARN expresadas de forma natural, denominadas microARN (miARN), provocan el silenciamiento génico al regular la expresión de los ARNm. El RISC que contiene miARN se dirige al ARNm que presenta una complementariedad de secuencia perfecta con los nucleótidos 2-7 en la región 5' del miARN, que se denomina región semilla, y otros pares de bases con su región 3'. La regulación a la baja de la expresión génica mediada por el miARN puede estar causada por la escisión de los ARNm diana, la inhibición de la traducción de los 35 ARNm diana o la descomposición del ARNm. Las secuencias de direccionamiento del miARN generalmente se ubican en el extremo 3'-UTR de los ARNm diana. Un solo miARN puede tener como diana más de 100 transcritos de varios genes, y un mismo ARNm puede ser la diana de diferentes miARN.

Se pueden diseñar y sintetizar dúplex de ARNsi o ARNds dirigidos a un ARNm específico *in vitro* e introducirlos en las 40 células para activar los procesos de ARNi. Elbashir et al. demostraron que los dúplex de ARNsi de 21 nucleótidos (denominados ARNs interferentes pequeños) eran capaces de efectuar una desactivación de genes potente y específica, sin inducir una respuesta inmune en células de mamíferos (Elbashir SM et al., Nature, 2001, 411, 494-498). Desde ese informe inicial, el silenciamiento génico postranscripcional mediante ARNsi ha irrumpido rápidamente como una herramienta poderosa para el análisis genético en células de mamíferos y tiene potencial para producir terapias novedosas.

45 Las moléculas de ARNi que se diseñaron para dirigirlas contra una secuencia de ácido nucleico que codifica proteínas repetidas de poliglutamina que causan enfermedades de expansión de poliglutamina, tales como la enfermedad de Huntington, se describen en los documentos de patente de EE. UU. n.º 9.169.483 y 9.181.544 y de Publicación de Patente Internacional n.º WO2015179525. Los documentos de patente de EE. UU. n.º 9.169.483 y 9.181.544 y de Publicación de Patente Internacional n.º WO2015179525 proporcionan cada uno dúplex de ARN aislados que comprenden una primera cadena de ARN (p. ej., 15 nucleótidos contiguos) y una segunda cadena de ARN (p. ej., complementaria a al menos 12 nucleótidos contiguos de la primera cadena), en donde el dúplex de ARN tiene entre 15 y 30 pares de bases de longitud. La primera hebra de ARN y la segunda hebra de ARN pueden ligarse 50 funcionalmente mediante un bucle de ARN (~4 a 50 nucleótidos) para formar una estructura de horquilla que puede insertarse en una casete de expresión. Ejemplos no limitantes de porciones de bucle incluyen SEQ ID NOS: 9-14 del documento de patente de EE. UU. n.º 9.169.483. Ejemplos no limitantes de hebras de ARN que pueden usarse, ya sea como secuencia completa o parte de la secuencia, para formar dúplex de ARN incluyen SEQ ID NOS: 1-8 del documento de patente de EE. UU. n.º 9.169.483 y SEQ ID NOS: 1-11, 33-59, 208-210, 213-215 y 218-221 del documento de patente de EE. UU. n.º 9.181.541. Ejemplos no limitantes de moléculas de ARNi incluyen SEQ ID NOS: 1-8 del documento de patente de EE. UU. n.º 9.169.483, SEQ ID NOS: 1-11, 33-59, 208-210, 213-215 y 218-221 del documento de patente de EE. UU. n.º 9.181.544 y SEQ ID NOS: 1, 6, 7 y 35-38 del documento de Publicación de 55 Patente Internacional n.º WO2015179525.

- Las moléculas de ARNsi sintetizadas *in vitro* pueden introducirse en las células para activar el ARNi. Un dúplex de ARNsi exógeno, cuando se introduce en las células, de forma similar a los ARNdS endógenos, se puede ensamblar para formar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), un complejo de unidades múltiples que interacciona con secuencias de ARN que son complementarias a una de las dos cadenas del dúplex de ARNsi (es decir, la cadena antisentido). Durante el proceso, la hebra sentido (o hebra pasajera) del ARNsi se pierde del complejo, mientras que la hebra antisentido (o hebra guía) del ARNsi se empareja con su ARN complementario. En particular, las dianas de los complejos RISC que contienen ARNsi, son ARNm que presentan una complementariedad de secuencia perfecta. Luego, se produce el silenciamiento génico mediado por el ARNsi al escindir, liberar y degradar la diana.
- El dúplex de ARNsi compuesto por una hebra sentido homóloga al ARNm diana y una hebra antisentido que es complementaria al ARNm diana, ofrece muchas más ventajas en términos de eficacia para la destrucción del ARN diana, en comparación con el uso de ARNsi de cadena sencilla (ss) (por ejemplo, el ARN de cadena antisentido u oligonucleótidos antisentido). En muchos casos, se requiere una mayor concentración de ARNsi-(ss) para lograr la potencia eficaz para un silenciamiento génico del dúplex correspondiente.
- Existen directrices para el diseño de ARNsi en la técnica. Esas directrices generalmente recomiendan generar una región dúplex de 19 nucleótidos, 2-3 nucleótidos simétricos sobresalientes en 3', grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo dirigidos a una región en el gen que se va a silenciar. Otras reglas que pueden regir la preferencia de la secuencia del ARNsi incluyen, pero no se limitan a, (i) A/U en el extremo 5' de la hebra antisentido; (ii) G/C en el extremo 5' de la hebra sentido; (iii) al menos cinco residuos A/U en el tercio terminal 5' de la hebra antisentido; y (iv) la ausencia de cualquier tramo de GC de más de 9 nucleótidos de longitud. De acuerdo con esa consideración, junto con la secuencia específica de un gen diana, se pueden diseñar fácilmente moléculas de ARNsi altamente eficaces, esenciales para suprimir la expresión de un gen diana de mamífero.
- Tal y como se proporciona en este documento, un vector de dos en uno incluye una secuencia de bases que codifica dos tipos de ARN de horquilla corta (ARNsh) que inhiben la expresión de PD-1 y TIGIT, y una secuencia de bases que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR).
- La secuencia de bases codifica dos tipos de ARNsh, que inhiben la expresión de dos genes que debilitan la función de las células inmunes, en donde el vector puede denominarse "vector doble de dos en uno". En otras realizaciones, la secuencia de bases codifica más de dos tipos de ARNsh, que inhiben la expresión de más de dos genes que debilitan la función de las células inmunes.
- Tal y como se describe en el presente documento, los dos o más tipos de ARNsh se pueden caracterizar porque se dirigen a un solo gen, por ejemplo, a diferentes partes de un solo gen, que debilita la función de las células inmunes. Por ejemplo, los dos o más tipos de ARNsh pueden dirigirse a PD-1, por ejemplo, a diferentes partes de PD-1. Los dos o más tipos de ARNsh se pueden caracterizar porque se dirigen a diferentes genes que debilitan la función de las células inmunes, por ejemplo, se dirigen a PD-1 y TIM-3.
- En realizaciones ejemplares, las secuencias de bases que codifican los dos o más tipos de ARNsh se pueden caracterizar porque comprenden diferentes secuencias seleccionadas a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NOs 2 a 219 y 238 a 267, por ejemplo, pueden comprender diferentes secuencias seleccionadas a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NOs 2 a 117 y 238 a 267, p. ej., pueden comprender diferentes secuencias seleccionadas a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NOs 2 a 12, 70 a 75 y 266 a 267.
- En algunas realizaciones, la expresión de los dos tipos de ARNsh se puede caracterizar porque están regulados por dos promotores diferentes, respectivamente, para minimizar artefactos debidos a una recombinación o delección durante la clonación.
- En algunas realizaciones, los promotores pueden ser el promotor de ARN polimerasa I, el promotor de ARN polimerasa II o el promotor de ARN polimerasa III, dependiendo de qué ARN polimerasa se une al promotor y comienza la transcripción. Los dos promotores anteriores se pueden caracterizar porque son promotores de ARN polimerasa III (de aquí en adelante, promotores de pol III). Se puede hacer que los promotores de pol III transcriban con precisión desde el extremo terminal 5' al extremo terminal 3' sin fijar el casquete en el extremo terminal 5' o la cola poli (A) en el extremo terminal 3' del ARN que se transcribe con regulación del promotor. Los tipos de promotor de pol III incluyen, pero no se limitan a, promotor U6, promotor H1 y promotor 7SK, etc. Los dos promotores incluidos en el vector pueden ser diferentes, seleccionados entre los promotores de pol III que incluyen los tres tipos mencionados anteriormente, y si se selecciona el mismo tipo de promotor, pueden proceder de diferentes especies. Por ejemplo, los dos promotores pueden ser promotores U6, p. ej., promotores U6 obtenidos a partir de diferentes especies, tales como promotores U6 obtenidos a partir de seres humanos y ratones. Como el transcripto creado por un promotor U6 permanece dentro del núcleo, se considera que esto podría hacer que el complejo Drosha que existe en el núcleo promueva el proceso en el que el ARNsh se procesa en pre-ARNsh.
- En algunas realizaciones, los dos o más promotores se pueden caracterizar porque están orientados en direcciones diferentes de los demás en el vector. Por ejemplo, en una determinada realización, los promotores están orientados con una orientación de cabeza a cabeza ($\rightarrow\leftarrow$). En otra realización, los promotores están orientados con una orientación de cola con cola ($\leftarrow\rightarrow$). En un vector doble de dos en uno, estar orientado con diferentes direcciones en

un vector significa que cuando se transcriben los respectivos ARNsh cuya expresión está regulada por los dos promotores, las direcciones en las que se mueven las ARN polimerasas se orientan hacia diferentes direcciones en una sola molécula de ácido nucleico. En una realización ejemplar, los dos promotores pueden estar en las direcciones →← (FIG. 15A). En otra realización ejemplar, los dos promotores pueden estar en las direcciones ↔↔ (FIG. 15B).
 5 Por ejemplo, los dos promotores pueden asumir las direcciones →← en el vector.

En algunas realizaciones, la expresión de los genes diana se reduce a aproximadamente el 90% o menos que la de un grupo de control, por ejemplo, la expresión de los genes diana se reduce a aproximadamente el 80% o menos, aproximadamente el 70% o menos, aproximadamente el 60% o menos, aproximadamente el 50% o menos, aproximadamente el 40% o menos, aproximadamente el 30% o menos, aproximadamente el 20% o menos y
 10 aproximadamente el 10% o menos que la de un grupo de control.

Por lo general, el ARNsh está diseñado para tener una secuencia que tiene una homología elevada con parte de la secuencia de ARNm de su gen diana (de aquí en adelante, la secuencia de bases del ARNsh sentido), una secuencia capaz de producir una horquilla afilada y una secuencia complementaria a la secuencia que tiene una alta homología (de aquí en adelante, la secuencia de bases de ARNsh antisentido). Los enlaces no covalentes entre las porciones
 15 autocomplementarias forman una estructura de tallo, y cuando el ARNsh se expresa y se procesa en la célula, la secuencia de bases del ARNsh antisentido actúa como guía para el ARNm del gen diana en el proceso de silenciamiento génico. Por ejemplo, las secuencias de bases de un casete utilizado en el presente documento para la expresión de ARNsh, pueden comprender una estructura NNNNNNNNNNNNNNNNNNN (21 bases), secuencia de bucle, NNNNNNNNNNNNNNNNN (19 bases). En una realización, el tramo de 21 bases codifica las secuencias
 20 de bases del ARNsh sentido y el tramo de 19 bases es complementario o sustancialmente complementario al tramo de 21 bases y codifica las secuencias de bases del ARNsh antisentido. En otra realización, el tramo de 19 bases codifica las secuencias de bases del ARNsh sentido y el tramo de 21 bases es complementario o sustancialmente complementario al tramo de 19 bases y codifica las secuencias de bases del ARNsh antisentido. Cuando se expresa, por lo tanto, el ARN resultante forma una estructura de tallo y bucle. En ciertas realizaciones, tales secuencias de
 25 bases de ARNsh sentido o antisentido para un gen diana (obtenido a partir de un ser humano) que pueden incluirse en el casete, se seleccionan a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-219. En realizaciones específicas, las secuencias de bases del casete utilizado en el presente documento para la expresión de ARNsh, se pueden seleccionar a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NOs: 220-224.

En algunas realizaciones, la secuencia de bases completa del ARNsh se puede colocar en el extremo terminal 3' de
 30 un promotor U6 humano o de ratón, y las TTTTT necesarias para terminar la transcripción con el promotor U6 se pueden colocar en los extremos terminales 3' de todas las secuencias de bases de ARNsh.

En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico de los respectivos ARNsh pueden, además de las secuencias descritas en este documento, comprender secuencias de ácido nucleico que muestran al menos 50%, específicamente al menos 70%, más específicamente al menos 80%, incluso más específicamente al menos 90% y lo más específicamente al menos 95% de homología de secuencia con esas secuencias. Esto se debe a que, en el caso de que un ARNsi (ARN interferente pequeño) y un ARNsh que se procesa intracelularmente para convertirse en ARNsi en particular, se ha descrito que cierto grado de mutación, especialmente la mutación en el extremo terminal 5', es tolerable, lo que provoca una desactivación normal del gen diana, y que las mutaciones de ARNsi y ARNsh realizadas para tener una estructura similar a la del miARN que desempeña un papel en el silenciamiento de genes, inducen de
 40 manera más eficaz una desactivación del gen diana. Además, en el uso de vectores, para los expertos en la técnica son evidentes las variaciones dentro del vector, es decir, la adición, modificación o delección de secuencias de bases que pueden tener lugar durante el proceso de clonación para introducir una determinada secuencia en el vector, o cambios de componentes o introducción de los mismos para mejorar la facilidad de uso del vector en el grado en que se expresa el gen deseado.

45 Existen varios modos de acción para los genes que debilitan la función de las células inmunes. Los ejemplos incluyen la inhibición de la proliferación de células inmunes o la muerte celular, la reducción de las reacciones con moléculas con las que las células inmunes deben reaccionar para activarse, la inhibición de la expresión de genes necesarios para que las células inmunes reconozcan las dianas de reacción y causar una diferenciación en diferentes tipos de células inmunes para desempeñar una función diferente, en lugar de causar una respuesta inmune frente a una diana particular. Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a, moléculas asociadas con los puntos de control inmunes que se explicarán a continuación.

50 El gen que debilita la función de las células inmunes se puede caracterizar porque es un receptor o un ligando de un punto de control inmune. Los puntos de control inmunes son moléculas que existen en el sistema inmune y pueden activar o desactivar la respuesta inmune. Se pueden considerar como dispositivos de seguridad para regular una activación excesiva de las células inmunes, lo que provoca una muerte celular o una respuesta autoinmune. Esas moléculas de punto de control inmune pueden clasificarse ampliamente en moléculas de punto de control inmune estimulantes que aumentan la respuesta inmune y moléculas de punto de control inmune inhibidoras que inhiben la respuesta inmune. Se ha descrito que muchas células cancerosas escapan del sistema inmune activando señales de puntos de control inmunes inhibidores, especialmente receptores de puntos de control inmunes inhibidores y ligandos en células inmunes. En consecuencia, la terapia con células inmunes dirigidas a un cáncer en particular puede hacerse eficaz haciendo que esa acción evasiva de los cánceres sea ineficaz, y esto puede lograrse inhibiendo la activación
 60

de los receptores de puntos de control inmunes inhibidores y sus ligandos, o reduciendo su expresión. Por ejemplo, el receptor del punto de control inmune y los ligandos pueden seleccionarse a partir de un grupo que consiste en PD1 (proteína 1 de muerte celular programada), PD-L1 (ligando 1 de muerte programada), CTLA4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos), TIM-3 (immunoglobulina de linfocitos T y que contiene dominio de mucina 3), CEACAM (molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario, incluidos los tres subtipos CEACAM-1, CEACAM-3 o CEACAM-5), LAG3 (gen 3 de activación de linfocitos), VISTA (supresor del dominio V de Ig de la activación de linfocitos T), BTLA (atenuador de linfocitos B y T), TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios de Ig e ITIM), LAIR1 (receptor 1 similar a inmunoglobulina asociado a leucocitos), CD160 (agrupación de diferenciación 160), CD96 (agrupación de diferenciación 96), MerTK (Proto-oncogén de tirosina-proteína cinasa MER) y 2B4 (ligando inductor de activación de células NK), y, por ejemplo, se puede seleccionar entre PD1, TIM3 y TIGIT.

El gen que debilita la función de las células inmunes se puede caracterizar porque codifica un receptor que puede promover AICD (muerte celular inducida por activación), actuando como un regulador negativo para los linfocitos T que han sido activados por estimulación repetida, mediante TCR, por ejemplo FAS (también conocido como CD95, APO-1 o antígeno de apoptosis 1). El gen que debilita la función de las células inmunes se puede caracterizar porque codifica factores que inhiben la activación de la señal de TCR, por ejemplo, los factores se pueden seleccionar a partir de CD45, PP2A, SHP1, SHP2, DGK alfa, DGK zeta, Cbl-b, Cbl-c y CD148. El gen que debilita la función de las células inmunes se puede caracterizar porque codifica una proteína que inhibe la eficacia de CAR y/o TCR, por ejemplo, mTCR a través de la supresión de la señal de 4-1BB, en donde 4-1BB es una molécula coestimuladora descrita en el presente documento, de TCR, por ejemplo, una LRR1 (proteína 1 con repetición rica en leucina). El gen que debilita la función de las células inmunes se puede caracterizar porque codifica un receptor, cuyo ligando es una citocina, que inhibe los linfocitos T, por ejemplo, TGFBR1 (receptor beta 1 del factor de crecimiento transformante) e IL10R alfa (subunidad alfa de IL-10R). El gen que debilita la función de las células inmunes se puede caracterizar porque codifica un receptor que inhibe la capacidad de proliferación y la citotoxicidad de los linfocitos T y las células NK, por ejemplo, KLGR1 (receptor G1 similar a lectina de células citolíticas). El gen que debilita la función de las células inmunes se puede caracterizar porque codifica un agente regulador asociado con la metilación del nuevo ADN que, según se ha descrito, inhibe el agotamiento de los linfocitos T cuando se desactiva (KO), por ejemplo, TNMT3a (ADN metiltransferasa 3 alfa). El gen que debilita la función de las células inmunes se puede caracterizar porque codifica un receptor de adenosina que está presente en exceso en los microentornos tumorales, que cuando se activa puede inhibir la toxicidad celular y la capacidad de producción de citocinas de los linfocitos T, por ejemplo, A2aR (receptor de adenosina, subtipo A2a).

El gen que debilita la función de las células inmunes se puede caracterizar porque se selecciona a partir de un grupo que consiste en FAS, CD45, PP2A, SHP1, SHP2, DGK alfa, DGK zeta, Cbl-b, Cbl-c, CD148, LRR1, TGFBR1, IL10RA, KLGR1, DNMT3A y A2aR.

3.2 Receptor de antígeno químérico (CAR) y receptor de linfocitos T, por ejemplo, receptor de linfocitos T monoclonal (mTCR).

Un vector de dos en uno incluye una secuencia de bases que codifica uno o varios tipos de ARN de horquilla corta (ARNsh) que inhiben la expresión de uno o varios genes que debilitan la función de las células inmunes, y una secuencia de bases que codifica uno cualquiera entre un receptor químérico de antígeno (CAR) o un receptor de linfocitos T, por ejemplo, un receptor de linfocitos T monoclonal (mTCR). Según la invención, un vector de dos en uno comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer ARNsh que inhibe la expresión de muerte celular programada 1 (PD-1), una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo ARNsh que inhibe la expresión del inmunorreceptor de linfocitos T con dominios de Ig e ITIM (TIGIT), y una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de antígeno químérico (CAR).

CAR es generalmente un conjunto de polipéptidos que, cuando están presentes en una célula inmune, hacen que la célula inmune tenga especificidad hacia una célula diana (normalmente una célula cancerosa) mientras que provoca la transducción de señales en la célula. CAR comprende como mínimo un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular que reconoce el antígeno diana que se describirá a continuación, un dominio transmembranal y un dominio de transducción de señales intracelular, en donde el dominio de transducción de señales intracelular se obtiene a partir de las moléculas promotoras o moléculas coestimuladoras.

La estructura de los CARs comúnmente utilizados hoy en día para aplicaciones clínicas, comprende un dominio de fragmento variable de cadena sencilla (en adelante, scFv) que otorga especificidad hacia un antígeno, un dominio espaciador para regular la distancia entre el scFv y la membrana celular, un dominio transmembranal y un dominio de señalización extracelular (de aquí en adelante ISD). El ISD a su vez comprende un dominio coestimulador (CD28, CD137 u OX40) que contribuye a una proliferación *in vivo* y una vida larga de uno o varios linfocitos T, y un dominio de señalización de TCR (CD3 zeta, CD3 ζ) que contribuye a la activación de los linfocitos T. Los linfocitos T modificados para expresar CAR que se han preparado de esta manera, pueden activarse mediante el reconocimiento de células cancerosas que expresan el antígeno diana con especificidad elevada, inducen con eficacia la muerte de esas células cancerosas, simultáneamente proliferan exponencialmente en el cuerpo y permanecen vivos durante mucho tiempo. Por ejemplo, cuando se administraban linfocitos T CAR (CART-19) preparados para dirigirse a CD19, un antígeno específico de los linfocitos B, a un paciente con leucemia de linfocitos B, se describía que las células proliferaban de 1000 a 10 000 veces y permanecían vivas en el cuerpo durante varios años. Como resultado, CART-19 mostraba una

5 respuesta completa del 90% en un ensayo clínico realizado en pacientes con leucemia linfoblástica aguda terminal (LLA-B) en los que la quimioterapia convencional, etc., no había sido eficaz, lo que llevó a un caso poco frecuente de autorización para una compañía farmacéutica global en la fase temprana de ensayos clínicos iniciada por investigadores. Se convirtió en el primer agente de terapia celular de CAR-T en recibir la aprobación de la FDA de EE. UU. en 2017 y, posteriormente, también se aprobó un segundo CAR-T.

10 En la superficie de las células inmunes, por ejemplo, los linfocitos T, existen receptores de puntos de control inmunes tales como CTLA-4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos) o PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada). Esos receptores son originalmente dispositivos de seguridad para regular una activación excesiva y la muerte celular de los linfocitos T, o el desencadenamiento de respuestas autoinmunes. Sin embargo, se ha descrito que las células cancerosas, especialmente los cánceres sólidos, usan esto para evitar la inmunovigilancia de los linfocitos T. Por ejemplo, si una célula cancerosa expresa PD-L1 (ligando 1 de muerte programada) en la superficie, un linfocito T que expresa PD-1, su receptor, reconoce la célula cancerosa y se activa, pero pronto se agotará por una señal de inhibición de activación de PD-1. Para evitar la inhibición de la actividad de los linfocitos T a través de señales de esos receptores de puntos de control inmunes, se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra CTLA4 o PD-1, etc. que inhiben la transmisión de señales por parte de los receptores de puntos de control inmunes diana. Las terapias que mejoran la función inmune general de los linfocitos T mediante el bloqueo de los puntos de control inmunes mediante el uso de estos inhibidores de los receptores de los puntos de control inmunes, también muestran eficacia contra varios cánceres sólidos.

15 Dado que los linfocitos T CAR también son, en última instancia, una terapia que se basa en la citotoxicidad de los linfocitos T activados, la existencia de un entorno inmunosupresor alrededor de los linfocitos T CAR actúa como un obstáculo importante para su efecto terapéutico. De hecho, a diferencia de sus efectos terapéuticos mostrados en la leucemia de linfocitos B, los linfocitos T CAR preparados para atacar tumores sólidos rara vez han mostrado efectos terapéuticos esperanzadores. Se cree que esto se debe a que los tumores sólidos, a diferencia de los cánceres de la sangre, crean microentornos tumorales inmunosupresores para suprimir la actividad y la proliferación de los linfocitos T CAR. Además, incluso entre los cánceres de sangre de linfocitos B, se ha descrito que, a diferencia de los pacientes 20 con leucemia linfoblástica aguda (LLA), de los cuales casi el 90% respondían a la terapia con CART-19, los efectos terapéuticos eran relativamente menores en pacientes con linfoma (20 a 50% respuesta) o en pacientes con leucemia linfoblástica crónica (LLC, aproximadamente el 20% de respuesta).

25 Además, se ha descrito que PD-L1 y otros ligandos inmunosupresores se expresan en los microentornos tumorales formados por el linfoma, por lo que agotan la función de los linfocitos T dentro del tejido canceroso. Además, se ha descrito que los linfocitos T obtenidos a partir de pacientes con CLL ya se habían agotado sustancialmente, con altos grados de expresión de receptores de puntos de control inmunes tales como PD-1, CD160 y CD244.

30 Se han descrito resultados de ensayos preclínicos que muestran que el uso simultáneo de anticuerpos inhibidores anti-CTLA o anti-PD-1 con linfocitos T CAR para recuperar esa actividad reducida de los linfocitos T CAR, mejora el efecto anticancerígeno, y ensayos clínicos que utilizan esas combinaciones están actualmente en marcha. Sin embargo, un problema con tales terapias simultáneas de anticuerpos y linfocitos T CAR es que los anticuerpos diseminados por todo el cuerpo impactan no solo en los linfocitos T CAR sino en todos los demás linfocitos T que se encuentran en el cuerpo, lo que puede dar lugar a reacciones adversas graves y sistémicas, tales como el síndrome de liberación de citocinas, así como síntomas autoinmunes. Otro problema que se ha señalado es el aumento del coste del tratamiento resultante de un uso simultáneo de terapias costosas de anticuerpos con una terapia celular.

35 40 En consecuencia, recientemente ha habido intentos de regular la expresión génica dentro de las células para permitir la supresión de los puntos de control inmunes de los linfocitos T CAR. El documento de publicación de solicitud de patente internacional WO2016/069282 describe composiciones y métodos para generar un linfocito T modificado con un ácido nucleico capaz de regular a la baja la expresión génica endógena seleccionada a partir del grupo que consiste en la cadena α de TCR, la cadena β de TCR, la microglobulina β-2 y FAS que comprende además un ácido nucleico 45 que codifica un receptor de linfocitos T modificado (TCR) que tiene afinidad hacia un antígeno de superficie en una célula diana o un ácido nucleico electroporado que codifica un receptor de antígeno químérico (CAR). La publicación establece que se pueden usar tijeras génicas tales como CRISPR/Cas9 para desactivar la expresión de genes endógenos, pero el método de preparación de los linfocitos T CAR descrito en el documento de publicación de patente, es bastante complicado y tiene problemas de bajo rendimiento en la producción y altos costes de producción.

50 55 Mientras tanto, el documento de publicación de patente internacional WO2015/090230 describe que un solo tipo de ARN de horquilla corta (ARNsh) que inhibe una molécula que suprime adicionalmente la función de los linfocitos T, puede usarse en células que expresan CAR. Dado que la carga de costes de una terapia celular es alta, un paciente se enfrenta a varias dificultades en caso de fracaso. Sin embargo, es posible que un solo tipo de ARNsh no pueda inhibir eficazmente la actividad de tales moléculas diana. En algunas realizaciones, se puede fijar el conjunto que comprende los polipéptidos. En algunas realizaciones, el conjunto que comprende el polipéptido puede estar en una forma en la que se fija a través de un conmutador que se dimeriza mediante estimulación. En algunas realizaciones, CAR puede ser una proteína de fusión que comprende el dominio de reconocimiento de un antígeno extracelular, el dominio transmembranal y el dominio de transducción de señales intracelular. En realizaciones adicionales, la proteína de fusión CAR puede comprender adicionalmente una secuencia líder en el extremo terminal N, y la secuencia líder 60 se puede eliminar por corte en el proceso de expresión de CAR y quedar anclada en la membrana celular.

El TCR, por ejemplo mTCR, descrito en el presente documento puede comprender una cadena seleccionada entre las cadenas α , β , γ y δ . En algunas realizaciones, las cadenas pueden reconocer el antígeno diana que se describirá a continuación, CD3 y una cadena zeta, y además una molécula coestimuladora, en donde la molécula coestimuladora puede seleccionarse entre ICOS, OX40, CD137 (4-1BB), CD27 o CD28.

- 5 Tal y como se describe en el presente documento, la transferencia retrovírica de estructuras artificiales de anticuerpos químéricos de cadena sencilla (scFv) puede usarse para producir un TCR, por ejemplo, mTCR con una especificidad de antígeno definida. Las estructuras artificiales químéricas de scFv se pueden unir a los dominios de señalización intracelular de FcR-gamma o CD3 ζ para desencadenar la función efectora de los linfocitos T. En CD3, el dominio ζ se puede combinar con los dominios de señalización de moléculas coestimuladoras, en donde la participación del anticuerpo puede desencadenar la función de los linfocitos T efectores y también proporcionar señales coestimuladoras. Las moléculas coestimuladoras se pueden seleccionar entre CD28, 4-1BB y OX40.

- 10 Los vectores de dos en uno pueden comprender un dominio CD3 ζ , en donde las cadenas del TCR, por ejemplo, mTCR, pueden formar un complejo a través de enlaces no covalentes con CD3 y una cadena zeta (ζ). Cuando se reconoce un antígeno a través de los sitios de reconocimiento de antígeno de las cadenas, las cadenas CD3 y zeta envían señales al citoplasma de las células inmunes sobre las que se expresa ese complejo de TCR, induciendo la 15 activación funcional.

- 15 El dominio de transducción de señales intracelular puede comprender adicionalmente uno o varios dominios de transducción de señales funcionales, obtenidos a partir de las moléculas coestimuladoras. La molécula promotora puede ser la cadena zeta del TCR descrito anteriormente.

- 20 CAR y TCR, por ejemplo, mTCR son receptores de la superficie celular. En algunas realizaciones, la diana de CAR se puede caracterizar porque es un antígeno canceroso cuya expresión aumenta específicamente en el cáncer. En algunas realizaciones, la diana de CAR se puede caracterizar porque es un antígeno canceroso que existe en formas mutadas en el cáncer.

- 25 En algunas realizaciones, la diana de CAR puede ser un antígeno tumoral humano cuya expresión aumenta en un cáncer que se va a tratar. Por ejemplo, la diana puede seleccionarse entre 5T4 (glicoproteína trofoblástica), 707-AP, 9D7, AFP (α -fetoproteína), AlbZIP (bZIP inducida por andrógenos), HPG1 (gen 1 específico de la próstata humana), α 5 β 1-integrina, α 5 β 6-integrina, α -metilacil-coenzima A racemasa, ART-4 (ADPRibosiltransferasa-4), B7H4 (inhibidor 1 de la activación de linfocitos T que contiene el dominio v-set), BAGE-1 (antígeno 1 del melanoma B), BCL-2 (CLL de linfocitos B/linfoma-2), BING-4 (dominio de repetición de WD 46), CA 15-3/CA 27-29 (mucina 1), CA 19-9 (antígeno del cáncer 19-9), CA 72-4 (antígeno de cáncer 72-4), CA125 (antígeno de cáncer 125), calreticulina, CAMEL (antígeno de melanoma reconocido por CTL), CASP-8 (caspase 8), catepsina B, catepsina L, CD19 (agrupación de diferenciación 19), CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA (antígeno carcinoembrionario SG8), CLCA2 (accesorio del canal de cloruro 2), CML28 (antígeno tumoral 28 de la leucemia mielógena crónica), proteína similar a la coactosina, colágeno XXIII, COX-2 (ciclooxigenasa 2), CT-9/BRD6 (cáncer/antígeno testicular 9), Cten (proteína similar a tensina c-terminal), ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1 (miembro 1 de la subfamilia B de la familia 1 de citocromo p450), DAM-10/MAGE-B1 (antígeno B1 asociado con melanoma), DAM-6/MAGE-B2, EGFR/Her1 (receptor del factor de crecimiento epidémico), EMMPRIN (basigina), EpCam, EphA2 (receptor A2 de EPH), EphA3, ErbB3 (receptor de tirosina cinasa 3 Erb-B2), EZH2 (potenciador de la 30 subunidad 2 del complejo represivo zeste 2 polycomb), FGF-5 (factor de crecimiento de fibroblastos 5), FN (fibronectina), Fra-1 (antígeno 1 relacionado con Fos), G250/CAIX (anhidrasa carbónica 9), GAGE-1 (antígeno G 1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP (gen expresado diferencialmente en la próstata), GnT-V (glucuronato cinasa), gp100 (antígeno específico de linaje de melanocitos GP100), GPC3 (glipican 3), HAGE (antígeno helicoidal), HAST-2 (miembro 1 de la familia de sulfotransferasa 1A), hepsina, Her2/neu/ErbB2 (receptor de tirosina cinasa 2 de Erb-B2), HERV-K-MEL, HNE (medulasina), homeobox NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-40 1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HST-2 (sirtuina 2), hTERT, iCE (caspasa 1), IGF-1R (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1), IL-13Ra2 (subunidad α 2 del receptor de interleucina-13), IL-2R (receptor de interleucina 2), IL-5 (interleucina 5), receptor de laminina inmaduro, calicreína 2, calicreína 4, Ki67, KIAA0205 (lisofosfatidilglicerol aciltransferasa 1), KK-LC-1 (antígeno 1 de cáncer de pulmón kita-kyushu), KM-HN-1, LAGE-1 (miembro 1 de la familia del antígenos L), Livina, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGEA2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGEB17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2 (familia L2 de antígenos de melanoma), mamaglobina A, MART-1/Melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T 1), MART-2, proteína matricial 22, MC1R (receptor de melanocortina 1), M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos), mesotelina, MG50/PXDN (peroxidasa), MMP 11 (metaloproteasa matricial 11), antígeno MN/CA IX (anhidrasa carbónica 9), MRP-3 (proteína 3 asociada a la resistencia a múltiples fármacos), MUC1 (mucina 1), MUC2, NA88-A (seudogén 1 de homeobox 2 similar a VENT), N-acetylglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP (Neo-poli (A) polimerasa), NGEP (gen nuevo expresado en la próstata), NMP22 (proteína matricial nuclear 22), NPM/ALK (nucleofosmina), NSE (enolasa específica de neuronas), NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1 (osteoartritis QTL 1), OFA-iLRP (proteína del receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal), OGT (O-GlcNAc transferasa), OS-9 (lectina del retículo endoplásmico), osteocalcina, osteopontina, p15 (inhibidor de CDK 2B), p53, PAGE-4 (miembro 4 de la familia del antígeno P), PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno 1), PAI-2, PAP (fosfatasa ácida prostática), PART-1 (transcrito 1 regulado por andrógenos prostáticos),

PATE (antígeno expresado en próstata y testículo 1), PDEF (factor Ets obtenido de la próstata), Pim-1-cinasa (sitio de integración proviral 1), Pin1 (peptidil-prolil cis-trans isomerasa 1 que interacciona con NIMA), POTE (antígeno expresada en próstata, ovario, testículo y placenta), PRAME (antígeno expresado preferentemente en melanoma), prosteína, proteinasa-3, PSA (antígeno específico prostático), PSCA (antígeno de células madre prostáticas), PSGR (receptor acoplado a la proteína G específico de próstata), PSM, PSMA (antígeno de la membrana específico de próstata), RAGE-1 (antígeno de carcinoma tumoral renal), RHAMM/CD168, RU1 (proteína ubicua renal 1), RU2, SAGE (antígeno de sarcoma), SART-1 (antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por linfocitos T 1), SART-2, SART-3, Sp17 (proteína de esperma 17), SSX-1 (miembro 1 de la familia SSX), SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1 (metalorreductasa STEAP2), STEAP, survivina, survivina-213, TA-90 (antígeno 90 asociado a tumor), TAG-72 (glicoproteína 72 asociada a tumor), TARP (proteína de marco de lectura alternativo de TCRγ), TGFb (factor de crecimiento transformante β), TGFbR11 (receptor 11 del factor de crecimiento transformante β), TGM-4 (transglutaminasa 4), TRAG-3 (gen 3 asociado a la resistencia al taxol), TRG (locus y del receptor de linfocitos T), TRP-1 (potencial de receptor transitorio 1), TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, tirosinasa, UPA (activador de plasminógeno U), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular A), VEGFR-2/FLK-1 y WT1 (tumor de Wilms 1) o puede ser una forma mutada de antígeno tumoral humano descubierto en el cáncer que se va a tratar, seleccionado entre α-actinina-4/m, ARTC1/m, bcr/abl, beta-Catenina/m, BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN, EFTUD2/m, ELF2/m, ETV6-AML1, FN1/m, GPNMB/m, HLA-A*0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-2M, KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT, MART2/m, ME1/m, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina de clase 1/m, neo-PAP/m, NFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RARa, PRDX5/m, PTPRX/m, RBAF600/m, SIRT2/m, SYTSSX-1, SYT-SSX-2, TEL-AML1, TGFbRII y TPI/m. Por ejemplo, el antígeno diana puede seleccionarse entre CD19 o CD22.

3.3 Componentes de los vectores de dos en uno

Tal y como se describe en este documento, un vector de dos en uno incluye una secuencia de bases que codifica uno o varios tipos de ARN de horquilla corta (ARNsh) que inhiben la expresión de uno o varios genes que debilitan la función de las células inmunes, y una secuencia de bases que codifica un receptor de antígeno químérico (CAR) o un receptor de linfocitos T (TCR), por ejemplo, un receptor de linfocitos T monoclonal (mTCR).

En algunas realizaciones, los vectores dos en uno pueden comprender secuencias que codifican factores que promueven la inserción de las secuencias en el genoma de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, las secuencias están ubicadas en uno o ambos extremos del gen del vector. En algunas realizaciones, las secuencias son LTRs (secuencia terminal larga).

En algunas realizaciones, los vectores de dos en uno pueden comprender un dominio que codifica proteínas que se utilizan para la purificación de células en las que ha tenido lugar la inserción descrita anteriormente. En algunas realizaciones, el dominio es un dominio ΔLNGFR, en donde ΔLNGFR es un LNGFR (receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad) sin un dominio citoplasmático, usado para la purificación de células en las que ha tenido lugar la inserción descrita anteriormente.

En algunas realizaciones, los vectores de dos en uno pueden comprender promotores que inducen la expresión tanto de ΔLNGFR como de CAR, caracterizados por una expresión sostenida, por ejemplo, un promotor EF1α que induce la expresión de ΔLNGFR y CD19 CAR como se muestra en la FIG. 22A. En realizaciones adicionales, ΔLNGFR y CD19 CAR se transcriben primero en una forma en la que se encuentran en un ARNm sencillo. En esas realizaciones en las que existen dos o más cistrones en el mismo ARNm, se puede insertar un IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) entre ellos para provocar la expresión de ambos cistrones. Sin embargo, un IRES es excesivamente largo y se ha descrito que se reduce la eficacia de la expresión del cistrón aguas abajo. En algunas realizaciones, se pueden usar componentes distintos del IRES para superar tales inconvenientes, por ejemplo, un P2A (péptido 2a), en donde durante la traducción, el ribosoma pasa sin formar un enlace peptídico en el extremo terminal C de P2A, lo que permite que el gen aguas abajo se exprese más adelante.

Algunos ejemplos de vectores de dos en uno son el vector de dos en uno que se muestra en las FIGs. 1, 6, 14 y 22A, comprendiendo el vector una cualquiera de las secuencias de bases SEQ ID 220 o 221. Los vectores ejemplares, que comprenden las secuencias de bases de SEQ ID 220 y 221, pueden tener la estructura que se muestra en las FIGs. 1A y 1B. Algunos plásmidos ejemplares se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de plásmidos

n. ^º	Plásmido ejemplar
1	pLV (lentivirus)-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shGFP
2	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shPD-1
3	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shTIM-3
4	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shPD-1_MCS
5	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_hU6-shPD-1_MCS
6	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shTIM-3→shPD-1-hU6
7	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_shPD-1-hU6_MCS
8	pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_shTIM-3-mU6→hU6-shPD-1

En algunas realizaciones, las secuencias de bases incluidas en el vector descrito anteriormente y las secuencias de ácidos nucleicos de los respectivos ARNsh pueden comprender, además de las secuencias descritas en el presente documento, secuencias de ácidos nucleicos que muestran al menos un 50%, específicamente al menos un 70%, más específicamente al menos el 80%, incluso más específicamente al menos un 90% y lo más específicamente al menos un 95% de homología de secuencia con esas secuencias. Esto se debe a que, en el caso de ARNsi (ARN interferente pequeño) y ARNsh que se procesa intracelularmente para convertirse en ARNsi en particular, se ha descrito que cierto grado de mutación, especialmente la mutación en el extremo terminal 5', es tolerable, lo que provoca una desactivación normal del gen diana, y que las mutaciones de ARNsi y ARNsh realizadas para tener una estructura similar a la del miARN que tiene un papel en el silenciamiento de genes, inducen de manera más eficaz la desactivación del gen diana. Además, con el uso de vectores, para los expertos en la técnica son evidentes las variaciones dentro del vector, es decir, la adición, modificación o delección de secuencias de bases que pueden tener lugar en el proceso de clonación para introducir una determinada secuencia en el vector, o cambios de componentes o introducción de los mismos para mejorar la facilidad de uso del vector en el grado en que se expresa el gen deseado.

4. Producción y evaluación de linfocitos T CAR que se dirigen a uno o varios puntos de control inmunes

Tal y como se describe en este documento, un vector de dos en uno incluye una secuencia de bases que codifica uno o varios tipos de ARN de horquilla corta (ARNsh) que inhiben la expresión de genes que debilitan la función de las células inmunes, y una secuencia de bases que codifica cualquiera entre un receptor de antígeno quimérico (CAR) y un receptor de linfocitos T (TCR), por ejemplo, receptor de linfocitos T monoclonal (mTCR). El vector se puede utilizar para la producción de células inmunes que tienen una expresión inhibida de genes que debilitan la función de las células inmunes. En algunas realizaciones, el vector se selecciona a partir del grupo que consiste en ADN, ARN, plásmido, vector de lentivirus, vector de adenovirus y vector de retrovirus.

En un aspecto, la célula inmune proporcionada en el presente documento se puede caracterizar porque comprende el vector de la invención que expresa CAR, y porque se reduce la expresión de los genes diana (PD-1 y TIM-3) de los dos tipos de ARNsh. En algunas realizaciones, la expresión de los genes diana se reduce a aproximadamente el 90% o menos de la de un grupo de control, por ejemplo, la expresión de los genes diana se reduce a aproximadamente el 80% o menos, aproximadamente el 70% o menos, aproximadamente el 60% o menos, aproximadamente el 50% o menos, aproximadamente el 40% o menos, aproximadamente el 30% o menos, aproximadamente el 20% o menos y aproximadamente el 10% o menos de la de un grupo de control. En algunas realizaciones, la célula inmune se selecciona entre linfocitos T obtenidos a partir de seres humanos y células NK.

En un ejemplo, se describe un método para producir una célula inmune que comprende introducir en una célula inmune, simultánea o secuencialmente en cualquier orden: (1) un gen que codifica un receptor de antígeno modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno diana; y (2) un agente de alteración genética que reduce o es capaz de reducir la expresión en una célula inmune de un gen que debilita la función de la célula inmune, produciendo de este modo una célula inmune en la que se expresa un receptor de antígeno modificado genéticamente y la expresión del gen que debilita la función de la célula inmune se reduce.

Según la invención, el receptor de antígeno modificado genéticamente es un CAR. En algunas realizaciones, CAR comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembranal y un dominio de transducción de señales intracelular.

En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno extracelular de CAR se une específicamente al antígeno diana.

En algunas realizaciones, el dominio de transducción de señales intracelular de CAR comprende un dominio intracelular de una cadena zeta de CD3 (CD3ζ). En algunas realizaciones, el dominio de transducción de señales

intracelular de CAR comprende además una molécula coestimuladora.

En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora se selecciona a partir del grupo que consiste en ICOS, OX40, CD137 (4-1BB), CD27 y CD28. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora es CD137 (4-1BB). En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora es CD28.

- 5 En algunas realizaciones, el antígeno diana se expresa en la superficie celular de una célula cancerosa, un tejido canceroso y/o un microentorno tumoral. En algunas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno canceroso cuya expresión está incrementada, o es una forma mutada de un antígeno canceroso, en la célula cancerosa, el tejido canceroso y/o el microentorno tumoral.
- 10 En algunas realizaciones, el antígeno del cáncer cuya expresión se incrementa en la célula cancerosa, el tejido canceroso y/o el microentorno tumoral, se selecciona a partir del grupo que consiste en: 5T4 (glicoproteína trofoblástica), 707-AP, 9D7, AFP (α -fetoproteína), AlbZIP (bZIP inducida por andrógenos), HPG1 (gen 1 específico de la próstata humana), α 5 β 1-integrina, α 5 β 6-integrina, α -metilacil-coenzima A racemasa, ART-4 (ADPriboisiltransferasa-4), B7H4 (inhibidor 1 de la activación de linfocito T que contiene el dominio v-set), BAGE-1 (antígeno 1 del melanoma B), BCL-2 (CLL de linfocitos B/linfoma-2), BING-4 (dominio de repetición de WD 46), CA 15-3/CA 27-29 (mucina 1),
- 15 CA 19-9 (antígeno del cáncer 19-9), CA 72-4 (antígeno del cáncer 72-4), CA125 (antígeno del cáncer 125), calreticulina, CAMEL (antígeno de melanoma reconocido por CTL), CASP-8 (caspasa 8), catepsina B, catepsina L, CD19 (agrupación de diferenciación 19), CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA (antígeno carcinoembrionario SG8), CLCA2 (accesorio del canal de cloruro 2), CML28 (antígeno tumoral 28 de la leucemia mielógena crónica), proteína similar a la coactosina, colágeno XXIII, COX-2 (ciclooxygenasa 2), CT-9/BRD6
- 20 (cáncer/antígeno testicular 9), Cten (proteína similar a tensina c-terminal), ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1 (miembro 1 de la subfamilia B de la familia 1 de citocromo p450), DAM-10/MAGE-B1 (antígeno B1 asociado con melanoma), DAM-6/MAGE-B2, EGFR/Her1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico), EMMPRIN (basigina), EpCam, EphA2 (receptor A2 de EPH), EphA3, ErbB3 (receptor de tirosina cinasa 3 Erb-B2), EZH2 (potenciador de la subunidad 2 del complejo represivo zeste 2 polycomb), FGF-5 (factor de crecimiento de fibroblastos 5), FN (fibronectina), Fra-1 (antígeno 1 relacionado con Fos), G250/CAIX (anhidrasa carbónica 9), GAGE-1 (antígeno G 1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP (gen expresado diferencialmente en la próstata), GnT-V (gluconato cinasa), gp100 (antígeno específico de linaje de melanocitos GP100), GPC3 (glipican 3), HAGE (antígeno helicoidal), HAST-2 (miembro 1 de la familia de sulfotransferasa 1A), hepsina, Her2/neu/ErbB2 (receptor de tirosina cinasa 2 de Erb-B2), HERV-K-MEL, HNE (medulasina), homeobox NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HST-2 (sirtuina 2), hTERT, iCE (caspasa 1), IGF-1R (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1), IL-13Ra2 (subunidad α 2 del receptor de interleucina-13), IL-2R (receptor de interleucina 2), IL-5 (interleucina 5), receptor de laminina inmaduro, calicreína 2, calicreína 4, Ki67, KIAA0205 (lisofosfatidilglicerol aciltransferasa 1), KK-LC-1 (antígeno 1 de cáncer de pulmón kita-kyushu), KM-HN-1, LAGE-1 (miembro 1 de la familia del antígeno L), Livina, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGEA2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGEB17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2 (familia L2 de antígenos de melanoma), mamaglobina A, MART-1/Melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T 1), MART-2, proteína matricial 22, MC1R (receptor de melanocortina 1), M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos), mesotelina, MG50/PXDН (peroxidasa), MMP 11 (metaloproteasa matricial 11), antígeno MN/CA IX (anhidrasa carbónica 9), MRP-3 (proteína 3 asociada a la resistencia a múltiples fármacos), MUC1 (mucina 1), MUC2, NA88-A (seudogén 1 de homeobox 2 similar a VENT), N-acetylglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP (Neo-poli (A) polimerasa), NGEP (gen nuevo expresado en la próstata), NMP22 (proteína matricial nuclear 22), NPM/ALK (nucleofosmina), NSE (enolasa específica de neuronas), NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1 (osteoartritis QTL 1), OFA-iLRP (proteína del receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal), OGT (O-GlcNAc transferasa), OS-9 (lectina del retículo endoplásmico), osteocalcina, osteopontina, p15 (inhibidor de CDK 2B), p53, PAGE-4 (miembro 4 de la familia del antígeno P), PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno 1), PAI-2, PAP (fosfatasa ácida prostática), PART-1 (transcríto 1 regulado por andrógenos prostáticos), PATE (antígeno expresado en próstata y testículo 1), PDEF (factor Ets obtenido de la próstata), Pim-1-cinasa (sitio de integración proviral 1), Pin1 (peptidil-prolil cis-trans isomerasa 1 que interacciona con NIMA), POTE (antígeno expresada en próstata, ovario, testículo y placenta), PRAME (antígeno expresado preferentemente en melanoma), prosteína, proteinasa-3, PSA (antígeno específico prostático), PSCA (antígeno de células madre prostáticas), PSGR (receptor acoplado a la proteína G específico de próstata), PSM, PSMA (antígeno de la membrana específico de próstata), RAGE-1 (antígeno de carcinoma tumoral renal), RHAMM/CD168, RU1 (proteína ubicua renal 1), RU2, SAGE (antígeno de sarcoma), SART-1 (antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por linfocitos T 1), SART-2, SART-3, Sp17 (proteína de esperma 17), SSX-1 (miembro 1 de la familia SSX), SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1 (metalreductasa STEAP2), STEAP, survivina, survivina-213, TA-90 (antígeno 90 asociado a tumor), TAG-72 (glicoproteína 72 asociada a tumor), TARP (proteína de marco de lectura alternativo de TCR γ), TGFb (factor de crecimiento transformante β), TGFbR11 (receptor 11 del factor de crecimiento transformante β), TGM-4 (transglutaminasa 4), TRAG-3 (gen 3 asociado a la resistencia al taxol), TRG (locus y del receptor de linfocitos T),
- 50 TRP-1 (potencial de receptor transitorio 1), TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, tirosinasa, UPA (activador de plasminógeno U), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular A), VEGFR-2/FLK-1 y WT1 (tumor de Wilms 1).
- 55 En algunas realizaciones, el antígeno diana es CD19 o CD22. En algunas realizaciones, el antígeno diana es CD19.
- 60

En algunas realizaciones, la forma mutada de un antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo que consiste en: α-actinina-4/m, ARTC1/m, bcr/abl, beta-Catenina/m, BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN, EFTUD2/m, ELF2/m, ETV6-AML1, FN1/m, GPNMB/m, HLA-A'0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-2M, KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT, MART2/m, ME1/m, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina de clase 1/m, neo-PAP/m, NFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RARa, PRDX5/m, PTPRX/m, RBAF600/m, SIRT2/m, SYTSSX-1, SYT-SSX-2, TEL-AML1, TGFbRII y TPI/m.

En algunas realizaciones, la expresión del gen que debilita la función de la célula inmune provoca uno o varios de los siguientes: i) inhibe la proliferación de la célula inmune; ii) induce la muerte celular de la célula inmune; iii) inhibe la función de una molécula necesaria para que la célula inmune reconozca el antígeno diana y/o se active; iv) induce la diferenciación de la célula inmune en un tipo diferente que desempeña una función diferente en lugar de provocar una respuesta inmune frente al antígeno diana; v) disminuye las reacciones de la célula inmune con una molécula que promueve la respuesta inmune de la célula inmune; o vi) aumenta las reacciones de la célula inmune con una molécula que inhibe la respuesta inmune de la célula inmune.

Según la invención, los genes que debilitan la función de la célula inmune son PD-1 y TIGIT. Tal y como se describe en este documento, un gen que debilita la función de la célula inmune se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 o CEACAM-5), LAG 3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD96, MerTK, 2B4, FAS, CD45, PP2A, SHP1, SHP2, DGK alfa, DGK zeta, Cbl-b, Cbl-c, CD148, LRR1, TGFBRI, IL10RA, KLGR1, DNMT3A y A2aR. En algunas realizaciones, el gen que debilita la función de la célula inmune incrementa las reacciones de la célula inmune con una molécula que inhibe la respuesta inmune de la célula inmune. En algunas realizaciones, el gen que incrementa las reacciones de la célula inmune con una molécula que inhibe la respuesta inmune de la célula inmune, codifica un ligando o un receptor de un punto de control inmune.

En algunas realizaciones, el agente de alteración genética reduce la expresión de los genes en la célula inmune que debilitan la función de la célula inmune, en al menos un 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95% en comparación con la célula inmune, en ausencia del agente de alteración genética. En algunas realizaciones, el agente de alteración genética reduce la expresión de los genes que aumentan las reacciones de la célula inmune con una molécula que inhibe la respuesta inmune de la célula inmune. En algunas realizaciones, el agente de alteración genética reduce la expresión de los genes que codifican un ligando o un receptor de un punto de control inmune.

En algunas realizaciones, el agente de alteración genética reduce la expresión de los genes que debilitan la función de la célula inmune mediante una interferencia con ARN (ARNi). En algunas realizaciones, el agente de alteración genética reduce la expresión de los genes que debilitan la función de la célula inmune en la célula inmune mediante ARNi. En algunas realizaciones, los agentes de alteración genética se dirigen a diferentes partes de un único gen que debilita la función de la célula inmune, se dirigen a diferentes genes que debilitan la función de la célula inmune, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el ARNi está mediado por los ARNs de horquilla corta (ARNsh) de la invención.

Tal y como se describe en este documento, dos ARNsh pueden dirigirse a diferentes partes de PD-1. Por ejemplo, dos ARNsh pueden dirigirse a PD-1 y a TIM-3, respectivamente; o a PD-1 y a CTLA-4, respectivamente; o a PD-1 y a LAG-3, respectivamente.

En algunas realizaciones, las secuencias de bases que codifican los ARNsh comprenden secuencias seleccionadas a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-219 y 238-267.

En algunas realizaciones, la expresión de diferentes ARNsh está regulada respectivamente por diferentes promotores. En algunas realizaciones, la expresión de dos ARNsh diferentes está regulada respectivamente por dos promotores diferentes. En algunas realizaciones, los dos promotores diferentes son promotores de ARN polimerasa III. En algunas realizaciones, los dos promotores son promotores U6 obtenidos a partir de diferentes especies. En algunas realizaciones, los dos promotores están orientados con direcciones diferentes en relación uno con otro.

El receptor de antígeno modificado genéticamente y el agente de alteración genética pueden expresarse cada uno a partir de un vector. El receptor de antígeno modificado genéticamente y el agente de alteración genética pueden expresarse a partir del mismo vector. De acuerdo con la invención, un primer ARNsh que inhibe la expresión de muerte celular programada 1 (PD-1) y un segundo ARNsh que inhibe la expresión del inmunorreceptor de linfocitos T con dominios de Ig e ITIM (TIGIT) y un receptor de antígeno quimérico (CAR), se expresan a partir del mismo vector. En algunas realizaciones, el vector se selecciona a partir del grupo que consiste en ADN, ARN, plásmido, vector de lentivirus, vector de adenovirus y vector de retrovirus. En algunas realizaciones, el vector es un vector de lentivirus.

La célula inmune se puede caracterizar porque se selecciona a partir de linfocitos, tales como linfocitos T citolíticos, linfocitos T colaboradores, linfocitos T gamma delta y linfocitos B, linfocitos T citolíticos naturales, mastocitos, eosinófilos, basófilos; y las células fagocíticas incluyen macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Los linfocitos T incluyen linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. En algunas realizaciones, el linfoma de linfocitos B es un linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), linfoma de linfocitos B mediastínico primario (PMBL), linfoma de Hodgkin (HL), linfoma no Hodgkin, linfoma de zona gris mediastínica o esclerosis nodular HL. En algunas realizaciones, el linfoma de linfocitos T es un linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma de linfocitos T periféricos no especificado

(PTCL-NOS) o linfoma de linfocitos T angioinmunoblastico (AITL). En una realización preferida, la célula inmune puede seleccionarse a partir de linfocitos T obtenidos a partir de seres humanos o linfocitos T y linfocitos citolíticos naturales (NK). En algunas realizaciones, la célula inmune es un linfocito T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T CD4+ o un linfocito T CD8+.

- 5 En algunas realizaciones, las células inmunes se producen a partir de células obtenidas originalmente a partir de un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un ser humano. En algunas realizaciones, el ser humano puede ser un donante sano. En otras realizaciones, el sujeto puede caracterizarse por tener un tumor o un cáncer, en el que se detecta un aumento o una variación en los niveles de antígeno canceroso al que se dirige el CAR expresado en la célula. En algunas realizaciones, las células se pueden producir y expandir generalmente usando métodos tal y como se describe, por ejemplo, en los documentos de patente de EE. UU. n.º 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 10 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y el documento de publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20060121005.

La producción de linfocitos T CAR puede comprender una etapa de proporcionar células monoclonales de sangre periférica. Las células monoclonales de sangre periférica se pueden separar de muestras de sangre entera. La 15 producción de linfocitos T CAR descritos en el presente documento puede comprender una etapa de estimulación de las células monoclonales de sangre periférica utilizando anticuerpos. A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de estimulación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento del mismo que se une a antígeno y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento del mismo que se une a antígeno. En algunos ejemplos, la producción de linfocitos T CAR descritos en este documento comprende una etapa de transducción 20 de CAR, en donde el CAR puede dirigirse a cualquier diana descrita en este documento y a cualquier otra diana de CAR conocida, por ejemplo, CAR puede ser un CAR CD19 que se dirige a CD19. En realizaciones adicionales, los linfocitos T CAR producidos se aislan.

Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (p. ej., medio mínimo esencial 25 o medio RPMI 1640 o X-vivo 15 (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluido el suero (p. ej., suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de las células, conocido por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de las células incluyen, pero no se limitan a, tensioactivo, plasmanato y 30 agentes reductores tales como N-acetilcisteína y 2-mercaptopropionato. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos agregados, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o complementadas con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido 35 de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de los linfocitos T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomicina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para favorecer el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (p. ej., 37°C) y una atmósfera (p. ej., aire más 5% de CO₂) adecuadas. También se pueden desear varios ciclos de estimulación de modo que el tiempo de cultivo de los linfocitos T pueda ser de 60 días o más.

Los linfocitos T que han estado expuestos a tiempos de estimulación variados pueden mostrar características diferentes. Por ejemplo, los productos de células mononucleares de sangre típica o de sangre periférica aférica tienen 40 una población de linfocitos T auxiliares (TH, CD4+) que es mayor que la población de linfocitos T citotóxicos o supresores (TC, CD8+). Una expansión *ex vivo* de los linfocitos T mediante una estimulación de los receptores CD3 y CD28, produce una población de linfocitos T que antes de los días 8-9 consiste predominantemente en linfocitos TH, mientras que después de los días 8-9, la población de linfocitos T comprende una población cada vez mayor de linfocitos TC. En consecuencia, dependiendo de la finalidad del tratamiento, puede ser ventajoso infundir a un sujeto 45 una población de linfocitos T que comprenda predominantemente linfocitos TH. De manera similar, si se ha aislado un subconjunto específico de antígeno de linfocitos TC, puede ser beneficioso expandir ese subconjunto en mayor grado. También, además de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de forma reproducible durante el curso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, esa reproducibilidad permite la capacidad de adaptar un producto de linfocitos T activados para fines específicos.

50 Se pueden usar diversos ensayos para evaluar los linfocitos T CAR, como, entre otros, la capacidad de multiplicarse después de una estimulación con antígeno, mantener la expansión de los linfocitos T en ausencia de una nueva estimulación y actividades anticancerígenas en condiciones apropiadas *in vitro* y en modelos animales. Los ensayos se describen con más detalle a continuación.

El análisis de transferencia Western de la expresión de CAR en linfocitos T primarios puede usarse para detectar la presencia de monómeros y dímeros. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009).

55 60 La expansión *in vitro* de los linfocitos T CAR+ después de una estimulación con antígeno puede medirse mediante citometría de flujo. Por ejemplo, se estimula una mezcla de linfocitos T CD4+ y CD8+ con aAPCs αCD3/αCD28 seguido de transducción con vectores lentivíricos que expresan GFP bajo el control de los promotores que se van a analizar. Los ejemplos de promotores incluyen los promotores del gen IE de CMV, EF-1a, ubiquitina C o fosfoglicerocinasa (PGK). La fluorescencia de GFP se evalúa el día 6 del cultivo en los subconjuntos de linfocitos T CD4+ y/o CD8+ mediante citometría de flujo. Véase, p. ej., Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Como alternativa, se estimula una mezcla

- de linfocitos T CD4+ y CD8+ con perlas magnéticas recubiertas de αCD3/αCD28 el día 0 y se transduce con CAR el día 1 usando un vector lentivírico bicistrónico que expresa CAR junto con eGFP, usando una secuencia de salto ribosómico 2A. Los cultivos se vuelven a estimular, por ejemplo, con células K562 que expresan hCD32 y 4-BBL en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (K562-BBL-3/28) después del lavado. Se añade IL-2 exógena a los cultivos cada dos días, a razón de 100 UI/ml. Los linfocitos T GFP+ se cuentan mediante citometría de flujo mediante un recuento basado en perlas. Véase, p. ej., Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). También se puede medir la expansión sostenida de los linfocitos T CAR+ en ausencia de una nueva estimulación.
- La evaluación de la proliferación celular y la producción de citocinas se ha descrito previamente, p. ej., en Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Brevemente, la evaluación de la proliferación mediada por CAR se realiza en placas de microtitulación mezclando linfocitos T lavados con células diana, tales como células K562-Meso, Ovcar3, Ovcar8, SW1990, Panc02.03, o CD32 y CD137 (KT32-BBL) para tener una relación final de linfocitos T:células diana de 1:1. Se añaden anticuerpos monoclonales anti-CD3 (clon OKT3) y anti-CD28 (clon 9.3) a cultivos con células KT32-BBL para que sirvan como control positivo, para estimular la proliferación de los linfocitos T, ya que esas señales respaldan la expansión de los linfocitos T CD8+ a largo plazo *ex vivo*. Los linfocitos T se cuentan en los cultivos usando perlas fluorescentes CountBright™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y citometría de flujo según lo descrito por el fabricante. Los linfocitos T CAR+ se identifican mediante la expresión de GFP utilizando linfocitos T modificados genéticamente con vectores lentivíricos que expresan CAR ligado a eGFP-2A. La expresión de CD4+ y CD8+ sobre los linfocitos T también se detecta simultáneamente con anticuerpos monoclonales específicos (BD Biosciences). Las mediciones de citocinas se realizan en el material sobrenadante recogido 24 horas después de la nueva estimulación, utilizando el kit de matriz de perlas citométricas de citocinas TH1/TH2 humanas (BD Biosciences, San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se evalúa utilizando un citómetro de flujo FACScalibur y los datos se analizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- La citotoxicidad se puede evaluar mediante los métodos descritos en este documento, por ejemplo, en los ejemplos, o mediante un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr (Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Brevemente, las células diana (p. ej., células BHK o CHO) se cargan con ^{51}Cr (tal como NaCr04, New England Nuclear, Boston, MA) a 37°C durante 2 horas con agitación frecuente, se lavan dos veces en RPMI completo y siembran en placas de microtitulación. Los linfocitos T efectores se mezclan con las células diana en los pocillos con RPMI completo en relaciones variables de célula efectora:célula diana (E:T). También se preparan pocillos adicionales que contienen solo medio (liberación espontánea, SR) o una solución al 1% de detergente Triton-X 100 (liberación total, TR). Después de 4 horas de incubación a 37°C, se recoge el material sobrenadante de cada pocillo. Luego se mide el ^{51}Cr liberado usando un contador de partículas gamma (Packard Instrument Co., Waltham, MA). Cada condición se analiza al menos por triplicado, y el porcentaje de lisis se calcula mediante la fórmula: % de Lisis = (ER-SR) / (TR - SR), en donde ER representa el promedio de ^{51}Cr liberado para cada condición experimental. También se pueden usar ensayos de citotoxicidad alternativos, como los ensayos de citotoxicidad basados en el flujo.
- También se pueden usar otros ensayos, incluidos los descritos en la sección de Ejemplos del presente documento, así como los que se conocen en la técnica, para evaluar los linfocitos T CAR producidos en el presente documento.
- Las células inmunes descritas en el presente documento pueden participar en la respuesta inmune frente a enfermedades en las que se expresan los antígenos a los que se dirigen los dos tipos de ARNsh y CAR o TCR, por ejemplo, mTCR. En algunas realizaciones, las células inmunes de la invención se pueden usar para proporcionar una composición farmacéutica para uso en un método para tratar el cáncer en pacientes humanos. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención puede mostrar un efecto terapéutico sobre la enfermedad diana sin necesidad de inhibidores de puntos de control inmunes adicionales, los cuales pueden causar reacciones adversas graves y abrumar al paciente adicionalmente con altos costos.
- En algunas realizaciones, las células inmunes de la invención pueden usarse como agentes terapéuticos de células inmunes; tales células inmunes se usan normalmente para el tratamiento de cánceres, pero no se limitan a ello. En realizaciones adicionales, para hacer que esas células inmunes reconozcan cánceres, éstas se modifican para expresar receptores en la superficie celular que se dirigen a antígenos cancerosos.
- En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden las células inmunes modificadas genéticamente de la invención.
5. Tratamiento empleando linfocitos T CAR que se dirigen a uno o varios puntos de control inmunes
- Tal y como se describe en este documento, un vector de dos en uno incluye una secuencia de bases que codifica uno o varios tipos de ARN de horquilla corta (ARNsh) que inhiben la expresión de genes que debilitan la función de las células inmunes, y una secuencia de bases que codifica uno cualquiera entre un receptor de antígeno quimérico (CAR) y un receptor de linfocitos T (TCR), por ejemplo, un receptor de linfocitos T monoclonal (mTCR). Utilizando el vector de la invención, se pueden producir células inmunes, en donde las células inmunes tienen una expresión reducida del receptor del punto de control inmune, es decir, una expresión reducida de PD-1 y TIGIT, y que expresan CAR específico para moléculas diana. Dichas células inmunes pueden usarse para proporcionar una composición farmacéutica para terapia inmune.

- Una variedad de enfermedades se pueden aliviar mediante la introducción de células inmunes tal y como se describe en el presente documento, en un sujeto para el que es adecuada una terapia inmune adoptiva. Por ejemplo, los linfocitos T CAR producidos pueden usarse para terapias celulares adoptivas alogénicas. Además, en el presente documento se describen usos terapéuticos de las composiciones descritas en el presente documento, que comprenden introducir la composición en un sujeto para el que es adecuada una terapia celular adoptiva, en donde el sujeto tiene un trastorno autoinmune; una neoplasia maligna hematológica; un tumor sólido; o una infección asociada con VIH, RSV, EBV, CMV, adenovirus o poliomavirus BK. También se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica de la invención para uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto humano.
- 5 Los ejemplos de neoplasias malignas hematológicas incluyen, entre otros, leucemias agudas y crónicas (leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena crónica (LMC), linfomas, linfoma no Hodgkin (LNH), enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple y síndromes mielodisplásicos. Ejemplos de cánceres sólidos incluyen, entre otros, cáncer de cerebro, próstata, mama, pulmón, colon, útero, piel, hígado, hueso, páncreas, ovario, testículos, vejiga, riñón, cabeza, cuello, estómago, cuello uterino, recto, laringe y esófago. Ejemplos de varios trastornos autoinmunes incluyen, entre otros, alopecia areata, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, 10 dermatomiositis, diabetes (tipo 1), algunas formas de artritis idiopática juvenil, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia grave, algunas formas de miocarditis, esclerosis múltiple, pénfigo/pénfigoide, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia/esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, lupus sistémico, eritematoso, algunas formas de tiroiditis, algunas formas de uveítis, vitíligo, granulomatosis con poliangitis (de 15 Wegener). Ejemplos de infecciones víricas incluyen, sin limitarse a, trastornos asociados con VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), HSV (virus del herpes simple), KSHV (herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi), RSV (virus sincitial respiratorio), EBV (virus de Epstein-Barr), CMV (citomegalovirus), VZV (virus de la varicela zoster), 20 adenovirus, un lentivirus, un poliomavirus BK.
- 25 La leucemia aguda se caracteriza por una rápida proliferación de células sanguíneas inmaduras. Ese hacinamiento hace que la médula ósea no pueda producir células sanguíneas sanas. Las formas agudas de leucemia pueden presentarse en niños y adultos jóvenes. De hecho, es una causa de muerte infantil en los EE. UU., más común que cualquier otro tipo de enfermedad maligna. En la leucemia aguda se requiere un tratamiento inmediato debido a la rápida progresión y acumulación de células malignas, que luego se arrastran hasta el torrente sanguíneo y se diseminan a otros órganos del cuerpo. La implicación del sistema nervioso central (SNC) es poco frecuente, aunque 30 la enfermedad en ocasiones puede causar una parálisis de los nervios craneales. La leucemia crónica se distingue por una acumulación excesiva de células sanguíneas relativamente maduras, pero todavía anormales. Por lo general, tarda meses o años en progresar, las células se producen a un ritmo mucho más alto que las células normales, lo que da como resultado muchos glóbulos blancos anormales en la sangre. La leucemia crónica se presenta principalmente en personas mayores, pero teóricamente puede ocurrir en cualquier grupo de edad. Mientras que la leucemia aguda debe tratarse de inmediato, las formas crónicas a veces se controlan durante algún tiempo antes del tratamiento para garantizar la máxima eficacia de la terapia. Además, las enfermedades se clasifican en linfocíticas o linfoblásticas, lo 35 que indica que el cambio canceroso se produjo en un tipo de célula de la médula que normalmente pasa a formar linfocitos, y mielógena o mieloide, lo que indica que el cambio canceroso se produjo en un tipo de célula de la médula que normalmente pasa a formar glóbulos rojos, algunos tipos de glóbulos blancos y plaquetas (véase células linfoides en contraposición con células mieloides).
- 40 La leucemia linfocítica aguda (también conocida como leucemia linfoblástica aguda o LLA) es el tipo más común de leucemia en niños pequeños. Esta enfermedad también afecta a los adultos, especialmente a los mayores de 65 años. La leucemia linfocítica crónica (LLC) afecta con mayor frecuencia a adultos mayores de 55 años. A veces se presenta en adultos más jóvenes, pero casi nunca afecta a los niños. La leucemia mielógena aguda (también conocida como leucemia mieloide aguda o LMA) se presenta con más frecuencia en adultos que en niños. Ese tipo de leucemia se denominaba anteriormente "leucemia no linfocítica aguda". La leucemia mielógena crónica (LMC) se presenta principalmente en adultos. Una cantidad muy escasa de niños también desarrolla esa enfermedad.
- 45 El linfoma es un tipo de cáncer que se origina en los linfocitos (un tipo de glóbulo blanco en el sistema inmune de los vertebrados). Hay muchos tipos de linfomas. Según los Institutos Nacionales de Salud de los EE. UU., los linfomas representan aproximadamente el cinco por ciento de todos los casos de cáncer en los Estados Unidos, y el linfoma de Hodgkin en particular representa menos del uno por ciento de todos los casos de cáncer en los Estados Unidos. Debido a que el sistema linfático forma parte del sistema inmune del cuerpo, los pacientes con un sistema inmune debilitado, como debido a una infección por VIH o por ciertos fármacos o medicamentos, también tienen una mayor incidencia de linfoma.
- 55 En los siglos XIX y XX, la afección se denominaba enfermedad de Hodgkin, ya que fue descubierta por Thomas Hodgkin en 1832. Coloquialmente, el linfoma se clasifica ampliamente como linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin (todos los demás tipos de linfoma). La clasificación científica de los tipos de linfoma es más detallada. Aunque las clasificaciones más antiguas se referían a los linfomas histiocíticos, estos se reconocen en clasificaciones más actuales como de linaje de linfocitos B, T o NK.
- 60 Cuando la composición farmacéutica se administra a un paciente que tiene un cáncer en el que se expresa la molécula diana de CAR o TCR, por ejemplo, mTCR, la composición farmacéutica puede reconocer el cáncer y tener actividad

inmune sin la activación de genes que debilitan la función de las células inmunes, con respecto a las células cancerosas, y sin problemas tales como el agotamiento debido a una señalización de activación-inhibición causada por ello.

En alguna realización, la composición farmacéutica de la invención que comprende células inmunes de la invención es capaz de suprimir más eficazmente la expresión de los receptores de puntos de control inmunes, al tiempo que maximiza simultáneamente la eficacia de la terapia con células inmunes contra el cáncer, en donde pueden actuar receptores de antígenos químicos. En realizaciones adicionales, dado que las células de la invención se utilizan en la composición farmacéutica de la invención, es posible eliminar las reacciones adversas graves y sistémicas, tales como el síndrome de liberación de citocinas o los síntomas autoinmunes, que pueden ser el resultado del uso de un inhibidor distinto para el receptor del punto de control inmune, así como la carga debido al aumento del costo del tratamiento, como resultado del uso simultáneo de terapias costosas con la terapia celular.

Como es evidente que, además de las células, a la composición farmacéutica se pueden añadir otras sales, soportes, excipientes, vehículos y otros aditivos, etc., farmacéuticamente aceptables, que pueden mejorar aún más la respuesta inmune, se omitirá una explicación detallada de los mismos.

La composición farmacéutica puede comprender linfocitos T CAR dobles dirigidos a dos puntos de control inmunes tal y como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los puntos de control inmunes dobles se pueden seleccionar a partir de un grupo que consiste en PD1 (proteína 1 de muerte celular programada), PD-L1 (ligando 1 de muerte programada), CTLA4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos), TIM-3 (immunoglobulina de linfocito T y que contiene dominio de mucina 3), CEACAM (molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario, incluidos los tres subtipos CEACAM-1, CEACAM-3 o CEACAM-5), LAG3 (gen 3 de activación de linfocitos), VISTA (supresor del dominio V de Ig de activación de linfocitos T), BTLA (atenuador de linfocitos B y T), TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios de Ig e ITIM), LAIR1 (receptor 1 similar a immunoglobulina asociado a leucocitos), CD160 (agrupación de diferenciación 160), CD96 (agrupación de diferenciación 96), MerTK (Proto-oncogén de tirosina-proteína cinasa MER) y 2B4 (ligando inductor de la activación de células NK) y, por ejemplo, se puede seleccionar entre PD1 y TIM3.

En algunas realizaciones, los tipos de controles inmunes que son diana, afectan al efecto antitumoral de la composición farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica dirigida a PD-1 y TIM3 puede mostrar un nivel de efecto antitumoral diferente al de una composición farmacéutica dirigida a PD-1 y TIGIT. En realizaciones adicionales, dicha diferencia en el efecto antitumoral es impredecible basándose en el conocimiento conocido sobre los efectos antitumorales de otros fármacos dirigidos al mismo punto de control inmune, por ejemplo, los otros fármacos pueden incluir un anticuerpo dirigido al punto de control inmune. En algunas realizaciones, dirigirse a dos puntos de control inmunes determinados, puede producir un efecto antitumoral sorprendentemente alto. En una realización exemplar (ejemplo 10), los linfocitos T CAR dirigidos a PD-1 y TIGIT muestran un efecto antitumoral sorprendentemente superior que en comparación con otros linfocitos T CAR KD dobles dirigidos a combinaciones de PD-1 y CTLA-4, PD-1 y LAG-3, y PD-1 y TIM-3.

En un aspecto, una composición descrita en el presente documento se puede proporcionar en forma de dosificación unitaria en la que cada unidad de dosificación, por ejemplo, una inyección, contiene una cantidad predeterminada de la composición, sola o en combinación apropiada con otros agentes activos. La expresión forma de dosificación unitaria, tal y como se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de una composición descrita en este documento, sola o en combinación con otros agentes activos, calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, en asociación con un diluyente, soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitaria de células o composiciones descritas en este documento, dependen de la farmacodinámica particular asociada con la composición farmacéutica en el sujeto particular.

En algunas realizaciones, la forma de dosificación farmacéutica preferida para las células o las composiciones proporcionadas en el presente documento, puede determinarse en función del contenido de la presente descripción y el conocimiento general de las técnicas de formulación y de acuerdo con la vía de administración prevista, el método de administración y la dosis diana. Independientemente del método de administración, la dosis eficaz se puede calcular de acuerdo con el peso corporal, el área de superficie o el tamaño del órgano del paciente. Los cálculos para determinar las dosis de administración apropiadas para la terapia, usando las respectivas formas de dosificación indicadas en la presente memoria descriptiva, así como una purificación adicional, se llevan a cabo diariamente en la técnica y se incluyen dentro del alcance del trabajo realizado diariamente en la técnica. Las dosis de administración apropiadas pueden identificarse mediante el uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden usar solas o en combinación con otros agentes conocidos, útiles para tratar el cáncer. Ya sea que se administren solas o en combinación con otros agentes, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse a través de varias rutas y en varios sitios en el cuerpo de un mamífero, particularmente humano, para lograr un efecto particular. Un experto en la técnica reconocerá que, aunque se puede usar más de una ruta para la administración, una ruta particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra ruta. Por ejemplo, la administración intradérmica se puede usar ventajosamente sobre la inhalación para el tratamiento del melanoma. El suministro local

o sistémico puede lograrse mediante una administración que comprende la aplicación o instilación de la formulación en las cavidades corporales, la inhalación o insuflación de un aerosol, o mediante una introducción parenteral, que comprende la administración intramuscular, intravenosa, intraportal, intrahepática, peritoneal, subcutánea o intradérmica. Una ruta ejemplar de administración a un sujeto incluye la inyección intravenosa (IV) y la administración regional (intratumoral, intraperitoneal). En alguna realización, la composición farmacéutica se puede administrar mediante infusión dentro de un tumor sólido.

En algunas realizaciones, además de las células inmunes modificadas genómicamente tal y como se proporcionan en el presente documento, se puede usar un agente terapéutico adicional que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se dirige a un antígeno asociado con una afección, una enfermedad o una indicación, con estas células efectoras en una terapia combinada. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo químérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo se une específicamente a un antígeno vírico. En otras realizaciones, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, se une específicamente a un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, los anticuerpos adecuados para un tratamiento combinado como agente terapéutico adicional para las células inmunes modificadas genómicamente administradas, incluyen, sin limitarse a, anticuerpos anti-CD20 (rituximab, veltuzumab, ofatumumab, ublituximab, ocaratuzumab, obinutuzumab), anti-HER2 (trastuzumab, pertuzumab), anti-CD52 (alemtuzumab), anti-EGFR (certuximab), anti-GD2 (dinutuximab), anti-PDL1 (avelumab), anti-CD38 (daratumumab, isatuximab, MOR202), anti-CD123 (7G3, CSL362), anti-SLAMF7 (elotuzumab); y sus variantes o fragmentos humanizados o modificados en Fc, o sus equivalentes funcionales y biosimilares.

Deseablemente, una cantidad eficaz o un número suficiente de linfocitos T transducidos aislados está presente en la composición y se introduce en el sujeto de manera que se establecen respuestas antitumorales específicas a largo plazo, para reducir el tamaño de un tumor o eliminar el crecimiento o rebrote de un tumor que de otro modo estaría presente en ausencia de ese tratamiento. Deseablemente, la cantidad de linfocitos T transducidos reintroducidos en el sujeto provoca un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 100% de disminución del tamaño del tumor en comparación con las mismas condiciones en las que los linfocitos T transducidos no están presentes.

En consecuencia, la cantidad de linfocitos T transducidos administrados debe tener en cuenta la vía de administración y debe ser tal que se introduzca una cantidad suficiente de linfocitos T transducidos para lograr la respuesta terapéutica deseada. Además, las cantidades de cada agente activo incluido en las composiciones descritas en el presente documento (p. ej., la cantidad por cada célula que se pone en contacto o la cantidad por cierto peso corporal) pueden variar en diferentes aplicaciones. En general, la concentración de linfocitos T transducidos deseablemente debería ser suficiente para proporcionar en el sujeto que se está tratando al menos desde aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 linfocitos T transducidos, incluso más deseablemente, desde aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 5×10^8 linfocitos T transducidos, aunque se puede utilizar cualquier cantidad adecuada superior, por ejemplo, más de 5×10^8 células, o inferior, por ejemplo, menos de 1×10^7 células. La pauta de dosificación se puede basar en terapias bien establecidas basadas en células (véase, p. ej., Topalian y Rosenberg, 1987; documento de patente de EE. UU. n.º 4.690.915), o se puede emplear una estrategia alternativa de infusión continua.

Estos valores proporcionan una directriz general del intervalo de linfocitos T transducidos que utilizará el médico al optimizar los métodos descritos en este documento. La descripción en este documento de tales intervalos, no excluye de ninguna manera el uso de una cantidad mayor o menor de un componente, según podría justificarse en una aplicación particular. Por ejemplo, la dosis y la pauta reales pueden variar dependiendo de si las composiciones se administran en combinación con otras composiciones farmacéuticas, o dependiendo de las diferencias interindividuales en la farmacocinética, la puesta a disposición del fármaco y el metabolismo. Un experto en la técnica puede realizar fácilmente cualquier ajuste necesario de acuerdo con las exigencias de una situación particular.

Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento puede estar comprendida en un kit. En algunas realizaciones, los linfocitos T CAR+ según la invención se proporcionan en el kit, que también puede incluir reactivos adecuados para multiplicar las células, como medios, aAPCs, factores de crecimiento, anticuerpos (p. ej., para clasificar o caracterizar linfocitos T CAR) y/o plásmidos que codifican CARs o transposasas.

En un ejemplo no limitativo, una estructura artificial de expresión de un receptor químérico, uno o varios reactivos para generar una estructura artificial de expresión de receptor químérico, células para la transfección de la estructura artificial de expresión y/o uno o varios instrumentos para obtener células alogénicas para la transfección de la estructura artificial de expresión (un instrumento de ese tipo puede ser una jeringa, pipeta, fórceps y/o cualquier otro aparato aprobado médicalemente).

En algunas realizaciones, una estructura artificial de expresión para eliminar la expresión endógena de TCR α/β, uno o varios reactivos para generar la estructura artificial y/o linfocitos T CAR+ según la invención, se proporcionan en el kit. En algunas realizaciones, se incluyen estructuras artificiales de expresión que codifican nucleasa(s) con dedos de zinc. En algunos aspectos, el kit comprende reactivos o aparatos para la electroporación de células.

Los kits pueden comprender una o varias composiciones en partes alícuotas adecuadas descritas en este documento o reactivos para generar composiciones tal y como se describe en este documento. Los componentes de los kits se pueden envasar en medios acuosos o en forma liofilizada. Los medios del envase de los kits pueden incluir al menos

un vial, un tubo de ensayo, un matraz, una botella, una jeringa u otro medio de envase, en el que se puede colocar un componente y, en ciertas realizaciones, preparar partes alícuotas adecuadamente. Cuando hay más de un componente en el kit, el kit generalmente también contendrá un segundo, un tercero u otro envase adicional en el que los componentes adicionales se puedan colocar por separado. Sin embargo, varias combinaciones de componentes

5 pueden estar comprendidas en un vial. Los kits descritos en el presente documento también incluirán típicamente un medio para contener la estructura artificial del receptor químérico y cualquier otro envase de un reactivo en un espacio cerrado para la venta comercial. Esos envases pueden incluir envases de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se guardan los viales deseados, por ejemplo.

10 En un aspecto, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden la célula inmune de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas para uso en un método de inmunoterapia para pacientes humanos que comprenden las células inmunes de la invención. En algunas realizaciones, la célula inmune se obtiene originalmente a partir del paciente. En algunas realizaciones, el paciente tiene un tumor o un cáncer en el que se detecta un aumento o una variación en los niveles del antígeno del cáncer al que se dirige el CAR expresado en la célula.

15 También se proporciona una célula inmune de la invención o una composición de la misma para uso en métodos de tratamiento, en donde el método comprende administrar a un sujeto que tiene una enfermedad o una afección, la célula inmune o la composición. En algunas realizaciones, el receptor de antígeno modificado genéticamente se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o la afección. En algunas realizaciones, la enfermedad o la afección es un cáncer o un tumor.

20 En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan células inmunes de la invención y composiciones de las mismas.

Se describe el uso de las células inmunes o composiciones descritas anteriormente en la preparación de un medicamento para uso en un método para tratar una enfermedad o una afección.

25 La descripción anterior de la presente invención se entiende que es ejemplar, y las personas con experiencia ordinaria en la técnica comprenderán que la presente invención puede modificarse fácilmente en ciertas otras formas, sin cambiar la idea técnica o las características esenciales de la presente invención. En consecuencia, las realizaciones descritas anteriormente se entenderán como ejemplares y no limitativas en todos los aspectos. Por ejemplo, los elementos de componentes respectivos que se describen como integrados, se pueden realizar por separado y, del mismo modo, los elementos de componentes que se describen como realizados por separado se pueden realizar de forma integrada.

Listado de secuencias

SEQ ID NO	Secuencia
1.	tctcgcatggacgagctgtat
2.	tggAACCCATTCCCTGAAATTAA
3.	GGAAACCCATTCCCTGAAATTAT
4.	GAACCCATTCCCTGAAATTATT
5.	ACCCATTCCCTGAAATTATTAA
6.	CCCATTCCTGAAATTATTAA
7.	CCTTCCCTGTGGTTCTATTAT
8.	CTTCCCTGTGGTTCTATTATA
9.	TTCCTGTGGTTCTATTATAT
10.	TCCCTGTGGTTCTATTATATT
11.	CCCTGTGGTTCTATTATATTAA
12.	CCTGTGGTTCTATTATATTAT
13.	GATGAAAGGGATGTGAATTAT
14.	GGGAGCCTCCCTGATATAAAT
15.	GGAAATTCGCTCAGAAGAAA
16.	GGACCAAACTGAAGCTATATT
17.	AGAACCTTGTTCCCTTAAT

ES 2 908 324 T5

18.	atgaaaggatgtgaatttt
19.	tcttacccggcgcttaat
20.	cttatccggcgcttaatt
21.	ttatccggcgcttaattt
22.	gaggagcccaatgagtattat
23.	aggagcccaatgagtattat
24.	atagatccaaccacccattt
25.	atgtcattgcctctgtattta
26.	tgtcattgcctctgtatttaa
27.	accaccatgcccagctaattt
28.	tgtgagatttaggctattt
29.	gaccaaactgaagctataattt
30.	aggccttcagcaatctatatt
31.	ggccttcagcaatctatatta
32.	gagttgtccctaaacttaaat
33.	agtggtccctaaacttaatt
34.	gtggtccctaaacttaattt
35.	ctaacacaaaatatccacat
36.	tcagcagcccagtccaaataa
37.	cagcagccccagtccaaataaa
38.	tcaacgtctccatcatgtata
39.	caacgtctccatcatgtataa
40.	ctggagacaatggcgacttta
41.	ctcagcagcccagtccaaata
42.	agcagccccagtccaaataaac
43.	gggatcaaagctatctatata
44.	gatatcaaagctatctatataa
45.	ggcaacggaaacccagattat
46.	tgaagaagagatccatattt
47.	ttggatgcggaaacccaaatta
48.	agcatcacttgggattaat
49.	tgtatgggtcaaggaaattt
50.	agcgagggagaagactatatt
51.	tttacgtatgagacgtttata
52.	gctcctgtatagttacttcc
53.	ggaaattaaacctgggtatgc
54.	gcaccaacagaatatgcattcc
55.	gctcaacaggatgtccaaataa
56.	gcattgtggacaacttatgt
57.	ggaacgcgactaaacttaatc

ES 2 908 324 T5

59.	gatgttaccataaggccaagt
60.	gcaagatgagtctgactatgg
61.	ggcacagagaagaatgcaca
62.	ggaaagagatgctaaatatac
63.	gcaaattcgtataatccctga
64.	gcaacttctccatcaccatgc
65.	gcaaagatgcaccatccaact
66.	gcggatggacagcaacattca
67.	ggacactctgagtgatgaagc
68.	gggaaccacaatgcacgaaag
69.	ggtgcttccaacacactttc
70.	gcttcggccatttgtaatgc
71.	gggagtactctgcatactatc
72.	gctgcataacttcaatgt
73.	taacgtggatctgtatcataa
74.	ggagacatacacaggccctca
75.	gcatttggccctgatctacc
76.	gacagggttgcaggcagtct
77.	gggagtgcctctcagttaca
78.	ggacgaggagggttgcattaa
79.	gaggagaaagagaaggagaa
80.	gcccttcctcaatgcacta
81.	ggttgactgcattcttagact
82.	gcatttgcataacgcattac
83.	gctgcactaattgttatgg
84.	ggatccagtcacccctgaaca
85.	gcacatccctccaaatgaaagg
86.	ggattctcaaccctgtggtta
87.	ggtgctggctccctctataa
88.	gcacagtactccctggcttac
89.	gcaacaggaccacagtcaaga
90.	gcaacaccaccctcagcataa
91.	gcctgtcagagcactcatc
92.	gcagtaatgcctctccatt
93.	gcacctggtgcttagctaga
94.	gcttcatctatgaggaattg
95.	gccagagaaccagctataagt
96.	gggtccctgtatgaatatctgg
97.	ggcttcaggaaagtgaatgg
98.	gcttcaggaaagtgaatgg
99.	agcttcatctatgaggaatt

ES 2 908 324 T5

100.	ggaatccagaacgaattaagt
101.	ggctgattgatggaaacatcc
102.	ggactacagtcaagacaatca
103.	ggaccctcactctattcaatg
104.	gctactggccgcaataattcc
105.	gctcttgtatgacagaatac
106.	ggtccaagggtcaccataaga
107.	gcaaccatacgatagaaatag
108.	ggttctgaaatttcctcaaca
109.	gcaagatataccagctacatct
110.	gcaactcaccccttccatct
111.	gctgcattccctaagataatt
112.	gggacagtagatccacataca
113.	ggacaacagtcaaatgagca
114.	ggctgttgatgttctagagag
115.	gcagacaaggccacagtcaat
116.	ggagggttctaaccagcatcc
117.	gccttgagactgtgttatata
118.	ccaagcccagaatgactatgg
119.	gcctcttgttctgcctgt
120.	gcttcgtactgcagttttct
121.	gctggataaaatggtaacc
122.	ggaaatgagcctgctccaagt
123.	ggattggctgaggaacaatt
124.	gccaaagaagggaaggagtaca
125.	gccaattccactaattgtttg
126.	ggttctcatgaatctccaact
127.	gctggagtcatgacactaagt
128.	gcctggttggagatactaac
129.	ggaaccaccaaagaacttcc
130.	ccgcgtgattaaagaaaga
131.	gcctgatacatatcagcatt
132.	gccccatggaaatttttagc
133.	gcacgactacagaaatatacg
134.	ttcccggttaagttgcactcg
135.	gcctggatctaattcagaaag
136.	gaaagccactgtcggtaaa
137.	tcctgtggatafcgtctaaag
138.	ggctcatagaggctgtatgt
139.	gggctgtccgagttgatatg
140.	aagattggataccgcaaaaa

ES 2 908 324 T5

141.	gtggtaactgaaggcacctatta
142.	gcttgtcagagaacaattgc
143.	ggagatttgttacccaagg
144.	gcagctaggctacagcatg
145.	ggtccttctgtcactatga
146.	ggtgtagctaaagaacattc
147.	ggacctgtctacaggatct
148.	gccaaaggcattgcaggaatg
149.	gcagaacaagccatgattga
150.	cccaaggtaaggagattatt
151.	gcagaagtgcggAACATGA
152.	gcgtcacacagaagcatatcc
153.	ccggctctttgagttcta
154.	cagaacgtcaccaactacttt
155.	ccatgttaggttggaaacaact
156.	ccaagtggcctgtctttga
157.	ggtgtctatttgcggatcttc
158.	agacccctccgcaagatcatc
159.	tccttagccatgagctcaagg
160.	gaaagtactgtggacacatgt
161.	gcacgtgtccatcttcgagg
162.	ggccaaacactcctcaagaact
163.	ggcttctacccatcacccat
164.	ggccatggactccacattga
165.	ggccgtgagtttatctaccagg
166.	gccagaagacaagttagaatt
167.	gctctggaaagtccaggatata
168.	ggaaatgtctggctcgatgc
169.	gcaaagatcctcaaggattta
170.	ggatgccttattgtcatcg
171.	gctatggtaactcgaaattgc
172.	ggaagggtttccaggcagaagt
173.	gcaaggagattgtggccatca
174.	gggcatttcataaggaaatgt
175.	gcaaagatcatccatgtttc
176.	gctggagatgtaccgcaaagt
177.	gcacaggatgagatttatatc
178.	ggaagaccacatacaggaaac
179.	gcattgggtttccatgcata
180.	gcacacgggtggtagattat
181.	gggtctgtaatggaaaggaaat

ES 2 908 324 T5

182.	gcatgtgcgagatgacatga
183.	gcagaccgagtctacacaagt
184.	gcaccatcatccacctcaagt
185.	ggtcaccacatcaaggtcat
186.	gggcaagaaccgctacaagaa
187.	ggaacaaatgcgtcccatact
188.	gcctggactgtgacattgaca
189.	gaacctgcacactaagaacaa
190.	gcagatcctacctctgaaagg
191.	gcaatgacggcaagtctaaag
192.	ggaactgaaatacgcgttgg
193.	gcgtgttaggaacgtcaaaga
194.	gctcatgactatacgctaaga
195.	ggagagaacggctggcaata
196.	gcagctgaacgagaaccaagt
197.	ggagactgtgactttcttgt
198.	ggaatgccaacgttggaaat
199.	ggatcgtttacaggaagtcc
200.	gccttgatgtgaaagtata
201.	gcctgcgttatttagtaac
202.	gctgcacatcaaggagtaatt
203.	gctggaaatactctggtaga
204.	ggagctgttggaaagggatga
205.	gcagaatactggccgtcaatg
206.	ggttatgtgtcaagctaaagg
207.	gcagaacccaaggaattaatc
208.	ggtgtaacatcacaggcttac
209.	gccatagagtcaggacaaat
210.	gcaattctcggttagaaataa
211.	gctggcttaccaacattacc
212.	gggagcaaattcatctgcattc
213.	gcgactcaaatacaccctga
214.	gctctgaggatgtgaataga
215.	gcaaatgacacatgaaagc
216.	ggtctaaagaggagtgcatct
217.	gggctatttggaaacaggatcc
218.	gctgttagaatggaaagcttca
219.	gcttgtttgtctctaattgt

220.	gttaacaaggcgggcaggaagagggccattttccatgattccatatttgcatatacgatacaaggctgttaga gagataattagaattaatttgactgtaaacacaaaagatattgtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttc ggtagttgcagtttaaaattatgtttaaaatggactatcatatgttaccgttaacttgcatttttttttttttt ttatatatcttgtggaaaggacgaaacaccgcgtggttctattatattttcaagagaataatataatagaaccaca ggttttgactgtcaaaaaggaattcgctcagaagaaatcttgcatttttttttttttttttttttttttt ctccaagggatattatgtctaaacacacaaattactttacagtttagggtagtttttttttttttttttttt ataatttttagtattttgtatctttatagaaatccaagcctatcatgtaaaatgttagctgtatttttttttt gtcttttatcgacattaagcctctatagttactaggaaatattatgtcaatttttttttttttttttttt gccttcccacaagtctgtcgagggggccggcgcggccctagagatggcggcgtcgatcgctagccatatgt ctagagtatac
221.	gttaaccaaaaacctgtggttctattatattttcttgcatttttttttttttttttttttttttttttttttt acaagatataaaagccaagaaatcgaaatactttcaagttacggtaagcatatgtatgtccatttttttttt aaaactgcaactacccaagaaattattactttctacgtcacgttttttttttttttttttttttttttttt ttctaaattatctctctaacagccctgtatgtatgtcaatataatgaaggaatcatggaaataggcccttccctgccc gaccctacttagtgcacgcggccatctctaggccccggccggcccccctgcacagacttgcggagaagct cggtactccctgccccggtaatttgcataatatttcttagtaactatagaggcttaatgtgcgataaaagacag ataatctgttttttaacttagctacatttcatgtatgtggatttttttttttttttttttttttttttttttt aaaaaaacagcacaaaagggaaactcaccctaactgtaaagtaattgtgtgtttggagactataaatccctggaga aaaggcttggtaatttgcctcagaagaaatcaagagatttttttttttttttttttttttttttttttttttt agagtatac
222.	gttaacgtccgaegccgcctatcttaggccccggccggcccccctgcacagacttgcggagaagctggcta ctccccctgccccggtaatttgcataatatttcttagtaactatagaggcttaatgtgcgataaaagacagataatct gttcttttaacttagctacatttcatgtataggctggattttctataagagatacaaataactaaatttttttttt acagcacaaaagggaaactcaccctaactgtaaagtaattgtgtgtttggagactataaatccctggagaagac cttggttgnnn nttgcgttaac
223.	gttaacgtccgaegccgcctatcttaggccccggccggcccccctgcacagacttgcggagaagctggcta ctccccctgccccggtaatttgcataatatttcttagtaactatagaggcttaatgtgcgataaaagacagataatct gttcttttaacttagctacatttcatgtataggctggattttctataagagatacaaataactaaatttttttttt acagcacaaaagggaaactcaccctaactgtaaagtaattgtgtgtttggagactataaatccctggagaagac cttggttgcgtgtgttt gtctagagtatac
224.	gttaacaaggcgggcaggaagagggccattttccatgattccatatttgcatatacgatacaaggctgttaga gagataattagaattaatttgactgtaaacacaaaagatattgtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttc ggtagttgcagtttaaaattatgtttaaaatggactatcatatgttaccgttaacttgcatttttttttttt ttatatatcttgtggaaaggacgaaacaccgcgtggttctattatattttcaagagaataatataatagaaccaca ggtttttg

225.	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEW LGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFLSQLNSVTPEDTAVY YCAREVTGDLEAFDIWGQGMVTVSSGGGGGGGGGGSDIQMT QSPSSLASAVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSL QSGVPSRFSGRGSQTDFTLTISLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKL EITTPAPRPPPTAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRR GKHDGLYQGLSTATKDYLALHMQALPPR
226.	MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTSCRASQDI SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNL EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGGGGGGGGGSEVKL QESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVW GSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTAPRPPPTAPIASQPLSLRPEACRPA AGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPREEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG QNQLYNELNLGRREYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ DKDMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDYLALHMQAL PPR
227.	MGAGATGRAMDGPRLLLLLGVSLGGAKEACPTGLYTHSGECCKAC NLGEVVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSVVVSATEPCKPCTECVGLQSM SAPCVEADDAVCRCAYGYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQ NTVCEECPDGTY SDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAEECE IPGRWITRSTPPEGSDSTAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVMGSSQ PVVTRGTTDNLIPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKRWGSGATNFSLLKQA GDVEENPGPALPVTALLLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTI SCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGGGGGGG GGSEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLE WLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTAPRPPPTAPIASQPLSLRP EACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRG RKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPREEEGGCELRVKFSRADA PAYKQGQNQLYNELNLGRREYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDYLAL HMQALPPR

228.	ggtatacttagacatatggctagcactagtcaaaaacctgtggtc
229.	tgtaccgttaacgatccgacgccc
230.	tgactagtcaaaaacctgtggtctattatattattctctgaaataatataatagaaccacaggcggtttcgiccttccacaagatataaagccaa
231.	gtaccgttaacaaggcggcaggaagagggctattccatgattcct
232.	aggactagtcaaaaaggaattcgctcagaagaaatctct
233.	cgttagcgtccgcacgcccacatct
234.	atgttaaccaaaaacctgtggtctattatattattctcttg
235.	tcaactagaaggcggcaggaagagggctatt
236.	taggcccactagtgtatccgacgccc
237.	cgttagccaaaaaggaattcgctcagaagaaatctc
238.	gcttcggccattgtaatgc
239.	gggagtagtctgcacatctatc
240.	gctgcacatgacttcaatgt
241.	taacgtggatctgtatcataa
242.	ggagacatacacaggcctca
243.	gcattggccctgtatctacc
244.	ccagctttcagctttctct
245.	gatctcagccctctgcgaaga
246.	gctcaacgtctccatcatgt
247.	ggtcttcctcactgccaagt
248.	ctggagacaatggcacttta
249.	gccactgtcacatggcaatc
250.	tccagttatctggacaagaacg
251.	gcagcagtgtactcacagag
252.	gctgtttctcatccctgg
253.	gccttggcttcacccctgg
254.	tcagcagcccaatgttccaaataa
255.	ggtggagctcatgtaccacc
256.	cccaaattacgtgtactacaa
257.	gcatacttggattatgt
258.	gcgagggagaagactatattg
259.	gccagtgtgttccaaagggtgt
260.	ggtgttatctgagttgacttg
261.	gatgaaaggatgtgaattat
262.	gggagccctccctgtatataat
263.	ggaattcgctcagaagaaaa
264.	ggaccaaactgaagctatatt
265.	cctgtggtctattatatt
266.	gcctagagaagttcaggaa
267.	cattgtttccctagcggaaat
268.	gattaagtccctgccttgc

269.	gttcacacctacggaaacctg
270.	cctcacccttacacatgcc
271.	cttactgcctcagctccct
272.	ccaagaaggccacagaactga
273.	gttggttcagatcccttagtccag
274.	actttgaacagcctcacagag
275.	ccgagttgaccgtaacagacat
276.	caaccgatccacccacccctt
277.	ggcactttgcctccagat
278.	cacaagctctgccactcgaa
279.	tgcagtgacctggaaggctc
280.	ctacctgggcataggcaacg
281.	ccccgaactaactgctcaa
282.	gaaacagcacaattccagatgttc
283.	atggcccagcggatgag
284.	cccagcatctgcaaaagctc
285.	gtccttgccgaagtcaatgt
286.	acatgattcagccacagatacc
287.	gcatagatgtcagcacgtttg
288.	acgttgtgagagatcgagg
289.	cccagcactcagtcaacgtc

Ejemplos

A continuación se describen ejemplos relacionados con la presente invención. En la mayoría de los casos, se pueden utilizar técnicas alternativas. Los ejemplos se entiende que son ilustrativos y no limitativos ni restrictivos del alcance de la invención.

5 Métodos generales

Líneas celulares y cultivo. Las líneas celulares Nalm-6, Nalm-6GL (que expresan GFP y luciferasa de luciérnaga), K562, K562-CD19, IM-9, Raji, Daudi se cultivaron en RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% y L-glutamina 2 mM y 1% de penicilina/estreptomicina en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ a 37°C. La línea celular Lenti-X™ 293T se adquirió en Takara y se conservó en DMEM complementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM y 1% de penicilina/estreptomicina. Para generar las líneas celulares CD19⁺ PD-L1⁺, las células K562-CD19 o NALM-6-GL se transdijeron con lentivirus que codificaban PD-L1 humano (NM_014143.3). La línea celular Nalm-6-PDL1-CD80 se generó mediante la transducción de células Nalm-6-PDL1 con lentivirus que codificaban CD80 humano (NM_005191.3).

10 Construcción de plásmidos. La construcción del vector pLV-CD19-BBz que contenía el scFv anti-CD19 (FMC63), la región bisagra y transmembranal de CD8α, y los dominios citoplasmáticos 4-1BB(CD137) y CD3ζ, se ha descrito previamente (PNAS, 2016, Ma JSY). Para generar pLV-CD19-28z, el dominio citoplasmático 4-1BB se reemplazó con la secuencia del dominio coestimulador CD28 humano. Para la detección y purificación de los linfocitos T CAR transducidos, se amplificó la secuencia ΔLNGFR (CD271 truncado en el dominio citoplasmático) del vector pMACS-ΔLNGFR (Milteny Biotec), y se insertó frente al transgén de CAR a través de la secuencia P2A, para producir pLV-ΔLNGFR-CD19-28z o pLV-ΔLNGFR-CD19-BBz.

15 Para generar los vectores de LV de dos en uno que codificaban los casetes de expresión de CAR y ARNsh, el casete que expresaba ARNsh que contenía ARNsh (secuencia enlazadora; TTCAAGAGA, secuencia de terminación; TTTTT) y los promotores Pol III (mU6, hU6 o hH1) se sintetizaron y subclonaron en vectores que codificaban CAR aguas arriba del trago central de polipurina (cPPT). Para la generación de vectores dobles de dos en uno que expresaban dos ARNsh a través de diferentes promotores (mU6 y hU6), la secuencia de MCS BstZ171-Xba1-Nde1-Bmt1-Spe1 se insertó en el vector pLV-hU6-shPD-1_ΔLNGFR-CD19-BBz aguas abajo del promotor hU6. Los segundos fragmentos

del casete mU6-ARNsh se subclonaron en el MCS.

Para el establecimiento de vectores indicadores, la secuencia NFAT RE x3 obtenida a partir del indicador pGL2_NFAT-Luc (addgene n.º 10959) se amplificó mediante PCR. Se sintetizaron las secuencias NF-kB-RE 5x (5'-GGGAATTCC-3') y miniP (IDT Technologies). El promotor EF-1a del vector pLV-eGFP se reemplazó con estos fragmentos indicadores para producir los vectores indicadores pLV-NFAT-RE 3x-eGFP o pLV-NF-kB-RE 5x-eGFP.

Selección de las secuencias de ARNsi o ARNsh. Las secuencias candidatas de ARNsi de 21 unidades que son específicas para los puntos de control inmunes inhibidores (CTLA-4, LAG-3, TIGIT y TIM-3) se diseñaron utilizando los programas BLOCK-iT™ RNAi Designer o Sfold antes de sintetizar los oligómeros de ARN. Los ARNsi dirigidos a CTLA-4 se seleccionaron a partir del grupo que consistía en SEQ ID NOs 255-260. Los ARNsi dirigidos a LAG-3 se seleccionaron a partir del grupo que consistía en SEQ ID NOs 244-254. Los ARNsi dirigidos a TIGIT se seleccionaron a partir del grupo que consistía en SEQ ID NOs 238-243. Los ARNsi dirigidos a TIM-3 se seleccionaron a partir del grupo que consistía en SEQ ID NOs 261-264 (Tecnologías IDT). Para analizar la cinética de la expresión de los puntos de control inmunes, las PBMCs se estimularon con Dynabeads Human T-Activator *CD3/CD28* (*Thermofisher*) o 4 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 y 2 µg/ml de anticuerpo anti-CD28, en presencia de IL-2 humana recombinante. Los niveles de expresión de los puntos de control inmunes se analizaron durante 12 días (día 3, día 6 y día 12). Para la selección de secuencias de ARNsi óptimas, 2 días después de la estimulación, se sometieron a electroporación las PBMCs con oligómeros de ARNsi utilizando el sistema de transfección Neon® (*Thermofisher*). Las eficacias de la inactivación de los ARNsi se midieron 2 días después de la transfección mediante citometría de flujo. Se seleccionaron 2 o 3 secuencias de ARNsi para cada punto de control inmune, en función de su eficacia y se convirtieron al formato de ARNsh para generar los vectores lentivíricos dobles de dos en uno. Para validar las eficacias de la inactivación mediada por ARNsh, los linfocitos T transducidos con lentivirus se estimularon con células K562-CD19 irradiadas con y en una relación de 1:1 durante 3 días, y se analizaron los niveles de expresión de sus puntos de control inmunes mediante citometría de flujo.

Citometría de flujo. El nivel de expresión de CAR anti-CD19 se analizó mediante el anticuerpo F(ab')₂ anti-ratón conjugado con AF647 (115-606-072, Jackson ImmunoResearch) o rhCD19-Fc conjugado con biotina (CD9-H5259, ACRO Biosystems) acoplado con estreptavidina conjugada con AF647 (405237, Biolegend). La expresión de ΔLNGFR se analizó mediante el anticuerpo anti-CD271 conjugado con APC o FITC (ME20.4-1.H4; Miltenyi Biotec). La expresión de los puntos de control inmunes en los linfocitos T CAR se midió mediante citometría de flujo convencional, utilizando los siguientes anticuerpos: PD-1 (PE, clon J105; *Thermofisher*), TIM-3 (PE, clon 344823; R & D systems), LAG-3 (PE, clon 7H2C65; Biolegend), TIGIT (PE, clon MBSA43; *Thermofisher*).

La expresión de CTLA-4 en los linfocitos T CAR se analizó mediante citometría de flujo intracelular después de la incubación con células NALM-6 o K562-CD19 irradiadas, con una relación E:T de 1:1 durante 3 días. Las células se fijaron/permeabilizaron con Cytofix/Cytoperm™ (BD Bioscience), seguido de tinción con anticuerpo anti-CD152 humano (CTLA-4) (PE, clon BNI3; Biolegend).

La expresión de los ligandos de los puntos de control inmunes estimuladores o inhibidores sobre las células tumorales se analizó con los siguientes anticuerpos: CD80 (PE, clon 2D10; Biolegend), CD86 (BV421, clon 2331 (FUN-1); BD Bioscience), PD-L1 (APC, clon 29E.2A3; Biolegend), HLA-DR (PE, clon L243; Biolegend), CD112 (PE, clon TX31; Biolegend), CD155 (PE, clon SKII.4; Biolegend).

Para el análisis del efecto de TGF-β sobre la expresión de PD-1, se estimularon linfocitos T CAR con células NALM-6 irradiadas, durante 3 días en presencia de 10 ng/ml de TGF-β1 humano recombinante (R & D Systems) antes de medir la expresión de PD-1 mediante citometría de flujo.

Análisis del estado de fosforilación de SMAD2/3 mediante citometría de flujo intracelular. Para determinar el estado de fosforilación de SMAD2/3, se incubaron linfocitos T CAR con células NALM-6 en una relación de células E:T de 1:1 durante 4 horas o 24 horas. Las células se fijaron con tampón Lyse/Fix (BD Bioscience), seguido de permeabilización con tampón Perm Buffer III (BD Bioscience). El estado de fosforilación en los linfocitos T CAR LNGFR+ se determinó con anticuerpo anti-Smad2 humano (pS465/pS467)/Smad3 (pS423/pS425) (PE, clon O72-670; BD Bioscience).

Detección de linfocitos T reguladores inducidos. La inducción de los linfocitos T reguladores (CD4+CD25+FOXP3+), generados a partir de linfocitos T CAR, se analizó mediante tinción intracelular después de un cocultivo con células NALM-6 durante 3 días. Las células que se fijaron y permeabilizaron con Foxp3/Tampón de tinción del factor de transcripción (*Thermofisher*), se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anti-CD4 (BV605, clon OKT4; Biolegend), anti-CD25 (FITC, clon VT-072; Biolegend) y anti-FOXP3 (APC, clon 236A/E7; *Thermofisher*).

Ensayo de proliferación de CAR-T. Los linfocitos T CAR que expresaban el marcador de superficie ΔLNGFR se clasificaron mediante perlas magnéticas (Miltenyi Biotec). Los linfocitos T CAR LNGFR+ (1 × 10⁶; > 95% de pureza) se estimularon con células K562-CD19-PDL1 irradiadas con y (1 × 10⁶) cada 6 días, en ausencia de citocinas. Se calculó el número de veces que se multiplicaban los linfocitos T CAR mediante el recuento de células los días 6, 12 y 18 utilizando exclusión con azul de tripano.

Citotoxicidad *in vitro* de los linfocitos T CAR. La citotoxicidad de los linfocitos T CAR se determinó utilizando el sistema de análisis de células vivas Incucyte S3. Las células diana NALM-6 o NALM-6-PDL1 que expresaban constitutivamente

5 GFP, se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad de 1×10^5 células por pocillo por triplicado. Se añadieron linfocitos T CAR LNGFR⁺ a cada pocillo con una relación E:T de 1:1, 0,3:1, 0,1:1. El cambio en tiempo real de la intensidad de GFP de cada pocillo se registró cada 2 horas como intensidad integrada de un objeto verde (promedio de intensidad de GFP media x $\mu\text{m}^2/\text{pocillo}$). El porcentaje de intensidad integrada relativa de un objeto verde se calculó mediante la siguiente fórmula: (intensidad de GFP integrada total de cada punto de tiempo/intensidad de GFP integrada total en el punto de tiempo inicial)*100.

10 Ensayo indicador de NFAT y NF-κB. Para determinar la actividad específica del factor de transcripción de NFAT en los linfocitos T CAR, las PBMCs que se estimularon con 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpos anti-CD3 y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpos anti-CD28 en presencia de IL-2 recombinante humana (300 UI/ml) durante 2 días, primero se transdijeron con el lentivirus que codificaba el gen informador NFAT-RE x3-eGFP. Ocho días después de la transducción, las células totales se volvieron a estimular con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-2 recombinante humana (300 UI/mL) durante 2 días. Las células activadas se dividieron en dos pocillos distintos y se transdijeron con diferentes lentivirus que codificaban CAR (CD19-28z o CD19-BBz). Después de 6 días, el total de células de cada pocillo se incubó junto con células NALM-6 en una relación de 1:1. La actividad indicadora de NFAT en los linfocitos T CAR, se determinó mediante el valor gMFI de la señal de eGFP dentro de poblaciones de T CAR LNGFR⁺ (20~25% en células CD3+ totales) a las 24 y 48 horas. La actividad específica del factor de transcripción NF-κB en los linfocitos T CAR se midió siguiendo un procedimiento similar, pero utilizando el gen indicador NF-κB-RE x5-eGFP que codificaba el lentivirus.

20 PCR cuantitativa en tiempo real. Se cultivaron conjuntamente 3×10^6 linfocitos T CAR LNGFR⁺ G28z o GBBz con células diana NALM-6 CD19⁺ en una relación de 1:1. Después de 4 y 48 horas de cultivo conjunto, los linfocitos T CAR LNGFR⁺ se clasificaron utilizando un clasificador MoFlo Astrios (Beckman Coulter). El ARNm de los linfocitos T CAR LNGFR⁺ se extrajo con el mini kit RNeasy (Qiagen) y se transcribió inversamente en ADNC usando el kit de transcripción inversa QuantiTect (Qiagen). La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con el protocolo SYBR utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (Biorad) y SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBIO). Las secuencias de los cebadores para la detección del ARNr 18s comprenden SEQ ID NOs 268 y 269.

25 Las secuencias de los cebadores para la detección de PDCD1 comprenden SEQ ID NOs 270 y 271. Las secuencias de los cebadores para la detección de IL2 comprenden SEQ ID NOs 272 y 273. Las secuencias de los cebadores para la detección de IL4 comprenden SEQ ID NOs 274 y 275. Las secuencias de los cebadores para la detección de IL17A comprenden SEQ ID NOs 276 y 277. Las secuencias de los cebadores para la detección de CD25 comprenden SEQ ID NOs 278 y 279. Las secuencias de los cebadores para la detección de CTLA4 comprenden SEQ ID NOs 280 y 281.

30 Las secuencias de los cebadores para la detección de FOXP3 comprenden SEQ ID NOs 282 y 283. Las secuencias de los cebadores para la detección de TGF-beta1 comprenden SEQ ID NOs 284 y 285. Las secuencias de los cebadores para la detección de TGFBR1 comprenden SEQ ID NOs 286 y 287. Las secuencias de los cebadores para la detección de TGFBR2 comprenden SEQ ID NOs 288 y 289.

35 La cantidad de ARNm diana se normalizó frente al ARNr 18s de referencia endógeno: ΔCt (muestra) = Ct (gen de la diana) - Ct (ARNr 18s). Se aplicó el método de Ct comparativo para analizar el número de veces de cambio del ARNm diana, en comparación con la condición no estimulada, basándose en la siguiente ecuación: $2^{-\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\Delta\text{Ct}[\text{estimulado}] - \Delta\text{Ct}[\text{no estimulado}])}$.

40 Experimentos con animales. Todos los procedimientos descritos en este documento fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en KAIST. Para establecer el modelo de cáncer de sangre CD19⁺, a ratones NSG (4 a 6 semanas de edad) se les inyectó por vía intravenosa 1×10^6 células de leucemia NALM-6 CD19⁺, diseñadas para expresar luciferasa de luciérnaga fusionada con EGFP, así como PDL1 humano (células NALM6-GL-PDL1). Los linfocitos T CAR se prepararon a partir de muestras de sangre total de donantes sanos siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. El día 4 después de la transducción, los linfocitos T CAR se clasificaron y se multiplicaron durante 6 días antes de la inyección en los ratones. Cinco días después de la inyección de las células NALM6-GL-PDL1, 2,5 o 1×10^6 linfocitos T CAR se infundieron por vía intravenosa a los ratones. La formación de imágenes bioluminiscentes de NALM6-GL-PDL1 en los ratones se vigiló con Xenogen IVIS Spectrum y las señales se cuantificaron como radiación en la región de interés (fotón/s) usando el programa informático Living Image (Perkin Elmer). Para el modelo de tumor sólido, a los ratones NSG se les inyectó por vía subcutánea 5×10^6 células IM-9 (CD19⁺ PD-L1⁺CD155⁺). Los linfocitos T CAR LNGFR⁺ se infundieron por vía intravenosa a los ratones, 14 días después de la inyección de las células tumorales (aproximadamente $150 \sim 300 \text{ mm}^3$ de volumen tumoral). Los tumores fueron controlados cada semana midiendo el calibre y el volumen fue estimado mediante ($\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2$).

Ejemplo de referencia 1: Métodos de producción y evaluación de vectores de dos en uno que expresan CART19 y ARNsh dirigido a PD-1

55 Este ejemplo describe los métodos de producción y evaluación de vectores de dos en uno que expresaban CART19 y ARNsh que inhibía la expresión de PD-1.

60 Para generar los vectores lentivíricos de dos en uno que codificaban casetes de expresión de CAR y ARNsh, se sintetizaron casetes que expresaban ARNsh que contenían ARNsh (secuencia enlazadora; TTCAAGAGA, secuencia de terminación; TTTTT) y promotores Pol III (mU6, hU6 o hH1) y se subclonaron en vectores LV que codificaban CAR aguas arriba del tracto central de polipurina (cPPT). Se construyó un vector lentivírico que expresaba espontáneamente CART19 basado en 4-1BB mediante el promotor EF-1α y ARNsh dirigido a PD-1 mediante el

promotor mU6 (FIGs. 1A y 1B).

Para seleccionar el ARNsh dirigido a PD-1, se utilizaron tres candidatos de ARNsh. shPD-1 n.º 1 mostraba un efecto inhibidor sorprendentemente efectivo sobre la expresión de PD-1 (FIG. 1F) sin afectar a la expresión de CAR (Figura 1C), la expansión homeostática (FIG. 1D), el estado de diferenciación y la composición de CD4/CD8 (FIG. 1F). Se ha descrito que el nivel de expresión de un ARNsh puede ser diferente dependiendo de los tipos de promotor Pol III (*Mol Ther.*, 2006, Irvin S.Y. Chen). Por lo tanto, se evaluó el efecto de los promotores mU6, hU6 o hH1 sobre la expresión de PD-1. mU6 y hU6 tenían una eficacia similar sobre KD similar, pero la de hH1 era menor (FIG. 2).

Los vectores lentivíricos de dos en uno producidos en este documento mostraban una inhibición sorprendentemente eficaz de la expresión de PD-1, por lo que pueden usarse en la producción de linfocitos T CAR modificados con PD-1 KD en el siguiente ejemplo.

Ejemplo de referencia 2: Métodos de producción y de evaluación *in vitro* de linfocitos T CAR PD-1 KD

Este ejemplo describe los métodos de producción y de evaluación *in vitro* de linfocitos T CAR modificados con PD-1 KD.

Las células mononucleares de sangre periférica se separaron de muestras de sangre total de donantes sanos, mediante el método de centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Esas células se estimularon con 4 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 unido a la placa (clon OKT3; Bio X cell) y 2 µg/ml de anticuerpo anti-CD28 soluble (clon CD28.2; Bio X cell) en presencia de 300 UI/ml de IL-2 humana recombinante (BMIKOREA). Para la producción de lentivirus recombinantes, se sembraron 6×10^5 células 293T en 2,5 ml de medio de crecimiento (DMEM complementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y piruvato de sodio 1 mM) en una placa de 6 pocillos, 24 horas antes de la transfección. Las células se transfecaron con la mezcla de vectores de empaquetamiento (pMDL, pRev, pMDG.1) y un vector de transferencia, utilizando 10 µl de Lipofectamina 2000 (Thermofisher). Dos días después de la transfección, se recogió el material sobrenadante del cultivo que contenía lentivirus y se centrifugó a 1800 rpm durante 5 minutos. Los linfocitos T activados se mezclaron con el material sobrenadante vírico en presencia de sulfato de protamina (1 µg/ml), se centrifugaron a 1000 × g durante 90 minutos y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, el material sobrenadante del cultivo se aspiró y se reemplazó con RPMI-1640 de nuevo aporte complementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM y β-mercaptoetanol 55 µM. Los linfocitos T transducidos se cultivaron hasta tener una densidad inferior a 1×10^6 células/mL en RPMI-1640 complementado con 10% de FBS inactivado por calor y L-glutamina 2 mM y 1% de penicilina/estreptomicina de medios de linfocitos T que contenían IL-2 recombinante humana (300 UI/mL), que se repusieron cada 2-3 días.

La actividad lítica y proliferativa *in vitro* de los linfocitos T CAR shPD-1 se investigó. Nalm-6-PDL1 o K562-CD19-PDL1 se usó como células diana CD19⁺PDL1⁺. En primer lugar, se examinó la actividad lítica a largo plazo utilizando el sistema de formación de imágenes en tiempo real IncuCyte. Cuando los linfocitos T CAR se mezclaron con las células NALM-6, los linfocitos T CAR WT (shGFP) y PD-1 KD (shPD-1) tenían una actividad lítica similar. Sin embargo, los linfocitos T CAR shGFP mostraban una actividad lítica sorprendentemente más eficaz que la de shGFP CAR, cuando los linfocitos T CAR se cultivaban con células NALM-6-PDL1 (Figura 3A). También se encontró que inesperadamente los linfocitos T CAR BBz con/sin casete de ARNsh y los linfocitos T CAR shGFP conservaban una citotoxicidad similar, lo que sugiere que la expresión de ARNsh por sí misma tiene poco efecto sobre la actividad de los linfocitos T CAR.

A continuación, se evaluó la actividad proliferativa de los linfocitos T CAR expuestos repetidamente al antígeno CD19 y PD-L1. Los linfocitos T CAR shPD-1 lograban una actividad proliferativa de linfocitos T de 4 a 5 veces mayor frente a la diana K562-CD19-PDL1 que los linfocitos T CAR shGFP en ausencia de IL-2 exógena (FIG. 3B). Se sabe que los ligandos coestimuladores facilitan la expansión óptima de los linfocitos T y no se expresan con poca frecuencia en las células tumorales. Para examinar si la expresión del ligando coestimulador en las células diana afecta a la proliferación celular tras una estimulación repetida, se examinó si CD80, un ligando coestimulador representativo, se expresaba en las células diana. K562-CD19 expresaba CD80 pero no Nalm-6 (FIG. 3C). Se descubrió que la sobreexpresión de CD80 en NALM-6-PDL1 (NALM-6-PDL1-CD80) permite que los linfocitos T CAR proliferen con una estimulación repetida. CD80 podría facilitar la proliferación de CART con una estimulación repetida *in vitro* (FIG. 3B). Colectivamente, se corroboró que la alteración de PD-1 intrínseca de la célula contribuye de manera sorprendentemente eficaz a una mejora funcional *in vitro* de los linfocitos T CAR específicos de CD19 tras una estimulación repetida de CAR y PDL1.

En este ejemplo, los linfocitos T CAR modificados con PD-1 KD generados usando los vectores de dos en uno descritos en el ejemplo 1, mostraban un sorprendente nivel de mejora en la actividad lítica y proliferativa *in vitro*, en comparación con los linfocitos T CAR WT, por lo que su potencial terapéutico se evaluó más a fondo en modelos *in vivo* en un modelo de ratón con tumor sanguíneo CD19⁺PDL1⁺ en el siguiente ejemplo.

Ejemplo de referencia 3: Métodos de tratamiento de cáncer de sangre CD19+ *in vivo* utilizando linfocitos T CAR PD-1 KD

Este ejemplo describe los métodos para tratar cáncer de sangre CD19+ *in vivo* utilizando linfocitos T CAR PD-1 KD.

Para establecer el modelo de cáncer de sangre CD19+, a ratones NSG (de 4 a 6 semanas de edad) se les inyectó por

vía intravenosa 1×10^6 células de leucemia NALM-6 CD19⁺ diseñadas para expresar luciferasa de luciérnaga fusionada con EGFP, así como PDL1 humano (células NALM6-GL-PDL1). Los linfocitos T CAR se prepararon a partir de muestras de sangre total de donantes sanos, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. El día 4 después de la transducción, los linfocitos T CAR se clasificaron y multiplicaron adicionalmente durante 6 días antes de inyectar en los ratones. Cinco días después de la inyección de las células NALM6-GL-PDL1, 1×10^6 linfocitos T CAR se infundieron por vía intravenosa a los ratones. La formación de imágenes de bioluminiscencia de NALM6-GL-PDL1 en ratones se vigiló con Xenogen IVIS Spectrum y las señales se cuantificaron como radiación en la región de interés (fotón/s) usando el programa informático Living Image (Perkin Elmer). Los ratones tratados con linfocitos T CAR shPD-1 tenían una reducción sorprendentemente uniforme en la carga tumoral en comparación con los linfocitos T CAR shGFP (FIG. 4). Además, se encontró que dos tipos de promotores que expresaban ARNsh tenían un efecto antitumoral similar y la expresión de ARNsh por sí misma, sorprendentemente no afecta al efecto antitumoral.

Examen del efecto de la alteración PD-1 intrínseca celular de los linfocitos T CAR sobre la producción de citocinas *in vivo*. La sangre periférica de ratones individuales se obtuvo 24 y 72 horas después de la inyección de CAR-T. El plasma se recogió desde la sangre periférica mediante centrifugación durante 5 minutos a $300 \times g$ a temperatura ambiente. El nivel de citocinas *in vivo* se analizó con el kit de citocinas Th1/Th2 humanas (BD Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante. La alteración de PD-1 intrínseca celular de los linfocitos T CAR reducía inesperadamente *in vivo* la producción de citocinas (FIG. 5A).

Al examinar el efecto de la alteración de PD-1 intrínseca celular de los linfocitos T CAR sobre la expansión *in vivo* de los linfocitos T CAR, se extirpó el bazo de ratones individuales 3 o 20 días después de la inyección de CAR-T. El porcentaje de linfocitos T CAR (Vivos/Muertos-CD3⁺) o NALM-6-PDL1 (Vivos/Muertos-GFP⁺) fue evaluado por citometría de flujo. La alteración de PD-1 intrínseca celular retrasaba inesperadamente *in vivo* la expansión de los linfocitos T CAR (FIG. 5B).

La alteración de PD-1 intrínseca de los linfocitos T CAR, adquirida por el sistema de vector de dos en uno, descrito en este documento, mostraba un nivel inesperadamente alto de aumento del efecto antitumoral *in vivo* de los linfocitos T CAR específicos de CD19 contra el tumor CD19+PDL1+. Por lo tanto, los linfocitos T CAR PD-1 KD se usaron adicionalmente en los métodos de los siguientes ejemplos.

Ejemplo de referencia 4: Evaluación del entorno de moléculas coestimulantes en la señalización de PD-1

Este ejemplo describe la evaluación del entorno de las moléculas estimulantes, incluidas CD28 y 4-1BB, en la señalización de PD-1.

Se investigó cómo la alteración de PD-1 intrínseca celular afecta a una función de los linfocitos T CAR CD28/CD3ζ o 4-1BB/CD3ζ (FIG. 6A). Primero se generaron linfocitos T CAR G28z GBBz, P28z y PBBz. Estos linfocitos T CAR se transdijeron de manera similar (FIG. 6B). El nivel de expresión de PD-1 era mayor en los linfocitos T CAR G28z que en los linfocitos T CAR GBBz, y el nivel de PD-1 de P28z era mayor que el de PBBz (FIG. 7A). También se encontró que ese diferente nivel de proteína PD-1 era el resultado del nivel transcripcional (FIG. 7B). Se planteó la hipótesis de que cada dominio coestimulador representaría una intensidad diferente sobre la activación de los factores involucrados en la transcripción de PD-1. Entre los factores de transcripción involucrados en la transcripción de PD-1, NFAT y NF-κB estaban significativamente involucrados en la transcripción de PD-1, y SMAD2/3 estaban involucrados en la transcripción de PD-1 en presencia de TGF-β exógeno que es el principal factor inmunosupresor del microentorno tumoral (*Cancer Discov.*, 2016, Benjamine V. Park). Se investigó la actividad de NFAT o NF-κB durante la estimulación de CAR. Se construyó el elemento de respuesta NFAT (NFAT-RE x3)-eGFP o el vector lentivírico indicador del elemento de respuesta NF-κB clásico (NF-κB RE x5)-eGFP. Se demostró que NFAT o NF-κB RE mediaban en la inducción de eGFP (FIGs. 8A y 8B). Los linfocitos T transducidos con indicador se vuelven a estimular y se transducen adicionalmente con G28z o GBBz. Se encontró que los linfocitos T CAR indicadores de NFAT transducidos con G28z (G28z-NFAT) tenían un nivel ligeramente alto de actividad NFAT, en comparación con GBBz-NFAT (FIG. 9A) y el nivel de ARNm de los genes diana de NFAT también era mayor en G28z (FIG. 9B). Sin embargo, los linfocitos T CAR indicadores de NF-κB transducidos con G28z (G28z-NF-κB) son similares por la actividad de NFAT, en comparación con GBB-NF-κB (FIG. 10). Para investigar la actividad de SMAD2/3 de cada linfocito T CAR, se trató el TGF-β con linfocitos T CAR G28z o GBBz durante la estimulación con CAR. Se encontró que la fosforilación SMAD2/3 de G28z CART es ligeramente superior a BBz CART (FIG. 11A) y el grado de aumento en la expresión de PD-1 a través del tratamiento con TGF-β es mayor para G28z que para GBBz ($n = 6$ de veces de cambio de G28z $2,39 \pm 0,031$, GBBz $1,61 \pm 0,034$) (FIG. 11B). Se investigó si esa diferencia se debía a diferencias en los niveles de expresión de los elementos de señalización de TGF-β. Se encontró que la expresión de TGF-β y del receptor 1 de TGF-β (TGFBR1) no eran significativamente diferentes entre los dos CARTs, pero el receptor 2 de TGF-β (TGFBR2) se expresaba con un nivel más alto en CD28z (FIG. 11C).

En este ejemplo, se evaluó el entorno de las moléculas estimulantes, incluyendo CD28 y 4-1BB, en la señalización de PD-1. La coestimulación con CD28 inducía fuertemente una señalización asociada con la transcripción de PD-1, y la inducción podría estar relacionada con una activación de la señalización de NFAT y TGF-β. La inducción de la coestimulación con CD28 era más fuerte que la de la coestimulación con 4-1BB.

Ejemplo de referencia 5: Métodos de modificación genética y evaluación de linfocitos T CAR PD-1 KD

Este ejemplo describe métodos de modificación genética y evaluación de linfocitos T CAR PD-1 KD.

Para imitar las condiciones *in vivo* de los linfocitos T CAR con múltiples antígenos secuenciales y encuentros de ligandos de puntos de control inmunes, los linfocitos T CAR se cocultivaron con células diana CD19⁺ PDL1⁺ sin citocinas exógenas. En los linfocitos T CAR primarios, los grupos CAR-T PD-1 KD mostraban una actividad lítica

5 sorprendentemente mayor que los grupos CAR-T WT, pero no había diferencia en la actividad lítica entre los grupos CAR-T basados en CD28 y en 4-1BB. (FIG. 12A). Después de una segunda estimulación de los linfocitos T CAR, los linfocitos T CAR G28z perdían la capacidad de multiplicarse después de la segunda estimulación, por lo que se analizó la actividad lítica de 3 linfocitos T CAR. Los linfocitos T CAR PBBz y P28z tenían una actividad lítica sorprendentemente mayor tras una exposición repetida al antígeno y PD-L1, que los linfocitos T CAR GBBz. Los linfocitos T CAR PBBz mostraban una capacidad inesperadamente mayor para conservar la función lítica que los linfocitos T CAR P28z (FIG. 12A). Esa tendencia también se observó en el ensayo de proliferación celular (FIG. 12B). Colectivamente, la aplicación del dominio coestimulador 4-1BB a CART PD-1 KD contribuye a la citotoxicidad retenida y la capacidad proliferativa *in vitro*, en comparación con el dominio coestimulador de CD28. Los linfocitos T CAR PBBz muestran un agotamiento retardado tras una exposición repetida a CD19 y PD-L1.

15 Se examinó el posible efecto del mecanismo inmunosupresor sobre los linfocitos T CAR BBz. Los linfocitos T CAR CD28 eran más sensibles a TGF-β que CART BBz (FIG. 11), por lo tanto, los linfocitos T CAR GBBz se compararon con los linfocitos T CAR G28z para analizar cuánto se suprimía su proliferación específica de antígeno a través de TGF-β. Si bien no se observó una diferencia significativa en la proliferación entre dos linfocitos T CAR durante la estimulación con CAR sin TGF-β, la proliferación de los linfocitos T CAR G28z se reducía significativamente más que en los linfocitos T CAR GBBz (FIG. 13A).

20 Se ha descrito que TGF-β no solo inhibe la proliferación, sino que también está profundamente involucrado en la inducción de linfocitos T reguladores (JEM, 2003, WanJun Chen; Science, 2003, Shohei Hori; Blood, 2007, Dat Q. Tran). Para examinar si la inducción de Treg es diferente entre los linfocitos T CAR G28z y BBz en ausencia de TGF-β exógeno, se cultivaron linfocitos T CAR G28z y BBz con células diana NALM-6 durante 3 días. Los linfocitos T CAR 25 G28z tenían de dos a tres veces más % de Tregs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ *in vitro* que en comparación con los linfocitos T CAR GBBz (FIG. 13B). Este resultado es consistente con el aumento en la expresión de genes relacionados con Treg, tales como CD25 y FOXP3 (FIG. 9B). A continuación, se observaron y compararon los cambios en el % de Treg después de un tratamiento con TGF-β. Se mostró que TGF-β mejoraba significativamente el % de Treg en linfocitos T CAR 30 28z, pero no afectaba al % de Treg en linfocitos T CAR BBz (FIG. 13B). Se llegó a la conclusión de que una coestimulación de CD28 tiene un mayor potencial para inducir Treg que la coestimulación de 4-1BB, y si TGF-β estaba presente, su potencial aumentaría aún más. También se investigó si la alteración de PD-1 intrínseca celular afecta a la inducción de Treg. Los linfocitos T CAR P28z y PBBz tenían un porcentaje de Treg de dos a tres veces menor, que en comparación con G28z y GBBz, respectivamente. Especialmente, PBBz tenía el % de Treg más bajo (FIG. 13C). Finalmente, se examinó el porcentaje de Treg con la condición de que la señalización de PD-1/PD-L1 estuviera 35 activada. Se examinó el cambio del % de Treg después de un cocultivo de NALM-6 o NALM-6-PDL1. Se encontró que la señalización de PD-1/PDL1 no afectaba significativamente a la inducción de los linfocitos Treg obtenidos a partir de CAR-T (FIG. 13C), lo que sugiere que los niveles de expresión intracelular de PD-1 están relacionados con la formación de Tregs. Se llegó a la conclusión de que los linfocitos T CAR PBBz podrían ser sorprendentemente insensibles frente a un mecanismo inmunosupresor.

40 En este ejemplo, los linfocitos T CAR PBBz se produjeron y mostraban un agotamiento retardado tras una exposición repetida a CD19 y PD-L1. Los linfocitos T CAR PBBz también evitan inesperadamente el mecanismo inmunosupresor. Por lo tanto, estas células fueron evaluadas más a fondo para estudiar su efecto antitumoral *in vivo*.

Ejemplo de referencia 6: Métodos de tratamiento del cáncer de sangre CD19+ *in vivo* usando linfocitos T CAR PBBz

45 Este ejemplo describe los métodos de tratamiento del cáncer de sangre CD19+ *in vivo* usando linfocitos T CAR PBBz. El modelo de tumor sanguíneo CD19⁺ se estableció como se ha descrito en el ejemplo 3. Se comparó el efecto antitumoral de los linfocitos T CAR G28z, GBBz, P28z y PBBz contra células B-ALL CD19⁺ *in vivo*. Los linfocitos T CAR se administraron en una dosis única de 2.5×10^6 el día 4 después de la infusión de las células diana. Las imágenes *in vivo* de ratones portadores de NALM6-GL-PDL1 se adquirieron con Xenogen IVIS Spectrum y se cuantificaron como radiación en la región de interés (fotón/s). Como se muestra en la FIG. 14, los linfocitos T CAR PD-1 KD (PBBz o P28z) muestran un efecto antitumoral superior al de los linfocitos T CAR WT (GBBz o G28z). Especialmente, los linfocitos T CAR PBBz inhibían la progresión de la leucemia durante períodos de tiempo más largos que los otros tres linfocitos T CAR. Los linfocitos T CAR WT tenían una fuerte respuesta antitumoral, pero no tenían una respuesta antitumoral sostenida. Por otro lado, los linfocitos T CAR PD-1 KD mostraba una respuesta débil en los 50 períodos iniciales, pero una respuesta antitumoral persistente, lo que sugiere que la alteración de PD-1 en los linfocitos T CAR podría reducir potencialmente el riesgo de CRS. Los linfocitos T CAR PBBz conferían inesperadamente un efecto antitumoral *in vivo* más alto que el de P28z.

Ejemplo 7: Métodos de producción de vectores dobles de dos en uno que tienen 2 tipos de casetes de ARNsh integrados en las direcciones →→ o ←←

Este ejemplo describe los métodos para producir vectores dobles de dos en uno, en los que 2 tipos de casetes de ARNsh se introducen en las direcciones \longleftrightarrow (shTIM-3-mU6 \longleftrightarrow U6-shPD-1) o las direcciones $\rightarrow\leftarrow$ (mU6-shTIM -3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1-hU6) y expresan shPD-1, shTIM-3 y CD19-CAR simultáneamente.

5 Construcción de un lentivirus en el que la expresión del ARNsh para PD-1 (de aquí en adelante shPD-1), el ARNsh para TIM-3 (de aquí en adelante shTIM-3) y CD19-CAR están reguladas por el promotor U6 humano (de aquí en adelante hU6), el promotor U6 de ratón (de aquí en adelante mU6) y el promotor EF1- α , respectivamente. El plásmido en el que ambos tipos de ARNsh se expresaban simultáneamente, se preparó de modo que los casetes de ARNsh respectivos se dispusieran en la dirección $\rightarrow\leftarrow$ (mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1-hU6) y en la dirección \longleftrightarrow (shTIM-3-mU6 \longleftrightarrow hU6-shPD-1) (FIG. 15). Con este fin, se realizó (1) la inserción de un sitio de clonación múltiple (MCS), (2) la conversión del promotor U6 de ratón de shPD-1 en un promotor U6 humano, (3) la inserción de shTIM-3 y (4) la clonación como un intercambio de posiciones de shTIM-3 y shPD-1.

10 Para insertar un MCS en mU6-shPD-1, se usó la parte 3' de pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shPD-1 (ID de plásmido nº 2) y cebadores que comprendían SEQ ID NOs 228 y 229 para preparar un producto de PCR (416 pb), en donde el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Hpa1 de mU6-shPD-1 3' se modificaba a un sitio de clonación 15 múltiple BsgZ171-Xba1-Nde-1-Bmt1-Spe1. A continuación, el producto de la PCR se trató con las enzimas de restricción BstZ17y y Hpa1 y el plásmido ID nº 2 se trató con la enzima de restricción Hpa1 y CIP, después de lo cual se utilizó una ligación con extremos romos para preparar un plásmido pLV-ΔLNGFR-P2A-CD19-CAR-mU6-shPD-1_MCS (ID de plásmido nº 4) que incluía la secuencia de bases de shPD-1-mU6-MCS (casete de ARNsh SEQ ID NO 223).

20 Posteriormente, se construyó un plásmido de modo que shPD-1 se expresara a través del promotor U6 humano en lugar del promotor U6 de ratón. El plásmido LentiCRISPR V2 se usó con cebadores que comprendían SEQ ID NOs 230 y 231 para obtener un producto de PCR que incluía el promotor U6 humano. El producto de la PCR se trató con las enzimas de restricción Hpa1 y Spe1, y luego se ligó con el plásmido ID n.º 4 tratado con las enzimas de restricción Hpa1 y Spe1 para preparar un plásmido pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_hU6-shPD-1_MSC (plásmido ID n.º 5) que comprendía la secuencia de bases de hU6-shPD-1 (SEQ ID NO 224). Se pretendía insertar el casete mU6-shTIM-3 25 en el plásmido ID n.º 5 para construir un plásmido que expresara shTIM-3 y shPD-1 simultáneamente.

30 El producto de la PCR, incluido el casete mU6-shTIM-3, se obtuvo usando el plásmido ID n.º 3 y los cebadores que comprendían SEQ ID NOs 232 y 233. Después de tratar el producto de PCR con las enzimas de restricción Bmt1 y Spe1, se ligó con el plásmido ID n.º 5 tratado con las enzimas de restricción Bmt1 y Spel para preparar un plásmido pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1- hU6 (plásmido ID n.º 6) que comprendía una secuencia de bases con la dirección $\rightarrow\leftarrow$ (mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ hPD-1-hU6) (SEQ ID NO 220).

35 Para construir un plásmido en el que dos tipos de casetes de ARNsh están dispuestos en las direcciones \longleftrightarrow (shTIM-3-mU6 \longleftrightarrow hU6-shPD-1), el plásmido ID n.º 6 y los cebadores que comprendían SEQ ID NOs 234 y 235 se utilizaron para obtener un producto de PCR. Después de tratar con las enzimas de restricción Spe1 y Hpa1, se insertó en el plásmido ID n.º 4 tratado con las mismas enzimas de restricción para producir el plásmido pLV-ΔLNGFR-P2A-CD19-CAR-shPD-1-hU6-MCS (plásmido ID n.º 7). Posteriormente, el plásmido ID n.º 6 y los cebadores que comprendían 40 SEQ ID NOs 236 y 237 se utilizaron para obtener un producto de PCR. Después de tratar con las enzimas de restricción Bmt1 y Spe1, se ligó al plásmido ID n.º 7 tratado con las mismas enzimas de restricción para finalmente preparar un plásmido pLV-ΔLNGFR-P2A-CD19-CAR_shTIM-3-mU6 \longleftrightarrow hU6-shPD-1 (plásmido ID n.º 8) que comprendía una secuencia de bases con la dirección \longleftrightarrow (shTIM-3-mU6 \longleftrightarrow hU6-shPD-1) (SEQ ID NO 221).

45 Los vectores lentivíricos de dos en uno en los que se introducen 2 tipos de casete de ARNsh en las direcciones \longleftrightarrow o $\rightarrow\leftarrow$ producidos en este documento, se pueden usar en la producción de linfocitos T CAR modificados con PD-1 KD en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 8: Métodos de producción y evaluación *in vitro* de linfocitos T CAR PD-1 KD

Este ejemplo describe los métodos de producción y evaluación *in vitro* de linfocitos T CAR KD dobles en donde shPD-45 1, shTIM-3 y CD19-CAR se expresan simultáneamente.

50 Los plásmidos ID n.º 1 (pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shGFP), n.º 6 (pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1-hU6) y n.º 8 (pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_shTIM-3-mU6 \longleftrightarrow hU6-shPD-1) en la Tabla 1, y los plásmidos de empaquetamiento pMDL g/p, pRSVrev y pMDG.1, se transfecaron en células T HEK293 utilizando lipofectamina y después de 48 horas se obtuvo un fluido de cultivo celular que incluía lentivirus. Usando una solución de ficoll-paque, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre humana, y se usaron anticuerpos diana CD3 y CD28 humanos para activar específicamente los linfocitos T. Uno o dos días después de la activación inicial de los linfocitos T, estos se transdujeron usando el virus obtenido previamente. Los linfocitos T CAR preparados se cultivaron posteriormente usando fluido de un cultivo de AIM-V que incluía plasma humano al 5% e IL-2 humana. El sexto día después de la transducción, se utilizó el sistema MACSelect LNGFR (miltenyi biotec, Alemania) 55 para obtener linfocitos T CAR puros, y el anticuerpo diana LNGFR se utilizó para aislar los linfocitos T CAR LNGFR+ con un citómetro de flujo. A continuación, las células preparadas usando los plásmidos ID n.º 1, n.º 6 y n.º 8 se indican como ΔLNGFRCART19/shGFP (o shGFP/CART19), ΔLNGFR-CART19/mU6-shTIM-3 $\rightarrow\leftarrow$ shPD-1-hU6 (o shPD-1_shTIM-3/CART19) y ΔLNGFR-CART19/shTIM-3-mU6 \longleftrightarrow U6-shPD-1, respectivamente (FIG. 16).

- Para preparar linfocitos T CAR de control que comprendían los casetes mU6-shPD-1, mU6-TIM-3 y shPD-1-hU6, respectivamente, el plásmido ID n.º 2 (pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shPD-1), el n.º 3 (pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_mU6-shTIM-3) y el n.º 7 (pLV-ΔLNGFR_P2A_CD19-CAR_shPD-1-hU6_MCS) en la Tabla 1, y los plásmidos de empaquetamiento pMDLg/p, pRSVrev y pMDG.1, se transfecaron en células T HEK293 usando 5 lipofectamina. Después de 48 horas, se obtuvo un fluido de un cultivo celular que incluía lentivirus. Usando una solución de ficoll-paque, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre humana, y se usaron anticuerpos diana CD3 y CD28 humanos para activar específicamente los linfocitos T. Uno o dos días 10 después de la activación inicial de los linfocitos T, estos se transdijeron usando el virus obtenido previamente. Los linfocitos T CAR preparados se cultivaron posteriormente usando fluido de un cultivo AIM-V que incluía plasma humano al 5% e IL-2 humana. El sexto día después de la transducción, se utilizó el sistema MACSelect LNGFR (miltenyibiotec, 15 Alemania) para obtener linfocitos T CAR puros, y el anticuerpo diana LNGFR se utilizó para aislar linfocitos T CAR LNGFR+ con un citómetro de flujo. A continuación, las células preparadas usando el plásmido ID n.º 2, n.º 3 y n.º 7 se indican como ΔLNGFR-CART19/shPD-1 (o shPD-1/CART19), ΔLNGFR-CART19/shTIM-3 (o shTIM-3/ CART19) y ΔLNGFRCART19/shPD-1-hU6, respectivamente.
- 15 Para medir la pureza de los linfocitos T CAR KD dobles producidos de ese modo, se realizó una citometría de flujo utilizando los anticuerpos diana LNGFR para las células preparadas anteriormente. Como se muestra en la FIG. 17, se obtuvo aproximadamente un 80% de linfocitos T CAR LNGFR+.
- 20 Se midió la expresión reducida de PD-1 y TIM-3 en los linfocitos T CAR KD dobles producidos de esta manera, y se mantuvo la reducción en la expresión de los mismos. Los linfocitos T CAR KD dobles se estimularon durante tres días con anticuerpo diana CD3 y CD28 humano para inducir la expresión de PD-1 y TIM-3. Posteriormente, la expresión de 25 PD-1 y TIM-3 de los linfocitos T CAR KD dobles se analizó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos dirigidos a CAR, PD-1 y TIM-3. Como se muestra en las FIGs. 18A y 18B, el análisis del efecto de los dos tipos de ARNsh expresados simultáneamente sobre la reducción de la expresión de PD-1 y TIM-3, mostraba que el grado de reducción de la expresión de PD-1 y TIM-3 observado en un linfocito T CAR CD19 que expresa shPD- 1 y shTIM-3 simultáneamente, era similar al grado de reducción en un linfocito T CAR CD19 en el que solo se expresa shPD-1 o shTIM-3.
- 30 Se midió el impacto de los linfocitos T CAR KD dobles producidos de esta manera sobre la diferenciación. Para observar el grado de diferenciación de PD-1 y TIM-3 de los linfocitos T CAR KD dobles, se llevó a cabo una citometría de flujo utilizando anticuerpos diana CD45RA y CCR7. Como se muestra en la FIG. 19, en las células ΔLNGFR-CART19/shPD-1 sometidas a una estimulación antigenica repetida, había un aumento de linfocitos T TEMRA diferenciadas terminalmente (CCR7-CD45RA+), en comparación con ΔLNGFR-CART19/shGFP. Por otro lado, ΔLNGFR-CART19/mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6 al que se había añadido shTIM-3 comprendía más subtipos de 35 linfocitos T TN (CCR7+CD45RA+), linfocitos T TCM (CCR7+CD45RA-) y linfocitos T TEM (CCR7-CD45RA-) que ΔLNGFR-CART19/shPD-1. Como también se observan resultados similares con las células ΔLNGFR-CART19/shTIM-3, se puede decir que la capacidad de diferenciación reducida de las células ΔLNGFR-CART19/mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6 surge debido a una supresión de la expresión de TIM-3 y, en consecuencia, se puede decir que el efecto de shTIM-3 tiene prioridad sobre el efecto de shPD-1, en cuanto a la influencia que tiene sobre la diferenciación celular. Como se sabe que los subtipos de linfocitos T menos diferenciados pueden favorecer una mejor capacidad terapéutica de los linfocitos T contra el cáncer, se espera que las células ΔLNGFR-CART19/mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6 muestren una mejor eficacia anticancerígena *in vivo* que las células ΔLNGFR-CART19/shPD-1.
- 40 Se comparó la eficacia de la transducción, la capacidad de proliferación y la viabilidad de los linfocitos T CAR KD dobles en los que se introdujeron vectores CD19-CAR que comprendían casetes de ARNsh con diferentes orientaciones. En los linfocitos T CAR producidos en este documento, la citometría de flujo se realizó usando un anticuerpo LNTFR para las células usando plásmidos que comprendían casetes con la dirección →← (mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6) y la dirección ←→ (shTIM-3-mU6←→hU6-shPD-1). Para el análisis de la viabilidad celular, se 45 realizó una tinción con azul de tripano y se encontró la relación de células no teñidas. Como se muestra en las FIGs. 20A-20C, en comparación con las células que utilizan los casetes con la dirección →←, (ΔLNGFR-CART19/mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6), las células que utilizan los casetes con la dirección ←→ (ΔLNGFR-CART19/shTIM-3-mU6←→hU6 -shPD-1) tenían problemas inesperados para formar células transducidas, y los linfocitos T transducidos tenían viabilidad y capacidad de proliferación bajas.
- 50 Este ejemplo describe los métodos para producir linfocitos T CAR KD dobles en los que shPD-1, shTIM-3 y CD19-CAR se expresan simultáneamente. Los linfocitos T CAR KD dobles se produjeron usando vectores lentivíricos de dos en uno, producidos en este documento que tenían 2 tipos de casete de ARNsh insertados en la dirección →← o ←→. En comparación con las células que utilizaban los casetes con la dirección ←→, las células que utilizaban los casetes con la dirección →← (ΔLNGFR-CART19/mU6-shTIM-3→←shPD-1-hU6) mostraban una capacidad de proliferación y 55 una viabilidad sorprendentemente mayores y, por lo tanto, se utilizaron en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 9: Métodos de producción de vectores dobles de dos en uno y linfocitos T CAR KD dobles

Este ejemplo describe los métodos para producir vectores de dos en uno dobles y linfocitos T CAR KD dobles.

Para la generación de vectores dobles de dos en uno que expresaban dos ARNsh a través de diferentes promotores (mU6 y hU6), se insertó un sitio de clonación múltiple (MCS) BstZ171-Xba1-Nde1-Bmt1-Spe1 en el vector pLV-hU6-

shPD-1_ΔLNGFR- CD19-BBz aguas abajo del promotor hU6. Los segundos fragmentos del casete mU6-ARNsh se subclonaron en el MCS. Para limitar el bloqueo de múltiples puntos de control inmunes solo a los linfocitos T CAR, se ideó un vector doble de dos en uno para expresar dos ARNsh mediante los promotores mU6 y hU6 Pol III para inhibir la expresión de dos puntos de control inmunes de los linfocitos T CAR. Para encontrar ARNs que se dirijan de forma eficaz a las dianas CTLA-4, LAG-3, TIGIT o TIM-3, los ARNs fueron sometidos a electroporación en linfocitos T estimulados con CD3/CD28. Se seleccionaron dos o más ARNs efectivos (FIG. 21A). Se construyó un vector de dos en uno para linfocitos T CAR CTLA-4, LAG-3, TIGIT o TIM-3 KD mediante la transformación de ARNs de 21 unidades a un formato de ARNsh y finalmente se seleccionó cada punto de control inmune dirigido a los ARNsh (shCTLA-4: n.º 1; shLAG-3: n.º 1278; shTIGIT: n.º 739; shTIM-3: n.º 3), que inhibían significativamente la expresión y se veían menos afectados por la expansión de CAR-T (FIG. 21B-C). Finalmente, los linfocitos T CAR PD-1_CTL4, PD-1_LAG-3, PD-1_TIGIT o PD-1_TIM-3 se construyeron mediante el vector doble de dos en uno (FIGs. 22A-22E). Todos los linfocitos T CAR KD dobles estaban menos expandidos en comparación con los linfocitos T CAR KD individuales (FIG. 22C). Estos resultados también se observaron en los linfocitos T CAR KD individuales (FIG. 21B).

En este ejemplo, se produjeron vectores dobles de dos en uno. Se produjeron linfocitos T CAR KD dobles utilizando los vectores dobles de dos en uno, y su potencial terapéutico se evaluó más a fondo en un modelo de ratones *in vivo* portadores de un tumor de sangre CD19⁺PDL1⁺ y en un modelo de tumor sólido en el ejemplo a continuación.

Ejemplo 10: Métodos de tratamiento del cáncer de sangre CD19+ *in vivo* usando linfocitos T CAR KD dobles dirigidos a PD-1 y TIGIT

Este ejemplo describe los métodos de tratamiento del cáncer de sangre CD19+ *in vivo* utilizando linfocitos T CAR KD dobles dirigidos a dos puntos de control inmunes, incluidas las siguientes combinaciones, PD-1 y CTLA-4, PD-1 y LAG-3, PD-1 y TIGIT, y PD-1 y TIM-3.

El modelo de tumor sanguíneo CD19⁺ se estableció como se ha descrito en el ejemplo 3. Se evaluó el efecto antitumoral de los linfocitos T CAR PD-1_CTL4, PD-1_LAG-3, PD-1_TIGIT o PD-1_TIM-3 KD frente al modelo B-ALL CD19⁺ de la sangre. Cada linfocito T CAR se inyectó en una dosis única de 1×10^6 , el día 5 después de la infusión de las células diana. Se descubrió que los linfocitos T CAR PD-1_TIGIT KD mostraban un efecto antitumoral sorprendentemente superior que en comparación con otros linfocitos T CAR KD dobles (FIG. 23). Por lo tanto, los linfocitos T CAR PD-1_TIGIT se evaluaron adicionalmente en un modelo de tumor sólido en el siguiente ejemplo.

Ejemplo 11: Métodos de tratamiento en un modelo de tumor sólido utilizando linfocitos T CAR KD dobles dirigidos a PD-1 y TIGIT

Este ejemplo describe los métodos de tratamiento del cáncer en un modelo de tumor sólido utilizando linfocitos T CAR KD dobles dirigidos a PD-1 y TIGIT.

Para establecer el modelo de tumor sólido, a ratones NSG de 4 a 6 semanas de edad se inyectaron subcutáneamente 5×10^6 células IM-9 (CD19⁺PD-L1⁺CD155⁺). Una vez que los tumores alcanzaron un volumen de 150~250 mm³, los linfocitos T CAR se inyectaron por vía intravenosa en una dosis única de 3×10^6 . Los tumores se vigilaron cada semana midiendo el calibre y el volumen fue estimado mediante ($\text{largo} \times \text{ancho}^2$)/2. Como se muestra en el modelo de tumor sanguíneo (Nalm-6-PDL1), los linfocitos T CAR PD-1_TIGIT KD también eran sorprendentemente eficaces frente al modelo de tumor sólido (IM-9) (FIG. 24). El bloqueo de PD-1_TIGIT intrínseco de la célula tiene un nivel inesperadamente más alto de efecto antitumoral que el bloqueo de PD-1.

Lista de secuencias

40 <110> CUROCELL CO. LTD. KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> CÉLULAS INMUNES MEJORADAS UTILIZANDO ARNSH DOBLE Y COMPOSICIÓN QUE LAS INCLUYE

<130> 14570-001-228

45 <140> Para asignar
<141> Adjunto

<150> KR 10-2018-0004238

50 <151> 12-01-2018

<160> 289

<170> PatentIn versión 3.5

55 <210> 1
<211> 21
<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra GFP para interferencia con ARN
 10 <400> 1
 tctcgccatg gacgagctgt a 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-1 para interferencia con ARN
 <400> 2
 tggAACCCAT tcctgaaatt a 21
 20 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-1 para interferencia con ARN
 <400> 3
 ggaACCCATT CCTGAAATT a 21
 30 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-1 para interferencia con ARN
 <400> 4
 gaACCATTc CTGAAATTt a 21
 40 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-1 para interferencia con ARN
 <400> 5
 accCATTCT GAAATTttt a 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-1 para interferencia con ARN
 60 <400> 6
 cccATTCCtG AAATTttta a 21
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-1 para interferencia con ARN
 5 <400> 7
 cttccctgt gttctattat t 21
 <210> 8
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-1 para interferencia con ARN
 15 <400> 8
 ctccctgtg ttctattat a 21
 <210> 9
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-1 para interferencia con ARN
 <400> 9
 ttccctgtgg ttctattat t 21
 30 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-1 para interferencia con ARN
 <400> 10
 40 tccctgtggt ttctattat t 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-1 para interferencia con ARN
 <400> 11
 50 ccctgtgggtt ctattatatt a 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-1 para interferencia con ARN
 60 <400> 12
 cctgtgggtt tattatatt t 21
 <210> 13
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 5 <400> 13
 gatgaaagggtatgtgaattttt t 21
 <210> 14
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 15 <400> 14
 gggagcctccctgtatataaaa t 21
 <210> 15
 20 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 15
 ggaattcgctcagaagaaaa 19
 30 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 16
 40 ggaccaaactcagaatcttat t 21
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 17
 50 agaactttggtttccttaat t 21
 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 60 <400> 18
 atgaaaggatgttgttttttttt t 21
 <210> 19
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 19
 tcttatcttc ggcccttaa t 21
 <210> 20
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 15 <400> 20
 ctatctcg gcgcattaa t 21
 <210> 21
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 21
 ttatctcg cgcttaatt t 21
 30 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 22
 40 gaggagccca atgagtatta t 21
 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 23
 50 agtagccaa tgagtattt t 21
 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 60 <400> 24
 atagatccaa ccaccttt t 21
 <210> 25
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 25
 atgtcattgc ctctgttatt a 21
 <210> 26
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 15 <400> 26
 tgtcattgcc tctgttattt a 21
 <210> 27
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 27
 accaccatgc ccagctaatt t 21
 30 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 28
 40 tgttgagatt taggctttt t 21
 <210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 29
 50 gaccaaactg aagcttatatt t 21
 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 60 <400> 30
 aggccctcag caatctatatt t 21
 <210> 31
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 31
 ggcctcagc aatctatatt a 21
 <210> 32
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 15 <400> 32
 gagttgtccc taaacttaaa t 21
 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 33
 agtggtcctt aaacttaaat t 21
 30 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 34
 gtggtcctta aacttaaatt t 21
 40 <210> 35
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIM-3 para interferencia con ARN
 <400> 35
 50 ctaacacaaa tatccacat 19
 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAG-3 para interferencia con ARN
 60 <400> 36
 tcagcagccc agtccaaata a 21
 <210> 37
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAG-3 para interferencia con ARN
 5 <400> 37
 cagcagccca gtccaaataa a 21
 <210> 38
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAG-3 para interferencia con ARN
 15 <400> 38
 tcaacgtctc catcatgtat a 21
 <210> 39
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAG-3 para interferencia con ARN
 <400> 39
 caacgtctcc atcatgtata a 21
 30 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAG-3 para interferencia con ARN
 <400> 40
 40 ctggagacaa tggcgactt a 21
 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAG-3 para interferencia con ARN
 <400> 41
 50 ctcagcagcc cagtccaaat a 21
 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAG-3 para interferencia con ARN
 60 <400> 42
 agcagccccag tccaaataaa c 21
 <210> 43
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CTLA-4 para interferencia con ARN
 5 <400> 43
 gggatcaaag ctatctatat a 21
 <210> 44
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CTLA-4 para interferencia con ARN
 15 <400> 44
 ggtatcaaagg tatcttatata a 21
 <210> 45
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CTLA-4 para interferencia con ARN
 <400> 45
 ggcaaacggaa cccagattta t 21
 30 <210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CTLA-4 para interferencia con ARN
 <400> 46
 tgaagaagag agtccatatt t 21
 40 <210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CTLA-4 para interferencia con ARN
 <400> 47
 50 ttggatgcgg aacccaaatt a 21
 <210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CTLA-4 para interferencia con ARN
 60 <400> 48
 agcatcactt gggattaata t 21
 <210> 49
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CTLA-4 para interferencia con ARN
 5 <400> 49
 tgcgtgggt caaggaatta a 21
 <210> 50
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CTLA-4 para interferencia con ARN
 15 <400> 50
 agcgaggagg aagactatat t 21
 <210> 51
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CTLA-4 para interferencia con ARN
 <400> 51
 ttacgtatg agacgtttat a 21
 30 <210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra BTLA para interferencia con ARN
 <400> 52
 40 gctcctgtat agtttacttc c 21
 <210> 53
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra BTLA para interferencia con ARN
 <400> 53
 50 gggaaatataac ctgggttgatc c 21
 <210> 54
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra BTLA para interferencia con ARN
 60 <400> 54
 gcaccaacag aatatgcac c 21
 <210> 55
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra BTLA para interferencia con ARN
 5 <400> 55
 gctcaacagg atgtcaaata a 21
 <210> 56
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra BTLA para interferencia con ARN
 15 <400> 56
 gcatcttgct gttcttccta c 21
 <210> 57
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra BTLA para interferencia con ARN
 <400> 57
 gcatttgtgg acaactttag t 21
 30 <210> 58
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD160 para interferencia con ARN
 <400> 58
 40 ggaacgcgac taaacttaat c 21
 <210> 59
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD160 para interferencia con ARN
 <400> 59
 50 gatgttcacc ataagccaa g 21
 <210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD160 para interferencia con ARN
 60 <400> 60
 gcaagatgag tctgactatg g 21
 <210> 61
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD160 para interferencia con ARN

5 <400> 61
ggcacagaga agaatgcaac a 21

<210> 62
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD160 para interferencia con ARN

15 <400> 62
gggaagagat gctaaatata c 21

<210> 63
20 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD160 para interferencia con ARN

<400> 63
gcaaatcagt gtaatcccttg a 21

30 <210> 64
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra VISTA para interferencia con ARN

<400> 64
40 gcaactctc catcaccatcg c 21

<210> 65
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra VISTA para interferencia con ARN

<400> 65
50 gcaaagatgc accatccaac t 21

<210> 66
<211> 21
<212> ADN
55 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra VISTA para interferencia con ARN

60 <400> 66
gccccatggac agcaacattc a 21

<210> 67
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra VISTA para interferencia con ARN
 <400> 67
 ggacacttct gagtatgaag c 21
 <210> 68
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra VISTA para interferencia con ARN
 15 <400> 68
 gggAACCCACA atgcacgaaa g 21
 <210> 69
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra VISTA para interferencia con ARN
 <400> 69
 ggtgcttcc aacacactt c 21
 30 <210> 70
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIGIT para interferencia con ARN
 <400> 70
 gcttcggcc atttgtaatg c 21
 40 <210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIGIT para interferencia con ARN
 <400> 71
 50 gggagtactt ctgcatctat c 21
 <210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIGIT para interferencia con ARN
 60 <400> 72
 gctgcattgac tactcaatg t 21
 <210> 73
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIGIT para interferencia con ARN
 5 <400> 73
 taacgtggat ctggatcata a 21
 <210> 74
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIGIT para interferencia con ARN
 15 <400> 74
 ggagacatac acaggccttc a 21
 <210> 75
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TIGIT para interferencia con ARN
 <400> 75
 gcatttgggc ctggatctac c 21
 30 <210> 76
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra 2B4 para interferencia con ARN
 <400> 76
 40 gacagggtgc aaggcagttc t 21
 <210> 77
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra 2B4 para interferencia con ARN
 <400> 77
 50 gggagtgcct tcaggatcac a 21
 <210> 78
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra 2B4 para interferencia con ARN
 60 <400> 78
 ggacgaggag gttgacattaa 21
 <210> 79
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra 2B4 para interferencia con ARN
 <400> 79
 gaggagaaag aggaaggaga a 21
 <210> 80
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra 2B4 para interferencia con ARN
 15 <400> 80
 gcccttcctt caatagcact a 21
 <210> 81
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra 2B4 para interferencia con ARN
 <400> 81
 ggttgactgc attcttagac t 21
 30 <210> 82
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-L1 para interferencia con ARN
 <400> 82
 40 gcatttgctg aacgcattta c 21
 <210> 83
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-L1 para interferencia con ARN
 <400> 83
 50 gctgcactaa ttgtctattg g 21
 <210> 84
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-L1 para interferencia con ARN
 60 <400> 84
 ggatccagtc acctctgaac a 21
 <210> 85
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-L1 para interferencia con ARN
 <400> 85
 gcacatcctc caaatgaaag g 21
 <210> 86
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-L1 para interferencia con ARN
 15 <400> 86
 ggatttcaa cctgtggttt a 21
 <210> 87
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PD-L1 para interferencia con ARN
 <400> 87
 ggtgcttgggt ctccctata a 21
 30 <210> 88
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-1 para interferencia con ARN
 <400> 88
 40 gcacagtact cctggcttat c 21
 <210> 89
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-1 para interferencia con ARN
 <400> 89
 50 gcaacaggac cacagtcaag a 21
 <210> 90
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-1 para interferencia con ARN
 60 <400> 90
 gcaacaccac cctcagcata a 21
 <210> 91
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-1 para interferencia con ARN
 <400> 91
 gcctgttcag agcactcatt c 21
 <210> 92
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-1 para interferencia con ARN
 15 <400> 92
 gcagtaatgc ctctccatat t 21
 <210> 93
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-1 para interferencia con ARN
 <400> 93
 gcaccctgggt gcttagctag a 21
 30 <210> 94
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-3 para interferencia con ARN
 <400> 94
 40 gctccatct atgaggaatt g 21
 <210> 95
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-3 para interferencia con ARN
 <400> 95
 50 gccagagaac cagctataag t 21
 <210> 96
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-3 para interferencia con ARN
 60 <400> 96
 gggtccctga tgaatatctg g 21
 <210> 97
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-3 para interferencia con ARN

5 <400> 97
ggctgcagg gaaagtgaat g 21

<210> 98
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-3 para interferencia con ARN

15 <400> 98
gcttcaggg aaagtgaatg g 21

<210> 99
20 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-3 para interferencia con ARN

<400> 99
agttccatc tatgaggaat t 21

30 <210> 100
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-5 para interferencia con ARN

<400> 100
40 ggaatccaga acgaattaag t 21

<210> 101
<211> 21
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-5 para interferencia con ARN

<400> 101
50 ggctgattga tgccaacatc c 21

<210> 102
<211> 21
<212> ADN
55 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-5 para interferencia con ARN

60 <400> 102
ggactacagt caagacaatc a 21

<210> 103
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-5 para interferencia con ARN
 5 <400> 103
 ggaccctcac tctattcaat g 21
 <210> 104
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-5 para interferencia con ARN
 15 <400> 104
 gctactggcc gcaataattc c 21
 <210> 105
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CEACAM-5 para interferencia con ARN
 <400> 105
 gctcttgta tgacagaata c 21
 30 <210> 106
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD96 para interferencia con ARN
 <400> 106
 40 ggtccaagggt caccaataag a 21
 <210> 107
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD96 para interferencia con ARN
 <400> 107
 50 gcaaccatac gatagaataa g 21
 <210> 108
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD96 para interferencia con ARN
 60 <400> 108
 ggttctgaaa ttccctcaac a 21
 <210> 109
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD96 para interferencia con ARN
 <400> 109
 gcaagatatc cagctacatc t 21
 <210> 110
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD96 para interferencia con ARN
 15 <400> 110
 gcaactcacc ctcttccatc t 21
 <210> 111
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD96 para interferencia con ARN
 <400> 111
 gctgcattcc ctaagataat t 21
 30 <210> 112
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAIR1 para interferencia con ARN
 <400> 112
 40 gggacagtatc atccacatac a 21
 <210> 113
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAIR1 para interferencia con ARN
 <400> 113
 50 ggacaacagt cacaatgago a 21
 <210> 114
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAIR1 para interferencia con ARN
 60 <400> 114
 ggctgttgat gttctagaga g 21
 <210> 115
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAIR1 para interferencia con ARN
 <400> 115
 gcagacaagg ccacagtcaa t 21

10 <210> 116
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAIR1 para interferencia con ARN
 <400> 116
 ggaggttct aaccagcatc c 21

20 <210> 117
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LAIR1 para interferencia con ARN
 <400> 117
 gccttgagac tgtgctatac a 21

30 <210> 118
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra KLRG1 para interferencia con ARN
 <400> 118
 ccaagccca g aatgactatg g 21

40 <210> 119
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra KLRG1 para interferencia con ARN
 <400> 119
 gccttcgt tctgccttg t 21

50 <210> 120
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra KLRG1 para interferencia con ARN
 <400> 120
 gctctgact gcagttctc t 21

60 <210> 121
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra KLRG1 para interferencia con ARN
 5 <400> 121
 gctggatgaa atatggtaac c 21
 <210> 122
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra KLRG1 para interferencia con ARN
 15 <400> 122
 ggaaatgagc ctgcgtccaag t 21
 <210> 123
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra KLRG1 para interferencia con ARN
 <400> 123
 ggattggctt gaggaacaat t 21
 30 <210> 124
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra FAS para interferencia con ARN
 <400> 124
 40 gccaagaagg gaaggagtac a 21
 <210> 125
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra FAS para interferencia con ARN
 <400> 125
 50 gccaaattcca ctaattgttt g 21
 <210> 126
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra FAS para interferencia con ARN
 60 <400> 126
 ggttctcatg aatctccaac t 21
 <210> 127
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra FAS para interferencia con ARN
 <400> 127
 gctggagtca tgacactaag t 21
 <210> 128
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra FAS para interferencia con ARN
 15 <400> 128
 gcctggttg gagatactaa c 21
 <210> 129
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra FAS para interferencia con ARN
 <400> 129
 ggaaccacct aaagaacttc c 21
 30 <210> 130
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-b para interferencia con ARN
 <400> 130
 ccgcgttgat taaaagaaag a 21
 40 <210> 131
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-b para interferencia con ARN
 <400> 131
 50 gcctgataca tatcagcatt t 21
 <210> 132
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-b para interferencia con ARN
 60 <400> 132
 gcgaaattgg aatttcttag c 21
 <210> 133
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-b para interferencia con ARN
 <400> 133
 gcacgactac agaaaatata g c 21
 <210> 134
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-b para interferencia con ARN
 15 <400> 134
 tttccggtaa agttgcactc g 21
 <210> 135
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-b para interferencia con ARN
 <400> 135
 gcctggatct aattcagaaa g 21
 30 <210> 136
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LRR1 para interferencia con ARN
 <400> 136
 gaaaggccact gttcggttaa a 21
 40 <210> 137
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LRR1 para interferencia con ARN
 <400> 137
 50 tcctgtggat atctgtctaa g 21
 <210> 138
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LRR1 para interferencia con ARN
 60 <400> 138
 ggctcataga ggctgttaatg t 21
 <210> 139
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LRR1 para interferencia con ARN
 <400> 139
 gggctgtcc gagttgatat g 21
 <210> 140
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LRR1 para interferencia con ARN
 15 <400> 140
 aagatttgc taccgcaaaa a 21
 <210> 141
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra LRR1 para interferencia con ARN
 <400> 141
 gtggtaactga agcacccatt a 21
 30 <210> 142
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TGFBR1 para interferencia con ARN
 <400> 142
 gcttgttcag agaacaattg c 21
 40 <210> 143
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TGFBR1 para interferencia con ARN
 <400> 143
 50 ggagattgtt ggtacccaag g 21
 <210> 144
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TGFBR1 para interferencia con ARN
 60 <400> 144
 gcagctaggc ttacaggatt g 21
 <210> 145
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TGFBR1 para interferencia con ARN
 <400> 145
 ggtccttct gtgcactatg a 21
 <210> 146
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TGFBR1 para interferencia con ARN
 15 <400> 146
 ggtggtagct aaagaacatt c 21
 <210> 147
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra TGFBR1 para interferencia con ARN
 <400> 147
 ggacctgtct acaggtgatc t 21
 30 <210> 148
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DNMT3A para interferencia con ARN
 <400> 148
 gccaaggta ttgcaggaat g 21
 40 <210> 149
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DNMT3A para interferencia con ARN
 <400> 149
 50 gcagaacaag cccatgattg a 21
 <210> 150
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DNMT3A para interferencia con ARN
 60 <400> 150
 cccaaggta aggagattat t 21
 <210> 151
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DNMT3A para interferencia con ARN
 <400> 151
 gcagaagtgc cggaacattg a 21

10 <210> 152
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DNMT3A para interferencia con ARN
 <400> 152
 gctcacaca gaagcatatc c 21

20 <210> 153
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DNMT3A para interferencia con ARN
 <400> 153
 ccggctcttc ttgagttct a 21

30 <210> 154
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra A2aR para interferencia con ARN
 <400> 154
 cagaacgtca ccaactactt t 21

40 <210> 155
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra A2aR para interferencia con ARN
 <400> 155
 ccatgctagg ttgaaacaac t 21

50 <210> 156
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra A2aR para interferencia con ARN
 <400> 156
 ccaagtggcc tgtctttt a 21

60 <210> 157
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra A2aR para interferencia con ARN
 <400> 157
 ggtgtctatt tgccgatctt c 21
 <210> 158
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra A2aR para interferencia con ARN
 15 <400> 158
 agacccctccg caagatcatt c 21
 <210> 159
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra A2aR para interferencia con ARN
 <400> 159
 tccttagcca tgagctcaag g 21
 30 <210> 160
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-c para interferencia con ARN
 <400> 160
 40 gaaagtactg tggcacatcg t 21
 <210> 161
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-c para interferencia con ARN
 <400> 161
 50 gcacgtgtcc atcttcgagt t 21
 <210> 162
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-c para interferencia con ARN
 60 <400> 162
 ggccaacact cctcaagaac t 21
 <210> 163
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-c para interferencia con ARN
 <400> 163
 ggcttctacc tctacccaga t 21
 <210> 164
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-c para interferencia con ARN
 15 <400> 164
 ggccatggac tccacattg a 21
 <210> 165
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra Cbl-c para interferencia con ARN
 <400> 165
 ggcgtgagt atctaccagt t 21
 30 <210> 166
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK alfa para interferencia con ARN
 <400> 166
 40 gccagaagac aagttagaat t 21
 <210> 167
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK alfa para interferencia con ARN
 <400> 167
 50 gctctggaag ttccagtata t 21
 <210> 168
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK alfa para interferencia con ARN
 60 <400> 168
 ggaaatgatc tggctcgatg c 21
 <210> 169
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK alfa para interferencia con ARN
 <400> 169
 gcaaagatcc tcaaggatt a 21
 <210> 170
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK alfa para interferencia con ARN
 15 <400> 170
 ggatgcctct attgctcatc g 21
 <210> 171
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK alfa para interferencia con ARN
 <400> 171
 gctatggtagt ttcgaatttg c 21
 30 <210> 172
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK zeta para interferencia con ARN
 <400> 172
 ggaagggtt ccagcagaag t 21
 40 <210> 173
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK zeta para interferencia con ARN
 <400> 173
 50 gcaaggagat tgtggccatc a 21
 <210> 174
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK zeta para interferencia con ARN
 60 <400> 174
 gggcatcctt caagaggaag t 21
 <210> 175
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK zeta para interferencia con ARN
 <400> 175
 gcaaagatca tccagtctt c 21

10 <210> 176
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK zeta para interferencia con ARN
 <400> 176
 gctggagatg taccgcaaag t 21

20 <210> 177
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra DGK zeta para interferencia con ARN
 <400> 177
 gcacaggatg agatttatat c 21

30 <210> 178
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra MerTK para interferencia con ARN
 <400> 178
 ggaagaccac atacaggaaa c 21

40 <210> 179
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra MerTK para interferencia con ARN
 <400> 179
 gcattggtgt ttctgcatt a 21

50 <210> 180
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra MerTK para interferencia con ARN
 <400> 180
 gcacacgggtt ggtagatta t 21

60 <210> 181
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra MerTK para interferencia con ARN
 <400> 181
 gggctgtaa tggaaaggaaa t 21
 <210> 182
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra MerTK para interferencia con ARN
 15 <400> 182
 gcatgttgcg agatgacatg a 21
 <210> 183
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra MerTK para interferencia con ARN
 <400> 183
 gcagaccgag tctacacaag t 21
 30 <210> 184
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP1 para interferencia con ARN
 <400> 184
 gcaccatcat ccacctcaag t 21
 40 <210> 185
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP1 para interferencia con ARN
 <400> 185
 50 ggtcacccac atcaaggta t 21
 <210> 186
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP1 para interferencia con ARN
 60 <400> 186
 gggcaagaac cgctacaaga a 21
 <210> 187
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP1 para interferencia con ARN
 <400> 187
 ggaacaaatg cgtccatac t 21
 <210> 188
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP1 para interferencia con ARN
 15 <400> 188
 gcctggactg tgacatttgac a 21
 <210> 189
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP1 para interferencia con ARN
 <400> 189
 gaacctgcac actaagaaca a 21
 30 <210> 190
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP2 para interferencia con ARN
 <400> 190
 40 gcagatccata cctctgaaaag g 21
 <210> 191
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP2 para interferencia con ARN
 <400> 191
 50 gcaatgacgg caagtctaaa g 21
 <210> 192
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP2 para interferencia con ARN
 60 <400> 192
 ggaactgaaa tacgacgtt g 21
 <210> 193
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP2 para interferencia con ARN
 <400> 193
 gcgtgttagg aacgtcaaag a 21
 <210> 194
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP2 para interferencia con ARN
 15 <400> 194
 gctcatgact atacgctaag a 21
 <210> 195
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra SHP2 para interferencia con ARN
 <400> 195
 ggagagaacg gtctggcaat a 21
 30 <210> 196
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PP2A para interferencia con ARN
 <400> 196
 gcagctgaac gagaaccaag t 21
 40 <210> 197
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PP2A para interferencia con ARN
 <400> 197
 50 ggagactgtg actttcttg t 21
 <210> 198
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PP2A para interferencia con ARN
 60 <400> 198
 ggaatgccaa cgtttggaaa t 21
 <210> 199
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PP2A para interferencia con ARN
 <400> 199
 ggatcgttt caggaagtcc 21
 <210> 200
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PP2A para interferencia con ARN
 15 <400> 200
 gccttgtat gtggaaagtata 21
 <210> 201
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra PP2A para interferencia con ARN
 <400> 201
 gcctgctgtat ttatagtaac 21
 30 <210> 202
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD45 para interferencia con ARN
 <400> 202
 gctgcacatc aaggagtaat 21
 40 <210> 203
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD45 para interferencia con ARN
 <400> 203
 50 gctggaaata ctctggtagt a 21
 <210> 204
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD45 para interferencia con ARN
 60 <400> 204
 ggagcttggtt gaaaggatg a 21
 <210> 205
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD45 para interferencia con ARN
 <400> 205
 gcagaatact ggccgtcaat g 21
 <210> 206
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD45 para interferencia con ARN
 15 <400> 206
 ggttatgttg tcaagctaag g 21
 <210> 207
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD45 para interferencia con ARN
 <400> 207
 gcagaaccca aggaataat c 21
 30 <210> 208
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD148 para interferencia con ARN
 <400> 208
 40 ggtgtaacat cacaggctta c 21
 <210> 209
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD148 para interferencia con ARN
 <400> 209
 50 gccatagagt tcaggacaaa t 21
 <210> 210
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD148 para interferencia con ARN
 60 <400> 210
 gcaattctcg ggttagaaata a 21
 <210> 211
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD148 para interferencia con ARN
 <400> 211
 gctggcttca ccaacattac c 21
 <210> 212
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD148 para interferencia con ARN
 15 <400> 212
 gggagcaaat catotgcatt c 21
 <210> 213
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra CD148 para interferencia con ARN
 <400> 213
 gcgactcaaa tatcacccatg a 21
 30 <210> 214
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra IL-10R alfa para interferencia con ARN
 <400> 214
 40 gctcctgagg tatggatag a 21
 <210> 215
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra IL-10R alfa para interferencia con ARN
 <400> 215
 50 gcaaatgaca catatgaaag c 21
 <210> 216
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra IL-10R alfa para interferencia con ARN
 60 <400> 216
 ggtctaaaga ggagtgcatt t 21
 <210> 217
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra IL-10R alfa para interferencia con ARN
 <400> 217
 gggctattg aaacaggatc c 21

10 <210> 218
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra IL-10R alfa para interferencia con ARN
 <400> 218
 gctgttagaa tggaaagcttc a 21

20 <210> 219
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> secuencia de ARNsh parcial, incluida en ARNsh para dirigirla contra IL-10R alfa para interferencia con ARN
 <400> 219
 gctgtgttt gctgctaatg t 21

30 <210> 220
 <211> 726
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> mU6-shTIM-3-><-shPD-1-hU6

<400> 220		
gttaacaagg tcgggcagga agagggccta tttcccatga ttccttcata tttgcata	60	
cgataacaagg ctgttagaga gataattaga attaatttga ctgtaaacac aaagatatta	120	
gtacaaaata cgtgacgtag aaagtaataa tttcttggtt agtttgcagt tttaaaatta	180	
tgttttaaaa tggactatca tatgcttacc gtaacttgaa agtatttcga tttcttggtt	240	
ttatatatatct tgtggaaagg acgaaacacc gcctgtggtt ctattatatt atttcaagag	300	
aataatataa tagaaccaca ggttttgac tagtcaaaaa ggaattcgct cagaagaaat	360	
ctcttgaatt tcttctgagc gaattccaaa caaggctttt ctccaaggga tattttatgt	420	
ctcaaaacac acaattactt tacagttagg gtgagttcc ttttgcgtg ttttttaaaa	480	
taataattta gtatgttat ctcttataga aatccaagcc tatcatgtaa aatgtatgt	540	
gtattaaaaa gaacagattt tctgtctttt atcgcacatt aaggctctat agttactagg	600	
aaatattata tgcaaattaa ccggggcagg ggagtagccg agcttctccc acaagtctgt	660	
gcgagggggc cggcgcccc ctagagatgg cggcgctggc tcgctagccca tatgtctaga	720	
gtatac	726	

40 <210> 221
 <211> 726
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> shTIM-3-mU6<-->hU6-shPD-1

<p><400> 221</p> <p>gtaacccaaa aacctgtgg tctattatat tattctcttg aaataatata atagaaccac</p> <p>aggcggtgtt tcgtccttcc cacaagatata ataaagccaa gaaatcgaaa tactttcaag</p> <p>ttacggtaag catatgatag tccatTTAA aacataattt taaaactgca aactacccaa</p> <p>gaaattatta ctttctacgt cacgtatTTT gtactaatat ctttgcgtt acagtcaaAT</p> <p>taattctaAT tatctctcta acagccttgt atcgatATG caaatatgaa ggaatcatgg</p> <p>gaaataggCC ctcttcctgc ccgaccttac tagtgatccg acgcccACat ctctaggccc</p> <p>gcgcggcccc cctcgcacAG acttgcggGA gaagctcgGC tactccctG ccccggttAA</p> <p>tttgcataA atatttccta gtaactataG aggcttaATG tgCGataAAA gacagataAT</p> <p>ctgttctttt taatactAGC tacatTTAC atgatAGGCT tggatttcta taagagataAC</p> <p>aaatactAAA ttatttattt AAAAAGACG ACAAAGGAA actCACCTA actgtAAAGT</p> <p>aattgtgtGT tttgagactA taaatATCCC ttggagaaaaA gccttgcTTG gaattcgctC</p> <p>agaagAAAATT caagagatTT cttctgagCG aattcTTTT tggctagCCA tatgtctAGA</p> <p>gtatac</p>	<p>60</p> <p>120</p> <p>180</p> <p>240</p> <p>300</p> <p>360</p> <p>420</p> <p>480</p> <p>540</p> <p>600</p> <p>660</p> <p>720</p> <p>726</p>
---	---

10 <210> 222

<211> 385

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> secuencia de bases del casete ARNsh

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (323)..(343)

20 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (353)..(373)

25 <223> n es a, c, g, o t

<p><400> 222</p> <p>gttaacgatc cgacGCCGCC atctctaggc ccgcGCCGGC cccctcgac agacttgcgg</p> <p>gagaagctcg gctactcccc tgccccgggtt aatttgcata taatatttcc tagtaactat</p> <p>agaggcttaA tggcgataa aagacagata atctgttctt tttaatacta gctacatttt</p> <p>acatgatagg ctggatTC tataAGAGAT acAAATACTA aatttatttt ttAAAAAAACA</p> <p>gcacAAAAGG AAACtCACCC TAACTGTAAA gtaattgtgt gttttgagac tataAAATAC</p> <p>ccttggagaa aagccttgc ttgnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnttcaaga gannnnnnnnn</p> <p>30 nnnnnnnnnn nnnttttgg ttaac</p>	<p>60</p> <p>120</p> <p>180</p> <p>240</p> <p>300</p> <p>360</p> <p>385</p>
--	---

<210> 223

<211> 409

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> secuencia de bases mU6-shPD-1 MCS

<400> 223	
gttaacgatc cgacgcccgc atctctaggc cgcgcggc cccctcgcac agacttgg	60
gagaagctcg gctactcccc tgcccggtt aatttcata taatattcc tagtaactat	120
agaggcttaa tgtgcataa aagacagata atctgttctt tttataacta gctacattt	180
acatgatagg ctggatttc tataagagat acaaatacta aattattatt ttaaaaaaca	240
gcacaaaagg aaactcaccc taactgtaaa gtaattgtgt gtttgagac tataaatatc	300
ccttggagaa aagccttgg tgcctgtgg tctattatat tatttcaaga gaataatata	360
atagaaccac aggttttga ctagtgctag ccatatgtct agagtatac	409

10 <210> 224

10 <211> 328

10 <212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

15 <220>

15 <223> secuencia de bases hU6-shPD-1

<400> 224	
gttaacaagg tcgggcagga agagggccta ttcccatga ttccatcata ttgcata	60
cgataacaagg ctgttagaga gataattaga attaatttga ctgtaaacac aaagatatta	120
gtacaaaata cgtgacgtag aaagtaataa ttcttgggt agttgcagt tttaaaat	180
tgttttaaaa tggactatca tatgttacc gtaacttgaa agtatttcga ttcttggct	240
ttatatatct tgtggaaagg acgaaacacc gcctgtgggt ctattatatt atttcaagag	300
aataatataa tagaaccaca ggtttttg	328

20 <210> 225

20 <211> 468

20 <212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

25 <220>

25 <223> CD22-CAR

<400> 225

ES 2 908 324 T5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu Glu Asp Ala Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
130 135 140

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
145 150 155 160

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
165 170 175

Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser
180 185 190

Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr
210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly

ES 2 908 324 T5

	225	230	235	240
	Thr Lys Leu Glu Ile Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro			
	245	250	255	
	Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys			
	260	265	270	
	Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala			
	275	280	285	
	Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu			
	290	295	300	
	Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys			
	305	310	315	320
	Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr			
	325	330	335	
	Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly			
	340	345	350	
	Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala			
	355	360	365	
	Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg			
	370	375	380	
	Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu			
	385	390	395	400
	Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn			
	405	410	415	
	Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met			
	420	425	430	
	Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly			
	435	440	445	
	Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala			
	450	455	460	
	Leu Pro Pro Arg			
	465			

<210> 226
 <211> 486
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CD19-CAR
 10 <400> 226

ES 2 908 324 T5

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys

ES 2 908 324 T5

210

215

220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 370 375 380

Pro Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 385 390 395 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 405 410 415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

5 <210> 227
 <211> 782
 <212> PRT

ES 2 908 324 T5

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Delta LNGFR_P2A_CD19-CAR
5
<400> 227
Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys
20 25 30

Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn
35 40 45

Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys
50 55 60

Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr
65 70 75 80

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser
85 90 95

Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly
100 105 110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys
115 120 125

Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr
130 135 140

Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His
145 150 155 160

Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln
165 170 175

Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro

ES 2 908 324 T5

180

185

190

Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
195 200 205

Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile
210 215 220

Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln
225 230 235 240

Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys
245 250 255

Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe
260 265 270

Lys Arg Trp Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala
275 280 285

Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu
290 295 300

Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln
305 310 315 320

Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val
325 330 335

Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp
340 345 350

Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr
355 360 365

Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
370 375 380

Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile
385 390 395 400

Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly
405 410 415

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
420 425 430

ES 2 908 324 T5

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro
435 440 445

Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser
450 455 460

Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro
465 470 475 480

Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr
485 490 495

Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn
500 505 510

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
515 520 525

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Tyr
530 535 540

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr
545 550 555 560

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
565 570 575

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
580 585 590

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
595 600 605

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
610 615 620

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
625 630 635 640

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
645 650 655

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
660 665 670

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
675 680 685

ES 2 908 324 T5

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 690 695 700

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 705 710 715 720

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 725 730 735

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 740 745 750

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 755 760 765

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 770 775 780

5 <210> 228
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador de clonación de PCR directa n.^o 1

15 <210> 228
 ggtatactct agacatatgg ctgcactag tcaaaaacct gtggttc 47
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador de clonación de PCR inversa n.^o 1

25 <400> 229
 ttgtaccgtt aacgatccga cgccgc 26
 <210> 230
 <211> 102
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador de clonación de PCR directa n.^o 2

35 <400> 230
 tgactagtca aaaacctgtg gttctattat attattctct tgaaataata taatagaacc 60
 acaggcggtg tttcgctctt tccacaagat atataaagcc aa

40 <210> 231
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Cebador de clonación de PCR inversa n.^o 2

<400> 231
 qtaccgttaa caaggtcggg caggaagagg gcctattcc catgattcc 50

5 <210> 232
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador de clonación de PCR directa n.^o 3

 15 <400> 232
 aggactagtc aaaaaggaat tcgctcagaa gaaatctct 39

 <210> 233
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de clonación de PCR inversa n.^o 3
 20 <400> 233
 ctagctagcg atccgacgcc gccatct 27

 25 <210> 234
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Cebador de clonación de PCR directa n.^o 4

 <400> 234
 atgttaacca aaaacctgtg gttctattat attattctct tg 42

 35 <210> 235
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Cebador de clonación de PCR inversa n.^o 4

 <400> 235
 tcactagtaa ggtcgccag gaagaggccc tatt 34
 45 <210> 236
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Cebador de clonación de PCR directa n.^o 5

 <400> 236
 55 taggccctca ctatgtatcc gacggcc 29

 <210> 237
 <211> 38
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de clonación de PCR inversa n.^o 5

 65 <400> 237
 ctagctagcc aaaaaggaat tcgctcagaa gaaatctct 38

5 <210> 238
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> TIGIT-268

10 <400> 238
 gcttcggcc attgttaatg c 21
 <210> 239
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> TIGIT-2

20 <400> 239
 gggagttactt ctgcattatc c 21
 <210> 240
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> TIGIT-739

30 <400> 240
 gctgcgtac tactcaatg t 21
 <210> 241
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> TIGIT-1

40 <400> 241
 taacgtggat ctggatata a 21
 <210> 242
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> TIGIT-1386

50 <400> 242
 ggagacatac acaggccttc a 21
 <210> 243
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> TIGIT-1750

60 <400> 243
 gcattgggc ctgtatctac c 21

5 <210> 244
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> LAG3-138

 15 <400> 244
 ccagcttcc agcttcctc t 21

 <210> 245
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> LAG3-503
 20 <400> 245
 gatctcagcc ttctgcgaag a 21

 <210> 246
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> LAG3-1092

 <400> 246
 gctcaacgt ctccatcatg t 21

 35 <210> 247
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> LAG3-1221

 <400> 247
 ggtctttct cactgccaag t 21
 45 <210> 248
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> LAG3-1278

 <400> 248
 55 ctggagacaa tggcgactt a 21

 <210> 249
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> LAG3-1379

 65 <400> 249
 gccactgtca cattggcaat c 21

5 <210> 250
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> LAG3-1465

10 <400> 250
 tccagtatct ggacaagaac g 21
 <210> 251
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> LAG3-1616

20 <400> 251
 gcagcagtgt acttcacaga g 21
 <210> 252
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> LAG3-1702
 <400> 252
 gctgtttctc atccttggtg t 21

35 <210> 253
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> LAG3-1751
 <400> 253
 45 gccttggct ttacaccttg g 21
 <210> 254
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> LAG3-1954
 <400> 254

55 tcagcagccc agtccaaata a 21
 <210> 255
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CTLA4-3

65 <400> 255
 ggtggagctc atgtacccac c 21

5 <210> 256
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CTLA4-1
 10 <400> 256
 cccaaattac gtgtactaca a 21
 <210> 257
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CTLA4-1058
 20 <400> 257
 gcatcacttg ggattaat g 21
 <210> 258
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> CTLA4-1154
 <400> 258
 gcgagggaga agactatatt g 21
 35 <210> 259
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> CTLA4-1309
 <400> 259
 gccagtgtatc ctaaagggtt t 21
 45 <210> 260
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> CTLA4-1686
 <400> 260
 55 ggttgttatct gagttgactt g 21
 <210> 261
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Tim3-1
 65 <400> 261
 gatgaaaagggtt atgtgaattt t 21

5 <210> 262
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Tim3-2

 15 <400> 262
 gggagcctcc ctgatataaa t 21

 <210> 263
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Tim3-3
 20 <400> 263
 ggaattcgct cagaagaaaa 19

 <210> 264
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Tim3-4

 <400> 264
 ggaccaaact gaagctatat t 21

 35 <210> 265
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> PD1-1

 <400> 265
 cctgtggttc tattatatta t 21
 45 <210> 266
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> PD1-2

 <400> 266
 55 gccttagagaa gtttcaggaa a 21

 <210> 267
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> PD1-3

 65 <400> 267
 catgtcttt cctagcggaa t 21

5 <210> 268
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> 18s rRNA directo
 10 <400> 268
 gattaagtcc ctgcccttg 20
 <210> 269
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> 18s rRNA inverso
 20 <400> 269
 gttcacctac gggaaaccttg 20
 <210> 270
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> PDCD1 directo
 <400> 270
 cctcccacctt tacacatgcc 20
 35 <210> 271
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> PDCD1 inverso
 <400> 271
 cttaactgcct cagctccct 20
 45 <210> 272
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> IL2 directo
 <400> 272
 55 ccaagaaggc cacagaactg a 21
 <210> 273
 <211> 26
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> IL2 inverso
 65 <400> 273
 gttgtttcag atcccttag ttccag 26

5 <210> 274
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> IL4 directo

 15 <400> 274
 acttgaaca gcctcacaga g 21

 <210> 275
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> IL4 inverso
 20 <400> 275
 ccgagttgac cgtaacagac at 22

 <210> 276
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> IL17A directo

 <400> 276
 caaccgatcc acctcacctt 20

 35 <210> 277
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> IL17A inverso

 <400> 277
 ggcactttgc ctccccagat 19
 45 <210> 278
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> CD25 directo

 <400> 278
 55 cacaagctct gcccactcgga a 21

 <210> 279
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> CD25 inverso

 65 <400> 279
 tgcagtgacc tgaaaggctc 20

5 <210> 280
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CTLA4 directo
 10 <400> 280
 ctacctggc ataggcaacg 20
 <210> 281
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CTLA4 inverso
 20 <400> 281
 ccccgaaacta actgctgcaa 20
 <210> 282
 25 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> FOXP3 directo
 <400> 282
 gaaacagcac attcccagag ttc 23
 35 <210> 283
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> FOXP3 inverso
 <400> 283
 atggccccagc ggatgag 17
 45 <210> 284
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> TGF-beta1 directo
 <400> 284
 55 cccagcatct gcaaagctc 19
 <210> 285
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> TGF-beta1 inverso
 65 <400> 285
 gtccctgcgg aagtcaatgt 20

5 <210> 286
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> TGFBR1 directo

15 <400> 286
 acatgattca gccacagata cc 22

 <210> 287
 <211> 21
15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> TGFBR1 inverso
20 <400> 287
 gcatagatgt cagcacgtt g 21

 <210> 288
25 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
30 <223> TGFBR2 directo

 <400> 288
 acgtgttgag agatcgagg 19

35 <210> 289
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> TGFBR2 inverso

 <400> 289
 cccagcactc agtcaacgtc 20
45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector que comprende: una secuencia de nucleótidos que codifica un primer ARNsh que inhibe la expresión de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo ARNsh que inhibe la expresión del inmunorreceptor de linfocitos T con los dominios Ig e ITIM (TIGIT) y una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR).
2. El vector según la reivindicación 1, en el que la expresión del primer ARNsh está regulada por un primer promotor y la del segundo ARNsh está regulada por un segundo promotor.
3. El vector según la reivindicación 2, en el que el primer y el segundo promotor son promotores de ARN polimerasa III.
4. El vector según la reivindicación 2 o 3, en el que los promotores de ARN polimerasa III son promotores U6.
- 10 5. El vector según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que los dos promotores están orientados en diferentes direcciones en relación uno con otro en el vector.
6. El vector según la reivindicación 5, en el que los dos promotores están orientados con una orientación de cabeza a cabeza.
7. El vector según la reivindicación 5, en el que los dos promotores están orientados con una orientación de cola a cola.
8. Una célula inmune que comprende el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 15 9. La célula inmune según la reivindicación 8, en la que un antígeno diana del CAR es un antígeno de cáncer cuya expresión aumenta en o sobre la superficie de una célula cancerosa, un tejido canceroso y/o un microentorno tumoral.
10. La célula inmune según la reivindicación 8 o 9, en la que el antígeno diana del CAR es CD19 o CD22.
11. La célula inmune según una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde la célula inmune es un linfocito T de origen humano o un linfocito T citolítico natural (NK).
- 20 12. La célula inmune según una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde la célula inmune es un linfocito T de origen humano.
13. La célula inmune según una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en la que el CAR comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembranal y un dominio de transducción de señales intracelular, en la que el dominio de transducción de señales intracelular del CAR comprende un dominio intracelular de una cadena CD3 zeta (CD3 ζ) y en la que el dominio de transducción de señal intracelular del CAR comprende además una molécula coestimuladora seleccionada a partir del grupo que consiste en ICOS, OX40, CD137 (4-1BB), CD27 y CD28.
- 25 14. Una composición farmacéutica que comprende la célula inmune según una cualquiera de las reivindicaciones 8-13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 15. La composición farmacéutica según la reivindicación 14, para uso en un método para tratar un cáncer en un sujeto humano.

DIBUJOS

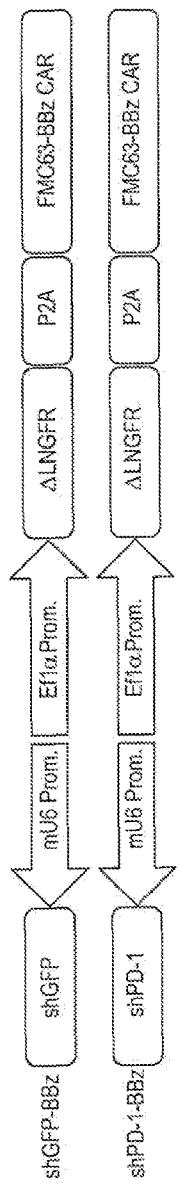


Fig. 1A

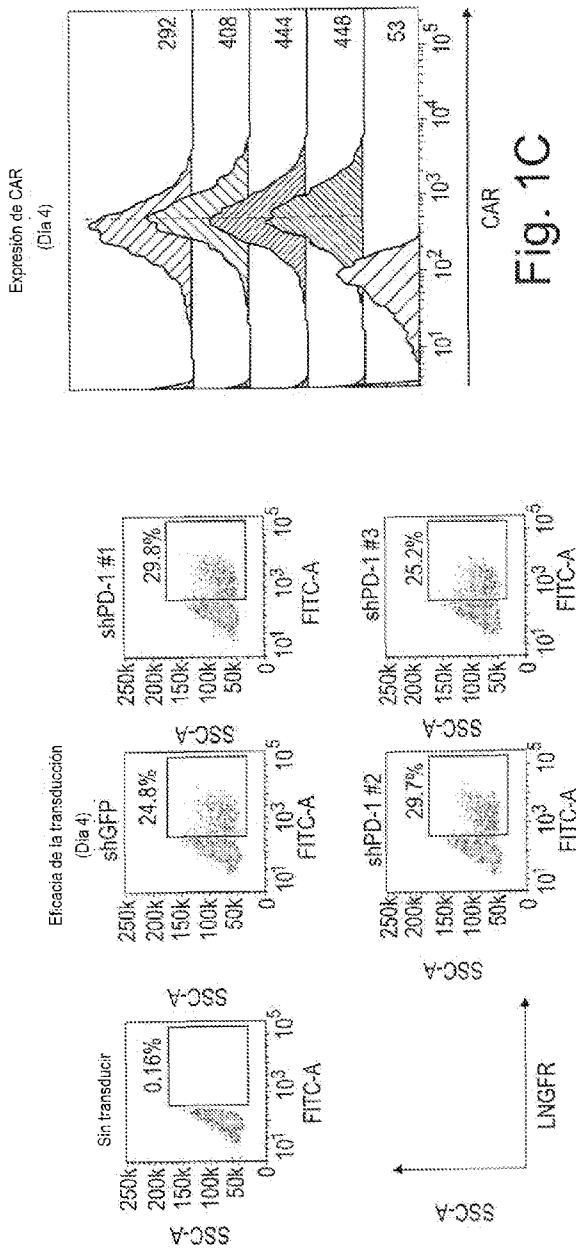
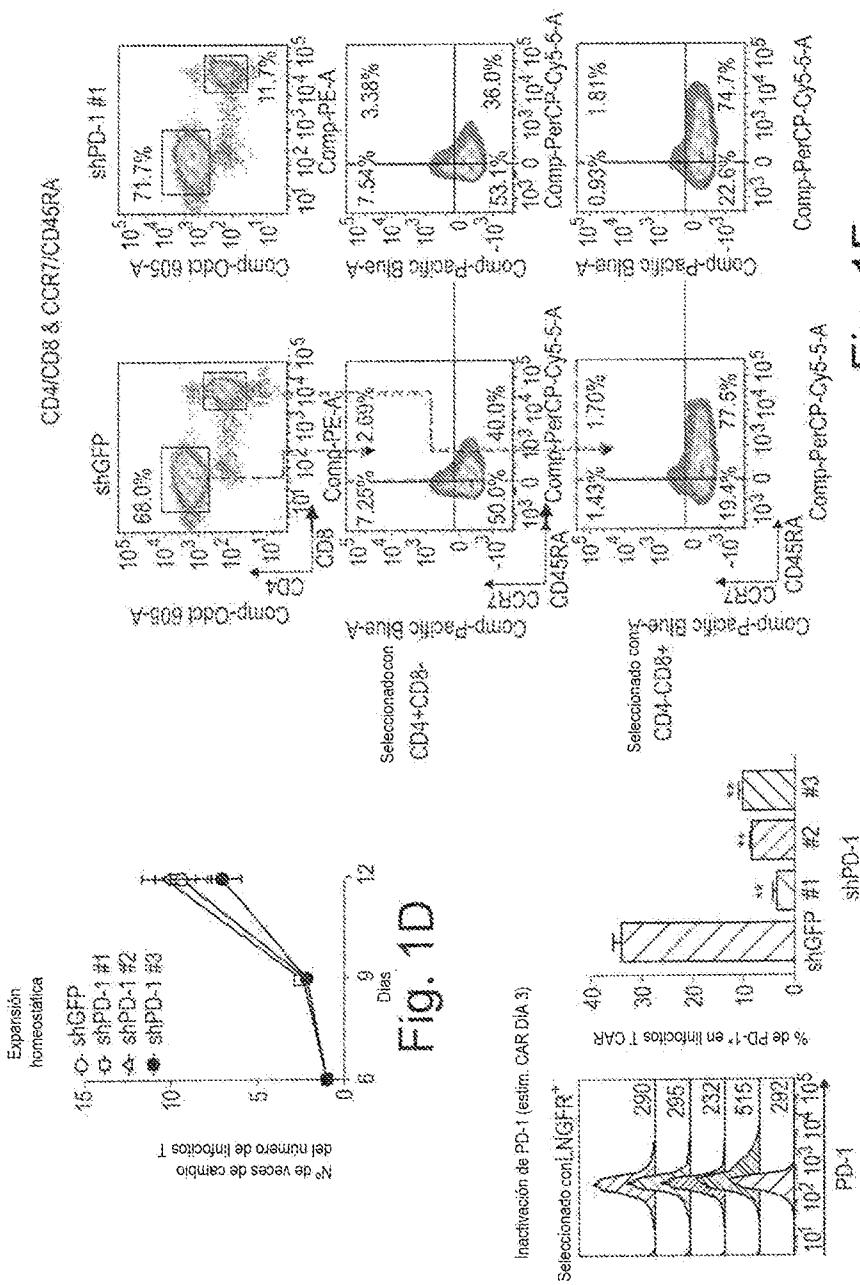


Fig. 1C

Fig. 1B



上
卷

三
一
二

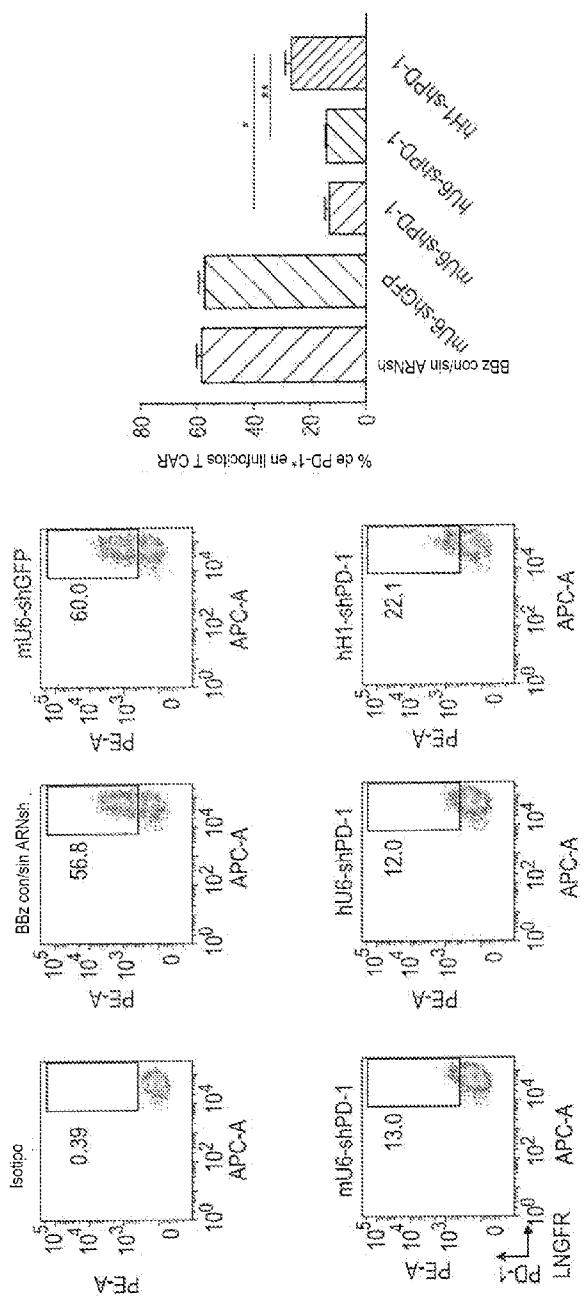


Fig. 2

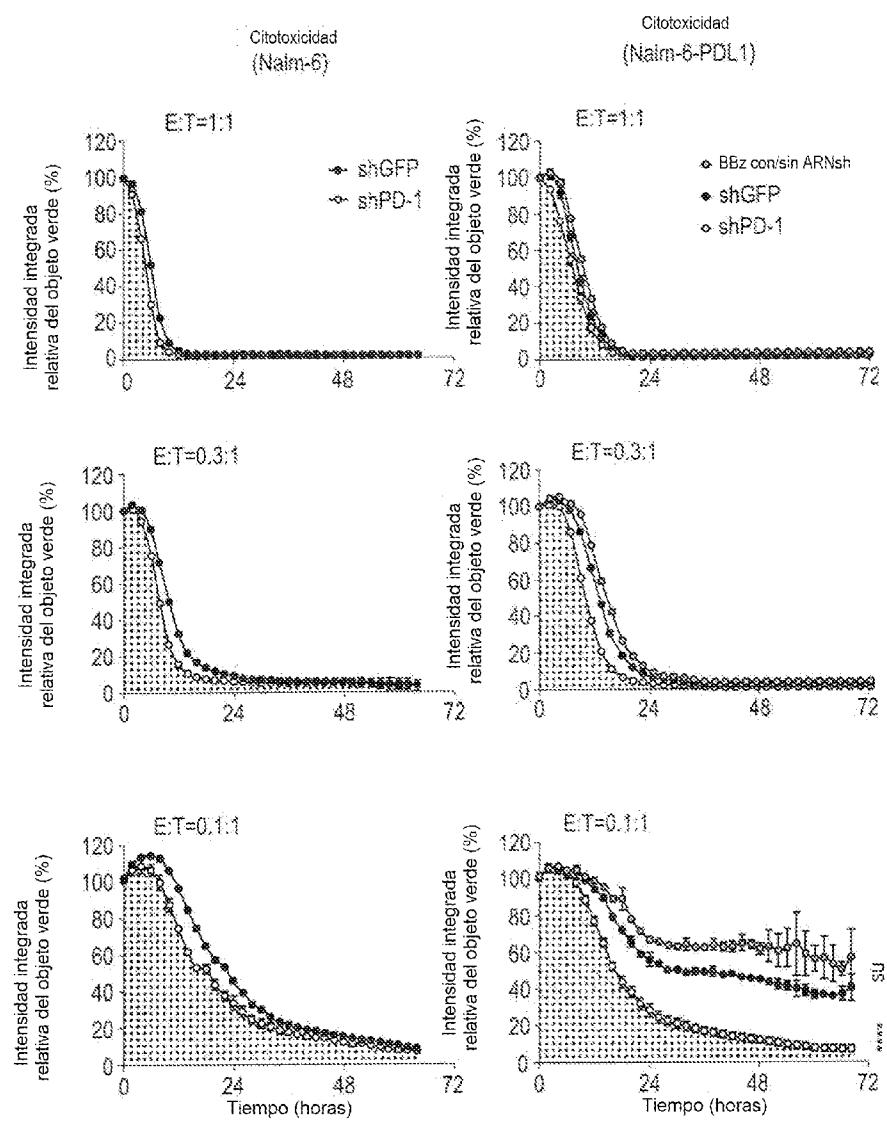


Fig. 3A

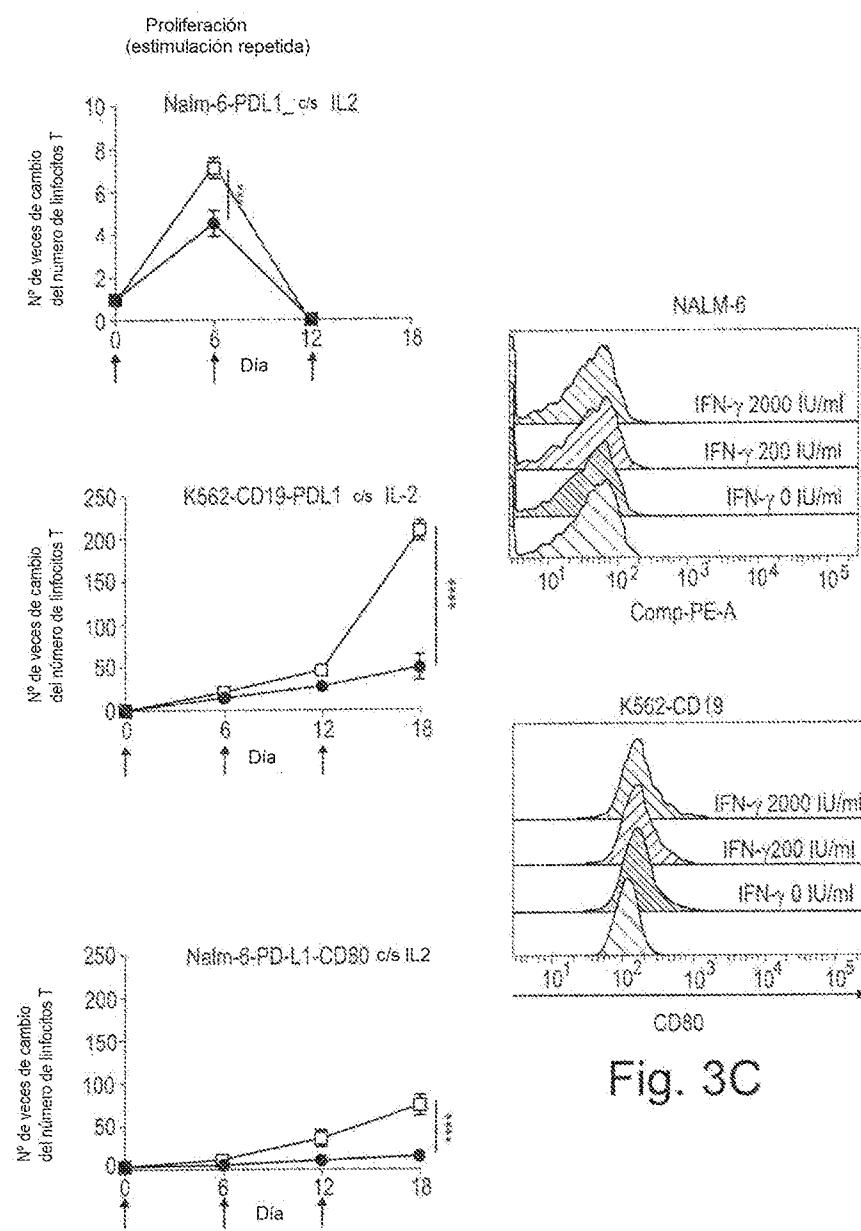


Fig. 3C

Fig. 3B

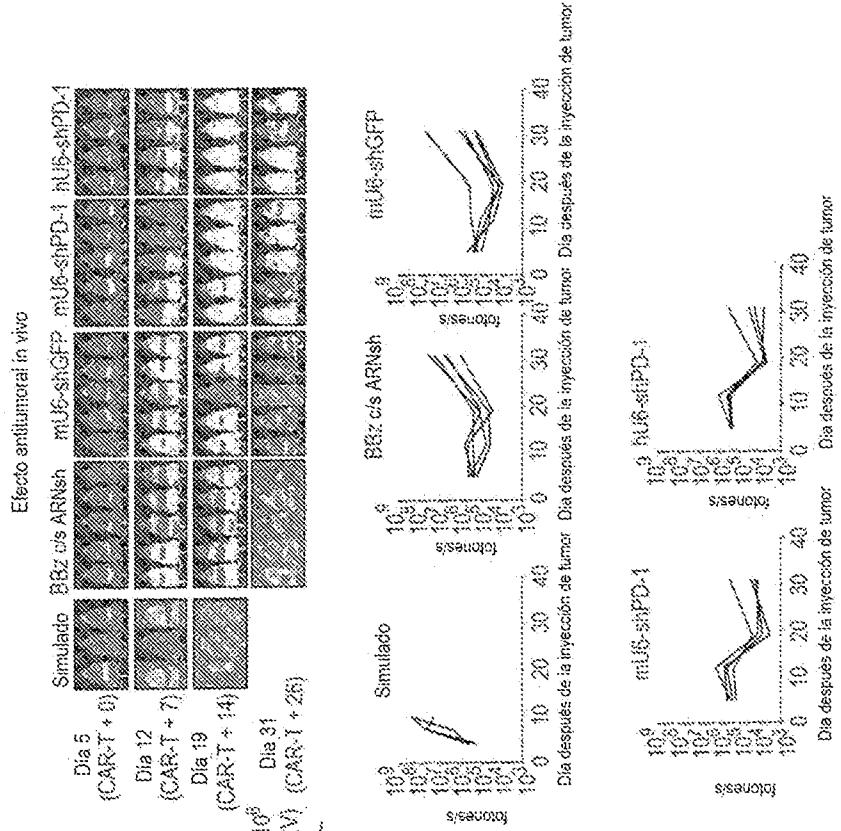
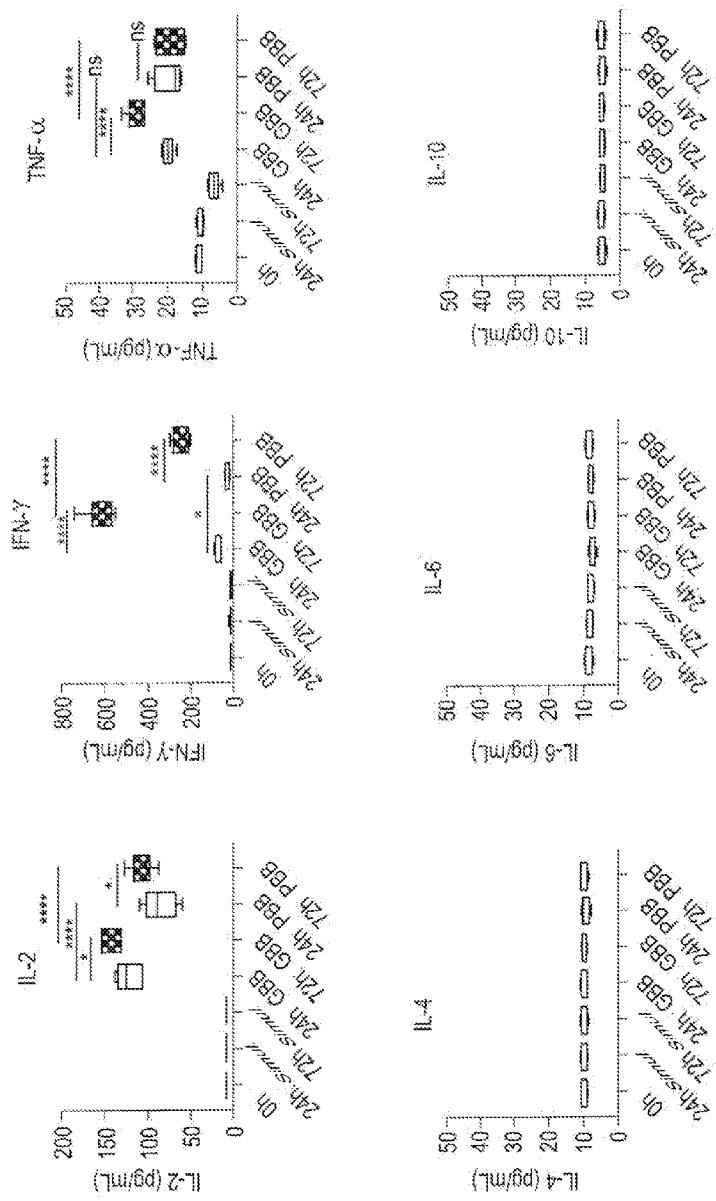


Fig. 4

Fig. 5A

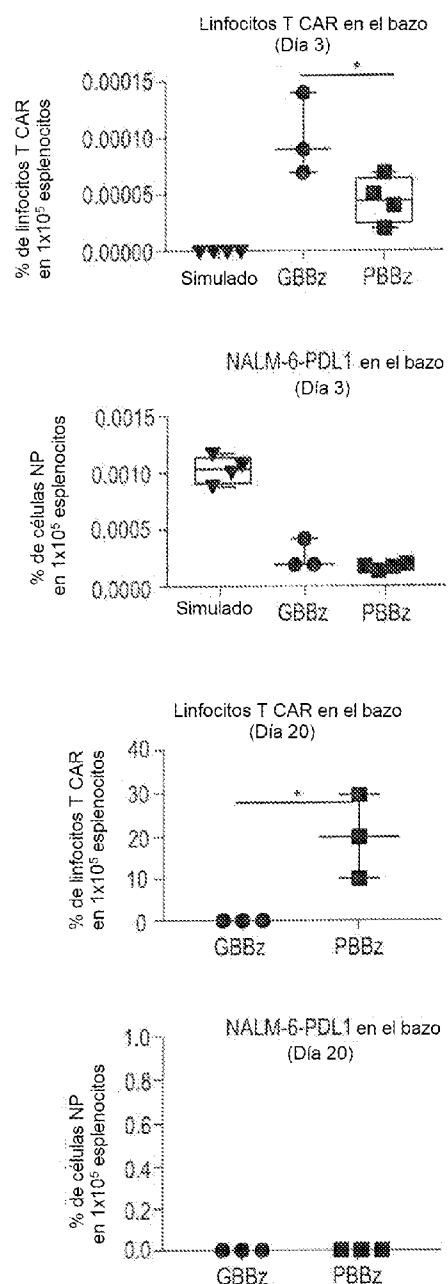


Fig. 5B

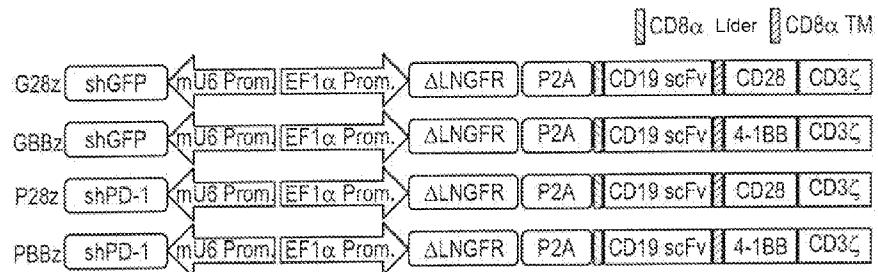


Fig. 6A

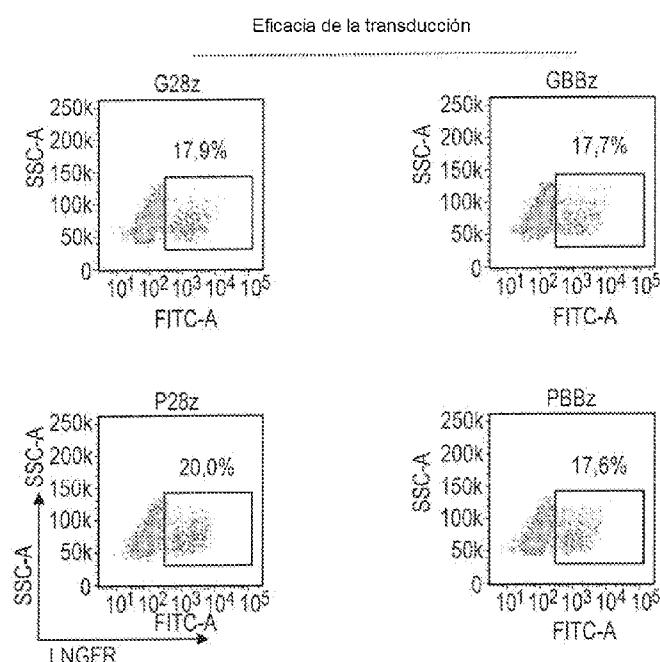


Fig. 6B

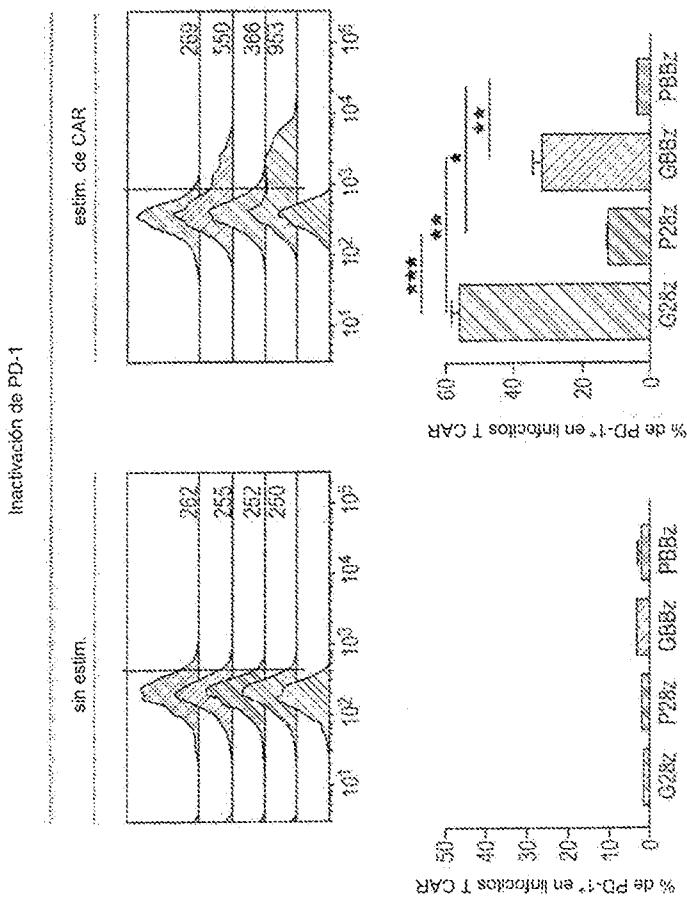


Fig. 7A

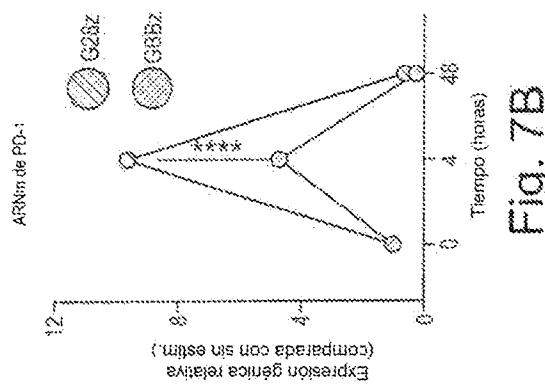
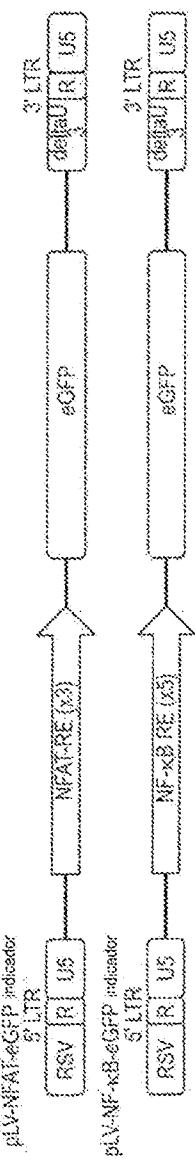
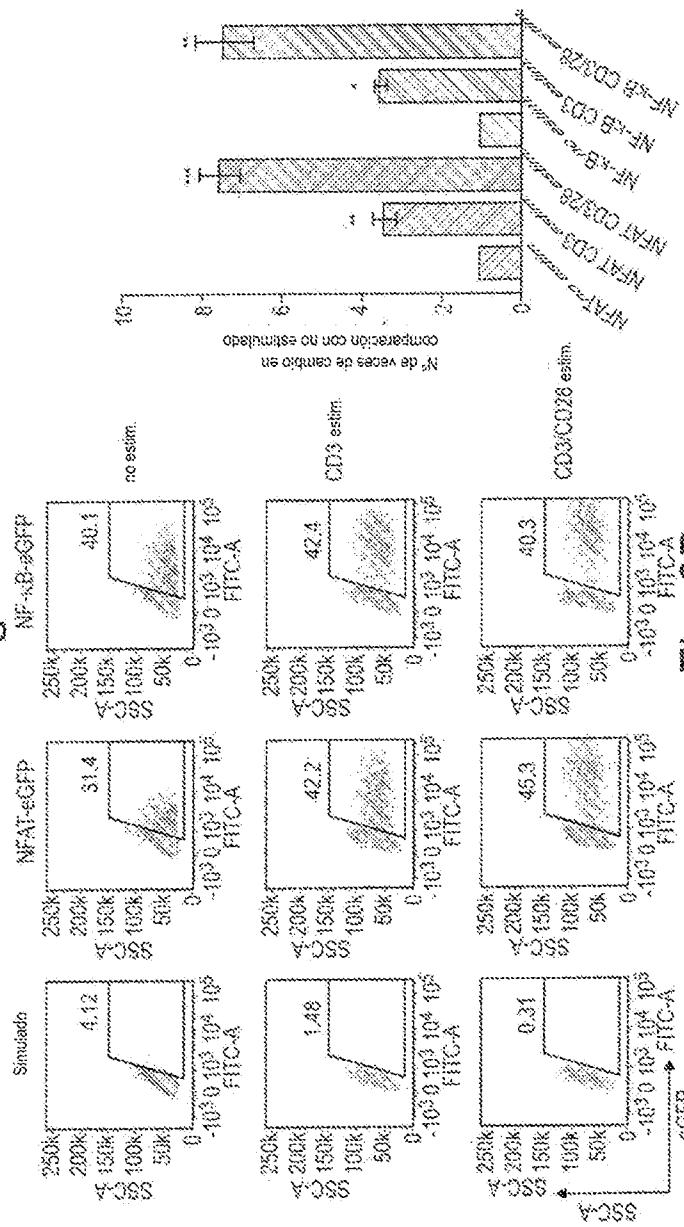


Fig. 7B



卷之三



卷之三

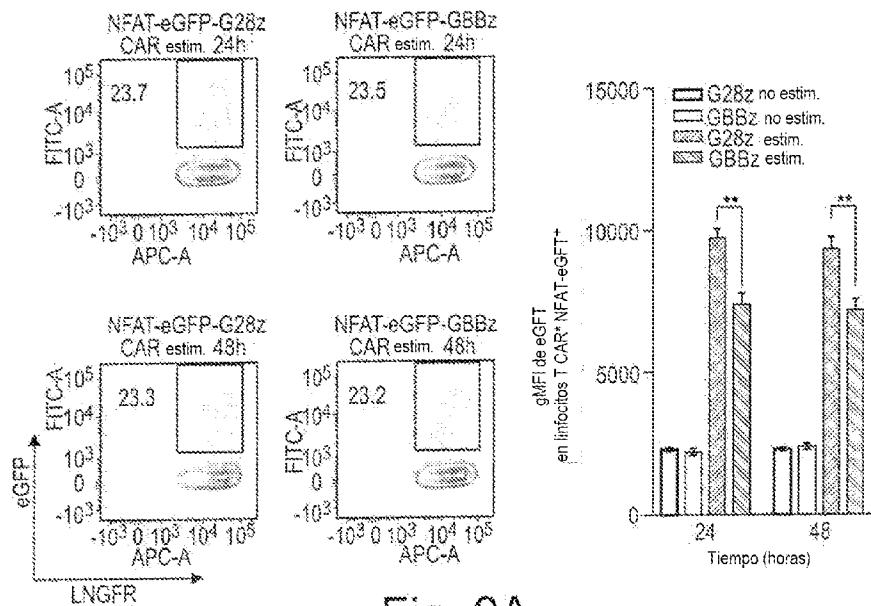


Fig. 9A

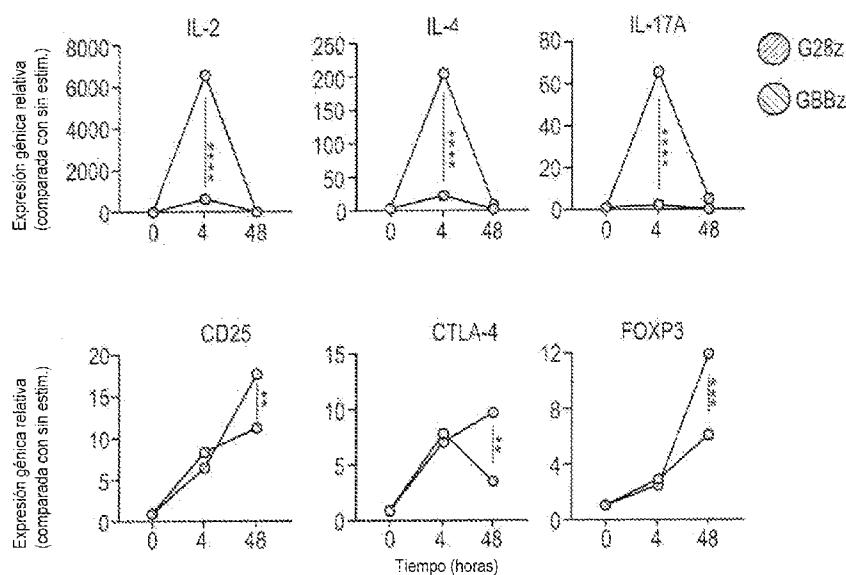


Fig. 9B

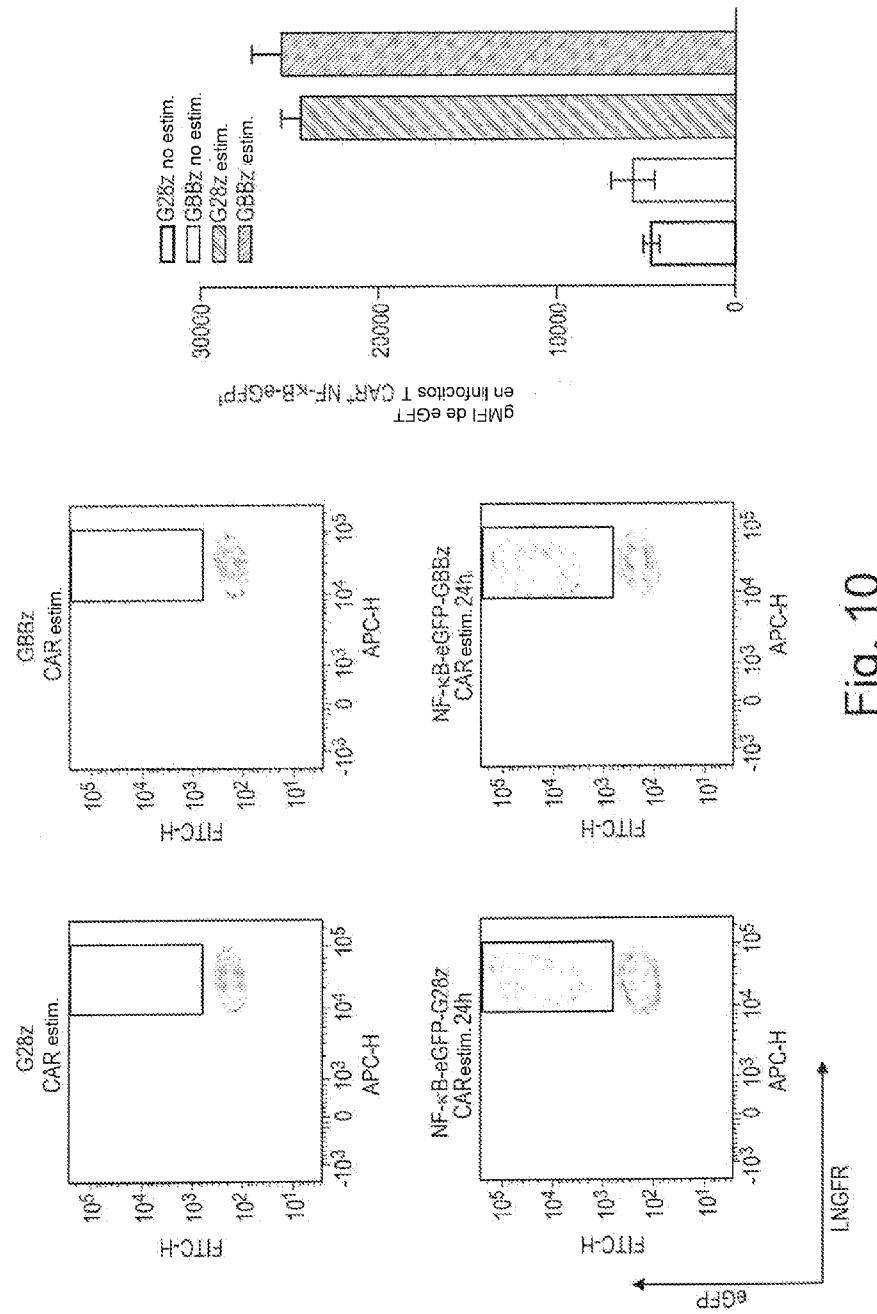


Fig. 10

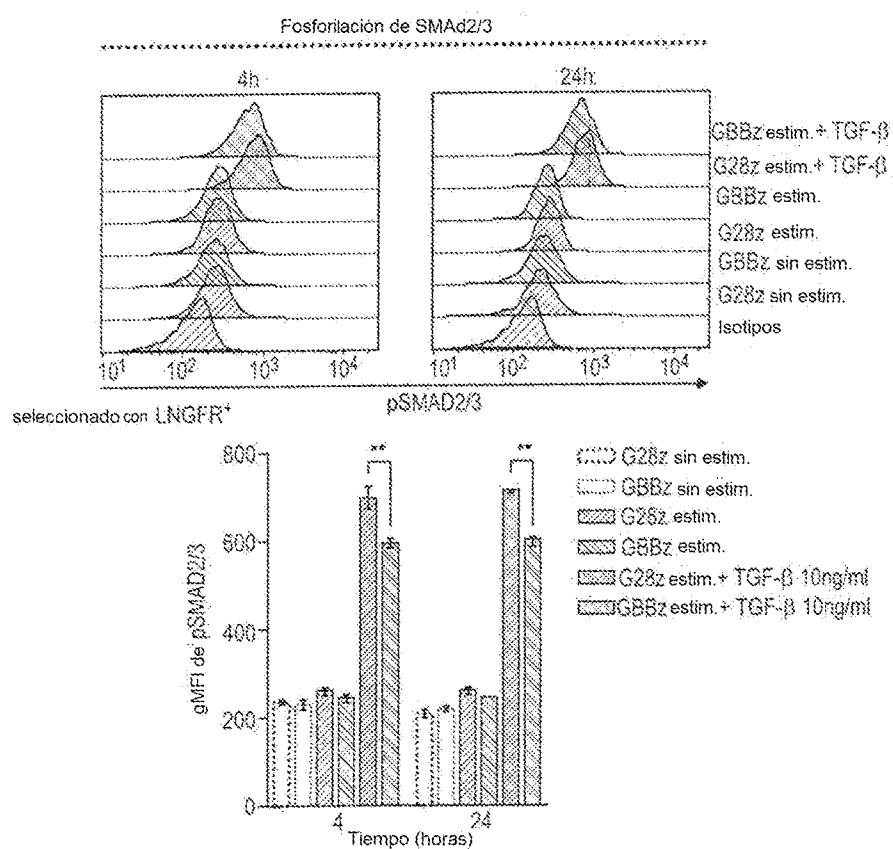
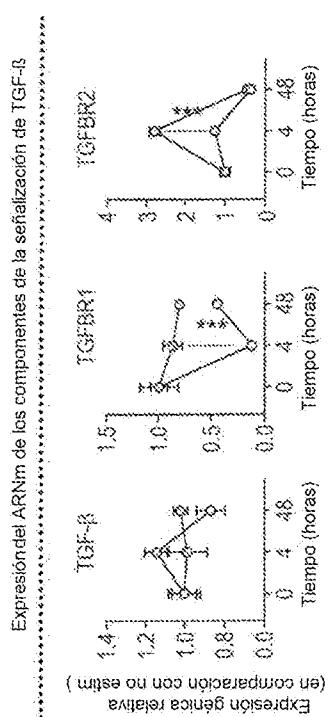
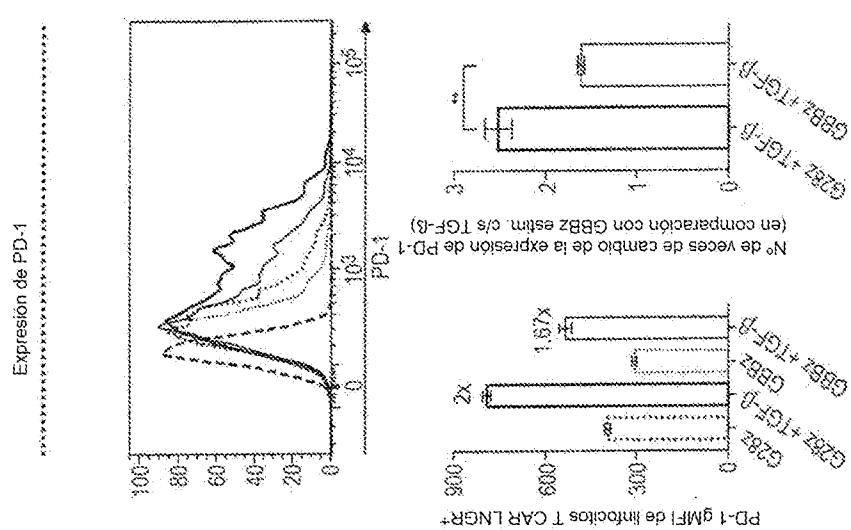


Fig. 11A



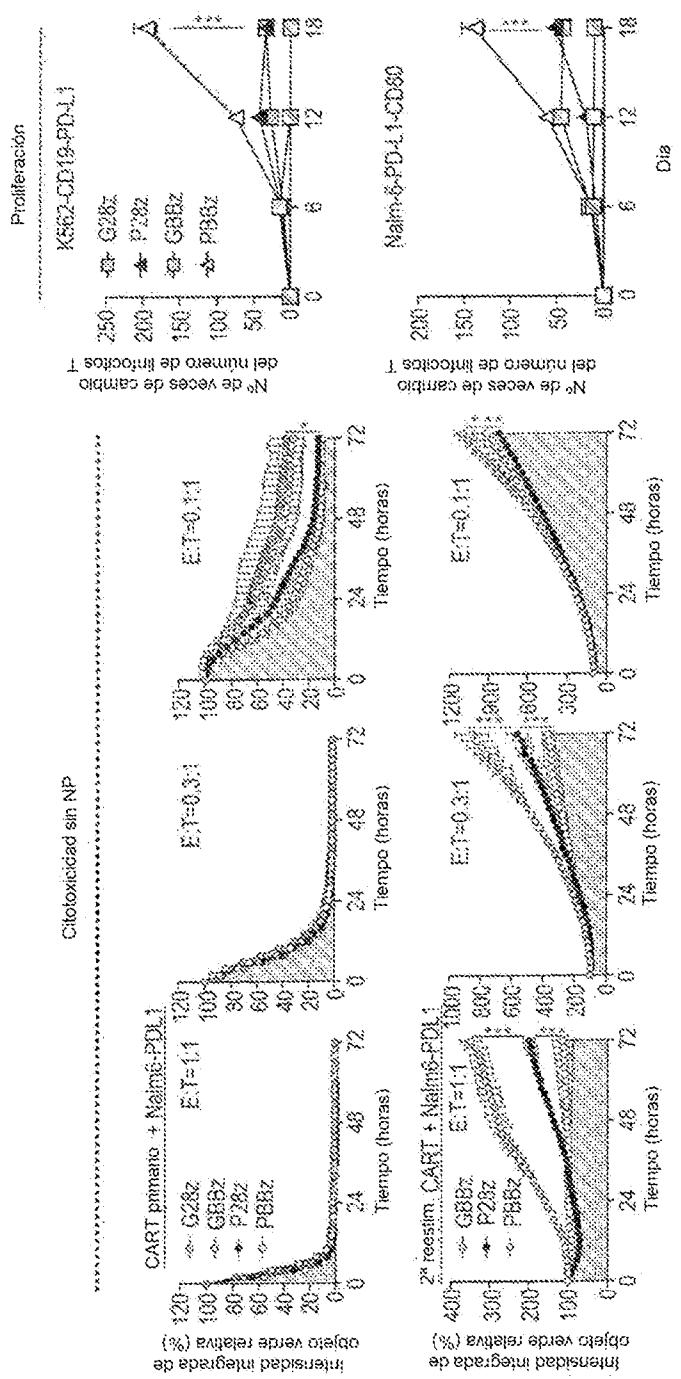
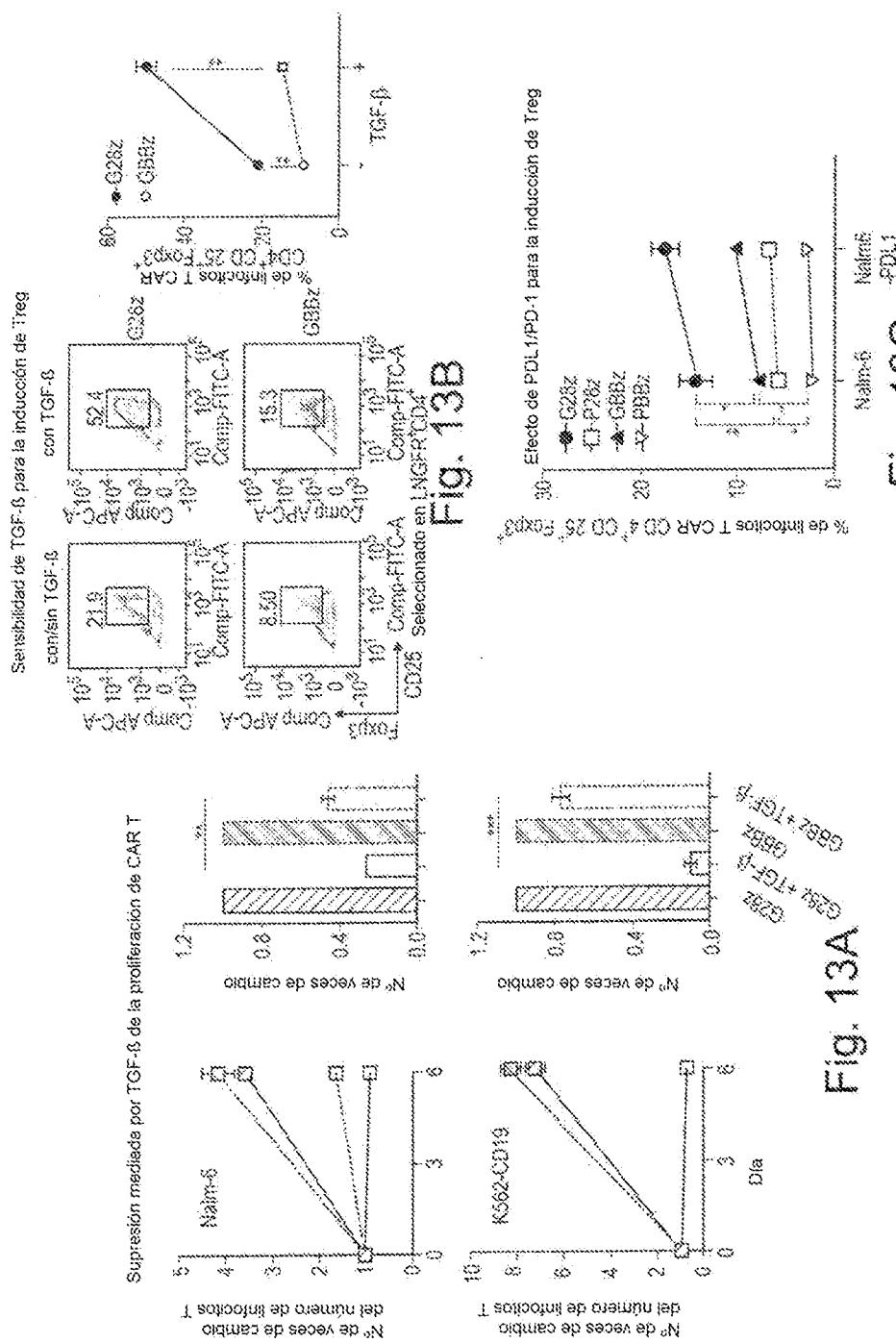


Fig. 12A

Fig. 12B



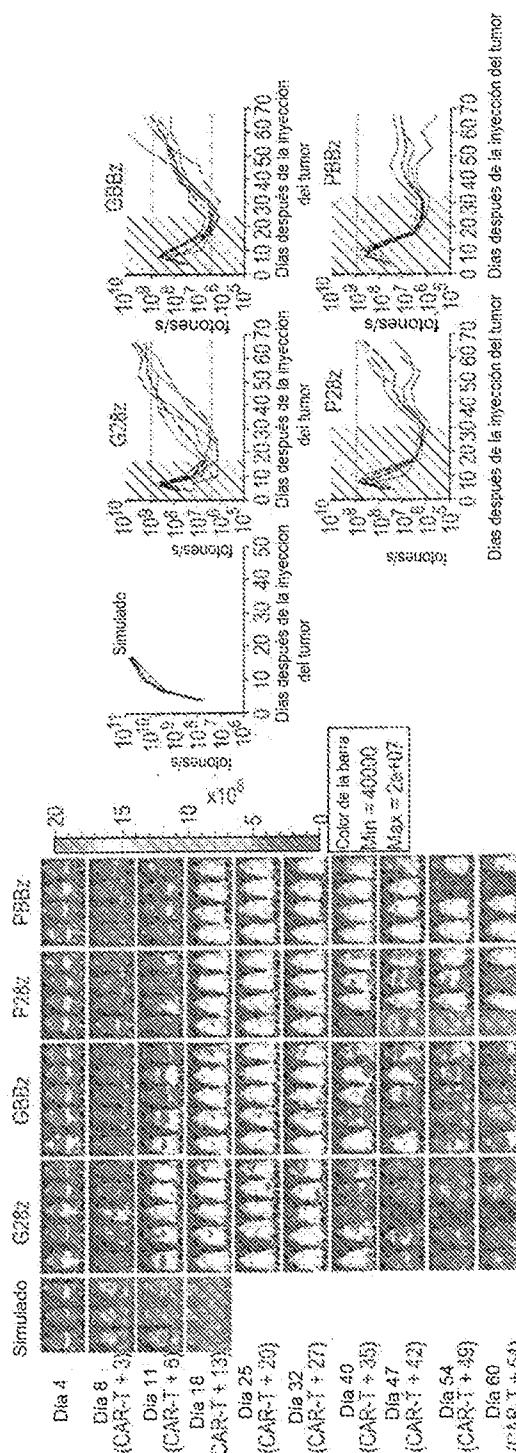


Fig. 14

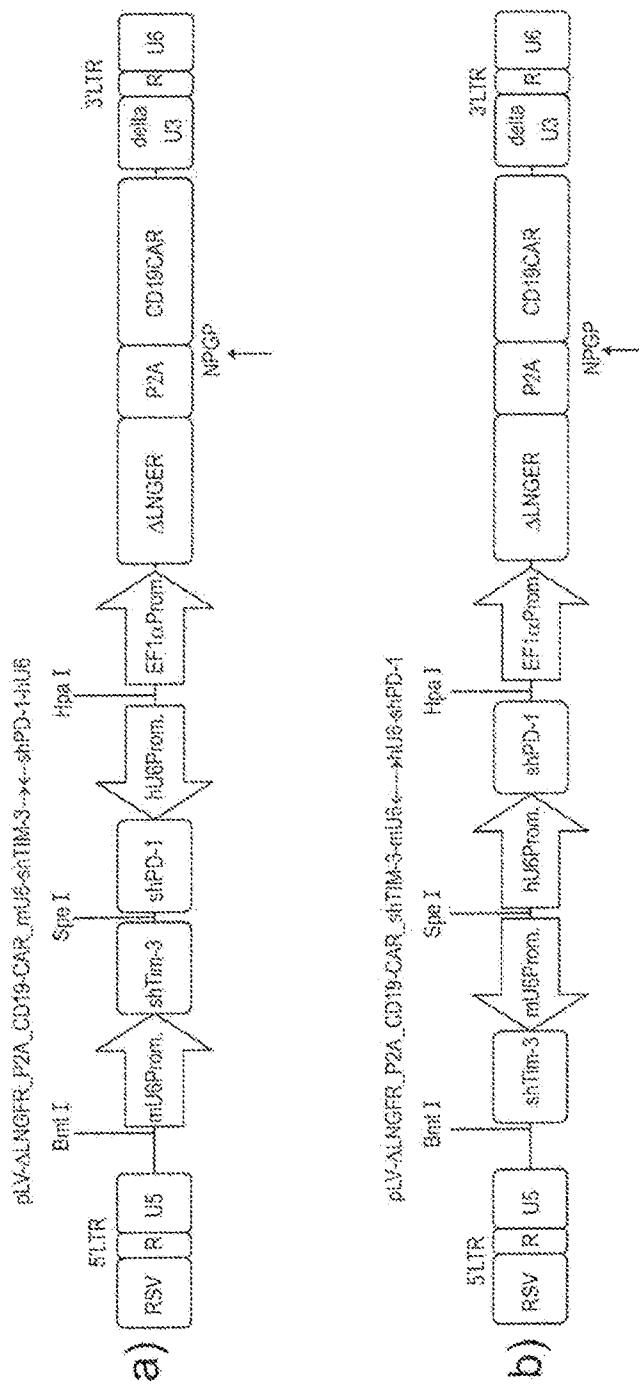


Fig. 15

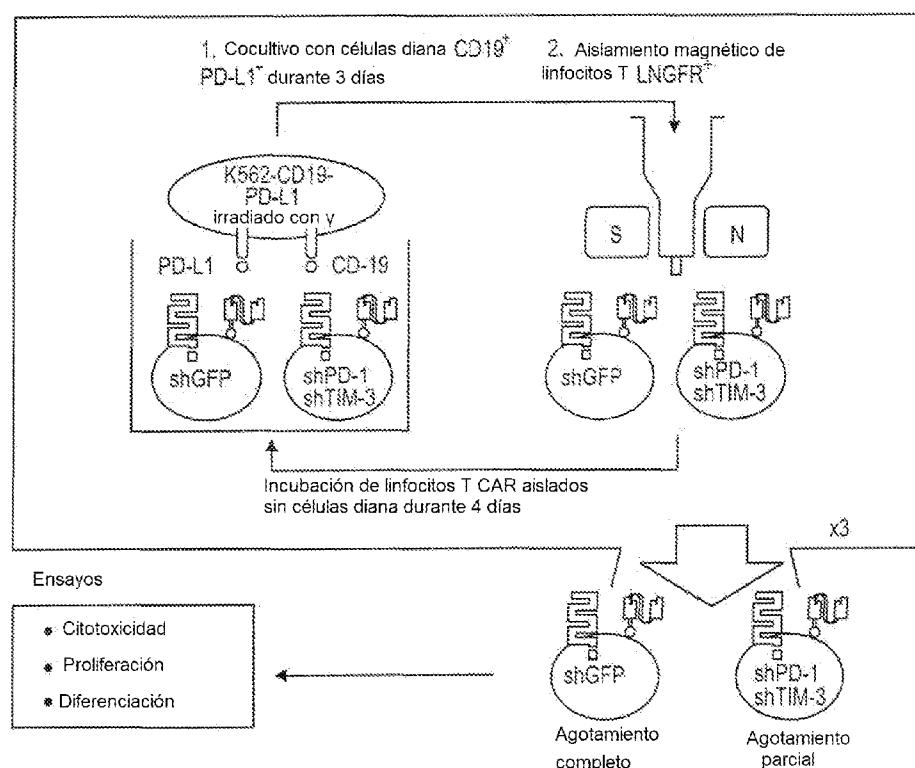


Fig. 16

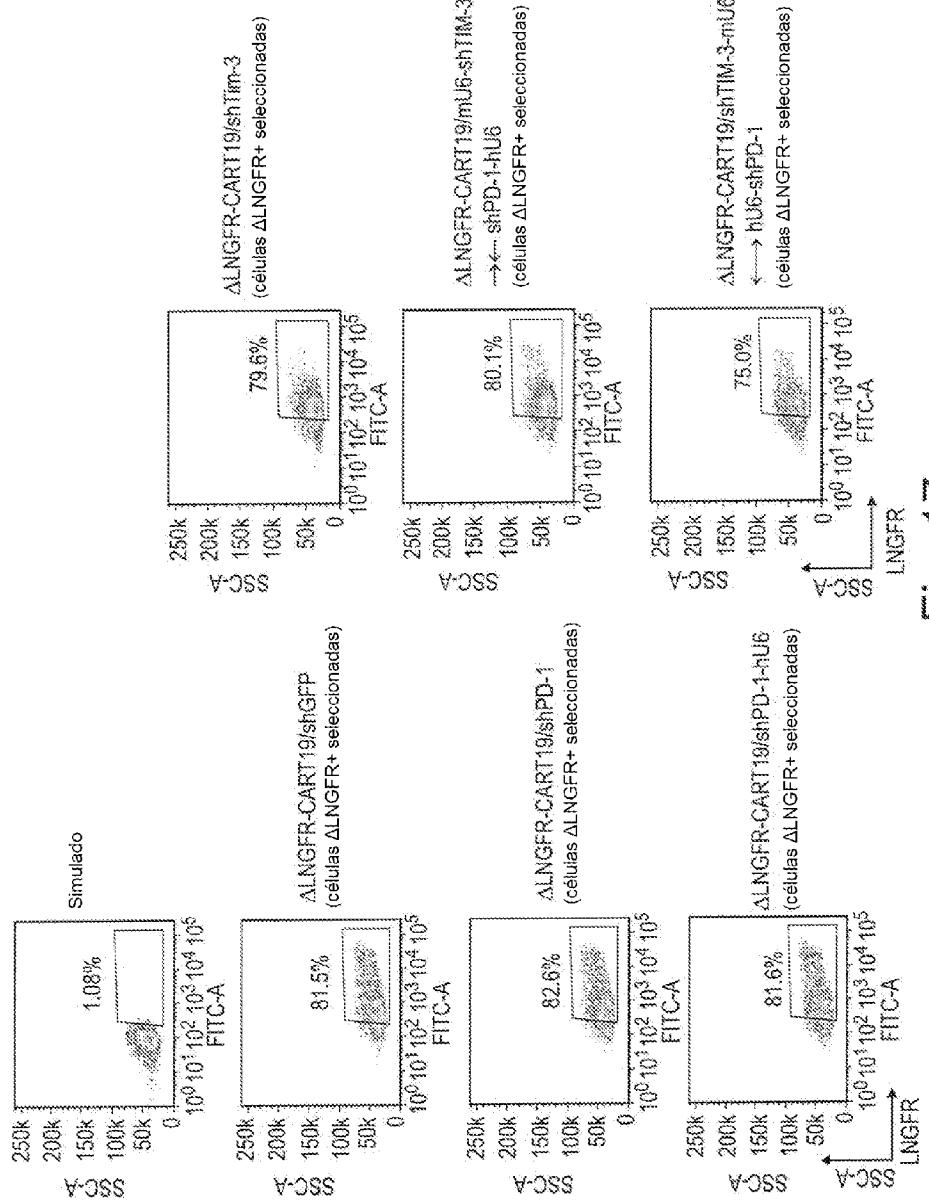


Fig. 17

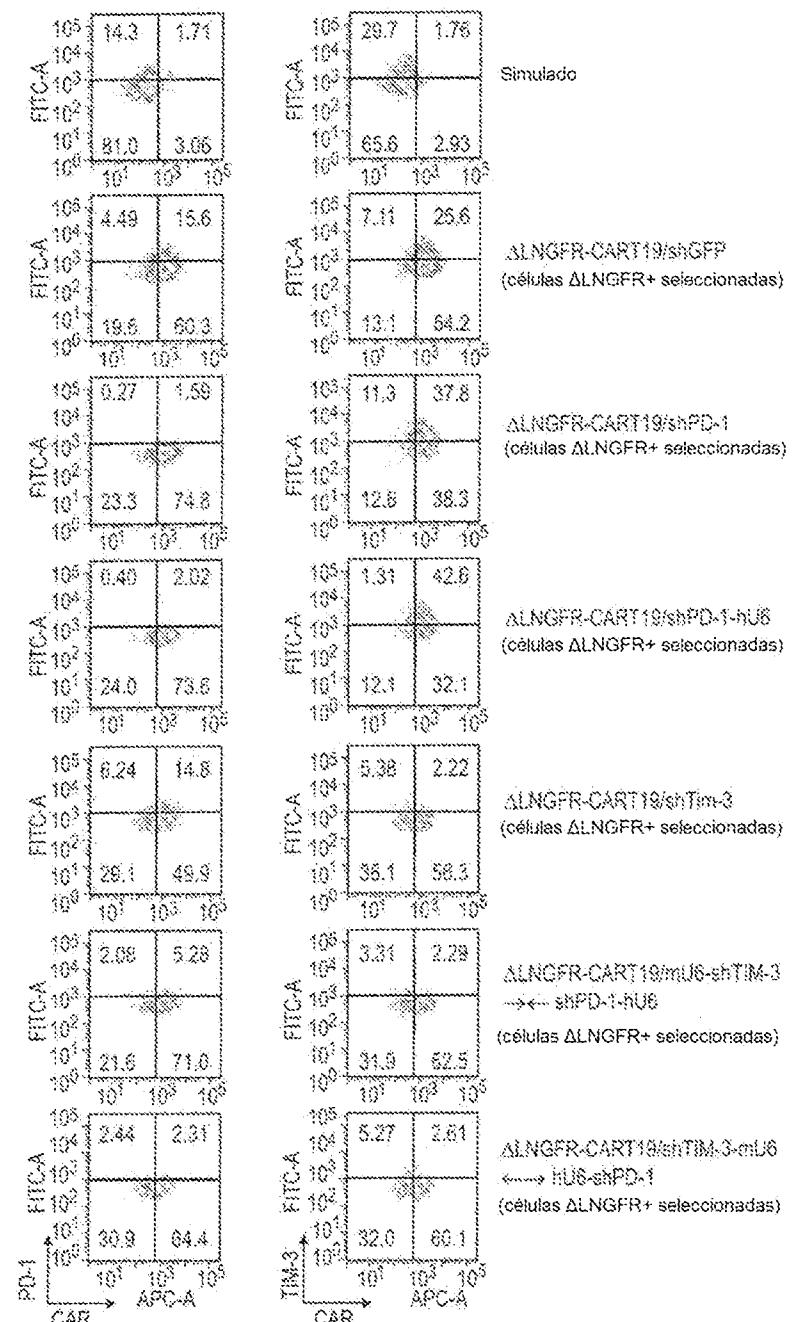
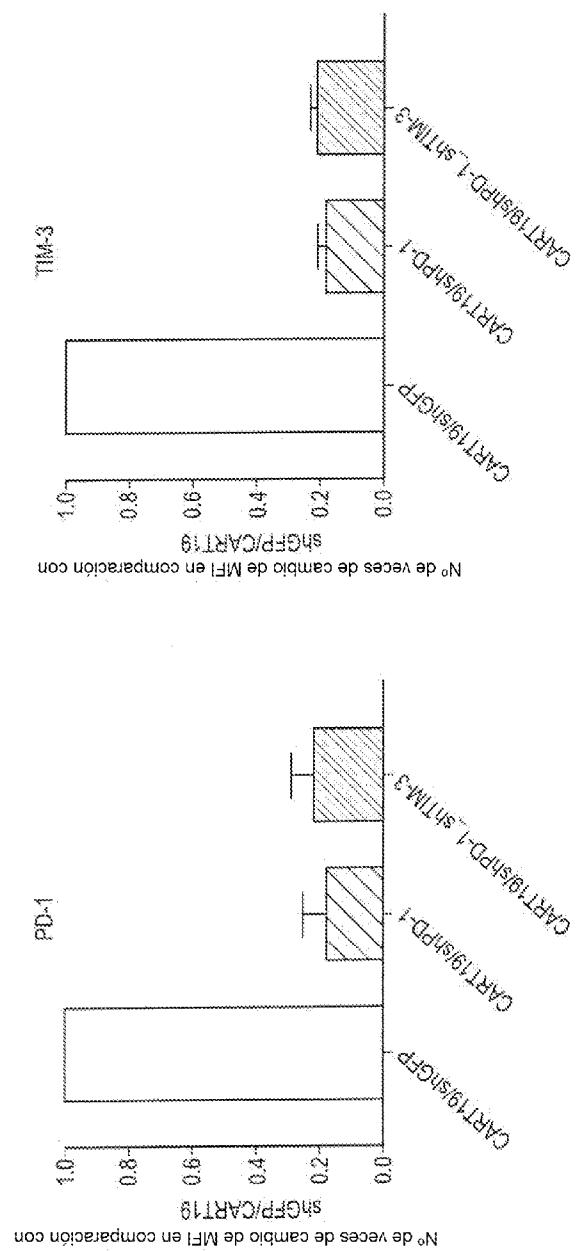
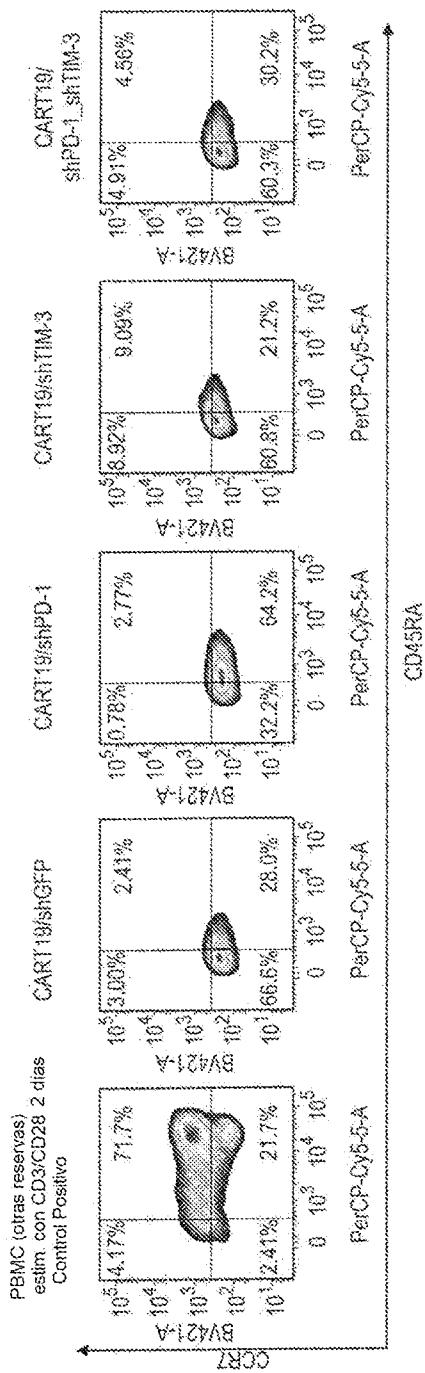


Fig. 18A

Fig. 18B





四

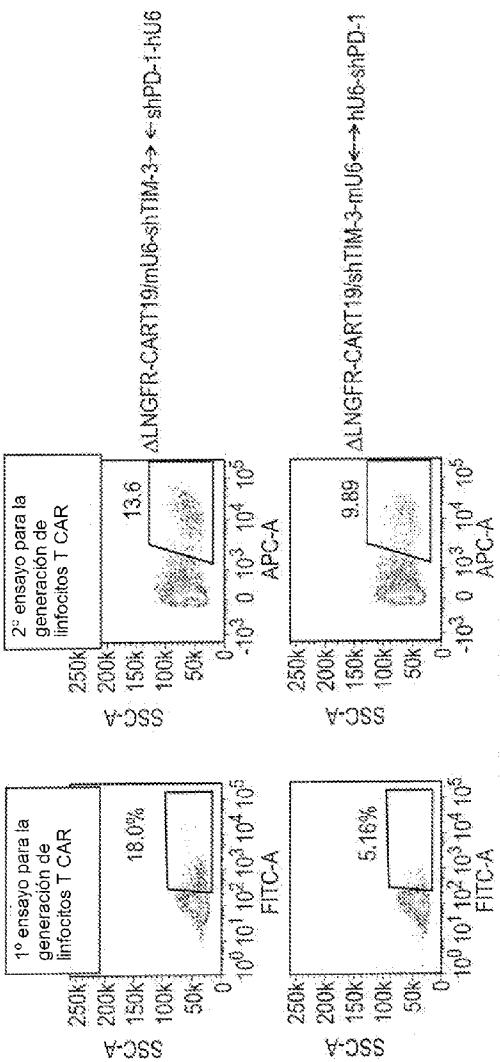


Fig. 20A

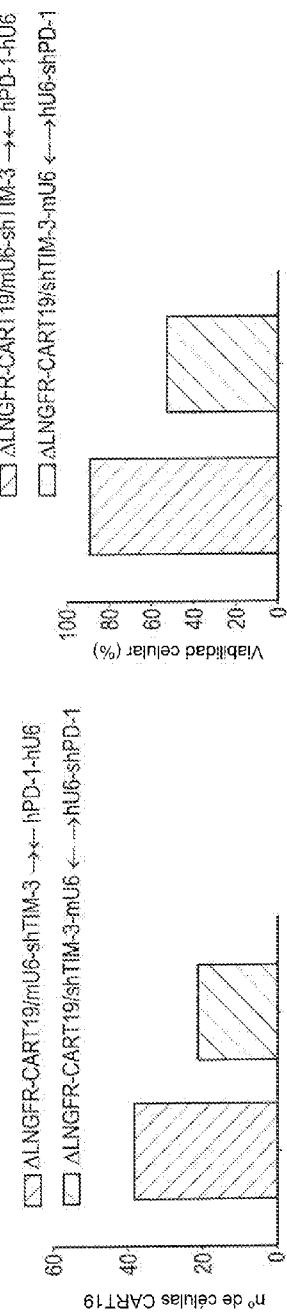
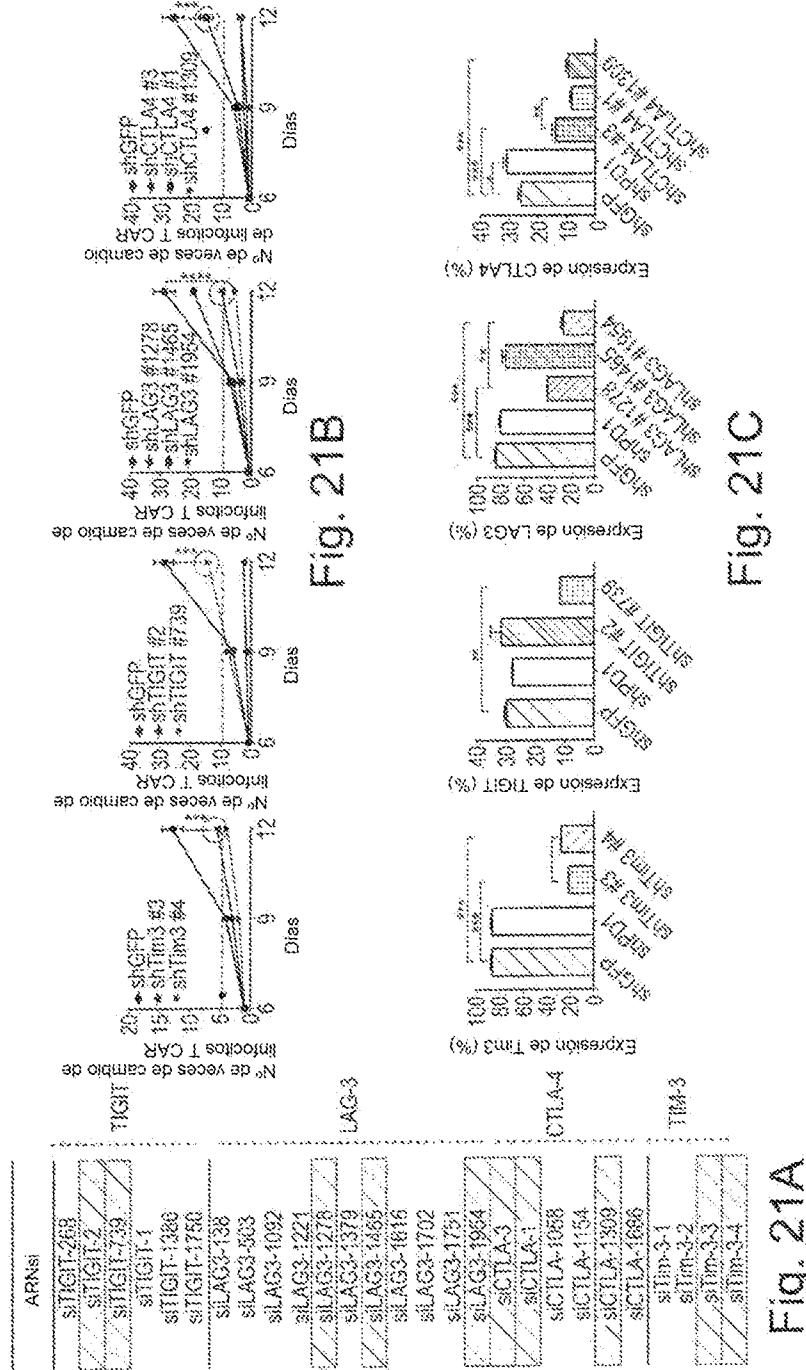


Fig. 20B

Fig. 20C



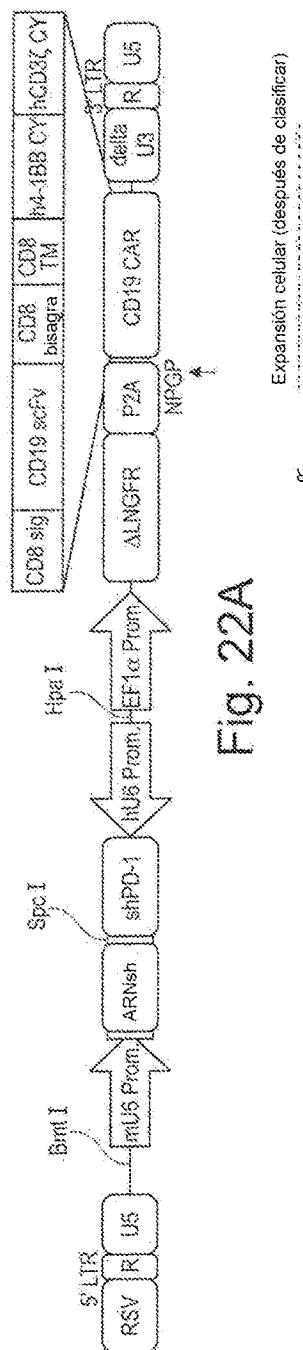


Fig. 22A

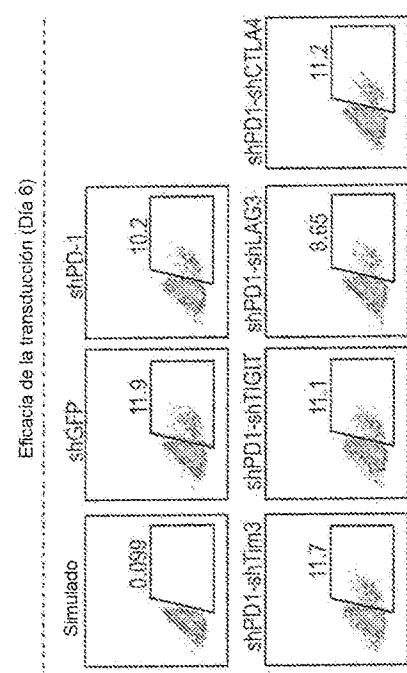


Fig. 22B

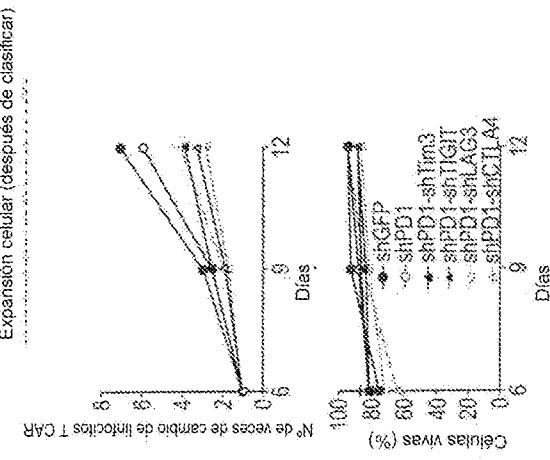


Fig. 22C

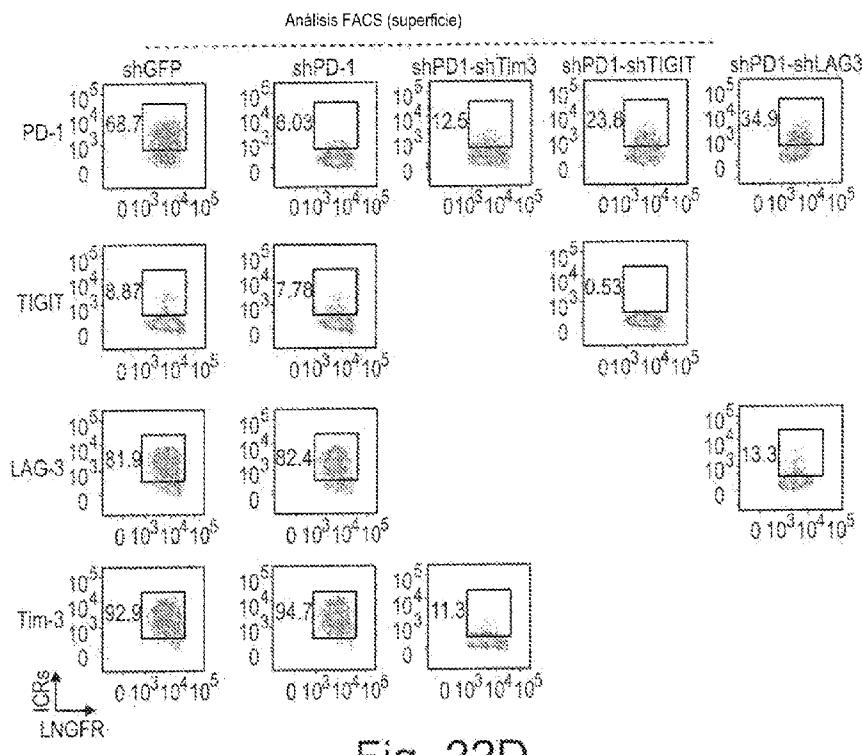


Fig. 22D

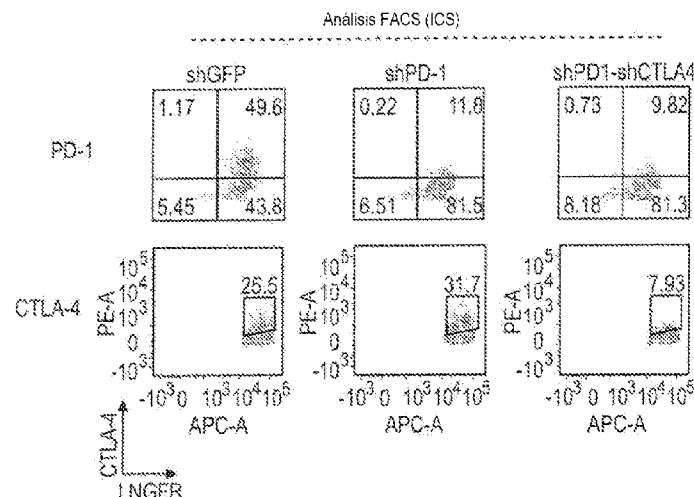


Fig. 22E

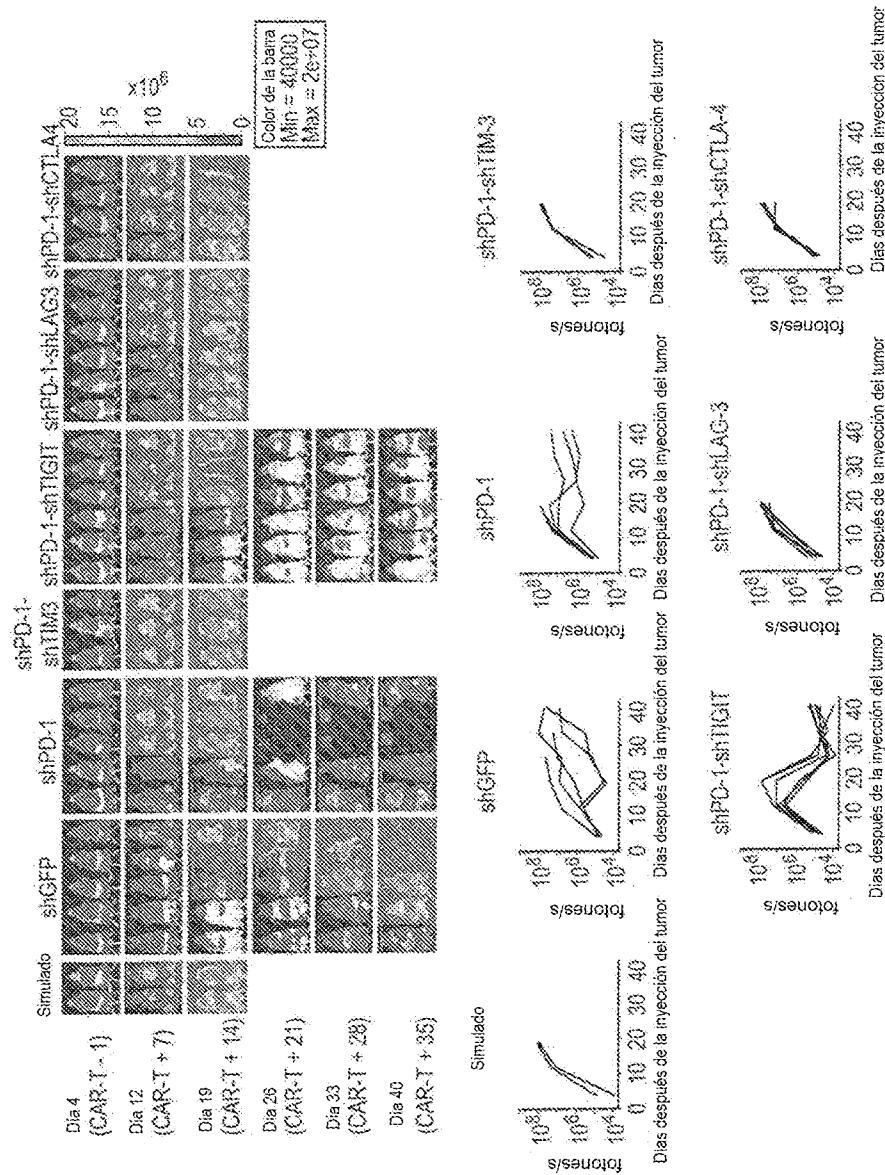


Fig. 23

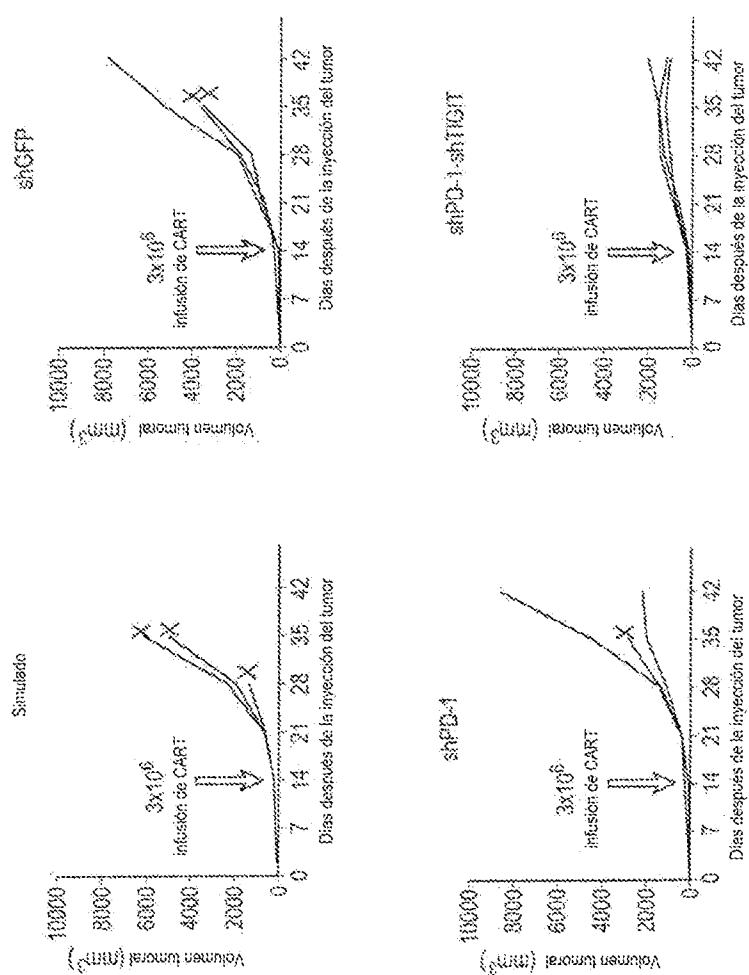


Fig. 24