

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 393**

51 Int. Cl.:

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2014 PCT/EP2014/056534**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191128**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2014 E 14714278 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 3004337**

54 Título: **Métodos de manipulación de linfocitos T para inmunoterapia usando el sistema de nucleasa Cas guiada por ARN**

30 Prioridad:

29.05.2013 DK 201370297

08.10.2013 US 201361888259 P

22.11.2013 US 201361907858 P

22.11.2013 US 201361907874 P

13.12.2013 DK 201370771

24.01.2014 WO PCT/EP2014/051458

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2017

73 Titular/es:

**CELLECTIS (100.0%)
8, rue de la Croix Jarry
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DUCHATEAU, PHILIPPE;
CHOULIKA, ANDRÉ y
POIROT, LAURENT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 645 393 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de manipulación de linfocitos T para inmunoterapia usando el sistema de nucleasa Cas guiada por ARN

5 Campo de la invención

En el presente documento se desvelan métodos de desarrollo de linfocitos T genéticamente manipulados, preferentemente no alorreactivos, para inmunoterapia. Este método implica el uso de endonucleasas guiadas por ARN, en particular el sistema Cas9/CRISPR, para dirigir específicamente una selección de loci genéticos clave en linfocitos T. Los linfocitos T manipulados también están previstos para expresar receptores de antígeno quimérico (CAR) para redirigir su actividad inmunitaria hacia células malignas o infectadas. La invención abre el camino a estrategias de inmunoterapia adoptiva estándar y asequibles usando linfocitos T para tratar cáncer, infecciones virales y enfermedades autoinmunitarias.

15 Antecedentes de la invención

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

A través de la transferencia genética de receptores de linfocitos T transgénicos o receptores de antígeno quimérico (CAR), se han generado satisfactoriamente nuevas especificidades en linfocitos T (Jena, Dotti et al. 2010). Los CAR son receptores sintéticos que consisten en un resto de direccionamiento que está asociado a uno o más dominios de señalización en una única molécula de fusión. En general, el resto de unión de un CAR consiste en un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo monocatenario (scFv), que comprende los fragmentos ligeros y variables de un anticuerpo monoclonal unidos por un conector flexible. También se han usado satisfactoriamente restos de unión basados en dominios de receptor o de ligando. Los dominios de señalización para los CAR de primera generación derivan de la región citoplasmática de las cadenas gamma del receptor de CD3zeta o de Fc. Se ha mostrado que los CAR de primera generación redirigen satisfactoriamente la citotoxicidad de linfocitos T, sin embargo, dejaron de proporcionar expansión y actividad antitumoral prolongadas *in vivo*. Se han añadido dominios de señalización de moléculas coestimuladoras que incluyen CD28, OX-40 (CD134) y 4-1BB (CD137) solos (segunda generación) o en combinación (tercera generación) para potenciar la supervivencia y aumentar la proliferación de linfocitos T modificados por CAR. Los CAR han permitido satisfactoriamente que los linfocitos T sean redirigidos contra antígenos expresados en la superficie de células tumorales de diversos tumores malignos que incluyen linfomas y tumores sólidos (Jena, Dotti et al. 2010).

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

Idealmente, uno quisiera usar una terapia normalizada en la que células terapéuticas alogénas pudieran ser prefabricadas, caracterizadas en detalle y estuvieran disponibles para la administración inmediata a pacientes. Por alogeno se indica que las células se obtienen de individuos que pertenecen a las mismas especies, pero son genéticamente distintas. Sin embargo, el uso de células alogénas tiene actualmente muchos inconvenientes. En hospedadores inmunocompetentes, las células alogénas son rápidamente rechazadas, un proceso llamado huésped frente a rechazo del injerto (HvG), y esto limita sustancialmente la eficacia de las células transferidas. En hospedadores inmunocompetentes, las células alogénas son capaces de injertarse, pero sus especificidades por receptores de linfocitos T (TCR) endógenos reconocen el tejido del hospedador como extraño, produciendo enfermedad injerto contra huésped (GvHD), que puede conducir a daño tisular grave y muerte.

Con el fin de obtener eficazmente células alogénas, los inventores desvelaron previamente un método de manipulación genética de linfocitos T, en el que diferentes genes efectores, en particular aquellos que codifican

receptores de linfocitos T, se inactivaron usando TAL-nucleasas específicas, mejor conocidas con la marca registrada TALEN™ (Cellestis, 8, rue de la Croix Jarry, 75013 PARIS). Este método ha demostrado ser altamente eficiencia en células primarias usando transfección de ARN como parte de una plataforma que permite la producción en masa de linfocitos T alógenos (documento WO 2013/176915).

Recientemente, se ha desarrollado una nueva herramienta de ingeniería del genoma basándose en los componentes del sistema inmunitario adaptativo CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) procariota de tipo II de las bacterias *S. pyogenes*. Este sistema multicomponente denominado sistema de nucleasa Cas guiada por ARN (Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chilinski et al. 2012), o más simplemente CRISPR, implica una endonucleasa Cas acoplada a una molécula de ARN guía que tiene la capacidad de conducir dicha nucleasa a algunas secuencias de genoma específicas. Donde la guía de ARN se hibrida con la secuencia de genoma, la endonucleasa tiene la capacidad de escindir el ADN. El sistema CRISPR/asociado a CRISPR (Cas) implica 1) retención de material genético extraño, llamados "espaciadores", en matrices agrupadas en el genoma del hospedador, 2) expresión de ARN de guiado corto (ARNcr) de los espaciadores, 3) unión del ARNcr a porciones específicas del ADN foráneo llamadas protoespaciadores y 4) degradación de protoespaciadores por nucleasas asociadas a CRISPR (Cas). La especificidad de unión al ADN foráneo está controlada por los elementos espaciadoras no repetitivos en el pre-ARNcr, que tras la transcripción junto con el ARNcrtra, dirige la nucleasa Cas9 al heterodúplex protoespaciador:ARNcr e induce la formación de roturas bicatenarias (DSB). Adicionalmente, la nucleasa Cas9 corta el ADN solo si una secuencia específica conocida como motivo adyacente a protoespaciador (PAM) está presente inmediatamente en la dirección 3' de la secuencia de protoespaciador, cuya secuencia canónica en *S. pyogenes* es 5' - NGG - 3', donde N se refiere a cualquier nucleótido. Después, se ha demostrado que la expresión de un único transcrito ARNcr:ARNcrtra quimérico, que normalmente se expresa como dos ARN diferentes en el sistema CRISPR de tipo II nativo, es suficiente para dirigir la nucleasa Cas9 a secuencias de ADN diana que escinden específicamente secuencias. Adaptando el sistema CRISPR/Cas de tipo II endógeno de *S. pyogenes* para su uso en células de mamífero, varios grupos han mostrado independientemente que Cas9 guiado por ARN es capaz de introducir eficientemente roturas bicatenarias precisas en loci genómicos endógenos en células de mamífero con altas eficiencias y mínimos efectos inespecíficos (Cong et al. 2013, Mali et al. 2013, Cho et al. 2013). Además, se han desarrollado varias formas mutantes de la nucleasa Cas9 que se aprovechan de sus características para aplicaciones adicionales en la ingeniería del genoma y regulación transcripcional. Por ejemplo, una forma mutante de la nucleasa Cas9 funciona como una nickasa (Jinek et al. 2012), generando una rotura en la hebra complementaria de ADN en vez de en ambas hebras como con la Cas9 no mutante. Esto permite la reparación del molde de ADN usando una vía de alta fidelidad en vez de NHEJ, que previene la formación de INDEL en el locus elegido como diana, y posiblemente otras localizaciones en el genoma para reducir posibles efectos inespecíficos/de toxicidad mientras que se mantiene la capacidad de experimentar recombinación homóloga (Cong et al., 2013). Lo más recientemente, se ha mostrado que cortes emparejados reducen la actividad inespecífica de 50 a 1.500 veces en líneas celulares y facilita la inactivación génica en el cigoto de ratón sin perder la eficiencia de escisión específica (Ran et al., 2013).

Aunque las endonucleasas guiadas por ARN, tales como el sistema Cas9/CRISPR, parecen ser un enfoque atractivo para manipular genéticamente células de mamífero, el uso de las mismas en células primarias, en particular en linfocitos T, está significativamente obstaculizado por el hecho de que:

- linfocitos T son adversamente afectados por la introducción de ADN en su citoplasma: se observa alta tasa de apoptosis cuando se transforman células con vectores de ADN;
- el sistema CRISPR requiere expresión estable de Cas9 en las células. Sin embargo, la prolongada expresión de Cas9 en células vivas puede conducir a defectos cromosómicos;
- La especificidad de la actual endonucleasa guiada por ARN se determina solo por secuencias que comprenden 11 nucleótidos (N12-20NGG, donde NGG representa el PAM), que hace muy difícil identificar secuencias diana en loci deseados que son únicos en el genoma.

La presente solicitud tiene como objetivo proporcionar soluciones a estas limitaciones con el fin de implementar eficientemente las endonucleasas guiadas por ARN en linfocitos T.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método de preparación de linfocitos T para inmunoterapia que comprende las etapas de:

(a) Modificar genéticamente linfocitos T introduciendo en las células y/o expresando en las células al menos:

- una endonucleasa guiada por ARN; y
- un ARN guía específico que dirige dicha endonucleasa a al menos un locus elegido como diana en el genoma de linfocitos T,

en el que dicha endonucleasa guiada por ARN se expresa de ARNm transfectado, y dicho ARN guía se expresa en las células como un transcrito de un vector de ADN;

(b) expandir las células resultantes *in vitro*.

Así, la presente invención desvela métodos de manipulación de linfocitos T, en particular linfocitos T alógenos, obtenibles de donantes, para hacerlos adecuados para fines de inmunoterapia, usando endonucleasas guiadas por ARN tales como Cas9/CRISPR.

Los métodos de la presente invención permiten más particularmente la modificación precisa del genoma de linfocitos T, relevantes para inmunoterapia, inactivando o sustituyendo genes implicados en el reconocimiento del MHC y/o proteínas reguladoras inmunitarias. En particular, proporcionan secuencias diana relevantes, específicas en el genoma para el ARN guía, para inactivar componentes de TCR sin provocar la muerte de las células.

Según varias realizaciones preferidas, las células modificadas relevantes para inmunoterapia comprenden además polinucleótidos recombinantes exógenos que codifican receptor de antígeno quimérico (CAR) monocatenario y multi-subunidad para el reconocimiento de células específicas. Más particularmente, se ponen a disposición linfocitos T modificados para tratar linfoma disponibles que llevan CAR dirigidos contra el antígeno CD19.

En el presente documento también se desvelan células aisladas o líneas celulares que comprenden las modificaciones genéticas expuestas en la descripción detallada, ejemplos y figuras, además de cualquiera de las proteínas, polipéptidos o vectores útiles para implementar endonucleasas guiadas por ARN en linfocitos T.

Como resultado de la invención, pueden usarse linfocitos T modificados como productos terapéuticos, idealmente como un producto "disponible para venta", en métodos de tratamiento o prevención de cáncer, infecciones o enfermedad auto-inmunitaria.

Breve descripción de las figuras y tablas

Figura 1: Representación esquemática de la relación normal entre linfocitos T y célula presentadora de antígenos.

Figura 2: Representación esquemática de los linfocitos T terapéuticos genéticamente modificados proporcionados por el método de la invención contra las células tumorales del paciente.

Figura 3: Representación esquemática de un CAR multi-subunidad, que puede ser introducido en los linfocitos T manipulados por endonucleasa guiada por ARN según el método de la invención.

Figura 4: Representación esquemática de un ejemplo del método de manipulación de células alógenas humanas para inmunoterapia.

Figura 5: Análisis de citometría de flujo de la actividad del sistema CRISPR en linfocitos T con respecto al gen TCR (resultados experimentales del Ejemplo 2) - se transfectaron 5×10^6 linfocitos T con $10 \mu\text{g}$ de ARNm de Cas9 + $10 \mu\text{g}$ de ADN de plásmido que expresa ARNg específico para genes TRAC bajo el control del promotor U6 en presencia de un inhibidor de caspasa. Lectura: 3 días después de la transfección, análisis de citometría de flujo usando anticuerpo para TCR $\alpha\beta$. Controles: células no transfectadas.

Figura 6: Análisis de citometría de flujo de la actividad del sistema CRISPR en linfocitos T con respecto al gen CD52 (resultados experimentales del Ejemplo 2) - se transfectaron 5×10^6 linfocitos T con $10 \mu\text{g}$ de ARNm de Cas9 + $10 \mu\text{g}$ de ADN de plásmido que expresa ARNg específico para genes CD52 bajo el control del promotor U6 en presencia de un inhibidor de caspasa. Lectura: 3 días después de la transfección, análisis de citometría de flujo usando el anticuerpo CD52. Controles: células no transfectadas.

Tabla 1: Diferentes programas de Cytopulse usados para determinar la tensión mínima requerida para la electroporación en linfocitos T derivados de CMSP.

Tabla 2: Diferentes programas de Cytopulse usados para determinar la tensión mínima requerida para la electroporación en linfocitos T derivados de CMSP.

Tabla 3: Secuencias diana para la rotura de Cas9/CRISPR no genotóxica de TCR α .

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina específicamente en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos usados tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en los campos de la terapia génica, bioquímica, genética y biología molecular.

Todos los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, siendo los métodos y materiales adecuados descritos en el presente documento. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes, a menos que se especifique de otro modo.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Edición (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. Patente de EE.UU. N.º 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); las series *Methods In ENZYMOLOGY* (J. Abelson and M. Simon, eds.-jefe, Academic Press, Inc., New York), específicamente, Vols. 154 y 155 (Wu et al. eds.) y Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); y *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

En un aspecto general, en el presente documento se desvelan métodos de nuevas estrategias de inmunoterapia adoptiva en el tratamiento de cáncer e infecciones.

Un objetivo principal de la invención es el uso de endonucleasa guiada por ARN, tal como Cas9, para modificar genéticamente linfocitos T para producir células adecuadas en terapia celular.

El método de la invención se refiere a un método de preparación de linfocitos T para inmunoterapia que comprende la etapa de:

(a) Modificar genéticamente linfocitos T introduciendo en las células y/o expresando en las células al menos:

- una endonucleasa guiada por ARN; y
- un ARN guía específico que dirige dicha endonucleasa a al menos un locus elegido como diana en el genoma de linfocitos T

en el que dicha endonucleasa guiada por ARN se expresa a partir de ARNm transfectado, y dicho ARN guía se expresa en las células como un transcrito de un vector de ADN,

(b) expandir las células resultantes.

Por "endonucleasa guiada por ARN" se indica un polipéptido cuya actividad de endonucleasa y especificidad dependen de su asociación con una molécula de ARN. La secuencia completa de esta molécula de ARN, o más generalmente un fragmento de esta molécula de ARN, que es una secuencia preferentemente más larga de 8 bases de ácido nucleico, más preferentemente más larga de 10 bases de ácido nucleico, incluso más preferentemente más larga de 12 bases de ácido nucleico, tiene la capacidad de especificar una secuencia diana en el genoma. En general, esta molécula de ARN tiene la capacidad de hibridarse con dicha secuencia diana y mediar en la actividad de endonucleasa de dicha endonucleasa. Un ejemplo de endonucleasa guiada por ARN es cas9 como parte del sistema Cas9/CRISPR.

Cas 9

Cas9, también llamada Csn1 (COG3513), es una proteína grande que participa en tanto la biogénesis de ARNcr como en la destrucción de ADN invasor. Cas9 se ha descrito en diferentes especies bacterianas tales como *S. thermophilus* (Sapranaukas, Gasiunas et al. 2011), *Listeria innocua* (Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chilinski et al. 2012) y *S. pyogenes* (Deltcheva, Chilinski et al. 2011). La gran proteína Cas9 (>1200 aminoácidos) contiene dos dominios de nucleasa predichos, concretamente el dominio de nucleasa HNH (similar a McrA) que se localiza en el centro de la proteína y un dominio de nucleasa de tipo RuvC dividido (pliegue de RNasa H) (Haft, Selengut et al. 2005; Makarova, Grishin et al. 2006).

Por "Cas9" también se indica una endonucleasa manipulada o un homólogo de Cas9 que es capaz de procesar la secuencia de ácidos nucleicos diana. En una realización particular del método de la invención, Cas9 puede inducir una escisión en la secuencia diana de ácido nucleico que puede corresponderse con o bien una rotura bicatenaria o bien una rotura monocatenaria. La variante de Cas9 puede ser una endonucleasa Cas9 que no existe naturalmente en la naturaleza y que se obtiene por ingeniería de proteínas o por mutagénesis al azar. Variantes de Cas9 según el método de la invención pueden obtenerse, por ejemplo, por mutaciones, es decir, deleciones de, o inserciones o

sustituciones de al menos un resto en la secuencia de aminoácidos de una endonucleasa Cas9 de *S. pyogenes* (COG3513 - SEQ ID NO. 3). En el método de la presente invención, tales variantes de Cas9 siguen siendo funcionales, es decir, retienen la capacidad de procesamiento de una secuencia de ácidos nucleicos diana. La variante de Cas9 también puede ser homólogos de Cas9 de *S. pyogenes* que pueden comprender delecciones de, o inserciones o sustituciones de, al menos un resto dentro de la secuencia de aminoácidos de Cas9 de *S. pyogenes*.

También puede hacerse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar al producto final, a condición de que la construcción final posea la actividad deseada, en particular la capacidad de unión a un ARN guía o secuencia diana de ácido nucleico.

El motivo RuvC/RNasa H incluye proteínas que muestran amplios espectros de funciones nucleolíticas, que actúan tanto en ARN como ADN (RNasa H, RuvC, ADN transposasas e integrasas retrovirales y dominio PIWI de proteínas Argonaut). En el método de la presente invención, el dominio catalítico RuvC de la proteína Cas9 (SEQ ID NO. 4) puede caracterizarse por el motivo de secuencia: D-[I/L]-G-X-X-S-X-G-W-A, en la que X representa uno cualquiera de los 20 aminoácidos naturales y [I/L] representa isoleucina o leucina (SEQ ID NO: 1). En otros términos, el método de la presente invención se refiere a la variante de Cas9 que comprende al menos la secuencia D-[I/L]-G-X-X-S-X-G-W-A, en la que X representa uno cualquiera de los 20 aminoácidos naturales y [I/L] representa isoleucina o leucina (SEQ ID NO: 1).

El motivo HNH es característico de muchas nucleasas que actúan sobre ADN bicatenario que incluyen colicinas, enzimas de restricción y endonucleasas de recirculación. El dominio HNH (SMART ID: SM00507, nomenclatura SCOP: familia HNH) está asociado con una variedad de proteínas de unión a ADN, que realizan una variedad de funciones de unión y corte (Gorbalenya 1994; Shub, Goodrich-Blair et al. 1994). Varias de las proteínas son proteínas hipotéticas o supuestas de función no bien definida. Aquellas con función conocida participan en una variedad de procesos celulares que incluyen toxicidad bacteriana, funciones de recirculación en intrones e inteínas de los grupos I y II, recombinación, transposición de ADN controlada por el desarrollo, encapsidación en fago y actividad de endonucleasa de restricción (Dalgaard, Klar et al. 1997). Estas proteínas se encuentran en virus, arqueobacterias, eubacterias y eucariotas. De forma interesante, al igual que con los motivos LAGLI-DADG y GIY-YIG, el motivo HNH está frecuentemente asociado a dominios de endonucleasa de elementos auto-propagadores como inteínas, intrones del grupo I y grupo II (Gorbalenya 1994; Dalgaard, Klar et al. 1997). El dominio HNH puede caracterizarse por presencia de un resto Asp/His conservado flanqueado por restos conservados His (extremo amino) y His/Asp/Glu (extremo carboxi) a alguna distancia. Un número sustancial de estas proteínas también puede tener un motivo CX2C en cualquier lado del resto Asp/His central. Estructuralmente, el motivo HNH aparece como una horquilla central de hebra β retorcida, que están flanqueadas en cada lado por una hélice α (Kleanthous, Kuhlmann et al. 1999). El gran dominio HNH de Cas9 se representa por SEQ ID NO. 5. En el método de la presente invención, el motivo HNH puede caracterizarse por el motivo de secuencia: Y-X-X-D-H-X-X-P-X-S-X-X-D-X-S, en la que X representa uno cualquiera de los 20 aminoácidos naturales (SEQ ID NO: 2). El método de la presente invención puede implicar una variante de Cas9 que comprende al menos la secuencia Y-X-X-D-H-X-X-P-X-S-X-X-D-X-S en la que X representa uno cualquiera de los 20 aminoácidos naturales (SEQ ID NO: 2).

La presente invención puede ser de particular interés para hacer fácilmente modificaciones de genes múltiplex dirigidas y para crear un sistema de nucleasa inducible introduciendo el ARN guía a las células de Cas9. Con el fin de la presente invención, los inventores han establecido que la proteína Cas9 puede dividirse en dos dominios RuvC y HNH de Cas9 divididos separados que pueden procesar la secuencia de ácidos nucleicos diana junto o por separado con el ARN guía.

También los dominios RuvC y HNH de diferentes endonucleasas guiadas por ARN u homólogos de Cas pueden ensamblarse para mejorar la eficiencia o especificidad de nucleasas. Los dominios de diferentes especies pueden estar o bien divididos en dos proteínas o bien fusionados entre sí para formar una proteína Cas de variante. El sistema dividido de Cas9 se considera particularmente adecuado para un método inducible de direccionamiento de genoma y para evitar el posible efecto tóxico de la expresión en exceso de Cas9 dentro de la célula. De hecho, como se desvela en el presente documento, un primer dominio de Cas9 dividido puede introducirse en la célula. Entonces, la parte dividida complementaria de Cas9 puede introducirse en la célula, de forma que las dos partes divididas se reensamblen en la célula para reconstituir una proteína Cas9 funcional en el momento deseado.

La reducción del tamaño de Cas9 dividida en comparación con Cas9 no mutante facilita la vectorización y la administración en la célula, por ejemplo, usando péptidos que penetran en la célula. El reordenar dominios de diferentes proteínas Cas permite modular la especificidad y actividad de nucleasas, por ejemplo, eligiendo como diana motivos PAM que son ligeramente diferentes de Cas9 de *S. pyogenes*.

Sistema de Cas9 dividido

La caracterización previa de los dominios RuvC y HNH ha dado pie a los inventores a manipular la proteína Cas9 para crear la proteína Cas9 dividida. Sorprendentemente, los inventores mostraron que estas dos Cas9 divididas podrían procesar juntas o por separado la diana de ácido nucleico. Esta observación permite desarrollar un nuevo sistema de Cas9 usando proteína de Cas9 dividida. Cada dominio de Cas9 dividida puede prepararse y usarse por

separado. Así, este sistema dividido muestra varias ventajas para la vectorización y administración de la endonucleasa guiada por ARN en linfocitos T, permitiendo la administración de una proteína más corta y/o inactiva, y es particularmente adecuada para inducir ingeniería del genoma en linfocitos T en el momento deseado y así limitar la posible toxicidad de una nucleasa Cas9 integrada.

Por "Cas9 dividida" se indica aquí una forma reducida o truncada de una proteína Cas9 o variante de Cas9, que comprende o bien un dominio RuvC o bien HNH, pero no ambos de estos dominios. Tal "Cas9 dividida" puede usarse independientemente con ARN guía o de un modo complementario como, por ejemplo, una Cas9 dividida que proporciona un dominio RuvC y otra que proporciona el dominio HNH. Pueden usarse diferentes endonucleasas guiadas por ARN divididas juntas que tienen ya sea dominios RuvC y/o HNH.

Cada dominio dividido de Cas9 puede derivarse de los mismos homólogos de Cas9 o de diferentes. Se han identificado muchos homólogos de Cas9 en bases de datos del genoma.

En el presente documento se desvela un método de ingeniería del genoma con las etapas de:

- (a) seleccionar una secuencia de ácidos nucleicos diana, opcionalmente que comprende un motivo PAM en la célula;
- (b) proporcionar un ARN guía que comprende una secuencia complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana;
- (c) proporcionar al menos un dominio de Cas9 dividida;
- (d) introducir en la célula el ARN guía y dicho(s) dominio(s) de Cas9 dividida, de forma que el (los) dominio(s) de Cas9 dividida procesen la secuencia de ácidos nucleicos diana en la célula.

Dichos dominios de Cas9 dividida (dominios RuvC y HNH) pueden ser simultáneamente o secuencialmente introducidos en la célula de forma que el (los) dominio(s) de Cas9 dividida procesen la secuencia de ácidos nucleicos diana en la célula. Dichos dominios de Cas9 dividida y ARN guía pueden introducirse en la célula usando métodos de transfección como se describen más adelante.

En otro aspecto del método de la invención, solo un dominio de Cas9 dividida, denominada Cas9 compacta, se introduce en dicha célula. De hecho, sorprendentemente, los inventores mostraron que el dominio de Cas9 dividida que comprende el motivo RuvC como se ha descrito anteriormente es capaz de escindir una secuencia de ácidos nucleicos diana independientemente del dominio dividido que comprende el motivo HNH. Así, podría establecerse que el ARN guía no necesita la presencia del dominio HNH para unirse a la secuencia de ácidos nucleicos diana y es suficientemente estable para ser unido por el dominio dividido RuvC. En una realización preferida, dicho dominio de Cas9 dividida solo es capaz de cortar dicha secuencia de ácidos nucleicos diana.

Cada dominio dividido puede fusionarse con al menos un dominio activo en el extremo N y/o extremo C, dicho dominio activo puede seleccionarse del grupo que consiste en: nucleasa (por ejemplo, endonucleasa o exonucleasa), polimerasa, cinasa, fosfatasa, metilasa, desmetilasa, acetilasa, desacetilasa, topoisomerasa, integrasa, transposasa, ligasa, helicasa, recombinasa, activador transcripcional (por ejemplo, VP64, VP16), inhibidor transcripcional (por ejemplo, KRAB), enzima de procesamiento de extremos de ADN (por ejemplo, Trex2, Tdt), molécula indicadora (por ejemplo, proteínas fluorescentes, lacZ, luciferasa).

El dominio HNH es responsable del corte de una hebra del ADN bicatenario diana y el dominio de pliegue de RNasa H de tipo RuvC participa en el corte de la otra hebra (que comprende el motivo PAM) de la diana de ácido nucleico bicatenario (Jinek, Chilinski et al. 2012). Sin embargo, en Cas9 no mutante, estos dos dominios producen la escisión roma del ADN invasivo dentro de la misma secuencia diana (protoespaciador) en la vecindad inmediata del PAM (Jinek, Chilinski et al. 2012). Cas9 puede ser una nickasa e induce un evento de corte dentro de diferentes secuencias diana.

Como ejemplo no limitante, Cas9 o Cas9 dividida puede comprender mutación (mutaciones) en los restos catalíticos de cualquiera de los dominios de tipo HNH o RuvC, para inducir un evento de corte dentro de diferentes secuencias diana. Como ejemplo no limitante, los restos catalíticos de la proteína Cas9 son aquellos correspondientes a los aminoácidos D10, D31, H840, H868, N882 y N891 o posiciones alineadas usando el método CLUSTALW en homólogos de los miembros de la familia Cas. Cualquiera de estos restos puede sustituirse por cualquier otro aminoácido, preferentemente por el resto alanina. Mutación en los restos catalíticos significa o bien sustitución por otros aminoácidos, o bien delección o adición de aminoácidos que inducen la inactivación de al menos uno del dominio catalítico de Cas9. (Véase.. En una realización particular del método de la invención, Cas9 o Cas9 dividida pueden comprender una o varias de las mutaciones anteriores. En otra realización particular del método de la invención, Cas9 dividida comprende solo uno de los dos dominios catalíticos RuvC y HNH. En el método de la presente invención, puede usarse Cas9 de diferentes especies, homólogos de Cas9, variante manipulada de Cas9 y funcional de la misma. El método de la invención prevé el uso de cualquier endonucleasa guiada por ARN o variantes de endonucleasas guiadas por ARN divididas para realizar la escisión de ácidos nucleicos en una secuencia genética de interés.

Preferentemente, dichas variantes de Cas9 tienen una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 %, e incluso más preferentemente el 95 % de identidad con Cas9 de *S. Pyogenes* (COG3513 - SEQ ID NO. 3).

En otro aspecto del método de la presente invención, Cas9 o Cas9 dividida carecen de actividad endonucleolítica. La Cas9 o Cas9 dividida resultante se co-expresa con ARN guía diseñado para comprender una secuencia complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos diana. La expresión de Cas9 que carece de actividad endonucleolítica produce el silenciamiento específico del gen de interés. Este sistema se llama interferencia por CRISPR (iCRISPR) (Qi, Larson et al. 2013). Por silenciamiento se indica que el gen de interés no se expresa en una forma de proteína funcional. El silenciamiento puede producirse en la etapa transcripcional o traduccional. Según el método de la presente invención, el silenciamiento puede producirse bloqueando directamente la transcripción, más particularmente bloqueando la elongación de la transcripción o dirigiendo los motivos que actúan en cis dentro de cualquier promotor, bloqueando estéricamente la asociación de sus factores de transcripción que actúan en trans relacionados. La Cas9 que carece de actividad endonucleolítica comprende tanto dominios HNH como RuvC no funcionales. En particular, el polipéptido Cas9 o Cas9 dividida comprende inactivar mutaciones en los restos catalíticos de cualquiera de los dominios de tipo RuvC o HNH. Por ejemplo, los restos catalíticos requeridos para la actividad de Cas9 de escisión pueden ser D10, D31, H840, H865, H868, N882 y N891 de Cas9 de *S. Pyogenes* (COG3513 - SEQ ID NO. 3) o posiciones alineadas usando el método de CLUSTALW en homólogos de miembros de la familia Cas. Los restos comprendidos en motivos HNH o RuvC pueden ser aquellos descritos en el párrafo anterior. Cualquiera de estos restos puede sustituirse por uno cualquiera de los otros aminoácidos, preferentemente por el resto alanina. La mutación en los restos catalíticos significa o bien sustitución por otros aminoácidos, o bien delección o adición de aminoácidos que inducen la inactivación de al menos uno del dominio catalítico de Cas9.

En otra realización particular del método de la invención, Cas9 o cada uno de los dominios divididos puede fusionarse con al menos un dominio activo en el extremo N y/o extremo C. Dicho dominio activo puede seleccionarse del grupo que consiste en: nucleasa (por ejemplo, endonucleasa o exonucleasa), polimerasa, cinasa, fosfatasa, metilasa, desmetilasa, acetilasa, desacetilasa, topoisomerasa, integrasa, transposasa, ligasa, helicasa, recombinasa, activador transcripcional (por ejemplo, VP64, VP16), inhibidor transcripcional (por ejemplo, KRAB), enzima de procesamiento de extremos de ADN (por ejemplo, Trex2, Tdt), molécula indicadora (por ejemplo, proteínas fluorescentes, lacZ, luciferasa).

Actividad de nucleasa inducible para el sistema de endonucleasa guiada por ARN/ARN guiado

Dada la posible toxicidad de la endonucleasa guiada por ARN dentro de los linfocitos T, debido a posibles interacciones inespecíficas con diversos ARN en la célula y direccionamiento inespecífico esperable, los inventores han buscado soluciones para inducir la actividad de nucleasa de la endonucleasa guiada por ARN transitoriamente, idealmente durante la vida útil del ARN guía en las células.

Como solución primaria, la endonucleasa guiada por ARN puede expresarse en una forma estabilizada o inactiva, que se vuelve activa tras la activación por una enzima producida por el linfocito T o la desestabilización de su estructura de polipéptido dentro del linfocito T. Puede obtenerse estabilidad de proteínas condicional, por ejemplo, por fusión de la endonucleasa con una proteína estabilizante / desestabilizante basada, como ejemplo no limitante, en el sistema FKBP/rapamicina, donde el cambio conformacional de proteínas se indujo por una molécula pequeña.

La dimerización química o inducida por la luz de una proteína asociada fusionada con la proteína endonucleasa también puede usarse para bloquear o desbloquear la endonucleasa.

En la situación donde la endonucleasa guiada por ARN se divide en dos polipéptidos como se sugirió antes, cada división puede fusionarse con una proteína asociada. Ambas proteínas asociadas se dimerizarán tras la adición de una molécula pequeña y reconstituirán, en células vivas, una endonucleasa activa. Tales sistemas pueden basarse, como ejemplo no limitante, en el uso de FKBP/FRB como componentes de dimerización y rapamicina como molécula pequeña. Como otro ejemplo, la proteína que puede experimentar un cambio conformacional importante tras la unión a una molécula pequeña o metabolito insertado en la proteína endonucleasa (1 cadena de polipéptidos compuesta de 2 "divisiones"). La unión (o no) de la molécula pequeña cambiará la Cas9 entre una conformación activa e inactiva. Tales sistemas pueden basarse, como ejemplo no limitante, en el uso de calmodulina y Ca²⁺.

Cada mitad de la endonucleasa dividida también puede fusionarse con una proteína asociada sensible a la luz.

Tales sistemas pueden basarse, como ejemplo no limitante, en luz azul con criptocromo 2 (CRY2) y CIB1 como componentes de fusión o en luz ultravioleta con los componentes de fusión UVR8 y COP1 del fotorreceptor de ultravioleta-B. Pueden combinarse tanto luz como productos químicos usando también, por ejemplo, los componentes fitocromo B y PIF6 (asociación de luz roja, disociación de luz roja lejana) y un cromóforo de PCB exógeno.

ARN guía

El método de la presente invención comprende proporcionar un ARN guía manipulado. El ARN guía se corresponde con una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia complementaria. Preferentemente, dicho ARN guía se corresponde con un ARNcr y ARNcrtra que pueden usarse por separado o fusionados juntos.

En el sistema CRISPR de tipo II natural, las secuencias que se dirigen a ARN que se dirige a CRISPR (ARNcr) se transcriben de secuencias de ADN conocidas como protoespaciadores. Los protoespaciadores están agrupados en el genoma bacteriano en un grupo llamado una matriz CRISPR. Los protoespaciadores son secuencias cortas (~20 pb) de ADN foráneo conocidas separadas por una repetición palindrómica corta y se mantienen como un registro contra futuros encuentros. Para crear el ARNcr, la matriz CRISPR se transcribe y el ARN se procesa para separar las secuencias de reconocimiento individuales entre las repeticiones. El locus de CRISPR que contiene espaciador se transcribe en un pre-ARNcr largo. El procesamiento del transcrito de la matriz CRISPR (pre-ARNcr) en ARNcr individual depende de la presencia de un ARNcr de activación en trans (ARNcrtra) que tiene la secuencia complementaria a la repetición palindrómica. El ARNcrtra se hibrida con las regiones de repetición que separan los espaciadores del pre-ARNcr, iniciando la escisión de ARNbc por RNasa III endógena, que va seguido de un segundo evento de escisión dentro de cada espaciador por Cas9, produciendo ARNcr maduro que queda asociado al ARNcrtra y Cas9 y forman el complejo Cas9-ARNcrtra:ARNcr. El ARNcr manipulado con ARNcrtra es capaz de ser dirigido a una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada, obviando la necesidad de RNasa III y el procesamiento de ARNcr en general (Jinek, Chilinski et al. 2012).

En el método de la presente invención, se manipula ARNcr para que comprenda una secuencia complementaria a una porción de un ácido nucleico diana de forma que sea capaz de ser dirigida, preferentemente escindiendo la secuencia de ácidos nucleicos diana. En una realización particular, el ARNcr comprende una secuencia de 5 a 50 nucleótidos, preferentemente 12 nucleótidos, que es complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana. En una realización más particular, el ARNcr es una secuencia de al menos 30 nucleótidos que comprende al menos 10 nucleótidos, preferentemente 12 nucleótidos, complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana.

En otro aspecto, el ARNcr puede ser manipulado para comprender una secuencia más grande complementaria a un ácido nucleico diana. De hecho, los inventores mostraron que el dominio RuvC de Cas9 dividida es capaz de escindir la secuencia de ácidos nucleicos diana solo con un ARN guía. Así, el ARN guía puede unirse a la secuencia de ácidos nucleicos diana en ausencia del dominio HNH de Cas9 dividida. El ARNcr puede diseñarse para comprender una secuencia más grande complementaria, preferentemente superior a 20 pb, para aumentar la hibridación entre el dúplex de ADN-ARN sin la necesidad de tener el efecto de estabilidad de la unión del dominio dividido HNH. Así, el ARNcr puede comprender una secuencia complementaria a una secuencia de ácidos nucleicos diana de más de 20 pb. Tal ARNcr permite aumentar la especificidad de la actividad de Cas9.

El ARNcr también puede comprender una secuencia complementaria, seguida de 4-10 nucleótidos en el extremo 5' para mejorar la eficiencia de direccionamiento (Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013). En la realización preferida, la secuencia complementaria al ARNcr va seguida en el extremo 3' por una secuencia de ácidos nucleicos llamada secuencias de repetición o secuencia de extensión de 3'.

Puede usarse simultáneamente la co-expresión de varios ARNcr con distintas regiones complementarias a dos genes diferentes dirigidos a ambos genes. Así, en una realización particular, el ARNcr puede manipularse para reconocer diferentes secuencias de ácidos nucleicos diana simultáneamente. En este caso, el mismo ARNcr comprende al menos dos secuencias distintas complementarias a una porción de las secuencias de ácidos nucleicos diana diferentes. En una realización preferida, dichas secuencias complementarias están separadas por una secuencia de repetición.

Como realización adicional del método de la presente invención, dicho ARN guía es soportado por un ácido nucleico peptídico (PNA) o ácido nucleico bloqueado (LNA), en particular para mejorar la estabilidad de dicho ARN guía en los linfocitos T.

Motivo PAM

Cualquier posible secuencia de ácidos nucleicos diana seleccionada en la presente invención puede tener una secuencia específica en su extremo 3', llamada el motivo adyacente a protoespaciador o motivo asociado a protoespaciador (PAM). El PAM está presente en la secuencia de ácidos nucleicos elegida como diana, pero no en el ARNcr que se produce para elegirla como diana. Preferentemente, el motivo adyacente a protoespaciador (PAM) puede corresponderse con 2 a 5 nucleótidos que empiezan inmediatamente o en la proximidad del protoespaciador en el extremo distal conductor. La secuencia y la localización del PAM varían entre los diferentes sistemas. El motivo PAM puede ser, por ejemplo, NNAGAA, NAG, NGG, NGGNG, AWG, CC, CC, CCN, TCN, TTC como ejemplos no limitantes (Shah SA, RNA biology 2013). Diferentes sistemas de tipo II tienen requisitos de PAM diferentes. Por ejemplo, el sistema de *S. pyogenes* requiere una secuencia de NGG, donde N puede ser cualquier nucleótido. Los sistemas de tipo II de *S. thermophilus* requieren NGGNG (Horvath y Barrangou 2010) y NNAGAAW (Deveau, Barrangou et al. 2008), mientras que diferentes sistemas de *S. mutant* toleran NGG o NAAR (Van der Ploeg 2009).

El PAM no está limitado a la región adyacente al protoespaciador, sino que también puede ser parte del protoespaciador (Mojica, Diez-Villasenor et al. 2009). En una realización particular, la proteína Cas9 puede ser manipulada para no reconocer ningún motivo PAM o para reconocer un motivo PAM no natural. En este caso, la secuencia diana seleccionada puede comprender un motivo PAM más pequeño o más grande con cualquier combinación de aminoácidos. En una realización preferida, la secuencia diana seleccionada comprende un motivo PAM que comprende al menos 3, preferentemente, 4, más preferentemente 5 nucleótidos reconocidos por la variante de Cas9.

Puede usarse simultáneamente la co-expresión de varios ARNcr con distintas regiones complementarias a dos genes diferentes que se dirigieron a ambos genes. Así, en una realización particular, el ARNcr puede manipularse para reconocer diferentes secuencias de ácidos nucleicos diana simultáneamente. En este caso, el mismo ARNcr comprende al menos dos secuencias distintas complementarias a una porción de las diferentes secuencias de ácidos nucleicos diana. En una realización preferida, dichas secuencias complementarias están separadas por una secuencia de repetición.

El ARNcr como se desveló en el presente documento también puede modificarse para aumentar la estabilidad de la estructura secundaria y/o su afinidad de unión por Cas9. En una realización particular, el ARNcr puede comprender un fosfato 2',3'-cíclico. El extremo del fosfato 2',3'-cíclico parece estar implicado en muchos procesos celulares, es decir, corte y empalme de ARNt, escisión endonucleolítica por varias ribonucleasas, en auto-escisión por ribozima de ARN y en respuesta a diversos estreses celulares que incluyen acumulación de proteína no plegada en el retículo endoplásmico y estrés oxidativo (Schutz, Hesselberth et al. 2010). Los inventores han especulado que el fosfato 2',3'-cíclico potencia la estabilidad del ARNcr o su afinidad/especificidad por Cas9. Así, en el presente documento se desvela el ARNcr modificado que comprende un fosfato 2',3'-cíclico, y los métodos de ingeniería del genoma basados en el sistema CRISPR/cas (Jinek, Chilinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013) usando el ARNcr modificado.

El ARN guía también puede comprender un ARN de CRISPR de activación en trans (ARNcrtra). Los ARN de CRISPR de activación en trans proporcionados en el presente documento se caracterizan por una secuencia anti-repetición capaz de apareamiento de bases con al menos una parte de la secuencia de extensión de 3' de ARNcr para formar un ARNcrtra:ARNcr también llamado ARN guía (ARNg). El ARNcrtra comprende una secuencia complementaria a una región del ARNcr. Puede usarse un ARN guía que comprende una fusión de ARNcr y ARNcrtra que forma una horquilla que imita el complejo ARNcrtra-ARNcr (Jinek, Chilinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013) para dirigir la escisión de ácido nucleico diana mediada por endonucleasa Cas9. El ARN guía puede comprender dos secuencias distintas complementarias a una porción de las dos secuencias de ácidos nucleicos diana, preferentemente separadas por una secuencia de repetición.

Recombinación homóloga

Se sabe que las roturas endonucleolíticas estimulan la tasa de recombinación homóloga. Por tanto, también en el presente documento se desvela un método de inducción del direccionamiento de genes homólogos en la secuencia diana de ácido nucleico usando una endonucleasa guiada por ARN. Este método puede comprender además la etapa de proporcionar un ácido nucleico exógeno a la célula (por ejemplo, ADN donante) que comprende al menos una secuencia homóloga a una porción de la secuencia de ácidos nucleicos diana, de forma que se produzca la recombinación homóloga entre la secuencia de ácidos nucleicos diana y dicho ácido nucleico exógeno.

Dicho ácido nucleico exógeno puede comprender primeras y segundas porciones que son homólogas a la región 5' y 3' de la secuencia de ácidos nucleicos diana, respectivamente. Dicho ácido nucleico exógeno en estas realizaciones también comprende una tercera porción situada entre la primera y la segunda porción que no comprende homología con las regiones 5' y 3' de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Tras la escisión de la secuencia de ácidos nucleicos diana, se estimula un evento de recombinación homóloga entre la secuencia de ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico exógeno. Preferentemente, se usan secuencias homólogas de al menos 50 pb, preferentemente superiores a 100 pb, y más preferentemente superiores a 200 pb, dentro de dicha matriz donante. Por tanto, la secuencia homóloga es preferentemente de 200 pb a 6000 pb, más preferentemente de 1000 pb a 2000 pb. De hecho, las homología de ácidos nucleicos compartidas se localizan en regiones que flanquean en la dirección 5' y en la dirección 3' el sitio de la rotura y la secuencia de ácidos nucleicos que va a introducirse debe localizarse entre los dos brazos.

Dependiendo de la localización de la secuencia de ácidos nucleicos diana en la que ha ocurrido el evento de rotura, tal ácido nucleico exógeno puede usarse para inactivar un gen, por ejemplo cuando el ácido nucleico exógeno se localiza dentro del marco de lectura abierto de dicho gen, o para introducir nuevas secuencias o genes de interés.

Inserciones de secuencia usando tal ácido nucleico exógeno pueden usarse para modificar un gen existente elegido como diana, por corrección o sustitución de dicho gen (intercambio de alelo como ejemplo no limitante), o para regular por incremento o disminución la expresión del gen elegido como diana (intercambio de promotor como ejemplo no limitante), dicha corrección o sustitución de gen elegido como diana.

Métodos de administración

Los inventores han considerado cualquier medio conocido en la técnica para permitir la administración dentro de células o compartimentos subcelulares de agentes/productos químicos y pueden usarse moléculas (proteínas y ácidos nucleicos) que incluyen medios de administración liposómica, vehículos poliméricos, vehículos químicos, lipoplejos, poliplejos, dendrímeros, nanopartículas, emulsión, vía natural de endocitosis o fagocitosis como ejemplos no limitantes, además de métodos físicos tales como electroporación.

Según la invención, los polinucleótidos que codifican la endonucleasa guiada por ARN de la presente invención se transfectan en forma de ARNm, que se introduce directamente en las células, por ejemplo por electroporación. Los inventores han determinado diferentes condiciones óptimas para la electroporación de ARNm en el linfocito T presentado en la Tabla 1. El inventor usó la tecnología de Cytopulse que permite, usando campos eléctricos pulsados, permeabilizar transitoriamente células vivas para la administración de material en las células. La tecnología, basada en el uso de formas de onda de electroporación PulseAgile (Harvard Apparatus, Holliston, MA 01746 USA) concede el control preciso de la duración de pulsos, intensidad, además del intervalo entre pulsos (patente de EE.UU. 6.010.613 y documento WO2004083379). Todos estos parámetros pueden modificarse con el fin de alcanzar las mejores condiciones para la alta eficiencia de transfección con mortalidad mínima. Básicamente, los primeros pulsos de campo eléctrico permiten la formación de poros, mientras que los posteriores pulsos de campo eléctrico más bajos permiten mover el polinucleótido en la célula. En un aspecto de la presente invención, los inventores describen las etapas que conducen a lograr >95 % de eficiencia de transfección de ARNm en linfocitos T, y el uso del protocolo de electroporación para expresar transitoriamente diferentes tipos de proteínas en linfocitos T. En particular, la invención se refiere a un método de transformación de linfocito T que comprende poner en contacto dicho linfocito T con ARN y aplicar al linfocito T una secuencia de Agile Pulse que consiste en:

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

En una realización particular, el método de transformación del linfocito T que comprende poner en contacto dicho linfocito T con ARN y aplicar al linfocito T una secuencia de Agile Pulse consiste en:

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

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

Tabla 1: Diferentes programas de Cytopulse usados para determinar la tensión mínima requerida para la electroporación en linfocitos T derivados de CMSP.												
Programa de Cytopulse	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
	Pulsos	V	duración (ms)	Intervalo (ms)	Pulsos	V	duración (ms)	Intervalo (ms)	Pulsos	V	duración (ms)	Intervalo (ms)
1	1	600	0,1	0,2	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2
2	1	900	0,1	0,2	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
3	1	1200	0,1	0,2	1	1200	0,1	100	4	130	0,2	2
4	1	1200	0,1	10	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
5	1	900	0,1	20	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2

Los inventores han mostrado que tras la transferencia en el citoplasma celular, la endonucleasa guiada por ARN retiene su actividad y puede asociarse fácilmente al ARN guía.

Puede fusionarse una NLS, una secuencia de aminoácidos que actúa conduciendo la proteína al núcleo celular mediante el complejo de poros nucleares, con la endonucleasa guiada por ARN con el fin de mejorar su eficiencia de administración. Normalmente, una NLS consiste en una o más secuencias cortas de aminoácidos positivamente cargados tales como lisinas o argininas tales como aquellas de las proteínas conocidas antígeno T grande de SV40 - PKKKRKV-, nucleoplasmina -KR[PAATKKAGOA]KKKK-, p54 - RIRKKLR-, SOX9 - PRRRK -, NS5A - PPRKKRTVV-.

10 Linfocitos T no alorreactivos:

Los receptores de linfocitos T (TCR) son receptores de la superficie celular que participan en la activación de linfocitos T en respuesta a la presentación de antígeno. El TCR está constituido generalmente de dos cadenas, alfa y beta, que se ensamblan para formar un heterodímero y se asocia con las subunidades transductoras de CD3 para formar el complejo de receptor de linfocitos T presente sobre la superficie celular. Cada cadena alfa y beta del TCR consiste en una región variable (V) y constante (C) del extremo N de tipo inmunoglobulina, un dominio transmembranario hidrófobo y una región citoplasmática corta. En cuanto a las moléculas de inmunoglobulina, la región variable de las cadenas alfa y beta se generan por recombinación V(D)J, creando una gran diversidad de especificidades por antígeno dentro de la población de linfocitos T. Sin embargo, a diferencia de las inmunoglobulinas que reconocen antígeno intacto, los linfocitos T se activan por fragmentos de péptido procesados en asociación con una molécula de MHC, que introduce una dimensión adicional para el reconocimiento del antígeno por linfocitos T, conocido como restricción del MHC. El reconocimiento de las disparidades del MHC entre el donante y el receptor mediante el receptor de linfocitos T conduce a la proliferación de linfocitos T y el posible desarrollo de GVHD. Se ha mostrado que la expresión superficial normal del TCR depende de la síntesis coordinada y el ensamblaje de los siete componentes del complejo (Ashwell y Klusner 1990). La inactivación de TCRalfa o TCRbeta puede producir la eliminación del TCR de la superficie de linfocitos T que previene el reconocimiento del aloantígeno y así GVHD. Sin embargo, la rotura de TCR generalmente produce la eliminación del componente de señalización de CD3 y altera los medios de expansión de linfocitos T adicionales.

Un objetivo importante de la presente invención es el uso de endonucleasa guiada por ARN como se describe previamente en un método de manipulación de linfocitos T no alorreactivos, para su uso en inmunoterapia.

Este método comprende más particularmente las etapas de modificar los linfocitos T como se describe previamente inactivando al menos un componente del receptor de linfocitos T (TCR) usando una endonucleasa guiada por ARN asociada a un ARN guía específico.

El injerto de linfocitos T alogénos es posible inactivando al menos un gen que codifica un componente de TCR. El TCR se convierte en no funcional en las células inactivando el gen TCR alfa y/o el (los) gen(es) TCR beta. La inactivación de TCR en linfocitos T alogénos tiene como objetivo prevenir o reducir GvHD.

Inactivando un gen se pretende que el gen de interés no se expresa en una forma de proteína funcional. En realizaciones particulares, la modificación genética del método se basa en la expresión, en células proporcionadas para ingeniería, de la endonucleasa guiada por ARN de forma que la misma catalice la escisión en un gen elegido como diana inactivando así dicho gen elegido como diana. Las roturas de hebras de ácido nucleico producidas por la endonucleasa son comúnmente reparadas mediante los distintos mecanismos de recombinación homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ). Sin embargo, la NHEJ es un proceso de reparación imperfecto que frecuentemente produce cambios a la secuencia de ADN en el sitio de la escisión. Los mecanismos implican volver a unir lo que queda de los dos extremos de ADN mediante re-ligación directa (Critchlow y Jackson 1998) o mediante la llamada unión de extremos mediada por microhomología (Betts, Brenchley et al. 2003; Ma, Kim et al. 2003). La reparación mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) frecuentemente produce pequeñas inserciones o deleciones y puede usarse para la creación de inactivaciones de genes específicos. Dicha modificación puede ser una sustitución, deleción o adición de al menos un nucleótido. Pueden identificarse y/o seleccionarse por métodos muy conocidos en la materia células en las que se ha producido un evento de mutagénesis inducida por escisión, es decir, un evento de mutagénesis consecutivo a un evento de NHEJ.

Los inventores han determinado secuencias diana apropiadas dentro de los 3 exones que codifican TCR, permitiendo una reducción significativa de la toxicidad, mientras que se retiene la eficiencia de escisión. Las secuencias diana preferidas están indicadas en la Tabla 2 (+ para relación más baja de células negativas para TCR, ++ para relación intermedia, +++ para relación más alta).

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

TCR de exón	Posición	Hebra	Secuencia genómica diana	SEQ ID	eficiencia
Ex1	78	-1	GAGAATCAAAATCGGTGAATAGG	6	+++
Ex3	26	1	TTCAAAACCTGTCAAGTGATTGGG	7	+++
Ex1	153	1	TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG	8	+++
Ex3	74	-1	CGTCATGAGCAGATTAAACCCGG	9	+++
Ex1	4	-1	TCAGGGTTCTGGATATCTGTGGG	10	+++
Ex1	5	-1	GTCAGGGTTCTGGATATCTGTGG	11	+++
Ex3	33	-1	TTCCGAACCCAATCACTGACAGG	12	+++
Ex3	60	-1	TAAACCCGGCCACTTTCAGGAGG	13	+++
Ex1	200	-1	AAAGTCAGATTTGTTGCTCCAGG	14	++
Ex1	102	1	AACAAATGTGTCACAAAGTAAGG	15	++
Ex1	39	-1	TGGATTTAGAGTCTCTCAGCTGG	16	++
Ex1	59	-1	TAGGCAGACAGACTTGTCACTGG	17	++
Ex1	22	-1	AGCTGGTACACGGCAGGGTCAGG	18	++
Ex1	21	-1	GCTGGTACACGGCAGGGTCAGGG	19	++
Ex1	28	-1	TCTCTCAGCTGGTACACGGCAGG	20	++
Ex3	25	1	TTTCAAAACCTGTCAAGTGATTGG	21	++
Ex3	63	-1	GATTAAACCCGGCCACTTTCAGG	22	++
Ex2	17	-1	CTCGACCAGCTTGACATCACAGG	23	++
Ex1	32	-1	AGAGTCTCTCAGCTGGTACACGG	24	++
Ex1	27	-1	CTCTCAGCTGGTACACGGCAGGG	25	++
Ex2	12	1	AAGTTCCTGTGATGTCAAGCTGG	26	++
Ex3	55	1	ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG	27	++
Ex3	86	1	TGCTCATGACGCTGCGGCTGTGG	28	++
Ex1	146	1	ACAAAACCTGTGCTAGACATGAGG	29	+
Ex1	86	-1	ATTTGTTTGAGAATCAAAATCGG	30	+
Ex2	3	-1	CATCACAGGAACCTTTCTAAAAGG	31	+
Ex2	34	1	GTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGG	32	+
Ex3	51	-1	CCACTTTCAGGAGGAGGATTCGG	33	+
Ex3	18	-1	CTGACAGGTTTTGAAAGTTTAGG	34	+
Ex2	43	1	AGCTTTGAAACAGGTAAGACAGG	35	+
Ex1	236	-1	TGGAATAATGCTGTTGTTGAAGG	36	+
Ex1	182	1	AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG	37	+
Ex3	103	1	CTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG	38	+
Ex3	97	1	CTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGG	39	+
Ex3	104	1	TGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGG	40	+
Ex1	267	1	CTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGG	41	+
Ex1	15	-1	ACACGGCAGGGTCAGGGTTCTGG	42	+
Ex1	177	1	CTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGG	43	+
Ex1	256	-1	CTGGGGAAGAAGGTGTCTTCTGG	44	+
Ex3	56	1	TCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGG	45	+
Ex3	80	1	TTAATCTGCTCATGACGCTGCGG	46	+
Ex3	57	-1	ACCCGGCCACTTTCAGGAGGAGG	47	+
Ex1	268	1	TTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGG	48	+
Ex1	266	-1	CTTACCTGGGCTGGGGAAGAAGG	49	+
Ex1	262	1	GACACCTTCTTCCCCAGCCCAGG	50	+
Ex3	102	1	GCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGG	51	+
Ex3	51	1	CCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGG	52	+

Método de manipulación de linfocitos T resistentes a fármacos:

Para mejorar la terapia del cáncer y el injerto selectivo de linfocitos T alogénos, la resistencia a fármaco puede ser conferida a los linfocitos T manipulados para protegerlos de los efectos secundarios tóxicos de la quimioterapia o agentes inmunosupresores. De hecho, los inventores han observado que la mayoría de los pacientes se trataron con quimioterapia y agentes inmunosupresores como un tratamiento de referencia, antes de los ensayos que implican la inmunoterapia de linfocitos T. También encontraron que podrían aprovecharse de estos tratamientos para ayudar en la selección de los linfocitos T manipulados, bien añadiendo fármacos de quimioterapia en medios de cultivo para la expansión de las células *ex vivo* antes del tratamiento, o bien obteniendo una expansión selectiva de los linfocitos T manipulados *in vivo* en pacientes bajo quimioterapia o tratamientos inmunosupresores.

También la resistencia a fármaco de linfocitos T también permite su enriquecimiento *in* o *ex vivo*, ya que los linfocitos T que expresan el gen de resistencia a fármaco sobrevivirán y se multiplicarán con respecto a células sensibles a fármaco. En particular, en el presente documento se desvela un método de manipulación de linfocitos T alogénos y de resistencia a fármaco resistentes para inmunoterapia que comprende:

- (a) Proporcionar un linfocito T;
- (b) Seleccionar al menos un fármaco;
- (c) Modificar el linfocito T para conferir resistencia a fármaco a dicho linfocito T;
- (d) Expandir dicho linfocito T modificado en presencia de dicho fármaco, y opcionalmente las etapas precedentes pueden combinarse con las etapas previamente descritas de:
- (e) Modificar dicho linfocito T inactivando al menos un gen que codifica un componente de receptor de linfocitos T (TCR);
- (f) Clasificar los linfocitos T transformados, que no expresan TCR sobre su superficie celular;

Así, según un aspecto del método de la presente invención, el método comprende la etapa de inactivar al menos un gen que codifica un componente de receptor de linfocitos T (TCR), mientras que se modifica adicionalmente dicho linfocito T para conferir una resistencia a un fármaco, más particularmente un agente de quimioterapia. La resistencia a un fármaco puede ser conferida a un linfocito T expresando un gen de resistencia a fármaco. Se han identificado alelos de variante de varios genes tales como dihidrofolato reductasa (DHFR), inosina monofosfato deshidrogenasa 2 (IMPDH2), calcineurina o metilguanina transferasa (MGMT) que confieren resistencia a fármaco a una célula. Dicho gen de resistencia a fármaco puede expresarse en la célula bien introduciendo un transgén que codifica dicho gen en la célula o bien integrando dicho gen de resistencia a fármaco en el genoma de la célula por recombinación homóloga.

La resistencia a un fármaco puede ser conferida a un linfocito T inactivando uno o más genes responsables de la sensibilidad de la célula al fármaco (gen(es) sensibilizante(s) a fármaco), tal como el gen de hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HPRT) (Genbank: M26434.1). En particular, HPRT puede inactivarse en linfocitos T manipulados para conferir resistencia a un metabolito citostático, la 6-tioguanina (6TG), que se convierte por HPRT en el nucleótido de tioguanina citotóxico y que se usa actualmente para tratar pacientes con cáncer, en particular leucemias (Hacke, Treger et al. 2013). Otro ejemplo si la inactivación de CD3 normalmente se expresa en la superficie del linfocito T puede conferir resistencia a anticuerpos anti-CD3 tales como teplizumab.

De otro modo, dicha resistencia a fármaco puede conferirse al linfocito T por la expresión de al menos un gen de resistencia a fármaco. Dicho gen de resistencia a fármaco se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica "resistencia" a un agente, tal como un agente quimioterapéutico (por ejemplo, metotrexato). En otras palabras, la expresión del gen de resistencia a fármaco en una célula permite la proliferación de las células en presencia del agente a un grado mayor que la proliferación de una célula correspondiente sin el gen de resistencia a fármaco. Un gen de resistencia a fármaco como se usa en el presente documento puede codificar resistencia a antimetabolito, metotrexato, vinblastina, cisplatino, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos citotóxicos, anti-inmunofilinas, sus análogos o derivados, y similares.

Se han identificado varios genes de resistencia a fármaco que pueden usarse posiblemente para conferir resistencia a fármaco a células elegidas como diana (Takebe, Zhao et al. 2001; Sugimoto, Tsukahara et al. 2003; Zielske, Reese et al. 2003; Nivens, Felder et al. 2004; Bardenheuer, Lehmberg et al. 2005; Kushman, Kabler et al. 2007).

Un ejemplo de gen de resistencia a fármaco también puede ser una forma mutante o modificada de dihidrofolato reductasa (DHFR). La DHFR es una enzima implicada en regular la cantidad de tetrahidrofolato en la célula y es esencial para la síntesis de ADN. Análogos de folato tales como metotrexato (MTX) inhiben DHFR y así se usan como agentes antineoplásicos en la clínica. Se han descrito diferentes formas mutantes de DHFR que tienen elevada resistencia a la inhibición por antifolatos usados en terapia. En una realización particular, el gen de resistencia a fármaco como se usa en el presente documento puede ser una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una forma mutante de DHFR no mutante humana (GenBank: AAH71996.1) que comprende al menos una mutación que confiere resistencia a un tratamiento antifolato, tal como metotrexato. En una realización particular, la forma mutante de DHFR comprende al menos un aminoácido mutado en la posición G15, L22, F31 o F34,

preferentemente en las posiciones L22 o F31 (Schweitzer, Dicker et al. 1990); solicitud internacional WO94/24277; patente de EE.UU. US 6.642.043).

Como se usa en el presente documento, "agente antifolato" o "análogos de folato" se refiere a una molécula dirigida a interferir con la vía metabólica del folato a cierto nivel. Ejemplos de agentes antifolato incluyen, por ejemplo, metotrexato (MTX); aminopterina; trimetrexato (Neutrexin™); edatrexato; ácido N10-propargil-5,8-didesazafólico (CB3717); ZD1694 (Tumodex), ácido 5,8-didesazaisofólico (IAHQ); ácido 5,10-didesazatetrahidrofólico (DDATHF); ácido 5-desazafólico; PT523 (N-alfa-(4-amino-4-desoxipteroil)-N-delta-hemifalolil-L-ornitina); 10-etil-10-desazaaminopterina (DDATHF, lomatrexol); piritrexim; 10-EDAM; ZD1694; GW1843; oemetrexato y PDX (10-propargil-10-desazaaminopterina).

Otro ejemplo de gen de resistencia a fármaco también puede ser una forma mutante o modificada de ionisina-5'-monofosfato deshidrogenasa II (IMPDH2), una enzima limitante de la velocidad en la síntesis *de novo* de nucleótidos de guanosina. La forma mutante o modificada de IMPDH2 es un gen de resistencia inhibidor de IMPDH. Los inhibidores de IMPDH pueden ser ácido micofenólico (MPA) o su profármaco micofenolato mofetilo (MMF). El mutante IMPDH2 puede comprender al menos una, preferentemente dos, mutaciones en el sitio de unión MAP de IMPDH2 humana no mutante (NP_000875.2) que conducen a una resistencia significativamente elevada al inhibidor de IMPDH. Las mutaciones son preferentemente en las posiciones T333 y/o S351 (Yam, Jensen et al. 2006; Sangiolo, Lesnikova et al. 2007; Jonnalagadda, Brown et al. 2013). En una realización particular, el resto de treonina en la posición 333 se sustituye por un resto de isoleucina y el resto de serina en la posición 351 se sustituye por un resto de tirosina.

Otro gen de resistencia a fármaco es la forma mutante de calcineurina. La calcineurina (PP2B) es una fosfatasa de proteína serina/treonina ubicuamente expresada que participa en muchos procesos biológicos y que es esencial para la activación de linfocitos T. La calcineurina es un heterodímero compuesto de una subunidad catalítica (CnA; tres isoformas) y una subunidad reguladora (CnB; dos isoformas). Después de la interacción del receptor de linfocitos T, la calcineurina desfosforila el factor de transcripción NFAT, permitiéndole translocarse al núcleo y activar el gen diana clave tal como IL2. FK506 en complejo con FKBP12, o ciclosporina A (CsA) en complejo con CyPA, bloquean el acceso de NFAT al sitio activo de calcineurina, previniendo su desfosforilación e inhibiendo así la activación de linfocitos T (Brewin, Mancao et al. 2009). El gen de resistencia a fármaco puede ser una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una forma mutante de calcineurina resistente al inhibidor de calcineurina tal como FK506 y/o CsA. En una realización particular, dicha forma mutante puede comprender al menos un aminoácido mutado del heterodímero de calcineurina no mutante a en las posiciones: V314, Y341, M347, T351, W352, L354, K360, preferentemente mutaciones dobles en las posiciones T351 y L354 o V314 y Y341. La correspondencia de posiciones de aminoácidos descritas en el presente documento se expresa frecuentemente en términos de las posiciones de los aminoácidos de la forma del heterodímero de calcineurina humana no mutante (GenBank: ACX34092.1).

En otra realización particular, dicha forma mutante puede comprender al menos un aminoácido mutado del heterodímero de calcineurina no mutante b en las posiciones: V120, N123, L124 o K125, preferentemente mutaciones dobles en las posiciones L124 y K125. La correspondencia de posiciones de aminoácidos descritas en el presente documento se expresa frecuentemente en términos de las posiciones de los aminoácidos de la forma de polipéptido del heterodímero de calcineurina humana no mutante b (GenBank: ACX34095.1).

Otro gen de resistencia a fármaco es O(6)-metilguanina metiltransferasa (MGMT) que codifica alquil guanina transferasa humana (hAGT). La AGT es una proteína de reparación de ADN que confiere resistencia a los efectos citotóxicos de agentes alquilantes, tales como nitrosoureas y temozolomida (TMZ). La 6-bencilguanina (6-BG) es un inhibidor de AGT que potencia la toxicidad de la nitrosourea y se co-administra con TMZ para potenciar los efectos citotóxicos de este agente. Varias formas mutantes de MGMT que codifican variantes de AGT son altamente resistentes a la inactivación por 6-BG, pero retienen su capacidad para reparar el daño de ADN (Maze, Kurpad et al. 1999). En una realización particular, la forma mutante de AGT puede comprender un aminoácido mutado de la posición de AGT no mutante P140 (UniProtKB: P16455).

Otro gen de resistencia a fármaco puede ser el gen de la proteína 1 de multirresistencia a fármaco (MDR1). Este gen codifica una glucoproteína de membrana, conocida como P-glucoproteína (P-GP) implicada en el transporte de los subproductos metabólicos a través de la membrana celular. La proteína P-Gp muestra una amplia especificidad hacia varios agentes de quimioterapia estructuralmente no relacionados. Así, la resistencia a fármaco puede ser conferida a células por la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica MDR-1 (NP_000918).

El gen de resistencia a fármaco también puede ser antibióticos citotóxicos, tales como el gen *ble* o gen *mcrA*. La expresión ectópica del gen *ble* o *mcrA* en una célula inmunitaria da una ventaja selectiva cuando se expone al agente quimioterapéutico, respectivamente la bleomicina o la mitomicina C.

Con respecto a los agentes inmunosupresores, el método de la presente invención proporciona las posibles etapas opcionales de:

- (a) Proporcionar un linfocito T, preferentemente de un cultivo celular o de una muestra de sangre;
- (b) Seleccionar un gen en dicho linfocito T que expresa una diana para un agente inmunosupresor;
- (c) Introducir en dicho linfocito T endonucleasa guiada por ARN capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN, preferentemente por rotura bicatenaria, codificando dicho gen una diana para dicho agente inmunosupresor,
- (d) Expandir dichas células, opcionalmente en presencia de dicho agente inmunosupresor.

En una realización más preferida, dicho método comprende inactivar un componente del receptor de linfocitos T (TCR).

Un agente inmunosupresor es un agente que suprime la función inmunitaria por uno de varios mecanismos de acción. En otras palabras, un agente inmunosupresor es una función desempeñada por un compuesto que es presentada por una capacidad para disminuir el grado y/o la voracidad de una respuesta inmunitaria. Como ejemplo no limitante, un agente inmunosupresor puede ser un inhibidor de calcineurina, una diana de rapamicina, un bloqueante de la cadena α de interleucina-2, un inhibidor de inosina monofosfato deshidrogenasa, un inhibidor de ácido dihidrofólico reductasa, un corticosteroide o un antimetabolito inmunosupresor. Inmunosupresores citotóxicos clásicos actúan inhibiendo la síntesis de ADN. Otros pueden actuar mediante la activación de linfocitos T o inhibiendo la activación de linfocitos cooperadores. El método según la invención permite conferir resistencia inmunosupresora a linfocitos T para inmunoterapia inactivando la diana del agente inmunosupresor en linfocitos T.

Como ejemplos no limitantes, dianas para el agente inmunosupresor pueden ser un receptor para un agente inmunosupresor tal como: CD52, receptor de glucocorticoides (GR), un miembro del gen de la familia FKBP y un miembro del gen de la familia ciclofilina.

En hospedadores inmunocompetentes, células alogénas normalmente son rápidamente rechazadas por el sistema inmunitario del hospedador. Se ha demostrado que leucocitos alogénos presentes en hemoderivados no irradiados persistirán durante no más de 5 a 6 días (Boni, Muranski et al. 2008). Así, para prevenir el rechazo de células alogénas, el sistema inmunitario del hospedador debe ser eficazmente suprimido. Se usan ampliamente esteroides glucocorticoides terapéuticamente para inmunosupresión (Coutinho y Chapman 2011). Esta clase de hormonas esteroideas se une al receptor de glucocorticoide (GR) presente en el citosol de linfocitos T produciendo la translocalización en el núcleo y la unión de motivos de ADN específicos que regulan la expresión de varios genes implicados en el proceso inmunológico. El tratamiento de linfocitos T con esteroides glucocorticoides produce niveles reducidos de producción de citocinas que conducen a anergia de linfocitos T y que interfieren en la activación de linfocitos T. Alemtuzumab, también conocido como CAMPATH1-H, es un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige a CD52, una glucoproteína de 12 aminoácidos asociada a glucosilfosfatidil-inositol (GPI) (Waldmann y Hale 2005). CD52 se expresa a altos niveles en linfocitos T y B y a niveles más bajos en monocitos, mientras que está ausente en granulocitos y precursores de la médula ósea. Se ha mostrado que el tratamiento con Alemtuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra CD52, induce un rápido agotamiento de linfocitos y monocitos circulantes. Se usa frecuentemente en el tratamiento de linfomas de linfocitos T y en ciertos casos como parte de un régimen de acondicionamiento para trasplante. Sin embargo, en el caso de inmunoterapia adoptiva, el uso de fármacos inmunosupresores también tendrá un efecto perjudicial sobre los linfocitos T terapéuticos introducidos. Por tanto, para usar eficazmente un enfoque de inmunoterapia adoptiva en estas condiciones, las células introducidas necesitarían ser resistentes al tratamiento inmunosupresor.

Como una realización preferida de las etapas anteriores, dicho gen de la etapa (b), específico para un tratamiento inmunosupresor, es CD52, y el tratamiento inmunosupresor de la etapa (d) comprende un anticuerpo humanizado que se dirige al antígeno CD52. Como otra realización, dicho gen de la etapa (b), específico para un tratamiento inmunosupresor, es un receptor de glucocorticoides (GR) y el tratamiento inmunosupresor de la etapa d) comprende un corticosteroide tal como dexametasona. Como otra realización, dicho gen diana de la etapa (b), específico para un tratamiento inmunosupresor, es un miembro de gen de la familia de FKBP o una variante del mismo y el tratamiento inmunosupresor de la etapa (d) comprende FK506 también conocido como tacrolimus o fujimicina. Como otra realización, dicho miembro de gen de la familia FKBP es FKBP12 o una variante del mismo. Como otra realización, dicho gen de la etapa (b), específico para un tratamiento inmunosupresor, es un miembro de gen de la familia de ciclofilina o una variante del mismo y el tratamiento inmunosupresor de la etapa (d) comprende ciclosporina.

En una realización particular del método de la invención, la etapa de modificación genética del método se basa en la inactivación de dos genes seleccionados del grupo que consiste en CD52 y GR, CD52 y TCR alfa, CDR52 y TCR beta, GR y TCR alfa, GR y TCR beta, TCR alfa y TCR beta. En otra realización, la etapa de modificación genética

del método se basa en la inactivación de más de dos genes. La modificación genética es preferentemente operada ex vivo usando al menos dos guías de ARN que se dirigen a diferentes genes.

Inactivando un gen se pretende que el gen de interés no se exprese en una forma de proteína funcional.

Manipulación de linfocitos T altamente activos para inmunoterapia

También en el presente documento se desvela un linfocito T aislado obtenido según uno cualquiera de los métodos previamente descritos. Dicho linfocito T puede derivarse de una célula madre. Las células madre pueden ser células madre adultas, células madre embrionarias no humanas, más particularmente células madre no humanas, células madre de sangre del cordón, células progenitoras, células madre de médula ósea, células madre pluripotentes no humanas inducidas, células madre totipotentes no humanas o células madre hematopoyéticas. Células humanas representativas son células CD34+. Los linfocitos T proporcionados en el presente documento pueden seleccionarse del grupo que consiste en linfocitos T inflamatorios, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores o linfocitos T cooperadores. En otra realización, dicha célula puede derivarse del grupo que consiste en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. Antes de la expansión y modificación genética de las células, puede obtenerse una fuente de células de un sujeto mediante una variedad de métodos no limitantes. Los linfocitos T pueden obtenerse de varias fuentes no limitantes, que incluyen células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglio linfático, sangre del cordón, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, líquido ascítico, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. En ciertas realizaciones del presente método de la invención, puede usarse cualquier número de líneas de linfocitos T disponible y conocido para aquellos expertos en la materia. En otra realización, dicha célula puede derivarse de un donante sano, de un paciente diagnosticado con cáncer o de un paciente diagnosticado con una infección. En otra realización, dicha célula es parte de una población mixta de células que presenta diferentes características fenotípicas. También se desvela en el presente documento una línea celular obtenida de un linfocito T transformado según el método previamente descrito. Células modificadas resistentes a un tratamiento inmunosupresor y susceptibles a ser obtenidas por el método previo también se proporcionan en el presente documento.

Puntos de regulación inmunitaria

Se entenderá por aquellos expertos habituales en la materia que el término "puntos de regulación inmunitaria" significa un grupo de moléculas expresadas por linfocitos T. Estas moléculas sirven eficazmente de "frenos" para modular por disminución o inhibir una respuesta inmunitaria. Las moléculas reguladoras inmunitarias incluyen, pero no se limitan a, muerte 1 programada (PD-1, también conocida como PDCD1 o CD279, número de acceso: NM_005018), antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, también conocido como CD152, número de acceso de GenBank AF414120.1), LAG3 (también conocida como CD223, número de acceso: NM_002286.5), Tim3 (también conocida como HAVCR2, número de acceso de GenBank: JX049979.1), BTLA (también conocida como CD272, número de acceso: NM_181780.3), BY55 (también conocida como CD160, número de acceso de GenBank: CR541888.1), TIGIT (también conocida como IVSTM3, número de acceso: NM_173799), LAIR1 (también conocida como CD305, número de acceso de GenBank: CR542051.1), SIGLEC10 (número de acceso de GeneBank: AY358337.1), 2B4 (también conocida como CD244, número de acceso: NM_001166664.1), PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, CD96, CRTAM, SIGLEC7, SIGLEC9, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, TGFBRII, TGFRBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3 que inhiben directamente células inmunitarias. Por ejemplo, CTLA-4 es una proteína de la superficie celular expresada en ciertos linfocitos T CD4 y CD8; cuando está acoplado por sus ligandos (B7-1 y B7-2) sobre células presentadoras de antígenos, se inhiben la activación y función efectora de linfocitos T. Así, la presente invención se refiere a un método de manipulación de linfocitos T, especialmente para inmunoterapia, que comprende modificar genéticamente linfocitos T inactivando al menos una proteína implicada en el punto de regulación inmunitaria, en particular PD1 y/o CTLA-4 o cualquier proteína reguladora inmunitaria referida en la Tabla 3.

Como se desvela en el presente documento, se inactivan al menos dos genes que codifican proteínas reguladoras inmunitarias, seleccionadas del grupo que consiste en: CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, LAG3, HAVCR2, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, TGFBRII, TGFRBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3.

Como se desvela en el presente documento, la inactivación de las anteriores proteínas reguladoras inmunitarias se combina con la inactivación propuesta previa, en particular de componentes de TCR.

Como se desvela en el presente documento, dicho linfocito T manipulado comprende dos genes inactivados seleccionados del grupo que consiste en CD52 y GR, CD52 y TCR alfa, CDR52 y TCR beta, GR y TCR alfa, GR y TCR beta, TCR alfa y TCR beta, PD1 y TCR alfa, PD1 y TCR beta, CTLA-4 y TCR alfa, CTLA-4 y TCR beta, LAG3 y TCR alfa, LAG3 y TCR beta, Tim3 y TCR alfa, Tim3 y TCR beta, BTLA y TCR alfa, BTLA y TCR beta, BY55 y TCR alfa, BY55 y TCR beta, TIGIT y TCR alfa, TIGIT y TCR beta, B7H5 y TCR alfa, B7H5 y TCR beta, LAIR1 y TCR alfa,

LAIR1 y TCR beta, SIGLEC10 y TCR alfa, SIGLEC10 y TCR beta, 2B4 y TCR alfa, 2B4 y TCR beta y/o expresa un CAR o un CAR multi-cadena.

Linfocitos T manipulados que expresan receptores de antígeno quimérico contra células malignas

CAR monocatenario

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

Tabla 3: Lista de genes que codifican proteínas reguladoras inmunitarias.

Vía	Genes que pueden inactivarse en la vía	
Co-receptores inhibitorios	CTLA4 (CD152)	CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22
	PDCD1 (PD-1, CD279)	PDCD1
	CD223 (lag3)	LAG3
	HAVCR2 (tim3)	HAVCR2
	BTLA (cd272)	BTLA
	CD160 (by55)	CD160
	Familia IgSF	TIGIT
		CD96
		CRTAM
	LAIR1(cd305)	LAIR1
Receptores de muerte	TRAIL	TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7
		FADD, FAS
	FAS	
Señalización de citocinas	Señalización de TGF-beta	TGFBRII, TGFBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1
	Señalización de IL10	IL10RA, IL10RB, HMOX2
	Señalización de IL6	IL6R, IL6ST
Prevención de la señalización de TCR		CSK, PAG1
		SIT1
Treg inducidos	Treg inducidos	FOXP3
Factores de transcripción que controlan el agotamiento	Factores de transcripción que controlan el agotamiento	PRDM1 (=blimp1, ratones heterocigotos controlan infección viral crónica mejor que KO wt o condicionales)
		BATF
Tolerancia mediada por hipoxia	Ciclasa guanilada inducida por iNOS	GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1 B3

Se han generado satisfactoriamente novedosas especificidades en linfocitos T mediante la transferencia genética de receptores de linfocitos T transgénicos o receptores de antígeno quimérico (CAR) (Jena, Dotti et al. 2010). Los CAR son receptores sintéticos que consisten en un resto de direccionamiento que está asociado a uno o más dominios de señalización en una única molécula de fusión. En general, el resto de unión de un CAR consiste en un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo monocatenario (scFv), que comprende los fragmentos ligero y variable de un anticuerpo monoclonal unidos por un conector flexible. También se han usado satisfactoriamente restos de unión basados en dominios de receptor o de ligando. Los dominios de señalización para los CAR de primera generación derivan de la región citoplasmática de las cadenas gamma del receptor de CD3zeta o de Fc. Se ha mostrado que los CAR de primera generación redirigen satisfactoriamente la citotoxicidad de linfocitos T, sin embargo, dejaron de proporcionar expansión y actividad antitumoral prolongadas *in vivo*. Se han añadido dominios de señalización de moléculas coestimuladoras que incluyen CD28, OX-40 (CD134) y 4-1BB (CD137) solos (segunda generación) o en combinación (tercera generación) para potenciar la supervivencia y aumentar la proliferación de linfocitos T modificados por CAR. Los CAR han permitido satisfactoriamente que los linfocitos T sean redirigidos contra antígenos expresados en la superficie de células tumorales de diversos tumores malignos que incluyen linfomas y tumores sólidos (Jena, Dotti et al. 2010).

El método de la presente invención incluye además la posibilidad de expresar un receptor de antígeno quimérico como se describe en la bibliografía en linfocitos T manipulados como se describe en el presente documento.

CD19 es una diana atractiva para inmunoterapia debido a que la gran mayoría de la leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B) expresa uniformemente CD19, mientras que la expresión está ausente en células no hematopoyéticas, además de células mieloides, eritroides y linfocitos T, y células madre de médula ósea. Ensayos clínicos que se dirigen a CD19 en tumores malignos de linfocitos B están en camino con respuestas antitumorales alentadoras. La mayoría infunden linfocitos T genéticamente modificados para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) con especificidad derivada de la región de scFv de un anticuerpo monoclonal específico de CD19 de ratón FMC63 (Nicholson, Lenton et al. 1997; Cooper, Topp et al. 2003; Cooper, Jena et al. 2012) (solicitud internacional: WO2013/126712).

Como un ejemplo de receptor de antígeno quimérico monocatenario que va a expresarse en los linfocitos T genéticamente manipulados según el método de la presente invención está un único polipéptido que comprende al menos un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembranario y al menos un dominio transductor de señales, en el que dicho dominio de unión a ligando extracelular comprende un scFV derivado del anticuerpo monoclonal anti-CD19 específico 4G7. Una vez traducido en el linfocito T, por ejemplo usando transducción retroviral o lentiviral, este CAR contribuye al reconocimiento del antígeno CD19 presente en la superficie de linfocitos B malignos implicados en linfoma o leucemia.

Otros ejemplos de receptor de antígeno quimérico también pueden introducirse en los linfocitos T desvelados en el presente documento, tal como CAR que lleva receptores de antígeno dirigidos contra marcadores de antígeno de mieloma múltiple o leucemia linfoblástica, tales como TNFRSF17 (UNIPROT Q02223), SLAMF7 (UNIPROT Q9NQ25), GPRC5D (UNIPROT Q9NZD1), FKBP11 (UNIPROT Q9NYL4), KAMP3, ITGA8 (UNIPROT P53708) y FCRL5 (UNIPROT Q68SN8).

Como ejemplos adicionales, el antígeno de la diana puede ser de cualquier agrupación de moléculas de diferenciación (por ejemplo, CD16, CD64, CD78, CD96, CLL1, CD116, CD117, CD71, CD45, CD71, CD123 y CD138), un antígeno de superficie asociado a tumor, tal como ErbB2 (HER2/neu), antígeno carcinoembrionario (CEA), molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante III de EGFR (EGFRvIII), CD19, CD20, CD30, CD40, disialogangliósido GD2, mucina ductal-epitelial, gp36, TAG-72, glucoesfingolípidos, antígeno asociado a glioma, β -gonadotropina coriónica humana, alfafetoproteína (AFP), AFP reactiva con lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, telomerasa transcriptasa inversa humana, RU1, RU2 (AS), carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno prostático específico (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGA-1a, p53, proteína, PSMA, survivina y telomerasa, antígeno 1 de tumor de carcinoma de próstata (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrina B2, CD22, factor de crecimiento de insulina (IGF1)-I, IGF-II, receptor de IGF1, mesotelina, una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que presenta un epítipo de péptido específico de tumor, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, antígenos de estroma del tumor, el dominio adicional A (EDA) y el dominio adicional B (EDB) de fibronectina y el dominio A1 de tenascina-C (TnCA1) y proteína asociada a fibroblastos (fap); un antígeno específico de linaje o específico de tejido tal como CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD33, CD34, CD133, CD138, CTLA-4, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), GM-CSF, receptores de citocina, endoglina, una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), BCMA (CD269, TNFRSF 17), o un antígeno de superficie específico de virus tal como un antígeno específico del VIH (tal como gp120 del VIH); un antígeno específico del VEB, un antígeno específico de CMV, un antígeno específico del VPH, un antígeno específico del virus de Lassa, un antígeno específico del virus de la gripe, además de cualquier derivado o variante de estos marcadores superficiales. Los antígenos no son necesariamente antígenos de marcador superficial, sino que también puede ser antígenos pequeños endógenos presentados por HLA de clase I en la superficie de las células.

CAR multi-subunidad

A partir de polipéptidos monocatenarios que necesitan anexo en serie de dominios de señalización, se han formado receptores de antígeno quimérico del estado de la técnica, introducidos en linfocitos T. Sin embargo, el mover dominios de señalización desde su posición de yuxtamembrana natural puede interferir con su función. Para vencer este inconveniente, el solicitante diseñó recientemente un CAR multi-cadena derivado de Fc ϵ RI para permitir la posición de yuxtamembrana normal de todos los dominios de señalización relevantes. En esta nueva arquitectura, el dominio de unión de IgE de alta afinidad de la cadena alfa de Fc ϵ RI está sustituido por un dominio de unión a ligando extracelular tal como scFv para redirigir la especificidad de linfocitos T contra dianas celulares y las colas de extremos N y/o C de la cadena beta de Fc ϵ RI se usan para poner señales coestimuladoras en posiciones de yuxtamembrana normales.

Por consiguiente, el CAR expresado por el linfocito T manipulado según el método de la invención puede ser un receptor de antígeno quimérico (CAR) multi-cadena particularmente adaptado a la producción y expansión de linfocitos T manipulados proporcionados en el presente documento. Tales CAR multi-cadena comprenden al menos dos de los siguientes componentes:

- a) un polipéptido que comprende el dominio transmembranario de la cadena alfa de Fc ϵ RI y un dominio de unión al ligando extracelular,

b) un polipéptido que comprende una parte de la cola citoplasmática del extremo N y C y el dominio transmembranario de la cadena beta de FcεRI y/o

c) al menos dos polipéptidos que comprenden cada uno una parte de cola intracitoplasmática y el dominio transmembranario de la cadena gamma de FcεRI, por lo que diferentes polipéptidos se multimerizan juntos espontáneamente para formar CAR dimérico, trimérico o tetramérico.

Según tales arquitecturas, dominios de unión a ligandos y dominios de señalización son soportados en polipéptidos separados. Los diferentes polipéptidos están anclados en la membrana en una estrecha proximidad que permite interacciones entre sí. En tales arquitecturas, la señalización y dominios coestimuladores pueden estar en posiciones de yuxtamembrana (es decir, adyacentes a la membrana celular en el lado interno de ella), que se considera que permite la función mejorada de dominios coestimuladores. La arquitectura multi-subunidad también ofrece más flexibilidad y posibilidades de diseño de CAR con más control sobre la activación de linfocitos T. Por ejemplo, es posible incluir varios dominios de reconocimiento del antígeno extracelulares que tienen diferente especificidad para obtener una arquitectura de CAR multi-específica. También es posible controlar la relación relativa entre las diferentes subunidades en el CAR multi-cadena. Este tipo de arquitectura ha sido recientemente descrito por el solicitante en el documento PCT/US2013/058005.

El ensamblaje de las diferentes cadenas como parte de un único CAR multi-cadena se hace posible, por ejemplo, usando las diferentes cadenas alfa, beta y gamma del receptor de alta afinidad por IgE (FcεRI) (Metzger, Alcaraz et al. 1986) a las que están fusionados los dominios de señalización y coestimuladores. La cadena gamma comprende una región transmembranaria y una cola citoplasmática que contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) (Cambier 1995).

El CAR multi-cadena puede comprender varios dominios de unión a ligando extracelulares, para unir simultáneamente diferentes elementos en la diana aumentando así la activación y función celular inmunitaria. Los dominios de unión a ligando extracelulares pueden colocarse en tándem en el mismo polipéptido transmembranario, y opcionalmente pueden separarse por un conector. Dichos dominios de unión a ligando extracelulares diferentes pueden ponerse en diferentes polipéptidos transmembranarios que comprenden el CAR multi-cadena. También en el presente documento se desvela una población de CAR multi-cadena que comprende cada uno un dominio de unión a ligando extracelular diferente. En particular, se desvela un método de manipulación de células inmunitarias que comprende proporcionar una célula inmunitaria y que expresa en la superficie de dicha célula una población de CAR multi-cadena comprendiendo cada una diferentes dominios de unión a ligando extracelulares. También en el presente documento se proporciona un método de manipulación de una célula inmunitaria que comprende proporcionar una célula inmunitaria e introducir en dicha célula polinucleótidos que codifican polipéptidos que componen una población de CAR multi-cadena comprendiendo cada uno diferentes dominios de unión a ligando extracelulares. El método de manipulación de una célula inmunitaria puede comprender expresar en la superficie de la célula al menos una parte de cadena beta y/o gamma de FcεRI fusionada con un dominio de transducción de señales y varias partes de cadenas alfa de FcεRI fusionadas con diferentes dominios de unión a ligando extracelulares. Dicho método puede comprender introducir en dicha célula al menos un polinucleótido que codifica una parte de cadena beta y/o gamma de FcεRI fusionada con un dominio de transducción de señales y varias cadenas alfa de FcεRI fusionadas con diferentes dominios de unión a ligando extracelulares. Por población de CAR multi-cadena se indica al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o más CAR multi-cadena, comprendiendo cada uno diferentes dominios de unión a ligando extracelulares. Los diferentes dominios de unión a ligando extracelulares pueden unirse preferentemente simultáneamente a diferentes elementos en la diana, aumentando así la activación y función celular inmunitaria.

También en el presente documento se desvela una célula inmunitaria aislada que comprende una población de CAR multi-cadena comprendiendo cada uno diferentes dominios de unión a ligando extracelulares.

El dominio de transducción de señales o el dominio de señalización intracelular del CAR multi-cadena es responsable de la señalización intracelular tras la unión del dominio de unión a ligando extracelular a la diana, produciendo la activación y respuesta inmunitaria de la célula inmunitaria. En otras palabras, el dominio de transducción de señales es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se expresa el CAR multi-cadena. Por ejemplo, la función efectora de un linfocito T puede ser una actividad citolítica o actividad cooperadora que incluye la secreción de citocinas.

En la presente solicitud, el término "dominio de transducción de señales" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de función de señal efectora y dirige la célula para realizar una función especializada.

Ejemplos preferidos del dominio de transducción de señales para su uso en CAR individual o multi-cadena pueden ser las secuencias citoplasmáticas del receptor de Fc o receptor de linfocitos T y co-receptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales tras la interacción de receptores de antígeno, además de cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tiene la misma capacidad funcional. El dominio de transducción de señales comprende dos clases distintas de secuencia de señalización citoplasmática, aquellas que inician la activación primaria dependiente de antígeno y aquellas que actúan en un modo independiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora. La secuencia de señalización citoplasmática

primaria puede comprender motivos de señalización que son conocidos como motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptor de ITAM. Los ITAM son motivos de señalización bien definidos encontrados en la cola intracitoplasmática de una variedad de receptores que sirven de sitios de unión para las tirosina cinasas de clase syk/zap70. Ejemplos de ITAM usados en el método de la invención pueden incluir como ejemplos no limitantes aquellos derivados de TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, FcRepsilon, CD3 gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En una realización preferida, el dominio de transducción de la señalización del CAR multi-cadena puede comprender el dominio de señalización CD3zeta, o el dominio intracitoplásmico de las cadenas beta o gamma de FcεRI.

En una realización particular, el dominio de transducción de señales del CAR multi-cadena desvelado en el presente documento comprende una molécula de señal coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta inmunitaria eficiente.

Los dominios de unión a ligando pueden ser cualquier receptor de antígeno previamente usado, y referido a, con respecto a CAR monocatenario referido en la bibliografía, en particular scFv de anticuerpos monoclonales.

CAR biespecíficos o multi-específicos como se describen en el documento WO 2014/4011988 también se desvelan en el presente documento.

Activación y expansión de linfocitos T

Tanto antes como después de la modificación genética de los linfocitos T, los linfocitos T pueden activarse y expandirse generalmente usando métodos como se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20060121005. Los linfocitos T pueden expandirse *in vitro* o *in vivo*.

Generalmente, los linfocitos T en el presente documento se proporcionan expandidos por contacto con una superficie que tiene unida a ella un agente que estimula una señal asociada a un complejo de TCR de CD3 y un ligando que estimula una molécula coestimuladora sobre la superficie de los linfocitos T.

En particular, pueden estimularse poblaciones de linfocitos T *in vitro* tales como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o fragmento de unión al antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado sobre una superficie, o por contacto con un activador de proteína cinasa C (por ejemplo, briostatina) conjuntamente con un ionóforo de calcio.

Para la coestimulación de una molécula accesoria sobre la superficie de los linfocitos T, se usa un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, pueden ponerse en contacto una población de linfocitos T con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Para estimular la proliferación de o bien linfocitos T CD4+ o bien linfocitos T CD8+, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Como aquellos expertos habituales en la materia pueden apreciar fácilmente, la relación de partículas con respecto a células puede depender del tamaño de partícula con respecto a la célula diana. Como se desvela en el presente documento, las células, tales como linfocitos T, pueden combinarse con perlas recubiertas de agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y entonces las células se cultivan. Alternativamente, antes del cultivo, las perlas recubiertas con agente y las células no se separan, pero se cultivan juntas. Pueden ligarse proteínas de la superficie celular permitiendo que las perlas paramagnéticas a las que están unidas anti-CD3 y anti-CD28 (3x28 perlas) se pongan en contacto con los linfocitos T. En una realización, las células (por ejemplo, 4 a 10 linfocitos T) y perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T a una relación de 1:1) se combinan en un tampón, preferentemente PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y magnesio).

Nuevamente, aquellos expertos habituales en la materia pueden apreciar fácilmente que puede usarse cualquier concentración de célula. La mezcla puede cultivarse durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero horario entremedias. Alternativamente, la mezcla puede cultivarse durante 21 días. Condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o X-vivo 5, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, que incluyen suero (por ejemplo, suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-γ, IL-4, IL-7, GM-CSF, -10, -2, IL-15, TGFβ y TNF- o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocidas para el experto. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, α-MEM, F-12, X-Vivo 1 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio, y vitaminas, bien sin suero o complementadas con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de linfocitos T. Antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomycin, están incluidos solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que no van a ser infundidos en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada (por ejemplo, 37 °C) y atmósfera

(por ejemplo, aire más 5 % de CO₂). Los linfocitos T que han sido expuestos a tiempos de estimulación variados pueden presentar diferentes características

- 5 Como se desvela en el presente documento, dichas células pueden ser expandidas por co-cultivo con tejido o células. Dichas células también pueden ser expandidas *in vivo*, por ejemplo en la sangre del sujeto después de administrar dicha célula al sujeto.

Aplicaciones terapéuticas

- 10 Los linfocitos T obtenibles por los diferentes métodos descritos anteriormente pretenden usarse como un medicamento para tratar, entre otros, cáncer, infecciones o enfermedades inmunitarias en un paciente en necesidad de los mismos.

- 15 Dicho tratamiento puede ser de mejora, curativo o profiláctico. Puede ser o bien parte de una inmunoterapia autóloga o bien parte de un tratamiento de inmunoterapia alogéna. Por autólogo se indica que las células, línea celular o población de células usadas para tratar los pacientes están originándose de dicho paciente o de un donante compatible con el antígeno leucocitario humano (HLA). Por alogéno se indica que las células o población de células usada para tratar los pacientes no se están originando de dicho paciente sino de un donante.

- 20 El método de la invención es particularmente adecuado para preparar linfocitos T para inmunoterapia alogéna, en tanto que permite la transformación de linfocitos T, normalmente obtenidos de donantes, en células no alorreactivas.

- 25 Esto puede hacerse bajo protocolos convencionales y reproducirse tantas veces como se necesite. Los linfocitos T modificados resultantes pueden reunirse y administrarse a uno o varios pacientes, estando disponibles como un producto terapéutico "disponible para venta". Células que pueden usarse con los métodos desvelados se describen en la sección previa.

- 30 Dichos tratamientos son principalmente para tratar pacientes diagnosticados con cáncer, infección viral, trastornos autoinmunitarios o enfermedad injerto contra huésped (GvHD). Los cánceres son preferentemente leucemias y linfomas, que tienen tumores líquidos, pero también pueden referirse a tumores sólidos. Tipos de cánceres que van a tratarse con los CAR desvelados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas leucemia o tumores malignos linfoides, tumores benignos y malignos, y tumores malignos, por ejemplo, sarcomas, carcinomas y melanomas. También están incluidos tumores/cánceres de adultos y tumores/cánceres pediátricos.

- 35 Los presentes linfocitos T, cuando se arman con CAR específicos dirigidos contra las propias células inmunitarias del paciente, permiten la inhibición o regulación de dichas células, que es una etapa clave para tratar enfermedad autoinmunitaria, tal como poliartritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, esclerodermia, fibromialgia, miositis, espondilitis anquilosante, diabetes de tipo I dependiente de insulina, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, enfermedad de Crohn, celiaquía, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y esclerosis múltiple (EM).

- 40 El tratamiento puede tener lugar en combinación con una o más terapias seleccionadas del grupo de terapia con anticuerpos, quimioterapia, terapia con citocinas, terapia con células dendríticas, terapia génica, terapia hormonal, 45 terapia con luz láser y radioterapia.

- Dichos tratamientos son particularmente aptos para pacientes que reciben tratamientos inmunosupresores o de quimioterapia. De hecho, el método de la presente invención implica preferentemente células o población de células, que han sido hechas resistentes a al menos un agente inmunosupresor debido a la inactivación de un gen que 50 codifica un receptor para tal agente inmunosupresor. En este aspecto, el tratamiento inmunosupresor debe ayudar en una selección y expansión de los linfocitos T según la invención dentro del paciente.

- Como se desvela en el presente documento, dichos linfocitos T pueden recibir una robusta expansión de linfocitos T *in vivo* tras la administración a un paciente, y pueden persistir en los líquidos corporales durante una cantidad de 55 tiempo prolongada, preferentemente durante una semana, más preferentemente durante 2 semanas, incluso más preferentemente durante al menos un mes. Aunque se espera que los linfocitos T proporcionados en el presente documento persistan durante estos periodos, está prevista que su duración en el cuerpo del paciente no supere un año, preferentemente 6 meses, más preferentemente 2 meses, e incluso más preferentemente un mes.

- 60 La administración de las células o población de células proporcionada en el presente documento puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, que incluye por inhalación por aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intratumoral, por vía intranodal, por vía intramedular, por 65 vía intramuscular, por inyección intravenosa o intralinfática, o por vía intraperitoneal. En una realización, las composiciones de células proporcionadas en el presente documento se administran preferentemente mediante inyección intravenosa.

La administración de las células o población de células puede consistir en la administración de 10^4 - 10^9 células por kg de peso corporal, preferentemente 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, que incluye todos los valores enteros de números de células dentro de aquellos intervalos. Las células o población de células pueden ser administradas en una o más dosis. En otra realización, dicha cantidad eficaz de células se administra como una dosis única. En otra realización, dicha cantidad eficaz de células se administra como más de una dosis durante un periodo de tiempo. El momento preciso de la administración está dentro del criterio de gestión del médico y depende del estado clínico del paciente. Las células o población de células pueden obtenerse de cualquier fuente, tal como un banco de sangre o un donante. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de intervalos óptimos de cantidades eficaces de un tipo dada de célula para una enfermedad particular o afecciones dentro de la experiencia de la materia. Una cantidad eficaz significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico. La dosificación administrada dependerá de la edad, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento simultáneo, si lo hay, frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

Dicha cantidad eficaz de células o composición que comprende aquellas células puede ser administrada por vía parenteral. Dicha administración puede ser una administración intravenosa. Dicha administración puede hacerse directamente mediante inyección dentro de un tumor.

Como se desvela en el presente documento, las células se administran a un paciente conjuntamente con (por ejemplo, antes, simultáneamente o tras) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con agentes tales como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, tratamiento con citarabina (también conocida como ARA-C) o natalizumab para pacientes con EM o tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LPA. En realizaciones adicionales, los linfocitos T proporcionados en el presente documento pueden usarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos, u otros agentes inmunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben o bien la fosfatasa calcineurina dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o bien inhiben la cinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 11; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Citr. Opin. mm n. 5:763-773, 93). Las composiciones de célula desveladas en el presente documento pueden administrarse a un paciente conjuntamente con (por ejemplo, antes, simultáneamente o tras) el trasplante de médula ósea, terapia ablativa de linfocitos T usando o bien agentes de quimioterapia tales como fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida, o bien anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. Alternativamente, las composiciones de célula pueden administrarse tras la terapia ablativa de linfocitos T tal como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden recibir tratamiento estándar con quimioterapia de alta dosis seguido de trasplante de células madre de sangre periférica. Algunas veces, tras el trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas. Las células expandidas pueden administrarse antes o tras la cirugía. Dichas células modificadas obtenidas por uno cualquiera de los métodos descritos aquí pueden usarse para tratar pacientes en necesidad de las mismas contra huésped frente a rechazo del injerto (HvG) y enfermedad injerto contra huésped (GvHD); por tanto, en el presente documento se desvela un método de tratamiento de pacientes en necesidad del mismo contra huésped frente a rechazo del injerto (HvG) y enfermedad injerto contra huésped (GvHD) que comprende tratar dicho paciente administrando a dicho paciente una cantidad eficaz de células modificadas que comprenden genes TCR alfa y/o TCR beta inactivados.

Otras definiciones

- Restos de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos se designan en el presente documento según el código de una letra, en el que, por ejemplo, Q significa resto Gln o glutamina, R significa resto Arg o arginina y D significa resto Asp o ácido aspártico.
- Sustitución de aminoácidos significa la sustitución de un resto de aminoácido con otro, por ejemplo, la sustitución de un resto de arginina con un resto de glutamina en una secuencia de péptidos es una sustitución de aminoácidos.
- Los nucleótidos se designan del siguiente modo: el código de una letra se usa para designar la base de un nucleósido: a es adenina, t es timina, c es citosina y g es guanina. Para los nucleótidos degenerados, r representa g o a (nucleótidos de purina), k representa g o t, s representa g o c, w representa a o t, m representa a o c, y representa t o c (nucleótidos de pirimidina), d representa g, a o t, v representa g, a o c, b representa g, t o c, h representa a, t o c, y n representa g, a, t o c.
- Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o "polinucleótidos" se refiere a nucleótidos y/o polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquiera de ligación, escisión, acción de endonucleasas y acción de exonucleasas. Las moléculas de ácidos nucleicos pueden estar compuestas de monómeros que son nucleótidos que existen de forma natural (tales como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos que existen de forma natural (por ejemplo, formas

enantioméricas de nucleótidos que existen de forma natural), o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcar incluyen, por ejemplo, sustitución de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, el resto de azúcar entero puede sustituirse con estructuras estéricas y electrónicamente similares, tales como aza-azúcares y análogos de azúcar carbocíclico. Ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos muy conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden estar unidos por enlaces fosfodiéster o análogos de tales enlaces. Los ácidos nucleicos pueden ser o bien monocatenarios o bien bicatenarios.

- "Polinucleótido que comprende sucesivamente una primera región de homología con secuencias en la dirección 5' de dicha rotura bicatenaria, una secuencia que va a insertarse en el genoma de dicha célula y una segunda región de homología con secuencias en la dirección 3' de dicha rotura bicatenaria" pretende significar una construcción de ADN o una matriz que comprende una primera y segunda porción que son homólogas a las regiones 5' y 3' de una diana de ADN *in situ*. La construcción de ADN también comprende una tercera porción situada entre la primera y segunda porción que comprende cierta homología con la secuencia de ADN correspondiente *in situ* o alternativamente no comprende homología con las regiones 5' y 3' de la diana de ADN *in situ*. Tras la escisión de la diana de ADN, se estimula un evento de recombinación homóloga entre el genoma que contiene el gen elegido como diana comprendido en el locus de interés y esta matriz, en la que la secuencia genómica que contiene la diana de ADN se sustituye por la tercera porción de la matriz y una parte variable de la primera y segunda porciones de dicha matriz.
- Por "diana de ADN", "secuencia diana de ADN", "secuencia de ADN diana", "secuencia diana de ácido nucleico", "secuencia diana" o "sitio de procesamiento" está prevista una secuencia de polinucleótidos que puede ser elegida como diana y procesada por una endonucleasa de corte raro. Estos términos se refieren a una localización de ADN específica, preferentemente una localización genómica en una célula, pero también una porción de material genético que puede existir independientemente al cuerpo principal de material genético tal como plásmidos, episomas, virus, transposones o en orgánulos tales como mitocondrias como ejemplo no limitante. Como ejemplos no limitantes de secuencias diana guiadas por ARN, están aquellas secuencias del genoma que pueden hibridarse con el ARN guía que dirige la endonucleasa guiada por ARN a un locus deseado.
- Por "vector de administración" o "vectores de administración" está previsto cualquier vector de administración que pueda usarse en el método de la presente invención para poner en contacto con la célula (es decir, "poner en contacto") o administrar dentro de las células o compartimentos subcelulares (es decir, "introducir") agentes/productos químicos y moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) necesarios en la presente invención. Incluye, pero no se limita a, vectores de administración liposómica, vectores de administración viral, vectores de administración de fármaco, vehículos químicos, vehículos poliméricos, lipoplejos, poliplexos, dendrímeros, microburbujas (agentes de contraste de ultrasonidos), nanopartículas, emulsiones u otros vectores de transferencia apropiados. Estos vectores de administración permiten la administración de moléculas, productos químicos, macromoléculas (genes, proteínas), u otros vectores tales como plásmidos, o péptidos penetrantes. En estos casos posteriores, los vectores de administración son vehículos de moléculas.
- Los términos "vector" o "vectores" se refieren a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un "vector" en la presente invención incluye, pero no se limita a, un vector viral, un plásmido, un vector de ARN o un ADN lineal o circular o molécula de ARN que puede consistir en ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómicos, semi-sintéticos o sintéticos. Vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma (vector episómico) y/o expresión de ácidos nucleicos a los que se unen (vectores de expresión). Grandes números de vectores adecuados son conocidos para aquellos expertos en la materia y están comercialmente disponibles.

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

- Por "vector lentiviral" se indica vectores lentivirales basados en el VIH que son muy prometedores para administración génica debido a su capacidad de encapsidación relativamente grande, inmunogenicidad reducida y su capacidad para transducir establemente con alta eficiencia un gran intervalo de diferentes tipos de células. Los vectores lentivirales son normalmente generados tras la transfección transitoria de tres (encapsidación,

envuelta y transferencia) o más plásmidos en células productoras. Al igual que el VIH, los vectores lentivirales entran en la célula diana mediante la interacción de glucoproteínas de la superficie viral con receptores sobre la superficie celular. Tras la entrada, el ARN viral se somete a transcripción inversa, que está mediada por el complejo de transcriptasa inversa viral. El producto de transcripción inversa es un ADN viral lineal bicatenario, que es el sustrato para la integración viral en el ADN de células infectadas. Por "vectores lentivirales integrativos (o LV)" se indica tales vectores como ejemplo no limitante que son capaces de integrar el genoma de una célula diana. En lo opuesto, por "vectores lentivirales no integrativos (o NILV)" se indica la eficiente administración de vectores génicos que no se integran en el genoma de una célula diana mediante la acción de integrasa del virus.

- Vectores de administración y los vectores pueden asociarse o combinarse con cualquier técnica de permeabilización celular tal como sonoporación o electroporación o derivados de estas técnicas.
- Por célula o células está previsto cualquier célula viva eucariota, célula primaria y líneas celulares derivadas de estos organismos para cultivos *in vitro*.
- Por "célula primaria" o "células primarias" están previstas células tomadas directamente de tejido vivo (es decir, material de biopsia) y establecido para crecimiento *in vitro*, que han experimentado muy pocas duplicaciones de población y son, por tanto, más representativas de los principales componentes funcionales y características de tejidos de los que derivan, en comparación con líneas celulares tumorigénicas continuas o artificialmente immortalizadas.

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

Todas estas líneas celulares pueden modificarse por el método de la presente invención para proporcionar modelos de línea celular para producir, expresar, cuantificar, detectar, estudiar un gen o una proteína de interés; estos modelos también pueden usarse para cribar moléculas biológicamente activas de interés en investigación y producción y diversos campos tales como productos químicos, biocombustibles, productos terapéuticos y agronomía como ejemplos no limitantes.

- Por "mutación" está prevista la sustitución, delección, inserción de hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta, o más nucleótidos/aminoácidos en un polinucleótido (ADNc, gen) o una secuencia de polipéptidos. La mutación puede afectar a la secuencia codificante de un gen o su secuencia reguladora. También puede afectar la estructura de la secuencia genómica o la estructura/estabilidad del ARNm codificado.
- Por "variante(s)" está prevista una variante de repetición, una variante, una variante de unión a ADN, una variante de TALE-nucleasa, una variante de polipéptido obtenida por mutación o sustitución de al menos un resto en la secuencia de aminoácidos de la molécula original.
- Por "variante funcional" está previsto un mutante catalíticamente activo de una proteína o un dominio de proteína; tal mutante puede tener la misma actividad en comparación con su proteína original o dominio de proteína o propiedades adicionales, o actividad más alta o más baja.
- Por "gen" se indica la unidad básica de herencia, que consiste en un segmento de ADN dispuesto de un modo lineal a lo largo de un cromosoma, que codifica una proteína específica o segmento de proteína. Un gen normalmente incluye un promotor, una región 5' no traducida, una o más secuencias codificantes (exones), opcionalmente intrones, una región 3' no traducida. El gen puede comprender además un terminador, potenciadores y/o silenciadores.
- Como se usa en el presente documento, el término "locus" es la localización física específica de una secuencia de ADN (por ejemplo, de un gen) sobre un cromosoma. El término "locus" puede referirse a la localización física específica de una secuencia diana de endonucleasa de corte raro sobre un cromosoma. Un locus tal puede comprender una secuencia diana que es reconocida y/o escindida por una endonucleasa de corte raro desvelada en el presente documento. Se entiende que el locus de interés de la presente invención puede no solo clasificar una secuencia de ácidos nucleicos que existe en el cuerpo principal del material genético (es decir, en un cromosoma) de una célula, sino también una porción de material genético que puede existir independientemente a dicho cuerpo principal de material genético tal como plásmidos, episomas, virus, transposones o en orgánulos tales como mitocondrias como ejemplos no limitantes.
- El término "escisión" se refiere a la rotura del esqueleto covalente de un polinucleótido. La escisión puede iniciarse mediante una variedad de métodos que incluyen, pero no se limitan a, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Tanto la escisión monocatenaria como la escisión bicatenaria son posibles, y la

escisión bicatenaria puede producirse como resultado de dos eventos de escisión monocatenaria distintos. La escisión de ADN bicatenario, ARN, o híbrido de ADN/ARN, puede producir la producción de o bien extremos romos o bien extremos en bisel.

- 5 - Por "proteína de fusión" está previsto el resultado de un proceso muy conocido en la materia que consisten en la unión de dos o más genes que originalmente codifican proteínas separadas o parte de ellas, produciendo la traducción de dicho "gen de fusión" un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales.
- 10 - "Identidad" se refiere a la identidad de secuencia entre dos moléculas de ácidos nucleicos o polipéptidos. La identidad puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse para los fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Un grado de similitud o identidad entre secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos es función del número de nucleótidos idénticos o correspondientes en las
- 15 posiciones compartidas por las secuencias de ácidos nucleicos. Pueden usarse diversos algoritmos y/o programas de alineamiento para calcular la identidad entre dos secuencias, que incluyen FASTA, o BLAST, que están disponibles como una parte del paquete de análisis de secuencias GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y pueden usarse con, por ejemplo, parámetros por defecto. Por ejemplo, se contemplan polipéptidos que tienen al menos el 70 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o el 99 % de identidad con polipéptidos específicos descritos en el presente documento y que presentan preferentemente sustancialmente las mismas funciones, además de polinucleótido que codifica tales polipéptidos.
- 20 - "Dominio de transducción de señales" o "dominio coestimulador" se refiere a una molécula en una célula presentadora de antígenos que se une específicamente a una molécula coestimuladora relacionada en un linfocito T, proporcionándose así una señal que, además de la señal primaria proporcionada por, por ejemplo, la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, media en una respuesta de linfocitos T, que incluye, pero no se limita a, activación de la proliferación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero no se limita a, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, receptor beta de linfoxina, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente a B7-H3. Un ligando coestimulador también engloba, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente a una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tal como, pero no se limita a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3,
- 25 un ligando que se une específicamente a CD83.
- 30 - Una "molécula coestimuladora" se refiere al componente de unión relacionado en un linfocito T que se une específicamente a un ligando coestimulador, mediando así en una respuesta coestimuladora por la célula, tal como, pero no se limita a, proliferación. Moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, una molécula de clase I de MHC, BTLA y receptor de ligando Toll.
- 35 - Una "señal coestimuladora", como se usa en el presente documento, se refiere a una señal, que en combinación con la señal primaria, tal como la ligación TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o regulación por incremento o regulación por disminución de moléculas clave.
- 40 - "Anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene sitios de unión para dos antígenos diferentes dentro de una única molécula de anticuerpo. Se apreciará por aquellos expertos en la materia que pueden construirse otras moléculas, además de la estructura de anticuerpo canónico, con dos especificidades de unión. Se apreciará adicionalmente que la unión al antígeno por anticuerpos biespecíficos puede ser simultánea o secuencial. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos por técnicas químicas (véase, por ejemplo, Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5807), por técnicas de "polidoma" (véase la patente de EE.UU. N.º 4.474.893) o por técnicas de ADN recombinante, que son todas en sí conocidas. Como ejemplo no limitante, cada dominio de unión comprende al menos una región variable de una cadena pesada del anticuerpo ("región VH o H"), en la que la región VH del primer dominio de unión se une específicamente al marcador de linfocitos tal como CD3 y la región VH del segundo dominio de unión se une específicamente al antígeno de tumor.
- 45 - El término "dominio de unión a ligando extracelular", como se usa en el presente documento, se define como un oligo- o polipéptido que es capaz de unir un ligando. Preferentemente, el dominio será capaz de interactuar con una molécula de la superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando extracelular puede elegirse para reconocer un ligando que actúa de marcador superficial de célula en células diana asociadas a un estado de enfermedad particular. Así, ejemplos de marcadores superficiales de célula que pueden actuar como ligandos incluyen aquellos asociados a infecciones virales, bacterianas y parasíticas, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.
- 50 - El término "sujeto" o "paciente", como se usa en el presente documento, incluye todos los miembros del reino animal que incluyen primates no humanos y seres humanos.
- 55
- 60
- 65

Donde se establezca un límite o intervalo numérico en el presente documento, están incluidos los puntos extremos. Por tanto, todos los valores y subintervalos dentro de un límite o intervalo numérico están específicamente incluidos como si se escribieran explícitamente.

- 5 Habiendo descrito generalmente la presente invención, puede obtenerse un entendimiento adicional por referencia a ciertos ejemplos específicos, que se proporcionan en el presente documento para fines de ilustración solo, y no pretenden ser limitantes, a menos que se especifique de otro modo.

10 Ejemplos

10 Ejemplo 1: Método general para manipular células alógenas humanas para inmunoterapia

Para un mejor entendimiento de la invención, el método para manipular células alógenas humanas para inmunoterapia se ilustra en la Figura 4. Comprendiendo el método una combinación de una o varias de las

15 siguientes etapas:

1. Proporcionar linfocitos T de un cultivo celular o de una muestra de sangre de un paciente individual o de banco de sangre y activar dichos linfocitos T usando perlas activadoras anti-CD3/C28. Las perlas proporcionan tanto las señales primarias como coestimuladoras que se requieren para la activación y expansión de linfocitos T.

20 2. Transducir dichas células con CAR multi-cadena permite el redireccionamiento de linfocitos T contra antígenos expresados en la superficie de células diana de diversos tumores malignos que incluyen linfomas y tumores sólidos, en particular contra el antígeno CD19. Para mejorar la función del dominio coestimulador, los inventores han diseñado un CAR multi-cadena derivado de FcεRI como se describe previamente. La transducción puede

25 realizarse antes o después de las inactivaciones de genes usando la endonucleasa guiada por ARN.

3. Manipular linfocitos T no alorreactivos y opcionalmente resistentes:

30 a) Es posible inactivar TCR alfa en dichas células para eliminar el TCR de la superficie de la célula y prevenir el reconocimiento de tejido del hospedador como extraño por TCR de alógeno y así para evitar GvHD.

b) También es posible inactivar un gen que codifica la diana para un agente inmunosupresor o un fármaco de quimioterapia para convertir dichas células en resistentes a tratamiento inmunosupresor o de quimioterapia para prevenir el rechazo del injerto sin afectar los linfocitos T trasplantados. En este ejemplo, la diana de los

35 agentes inmunosupresores es CD52 y el agente inmunosupresor es un anticuerpo anti-CD52 monoclonal humanizado.

Como se muestra más adelante por los inventores, el uso de endonucleasa guiada por ARN es particularmente ventajoso para lograr inactivaciones de genes dobles en linfocitos T simplemente introduciendo dos ARN guía distintos (ARNg), que se dirige cada uno a un gen, tal como genes TCRalfa y CD52. Esto puede hacerse por

40 electroporación de linfocitos T con ARNm que codifica Cas9 y simultáneamente transcripción de plásmidos de ADN que codifican el ARNg específico. Alternativamente, el ARNg puede transcribirse de secuencias de ADN establemente integradas en el genoma usando vectores retrovirales. Se ha encontrado por los inventores que expresar transitoriamente Cas9 de ARNm produjo alta tasa de transformación y fue menos perjudicial para los linfocitos T. Entonces, los linfocitos T inactivados se clasifican usando perlas magnéticas. Por ejemplo, los linfocitos

45 T que todavía expresan el gen elegido como diana (por ejemplo, CD52) pueden eliminarse por fijación sobre una superficie sólida, y las células inactivadas no se exponen al estrés de ser pasadas a través de una columna. Este método suave aumenta la concentración de linfocitos T apropiadamente manipulados.

4. Expansión *in vitro* de linfocitos T manipulados antes de la administración a un paciente o *in vivo* tras la administración a un paciente mediante estimulación del complejo de CD3. Antes de la etapa de administración, los pacientes pueden someterse a un tratamiento inmunosupresor tal como CAMPATH1-H, un anticuerpo anti-CD52 monoclonal humanizado.

50 5. Opcionalmente, exposición de dichas células a anticuerpos biespecíficos *ex vivo* antes de la administración a un paciente o *in vivo* tras la administración a un paciente para poner las células manipuladas en proximidad a un antígeno diana.

50 Ejemplo 2: Inactivación específica de genes TCR y CD52 en los linfocitos T

60 1 - Construcción de plásmidos de CAS9 y ARNg

Se sintetizó *de novo* la secuencia que codifica Cas9 de *S. pyogenes* (GeneCust) y se flanqueó por 3xNLS y una marca HA en el extremo C (pCLS22972 (SEQ ID NO. 53)). Se clonaron las secuencias que codifican el ARNg que se dirigen a las secuencias de 20 pb respectivas (5' a 3') en el gen TCRa (SEQ ID NO. 54) y el gen CD52 (SEQ ID

65 NO. 55) se clonaron en el plásmido derivado de pUC57 en la dirección 3' de un promotor U6 que conduce respectivamente a los vectores plasmídicos pCLS24029 (SEQ ID NO. 56) y pCLS24027 (SEQ ID NO. 57).

2 - Síntesis de ARNm de CAS9

Se produjo ARNm que codifica CAS9 y se poliadeniló usando el kit mMessage mMachine T7 Ultra (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se purificó posteriormente con columnas RNeasy (Qiagen), se eluyó en tampón de electroporación y se cuantificó (espectrofotómetro Nanodrop ND-1000) midiendo la absorbancia a 260 nm. La calidad del ARN se verificó en un gel de agarosa desnaturante de formaldehído/MOPS.

3 - Transfecciones

Se transfectaron linfocitos T por electrotransferencia de ARNm que codifica CAS9 y plásmidos que codifican ARNg usando un sistema AgilePulse MAX (Harvard Apparatus) 4 días después de la activación (Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28, Life Technologies). Brevemente, se preactivaron linfocitos T varios días (3-5) pre-transfección con perlas recubiertas con anti-CD3/CD28 e IL2. Un día antes de la electroporación, se cambió el medio de cultivo y las células se sembraron a 10^6 células/ml; 24 h después, se lavaron los linfocitos T en medio T Cytoporation (Harvard Apparatus), se eliminaron las perlas de activación decantando la suspensión de linfocitos T de un tubo insertado en un imán EasySep (StemCell Technologies). Los linfocitos T se sedimentaron entonces, se resuspendieron en medio T Cytoporation a 25×10^6 células/ml. Se mezclaron 5×10^6 células con 10 µg del ARNm que codifica CAS9 y los plásmidos que codifican el ARNg que se dirige a TCRα o en una cubeta de 0,4 cm. La electroporación consistió en dos pulsos de 0,1 ms a 1200 V, seguido de cuatro pulsos de 0,2 ms a 130 V. Tras la electroporación, los linfocitos T se diluyeron en medio de cultivo y se incubaron a 37 °C/ 5 % de CO₂ durante 24 horas antes de otro cambio de medio. 3 días después de la electroporación, los linfocitos T se tiñeron con un colorante de viabilidad fijable eFluor-780 y un fragmento F(ab')₂ anti-IgG de ratón de cabra conjugado con PE o APC específico para evaluar la expresión superficial celular de TCRα o CD52, respectivamente. Se analizó la inactivación de cualquiera de los genes TCRα o CD52 (MACSQuant) por citometría de flujo. Los resultados se presentan en las Figuras 5 y 6, que muestran que los genes TCR y CD52 han sido respectivamente inactivados en una proporción significativa de las células analizadas.

Ejemplo 3: Análisis funcional de los linfocitos T manipulados sometidos a electroporación con un ARNm monocistrónico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) monocatenario anti-CD19:

Para verificar que la ingeniería del genoma no afectó la capacidad de los linfocitos T manipulados para presentar actividad antitumoral cuando se proveen de un receptor de antígeno quimérico (CAR CD19), los linfocitos T previamente elegidos como diana usando Cas9 y el ARN guía específico que se dirige a TCRα se transfectaron adicionalmente con 10 µg de ARN que codifica un CAR anti-CD19. 24 horas después, los linfocitos T se incubaron durante 4 horas con CD19 que expresaba células Daudi. Se midió la regulación por incremento de la superficie celular de CD107a, un marcador de liberación de gránulos citotóxicos por linfocitos T (llamado desgranulación), por análisis de citometría de flujo (Betts, Brenchley et al. 2003).

Se resuspendieron 5×10^6 linfocitos T preactivados varios días (3-5) con perlas recubiertas con anti-CD3/CD28 e IL2 en tampón T Cytoporation, y se sometieron a electroporación en cubetas de 0,4 cm sin ARNm o con 10 µg de ARNm que codifica un CAR monocatenario.

Veinticuatro (24) horas después de la electroporación, las células se tiñeron con un colorante de viabilidad fijable eFluor-780 y un fragmento F(ab')₂ anti-IgG de ratón de cabra conjugado con PE específico para evaluar la expresión superficial celular de CAR en las células vivas. Los datos se muestran en la Figura 20. A indica que la gran mayoría de los linfocitos T vivos sometidos a electroporación con el ARNm monocistrónico descrito previamente expresan el CAR en su superficie. 24 horas después de la electroporación, los linfocitos T se co-cultivaron con células Daudi (CD19⁺) durante 6 horas y se analizaron por citometría de flujo para detectar la expresión del marcador de desgranulación CD107a en su superficie (Betts, Brenchley et al. 2003).

Los resultados mostraron que las células negativas para TCRα y los linfocitos T positivos para TCRα tuvieron la misma capacidad de desgranular en respuesta a PMA/ionomicina (control positivo) o células Daudi CD19⁺. La regulación por incremento de CD107 depende de la presencia de CD19⁺. Estos datos sugieren que la ingeniería del genoma usando Cas9 no tuvo impacto negativo sobre la capacidad de los linfocitos T para organizar una respuesta antitumoral controlada.

Lista de referencias citadas en la descripción

- Arimondo, P. B., C. J. Thomas, et al. (2006). "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates." *Mol Cell Biol* 26(1): 324-33.
- Ashwell, J. D. and R. D. Klusner (1990). "Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor." *Annu Rev Immunol* 8: 139-67.
- Bardenheuer, W., K. Lehmborg, et al. (2005). "Resistance to cytarabine and gemcitabine and in vitro selection of transduced cells after retroviral expression of cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells." *Leukemia* 19(12): 2281-8.

- Betts, M. R., J. M. Brechley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." *J Immunol Methods* 281(1-2): 65-78.
- Boni, A., P. Muranski, et al. (2008). "Adoptive transfer of allogeneic tumor-specific T cells mediates effective regression of large tumors across major histocompatibility barriers." *Blood* 112(12): 4746-54.
- 5 Brahmner, J. R., C. G. Drake, et al. (2010). "Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates." *J Clin Oncol* 28(19): 3167-75.
- Cambier, J. C. (1995). "Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)." *J Immunol* 155(7): 3281-5.
- 10 Carrasco, Y. R. et al. (2001). "An endoplasmic reticulum retention function for the cytoplasmic tail of the human pre-T cell receptor (TCR) alpha chain: potential role in the regulation of cell surface pre-TCR expression levels." *J Exp Med* 193(9):1045-58.
- Cho, S.W. et al. (2013). "Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease". *Nature Biotechnology* 31: 230-232
- 15 Cong, L., F. A. Ran, et al. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." *Science* 339(6121): 819-23
- Cooper, L.J.N. (2003). "T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect". *Blood* 101(4):1637-1644.
- Coutinho, A. E. and K. E. Chapman (2011). "The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights." *Mol Cell Endocrinol* 335(1): 2-13.
- 20 Critchlow, S. E. and S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man." *Trends Biochem Sci* 23(10): 394-8.
- Dalgaard, J. Z., A. J. Klar, et al. (1997). "Statistical modeling and analysis of the LAGLIDADG family of site-specific endonucleases and identification of an intein that encodes a site-specific endonuclease of the HNH family." *Nucleic Acids Res* 25(22): 4626-38.
- 25 Deltcheva, E., K. Chylinski, et al. (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." *Nature* 471(7340): 602-7.
- Deveau, H., R. Barrangou, et al. (2008). "Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*." *J Bacteriol* 190(4): 1390-400
- 30 Eisenschmidt, K., T. Lanio, et al. (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." *Nucleic Acids Res* 33(22): 7039-47.
- Gasiunas, G., R. Barrangou, et al. (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." *Proc Natl Acad Sci USA* 109(39): E2579-86.
- 35 Geissler, R., H. Scholze, et al. (2011). "Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity." *PLoS One* 6(5): e19509.
- Gorbalenya, A. E. (1994). "Self-splicing group I and group II introns encode homologous (putative) DNA endonucleases of a new family." *Protein Sci* 3(7): 1117-20.
- Haft, D. H., J. Selengut, et al. (2005). "A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes." *PLoS Comput Biol* 1(6): e60
- 40 Howard, F. D., H. R. Rodewald, et al. (1990). "CD3 zeta subunit can substitute for the gamma subunit of Fc epsilon receptor type I in assembly and functional expression of the high-affinity IgE receptor: evidence for interreceptor complementation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(18): 7015-9.
- Huang, P., A. Xiao, et al. (2011). "Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs." *Nat Biotechnol* 29(8): 699-700.
- 45 Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." *Blood* 116(7): 1035-44.
- Jinek, M., K. Chylinski, et al. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *Science* 337(6096): 816-21.
- 50 Jonnalagadda, M., C. E. Brown, et al. (2013). "Engineering human T cells for resistance to methotrexate and mycophenolate mofetil as an in vivo cell selection strategy." *PLoS One* 8(6): e65519.
- Kleanthous, C., U. C. Kuhlmann, et al. (1999). "Structural and mechanistic basis of immunity toward endonuclease colicins." *Nat Struct Biol* 6(3): 243-52.
- Kushman, M. E., S. L. Kabler, et al. (2007). "Expression of human glutathione S-transferase P1 confers resistance to benzo[a]pyrene or benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol mutagenesis, macromolecular alkylation and formation of stable N2-Gua-BPDE adducts in stably transfected V79MZ cells co-expressing hCYP1A1." *Carcinogenesis* 28(1): 207-14.
- 55 Ma, J. L., E. M. Kim, et al. (2003). "Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences." *Mol Cell Biol* 23(23): 8820-8.
- Mak, A. N., P. Bradley, et al. (2012). "The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target." *Science* 335(6069): 716-9.
- 60 Makarova, K. S., N. V. Grishin, et al. (2006). "A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action." *Biol Direct* 1: 7
- Mali, P., L. Yang, et al. (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." *Science* 339(6121): 823-6.
- 65 Metzger, H., G. Alcaraz, et al. (1986). "The receptor with high affinity for immunoglobulin E." *Annu Rev Immunol* 4: 419-70.

- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, et al. (2009). "Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system." *Microbiology* 155(Pt 3): 733-40
- Nicholson, I.C. (1997) "Construction and characterisation of a functional CD19 specific single chain Fv fragment for immunotherapy of B lineage leukaemia and lymphoma". *Molecular Immunology* 34(16):1157-1165.
- 5 Nivens, M. C., T. Felder, et al. (2004). "Engineered resistance to camptothecin and antifolates by retroviral coexpression of tyrosyl DNA phosphodiesterase-I and thymidylate synthase." *Cancer Chemother Pharmacol* 53(2): 107-15
- Pang, S. S., R. Berry, et al. (2010). "The structural basis for autonomous dimerization of the pre-T-cell antigen receptor." *Nature* 467(7317): 844-8.
- 10 Pardoll, D. and C. Drake (2012). "Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy." *J Exp Med* 209(2): 201-9.
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* 12(4): 252-64.
- 15 Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." *Trends Biotechnol* 29(11): 550-7.
- Robert, C. and C. Mateus (2011). "[Anti-CTLA-4 monoclonal antibody: a major step in the treatment of metastatic melanoma]." *Med Sci (Paris)* 27(10): 850-8.
- Saint-Ruf, C., O. Lechner, et al. (1998). "Genomic structure of the human pre-T cell receptor alpha chain and expression of two mRNA isoforms." *Eur J Immunol* 28(11): 3824-31.
- 20 Sangiolo, D., M. Lesnikova, et al. (2007). "Lentiviral vector conferring resistance to mycophenolate mofetil and sensitivity to ganciclovir for in vivo T-cell selection." *Gene Ther* 14(21): 1549-54.
- Sapranaukas, R., G. Gasiunas, et al. (2011). "The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* 39(21): 9275-82.
- 25 Schutz, K., J. R. Hesselberth, et al. (2010). "Capture and sequence analysis of RNAs with terminal 2',3'-cyclic phosphates." *RNA* 16(3): 621-31.
- Shub, D. A., H. Goodrich-Blair, et al. (1994). "Amino acid sequence motif of group I intron endonucleases is conserved in open reading frames of group II introns." *Trends Biochem Sci* 19(10): 402-4.
- Schweitzer, B. I., A. P. Dicker, et al. (1990). "Dihydrofolate reductase as a therapeutic target." *Faseb J* 4(8): 2441-52.
- 30 Sugimoto, Y., S. Tsukahara, et al. (2003). "Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 in vivo from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91." *J Gene Med* 5(5): 366-76.
- Takebe, N., S. C. Zhao, et al. (2001). "Generation of dual resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide and methotrexate by retroviral transfer of the human aldehyde dehydrogenase class 1 gene and a mutated dihydrofolate reductase gene." *Mol Ther* 3(1): 88-96.
- 35 Van der Ploeg, J. R. (2009). "Analysis of CRISPR in *Streptococcus mutans* suggests frequent occurrence of acquired immunity against infection by M102-like bacteriophages." *Microbiology* 155(Pt 6): 1966-76
- von Boehmer, H. (2005). "Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate." *Nat Rev Immunol* 5(7): 571-7.
- 40 Waldmann, H. and G. Hale (2005). "CAMPATH: from concept to clinic." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1461): 1707-11.
- Yam, P., M. Jensen, et al. (2006). "Ex vivo selection and expansion of cells based on expression of a mutated inosine monophosphate dehydrogenase 2 after HIV vector transduction: effects on lymphocytes, monocytes, and CD34+ stem cells." *Mol Ther* 14(2): 236-44
- 45 Zielske, S. P., J. S. Reese, et al. (2003). "In vivo selection of MGMT(P140K) lentivirus-transduced human NOD/SCID repopulating cells without pretransplant irradiation conditioning." *J Clin Invest* 112(10): 1561-70

Listado de secuencias

- 50 <110> CELLECTIS CHOULIKA, André DUCHATEAU, Philippe POIROT, Laurent
- <120> MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE LINFOCITOS T PARA INMUNOTERAPIA USANDO EL SISTEMA DE NUCLEASA CAS GUIADA POR ARN
- 55 <130>
- <160> 57
- <170> PatentIn versión 3.5
- 60 <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 65 <220>
- <223> motivo RuvC

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 1

Asp Xaa Gly Xaa Xaa Ser Xaa Gly Trp Ala
1 5 10

20
 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

30
 <220>
 <223> motivo HNH

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 2

Tyr Xaa Xaa Asp His Xaa Xaa Pro Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ser
1 5 10 15

60

<210> 3
 <211> 1368
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M1

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cas9

10

<400> 3

```

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val
1          5          10          15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
          20          25          30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
          35          40          45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
          50          55          60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65          70          75          80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
          85          90          95
    
```

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
 100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
 115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
 130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
 145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
 165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
 180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
 195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
 225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
 245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
 260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
 275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
 290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
 305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
 325 330 335

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

Asp	Gln	Ser	Lys	Asn	Gly	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Asp	Gly	Gly	Ala	Ser	355	360	365	
Gln	Glu	Glu	Phe	Tyr	Lys	Phe	Ile	Lys	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Met	Asp	370	375	380	
Gly	Thr	Glu	Glu	Leu	Leu	Val	Lys	Leu	Asn	Arg	Glu	Asp	Leu	Leu	Arg	385	390	395	400
Lys	Gln	Arg	Thr	Phe	Asp	Asn	Gly	Ser	Ile	Pro	His	Gln	Ile	His	Leu	405	410	415	
Gly	Glu	Leu	His	Ala	Ile	Leu	Arg	Arg	Gln	Glu	Asp	Phe	Tyr	Pro	Phe	420	425	430	
Leu	Lys	Asp	Asn	Arg	Glu	Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Leu	Thr	Phe	Arg	Ile	435	440	445	
Pro	Tyr	Tyr	Val	Gly	Pro	Leu	Ala	Arg	Gly	Asn	Ser	Arg	Phe	Ala	Trp	450	455	460	
Met	Thr	Arg	Lys	Ser	Glu	Glu	Thr	Ile	Thr	Pro	Trp	Asn	Phe	Glu	Glu	465	470	475	480
Val	Val	Asp	Lys	Gly	Ala	Ser	Ala	Gln	Ser	Phe	Ile	Glu	Arg	Met	Thr	485	490	495	
Asn	Phe	Asp	Lys	Asn	Leu	Pro	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Pro	Lys	His	Ser	500	505	510	
Leu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Phe	Thr	Val	Tyr	Asn	Glu	Leu	Thr	Lys	Val	Lys	515	520	525	
Tyr	Val	Thr	Glu	Gly	Met	Arg	Lys	Pro	Ala	Phe	Leu	Ser	Gly	Glu	Gln	530	535	540	
Lys	Lys	Ala	Ile	Val	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Thr	Asn	Arg	Lys	Val	Thr	545	550	555	560
Val	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Asp	Tyr	Phe	Lys	Lys	Ile	Glu	Cys	Phe	Asp	565	570	575	
Ser	Val	Glu	Ile	Ser	Gly	Val	Glu	Asp	Arg	Phe	Asn	Ala	Ser	Leu	Gly	580	585	590	
Thr	Tyr	His	Asp	Leu	Leu	Lys	Ile	Ile	Lys	Asp	Lys	Asp	Phe	Leu	Asp	595	600	605	

ES 2 645 393 T3

Asn	Glu	Glu	Asn	Glu	Asp	Ile	Leu	Glu	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	610	615	620
Leu	Phe	Glu	Asp	Arg	Glu	Met	Ile	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Thr	Tyr	Ala	625	630	635
His	Leu	Phe	Asp	Asp	Lys	Val	Met	Lys	Gln	Leu	Lys	Arg	Arg	Arg	Tyr	645	650	655
Thr	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ile	Asn	Gly	Ile	Arg	Asp	660	665	670
Lys	Gln	Ser	Gly	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp	Phe	Leu	Lys	Ser	Asp	Gly	Phe	675	680	685
Ala	Asn	Arg	Asn	Phe	Met	Gln	Leu	Ile	His	Asp	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe	690	695	700
Lys	Glu	Asp	Ile	Gln	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	705	710	715
His	Glu	His	Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Lys	Lys	Gly	725	730	735
Ile	Leu	Gln	Thr	Val	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Leu	Val	Lys	Val	Met	Gly	740	745	750
Arg	His	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Val	Ile	Glu	Met	Ala	Arg	Glu	Asn	Gln	755	760	765
Thr	Thr	Gln	Lys	Gly	Gln	Lys	Asn	Ser	Arg	Glu	Arg	Met	Lys	Arg	Ile	770	775	780
Glu	Glu	Gly	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Lys	Glu	His	Pro	785	790	795
Val	Glu	Asn	Thr	Gln	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	805	810	815
Gln	Asn	Gly	Arg	Asp	Met	Tyr	Val	Asp	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Asn	Arg	820	825	830
Leu	Ser	Asp	Tyr	Asp	Val	Asp	His	Ile	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Lys	835	840	845
Asp	Asp	Ser	Ile	Asp	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Arg	Ser	Asp	Lys	Asn	Arg			

850		855		860
Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys				
865		870		880
Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys				
		885		895
Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp				
		900		910
Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr				
		915		925
Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp				
		930		940
Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser				
		950		960
Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg				
		965		975
Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val				
		980		990
Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe				
		995		1005
Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala				
		1010		1020
Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe				
		1025		1035
Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala				
		1040		1050
Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu				
		1055		1065
Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val				
		1070		1080
Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr				
		1085		1095

Glu Val 1100	Gln Thr Gly Gly Phe 1105	Ser Lys Glu Ser Ile 1110	Leu Pro Lys
Arg Asn 1115	Ser Asp Lys Leu Ile 1120	Ala Arg Lys Lys Asp 1125	Trp Asp Pro
Lys Lys 1130	Tyr Gly Gly Phe Asp 1135	Ser Pro Thr Val Ala 1140	Tyr Ser Val
Leu Val 1145	Val Ala Lys Val Glu 1150	Lys Gly Lys Ser Lys 1155	Lys Leu Lys
Ser Val 1160	Lys Glu Leu Leu Gly 1165	Ile Thr Ile Met Glu 1170	Arg Ser Ser
Phe Glu 1175	Lys Asn Pro Ile Asp 1180	Phe Leu Glu Ala Lys 1185	Gly Tyr Lys
Glu Val 1190	Lys Lys Asp Leu Ile 1195	Ile Lys Leu Pro Lys 1200	Tyr Ser Leu
Phe Glu 1205	Leu Glu Asn Gly Arg 1210	Lys Arg Met Leu Ala 1215	Ser Ala Gly
Glu Leu 1220	Gln Lys Gly Asn Glu 1225	Leu Ala Leu Pro Ser 1230	Lys Tyr Val
Asn Phe 1235	Leu Tyr Leu Ala Ser 1240	His Tyr Glu Lys Leu 1245	Lys Gly Ser
Pro Glu 1250	Asp Asn Glu Gln Lys 1255	Gln Leu Phe Val Glu 1260	Gln His Lys
His Tyr 1265	Leu Asp Glu Ile Ile 1270	Glu Gln Ile Ser Glu 1275	Phe Ser Lys
Arg Val 1280	Ile Leu Ala Asp Ala 1285	Asn Leu Asp Lys Val 1290	Leu Ser Ala
Tyr Asn 1295	Lys His Arg Asp Lys 1300	Pro Ile Arg Glu Gln 1305	Ala Glu Asn
Ile Ile 1310	His Leu Phe Thr Leu 1315	Thr Asn Leu Gly Ala 1320	Pro Ala Ala
Phe Lys 1325	Tyr Phe Asp Thr Thr 1330	Ile Asp Arg Lys Arg 1335	Tyr Thr Ser

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
1355 1360 1365

<210> 4

<211> 166

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<223> Dominio RuvC de Cas9 de *S. pyogenes*

<400> 4

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val
1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly

165

<210> 5
<211> 256
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>
<223> Versión completa del dominio HNH de Cas9 de *S. pyogenes*

<400> 5

ES 2 645 393 T3

Pro	Val	Glu	Asn	Thr	Gln	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	1	5	10	15
Leu	Gln	Asn	Gly	Arg	Asp	Met	Tyr	Val	Asp	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Asn	20	25	30	
Arg	Leu	Ser	Asp	Tyr	Asp	Val	Asp	His	Ile	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	35	40	45	
Lys	Asp	Asp	Ser	Ile	Asp	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Arg	Ser	Asp	Lys	Asn	50	55	60	
Arg	Gly	Lys	Ser	Asp	Asn	Val	Pro	Ser	Glu	Glu	Val	Val	Lys	Lys	Met	65	70	75	80
Lys	Asn	Tyr	Trp	Arg	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Lys	Leu	Ile	Thr	Gln	Arg	85	90	95	
Lys	Phe	Asp	Asn	Leu	Thr	Lys	Ala	Glu	Arg	Gly	Gly	Leu	Ser	Glu	Leu	100	105	110	
Asp	Lys	Ala	Gly	Phe	Ile	Lys	Arg	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Gln	Ile	115	120	125	
Thr	Lys	His	Val	Ala	Gln	Ile	Leu	Asp	Ser	Arg	Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	130	135	140	
Asp	Glu	Asn	Asp	Lys	Leu	Ile	Arg	Glu	Val	Lys	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	145	150	155	160
Ser	Lys	Leu	Val	Ser	Asp	Phe	Arg	Lys	Asp	Phe	Gln	Phe	Tyr	Lys	Val	165	170	175	
Arg	Glu	Ile	Asn	Asn	Tyr	His	His	Ala	His	Asp	Ala	Tyr	Leu	Asn	Ala	180	185	190	
Val	Val	Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Lys	Tyr	Pro	Lys	Leu	Glu	Ser	Glu	195	200	205	
Phe	Val	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Lys	Val	Tyr	Asp	Val	Arg	Lys	Met	Ile	Ala	210	215	220	
Lys	Ser	Glu	Gln	Glu	Ile	Gly	Lys	Ala	Thr	Ala	Lys	Tyr	Phe	Phe	Tyr	225	230	235	240
Ser	Asn	Ile	Met	Asn	Phe	Phe	Lys	Thr	Glu	Ile	Thr	Leu	Ala	Asn	Gly	245	250	255	

<210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 10 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9
 <400> 6
 15 gagaatcaaa atcggatgaat agg 23
 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 25 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9
 <400> 7
 30 ttcaaaacct gtcagtgaat ggg 23
 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 40 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9
 <400> 8
 45 tgtgctagac atgaggtcta tgg 23
 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 55 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9
 <400> 9
 60 cgtcatgagc agattaaacc cgg 23
 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

5 <220>
<223> Gen TCR diana de Cas9

<400> 10
tcaggggtct ggatatctgt ggg 23

10 <210> 11

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

20 <220>
<223> Gen TCR diana de Cas9

<400> 11
gtcaggggtc tggatatctg tgg 23

25 <210> 12

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

35 <220>
<223> Gen TCR diana de Cas9

<400> 12
ttcggaacct aatcactgac agg 23

40 <210> 13

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

50 <220>
<223> Gen TCR diana de Cas9

<400> 13
taaaccggtc cactttcagg agg 23

55 <210> 14

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

65 <220>
<223> Gen TCR diana de Cas9

	<400> 14 aaagtcagat ttgtgctcc agg	23
5	<210> 15 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético	
15	<220> <223> Gen TCR diana de Cas9	
	<400> 15 aacaatgtg tcacaaagta agg	23
20	<210> 16 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético	
30	<220> <223> Gen TCR diana de Cas9	
	<400> 16 tggatttaga gtctctcagc tgg	23
35	<210> 17 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético	
45	<220> <223> Gen TCR diana de Cas9	
	<400> 17 taggcagaca gactgtcac tgg	23
50	<210> 18 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético	
60	<220> <223> Gen TCR diana de Cas9	
	<400> 18 agctgtgaca cggcagggtc agg	23
65	<210> 19	

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

10 <400> 19
 gctggtacac ggcaggggtca ggg 23

<210> 20

15 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

25 <400> 20
 tctctcagct ggtacacggc agg 23

<210> 21

30 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

40 <400> 21
 ttcaaaacc tgtcagtgat tgg 23

<210> 22

45 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

55 <400> 22
 gattaaaccc ggccacttc agg 23

<210> 23

60 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

 5 <400> 23
 ctcgaccagc ttgacatcac agg 23

 <210> 22

 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

 20 <400> 24
 agagtctctc agctgtgaca cgg 23

 <210> 25

 25 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

 35 <400> 25
 ctctcagctg gtacacggca ggg 23

 <210> 26

 40 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

 50 <400> 26
 aagttctctgt gatgtcaagc tgg 23

 <210> 27

 55 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

 65 <400> 27
 atcctcctcc tgaaagtggc cgg 23

<210> 28
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 10 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9
 <400> 28
 15 tgctcatgac gctgcggctg tgg 23
 <210> 29
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 25 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9
 <400> 29
 30 acaaaactgt gctagacatg agg 23
 <210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 40 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9
 <400> 30
 45 attgtttga gaatcaaaat cgg 23
 <210> 31
 <211> 23
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 55 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9
 <400> 31
 60 catcacagga actttctaaa agg 23
 <210> 32
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

5 <220>
<223> Gen TCR diana de Cas9

<400> 32
gtcgagaaaa gcttgaaac agg 23

10 <210> 33

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

20 <220>
<223> Gen TCR diana de Cas9

<400> 33
ccacttcag gaggaggatt cgg 23

25 <210> 34

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

35 <220>
<223> Gen TCR diana de Cas9

<400> 34
ctgacaggtt ttgaaagttt agg 23

40 <210> 35

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

50 <220>
<223> Gen TCR diana de Cas9

<400> 35
agcttgaaa caggtaagac agg 23

55 <210> 36

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

65 <220>
<223> Gen TCR diana de Cas9

	<400> 36 tggaataatg ctgtgttga agg	23
5	<210> 37 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético	
15	<220> <223> Gen TCR diana de Cas9	
	<400> 37 agagcaacag tgctgtggcc tgg	23
20	<210> 38 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético	
30	<220> <223> Gen TCR diana de Cas9	
	<400> 38 ctgtgttcca gctgaggtga ggg	23
35	<210> 39 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético	
45	<220> <223> Gen TCR diana de Cas9	
	<400> 39 ctgcggctgt ggtccagctg agg	23
50	<210> 40 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético	
60	<220> <223> Gen TCR diana de Cas9	
	<400> 40 tgtgttccag ctgaggtgag ggg	23
65	<210> 41	

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

10 <400> 41
 ctcttcccc agcccagga agg 23

<210> 42

15 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

25 <400> 42
 acacggcagg gtcagggttc tgg 23

<210> 43

30 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

40 <400> 43
 ctcaagagc aacagtgttg tgg 23

<210> 44

45 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

55 <400> 44
 ctggggaaga aggtgtcttc tgg 23

<210> 45

60 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

5 <400> 45
 tcctcctcct gaaagtggcc ggg 23

<210> 46

10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

20 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

20 <400> 46
 ttaatctgct catgacgctg cgg 23

<210> 47

25 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

35 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

35 <400> 47
 acccgccac ttccaggagg agg 23

<210> 48

40 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

50 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

50 <400> 48
 ttctccca gccaggtaa ggg 23

<210> 49

55 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

65 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9

65 <400> 49
 ctacctggg ctgggaaga agg 23

<210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 10 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9
 <400> 50
 15 gacaccttct tccccagccc agg 23
 <210> 51
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 25 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9
 <400> 51
 30 gctgtgtgcc agctgagggtg agg 23
 <210> 52
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 40 <220>
 <223> Gen TCR diana de Cas9
 <400> 52
 45 ccgaatcctc ctctgaaag tgg 23
 <210> 53
 <211> 1410
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético
 55 <220>
 <223> Cas9 codificada por pCLS22972
 <400> 53

Met	Asp	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ile	Gly	Leu	Asp	Ile	Gly	Thr	Asn	Ser	Val
1				5					10					15	
Gly	Trp	Ala	Val	Ile	Thr	Asp	Glu	Tyr	Lys	Val	Pro	Ser	Lys	Lys	Phe
			20					25					30		
Lys	Val	Leu	Gly	Asn	Thr	Asp	Arg	His	Ser	Ile	Lys	Lys	Asn	Leu	Ile
		35					40					45			
Gly	Ala	Leu	Leu	Phe	Asp	Ser	Gly	Glu	Thr	Ala	Glu	Ala	Thr	Arg	Leu
	50					55					60				
Lys	Arg	Thr	Ala	Arg	Arg	Arg	Tyr	Thr	Arg	Arg	Lys	Asn	Arg	Ile	Cys
65					70					75					80
Tyr	Leu	Gln	Glu	Ile	Phe	Ser	Asn	Glu	Met	Ala	Lys	Val	Asp	Asp	Ser
				85					90					95	
Phe	Phe	His	Arg	Leu	Glu	Glu	Ser	Phe	Leu	Val	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys
			100					105					110		
His	Glu	Arg	His	Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Ile	Val	Asp	Glu	Val	Ala	Tyr
		115					120					125			
His	Glu	Lys	Tyr	Pro	Thr	Ile	Tyr	His	Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Val	Asp
	130					135					140				

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
 145 150 155 160
 Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
 165 170 175
 Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
 195 200 205
 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
 245 250 255
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
 260 265 270
 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
 275 280 285
 Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
 325 330 335
 Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
 340 345 350
 Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
 355 360 365
 Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
 370 375 380
 Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
 385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
 405 410 415
 Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
 420 425 430
 Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
 435 440 445
 Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
 450 455 460
 Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
 465 470 475 480
 Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
 485 490 495
 Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
 500 505 510
 Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
 515 520 525
 Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
 530 535 540
 Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
 545 550 555 560
 Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
 565 570 575
 Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
 580 585 590
 Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
 595 600 605
 Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
 610 615 620
 Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
 625 630 635 640
 His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
 645 650 655

Thr	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ile	Asn	Gly	Ile	Arg	Asp	660	665	670
Lys	Gln	Ser	Gly	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp	Phe	Leu	Lys	Ser	Asp	Gly	Phe	675	680	685
Ala	Asn	Arg	Asn	Phe	Met	Gln	Leu	Ile	His	Asp	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe	690	695	700
Lys	Glu	Asp	Ile	Gln	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	705	710	715
His	Glu	His	Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Lys	Lys	Gly	725	730	735
Ile	Leu	Gln	Thr	Val	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Leu	Val	Lys	Val	Met	Gly	740	745	750
Arg	His	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Val	Ile	Glu	Met	Ala	Arg	Glu	Asn	Gln	755	760	765
Thr	Thr	Gln	Lys	Gly	Gln	Lys	Asn	Ser	Arg	Glu	Arg	Met	Lys	Arg	Ile	770	775	780
Glu	Glu	Gly	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Lys	Glu	His	Pro	785	790	795
Val	Glu	Asn	Thr	Gln	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	805	810	815
Gln	Asn	Gly	Arg	Asp	Met	Tyr	Val	Asp	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Asn	Arg	820	825	830
Leu	Ser	Asp	Tyr	Asp	Val	Asp	His	Ile	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Lys	835	840	845
Asp	Asp	Ser	Ile	Asp	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Arg	Ser	Asp	Lys	Asn	Arg	850	855	860
Gly	Lys	Ser	Asp	Asn	Val	Pro	Ser	Glu	Glu	Val	Val	Lys	Lys	Met	Lys	865	870	875
Asn	Tyr	Trp	Arg	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Lys	Leu	Ile	Thr	Gln	Arg	Lys	885	890	895
Phe	Asp	Asn	Leu	Thr	Lys	Ala	Glu	Arg	Gly	Gly	Leu	Ser	Glu	Leu	Asp			

ES 2 645 393 T3

900	905	910
Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr 915 920 925		
Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp 930 935 940		
Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser 945 950 955 960		
Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg 965 970 975		
Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val 980 985 990		
Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe 995 1000 1005		
Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys 1010 1015 1020		
Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser 1025 1030 1035 1040		
Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu 1045 1050 1055		
Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile 1060 1065 1070		
Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser 1075 1080 1085		
Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly 1090 1095 1100		
Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile 1105 1110 1115 1120		
Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser 1125 1130 1135		
Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly 1140 1145 1150		

Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile
1155 1160 1165

Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala
1170 1175 1180

Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys
1185 1190 1195 1200

Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser
1205 1210 1215

Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr
1220 1225 1230

Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His
1250 1255 1260

Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val
1265 1270 1275 1280

Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys
1285 1290 1295

His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu
1300 1305 1310

Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp
1315 1320 1325

Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp
1330 1335 1340

Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile
1345 1350 1355 1360

Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp Gly Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys
1365 1370 1375

Val Glu Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Ser Pro Lys Lys Lys
1380 1385 1390

Arg Lys Val Glu Gly Asn Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1395 1400 1405

Ala Asp
1410

	<210> 54		
	<211> 20		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> TCRa diana		
10	<400> 54		
	gtcagggttc tggatatctg	20	
	<210> 55		
15	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> CD52 diana		
	<400> 55		
	ggaggctgat ggtgagtagg	20	
25	<210> 56		
	<211> 496		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético		
	<220>		
35	<223> pCLS24029 de TCRa de ARNg		
	<400> 56		
	cgcgcgggccg cgcggtggccg gacggggccgg tacctgtaca aaaaagcagg ctttaaagga 60		
	accaattcag tcgactggat ccggtaccaa ggctcgggcag gaagagggcc tatttcccat 120		
	gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataatta gaattaattt 180		
	gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat aatttcttgg 240		
	gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta ccgtaacttg 300		
	aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaaca ccgtcagggg 360		
	tctggatatc tggttttaga gctagaaata gcaagttaaa ataaggctag tccgttatca 420		
	acttgaaaaa gtggcaccga gtcggtgctt tttttctaga cccagcaggt ggccactggg 480		
	gcccgcgaat tcgcgt		496
40	<210> 57		
	<211> 496		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético		
50	<220>		
	<223> pCLS24027 de CD52 de ARNg		
	<400> 57		

ES 2 645 393 T3

cgcgcggccg	cgcgtggccg	gacgggcccg	tacctgtaca	aaaaagcagg	ctttaaagga	60
accaattcag	tcgactggat	ccggtaccaa	ggtcgggcag	gaagagggcc	tatttcccat	120
gattccttca	tatttgcata	tacgatacaa	ggctgttaga	gagataatta	gaattaattt	180
gactgtaaac	acaaagatat	tagtacaaaa	tacgtgacgt	agaaagtaat	aatttcttgg	240
gtagtttgca	gttttaaaat	tatgttttaa	aatggactat	catatgctta	ccgtaacttg	300
aaagtatttc	gatttcttgg	ctttatatat	cttgtggaaa	ggacgaaaca	ccggaggctg	360
atggtgagta	gggtttttaga	gctagaaata	gcaagttaaa	ataaggctag	tccgttatca	420
acttgaaaaa	gtggcaccga	gtcggtgctt	tttttctaga	cccagcaggt	ggccactggg	480
gcccgcgaat	tcgcgt					496

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de linfocitos T para inmunoterapia que comprende las etapas de:

5 (a) Modificar genéticamente linfocitos T introduciendo en las células y/o expresando en las células al menos:

- una endonucleasa guiada por ARN; y
 - un ARN guía específico que dirige dicha endonucleasa a al menos un locus elegido como diana en el
- 10 en el que dicha endonucleasa guiada por ARN se expresa de ARNm transfectado, y dicho ARN guía se expresa en las células como un transcrito de un vector de ADN;

(b) expandir las células resultantes *in vitro*.

15 2. Un método según la reivindicación 1, en el que dicha endonucleasa guiada por ARN comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los dominios RuvC o HNH de Cas9 de *S. Pyogenes* (SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2).

20 3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que la endonucleasa guiada por ARN es Cas9.

4. Un método según la reivindicación 2, en el que la endonucleasa guiada por ARN se divide en al menos 2 polipéptidos, uno que comprende RuvC y otro que comprende HNH.

25 5. Un método según la reivindicación 4, en el que la endonucleasa guiada por ARN se expresa en una forma estabilizada o inactiva, que se vuelve activa tras la activación por una enzima producida por el linfocito T o desestabilización de su estructura de polipéptido dentro del linfocito T.

30 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ARN guía se expresa de un ADN de plásmido.

7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho ARNm transfectado se estabiliza incluyendo bases de ácido nucleico modificadas o secuencias de poliadenilación.

35 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho ARNm transfectado se estabiliza por agregación de ARCA (anti-análogo inverso de terminación).

9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho ARNm transfectado se estabiliza por agregación de 5' o 3' UTR.

40 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho ARNm transfectado se acopla a al menos un péptido penetrante en la célula.

45 11. Un método según la reivindicación 10, en el que dicho péptido penetrante en la célula está seleccionado de penetratina, TAT, péptido de poliarginina, pVEC, MPG, Transportan, transportador molecular rico en guanidino.

12. Un método según la reivindicación 11, en el que dichos péptidos penetrantes comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas de RQIRIWFQNRMRWRR; RQIRIWFQNRMRWRRC y/o RQIKIWFQNRMRMKWKKC.

50 13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho ARNm se introduce en las células por electroporación.

14. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho vector de ADN es un vector episómico.

55 15. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho vector de ADN comprende un promotor U6 para la transcripción más eficiente de dicho ARN guía en los linfocitos T.

16. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho ARN de endonucleasa se transfecta usando vectores liposómicos.

60 17. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que al menos un locus elegido como diana codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR).

18. Un método según la reivindicación 17, que comprende además la etapa de clasificar los linfocitos T transformados que no expresan TCR en su superficie celular.

65

19. Un método según la reivindicación 17, en el que dicho componente del receptor de linfocitos T es TCR α .
20. Un método según la reivindicación 19, en el que dicho ARN guía se hibrida específicamente con una secuencia diana de TCR α seleccionada de SEQ ID NO. 6 a SEQ ID NO. 52 enumeradas en la Tabla 2.
- 5 21. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que al menos un locus elegido como diana por dicha endonucleasa guiada por ARN y ARN guía codifica una proteína reguladora inmunitaria seleccionada de CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, LAG3, HAVCR2, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, 10 FAS, TGFBRII, TGFRBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1 B2 y GUCY1 B3.
22. Un método según la reivindicación 20, en el que dicho locus elegido como diana por dicha endonucleasa guiada por ARN y ARN guía codifica PD1 o CTLA-4.
- 15 23. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que al menos un locus elegido como diana por dicha endonucleasa guiada por ARN y ARN guía es un gen sensibilizante a fármaco o un gen que expresa una diana para un agente inmunosupresor.
- 20 24. El método según la reivindicación 23, en el que dicho locus elegido como diana es CD52, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) o un receptor de glucocorticoides (GR).
- 25 25. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el que se induce recombinación homóloga en dicho locus elegido como diana para introducir un ADN exógeno o una mutación en el genoma de linfocitos T.
26. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, que comprende además introducir en dichos linfocitos T un receptor de antígeno quimérico (CAR).
- 30 27. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en el que dichos linfocitos T en la etapa a) derivan de linfocitos T inflamatorios, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores o linfocitos T cooperadores.
28. El método según la reivindicación 27, en el que dichos linfocitos T en la etapa a) derivan de linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+.

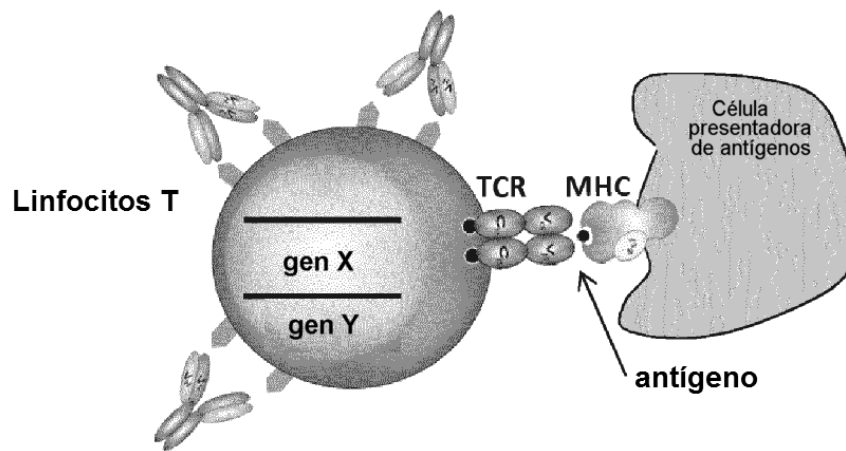


Figura 1

Cas9 + ARN guía específico

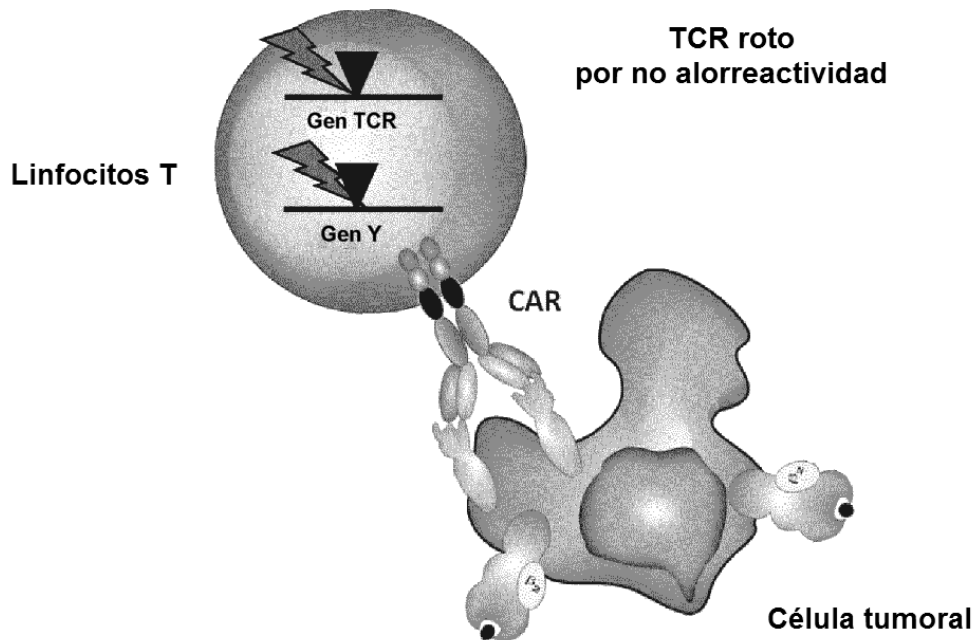
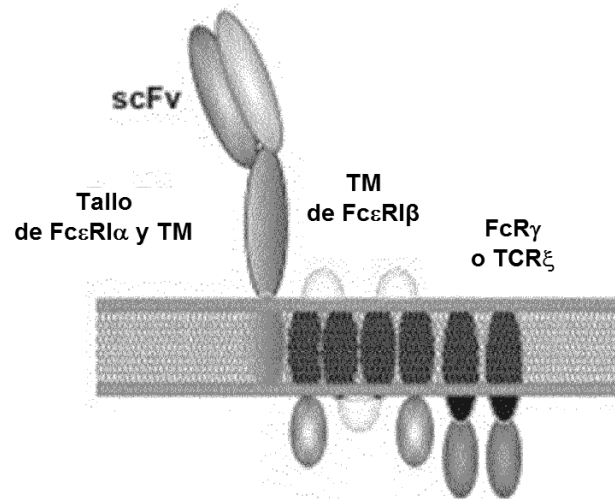


Figura 2

CAR multi-cadena



Dominios
de señalización
activantes
- la cadena beta
permite que todos
los dominios
de señalización
estén en posición
de yuxtamembrana natural
- la cadena beta
ya posicionada para interacciones
de señales de FcRγ o TCRzeta

Figura 3

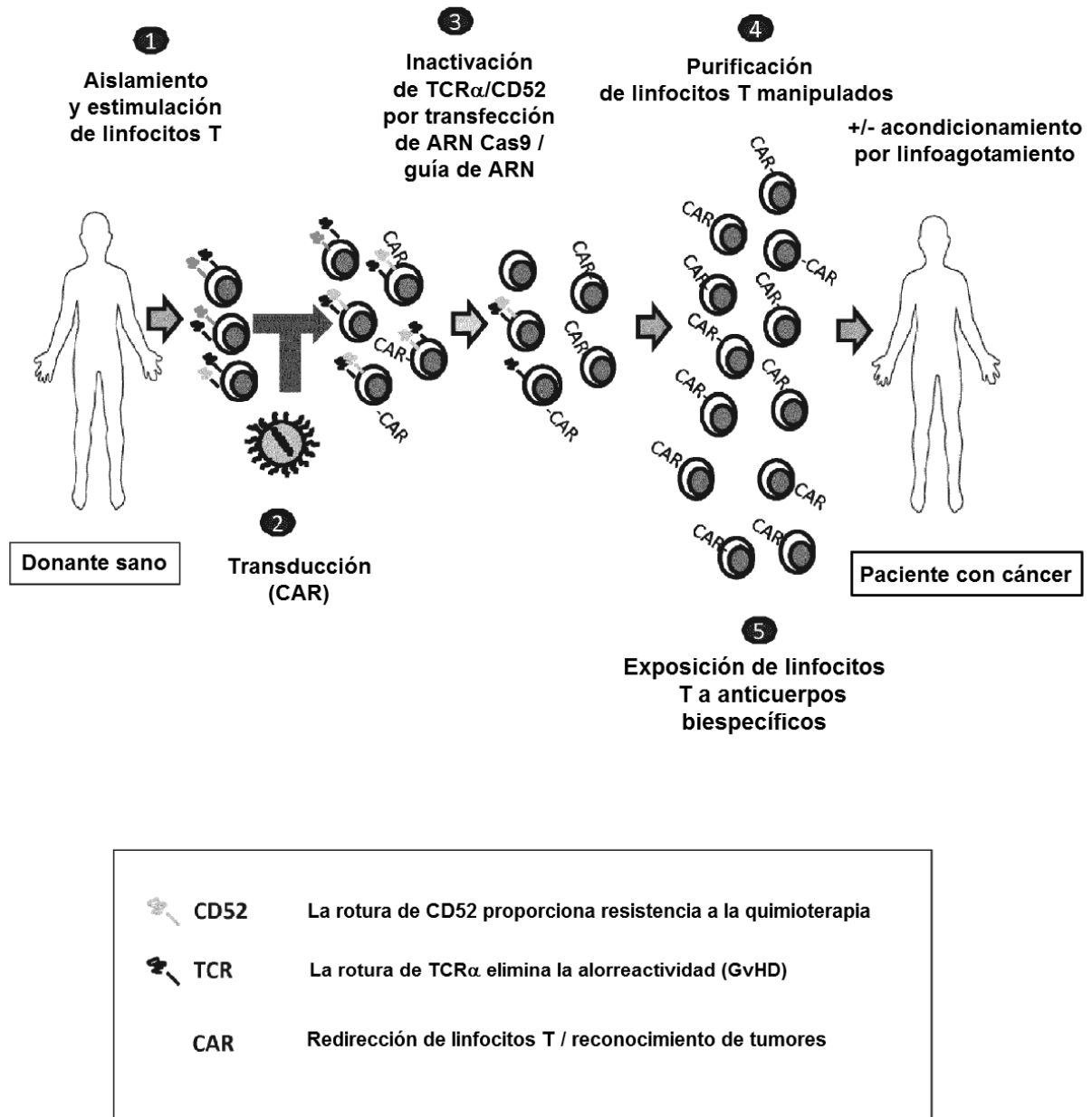


Figura 4

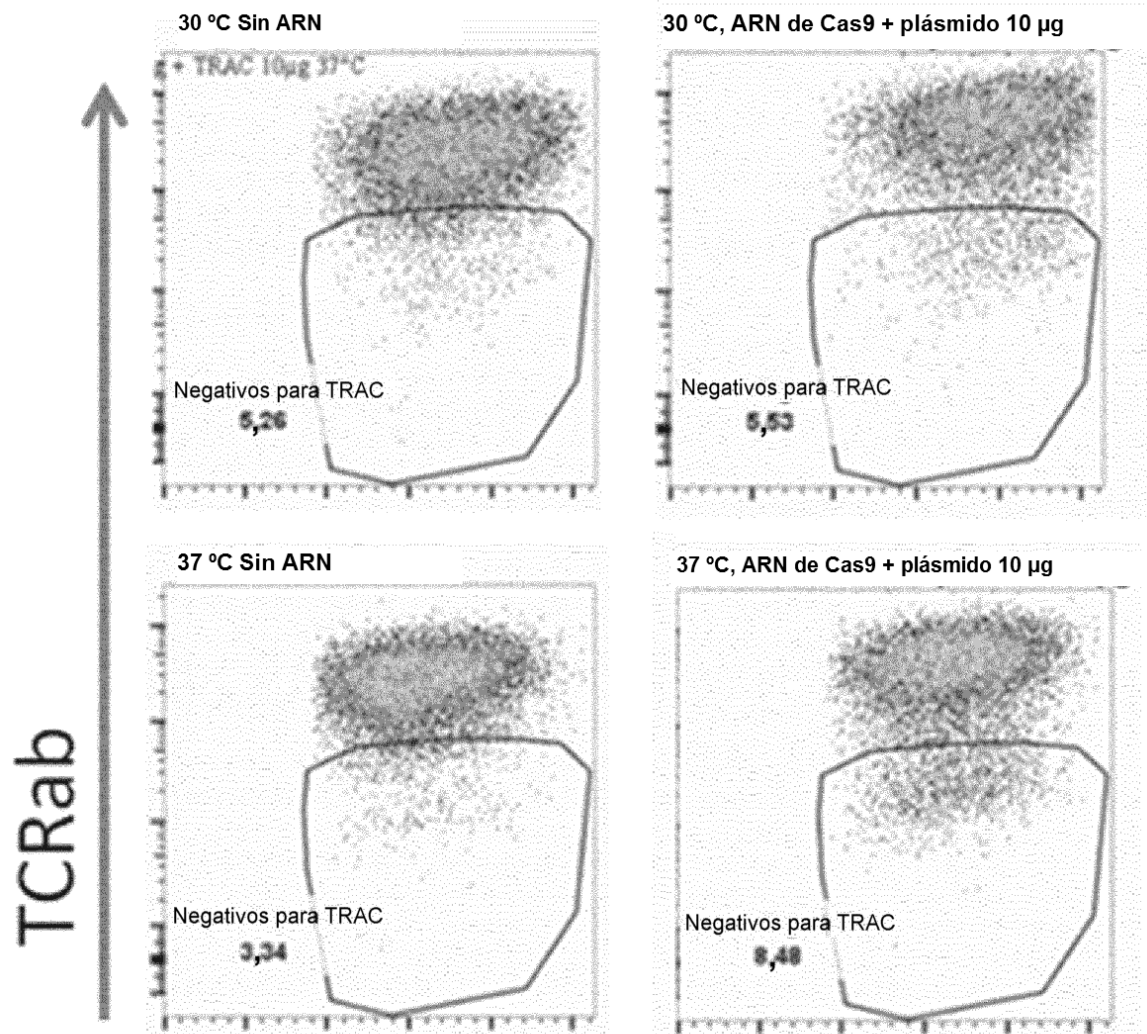


Figura 5

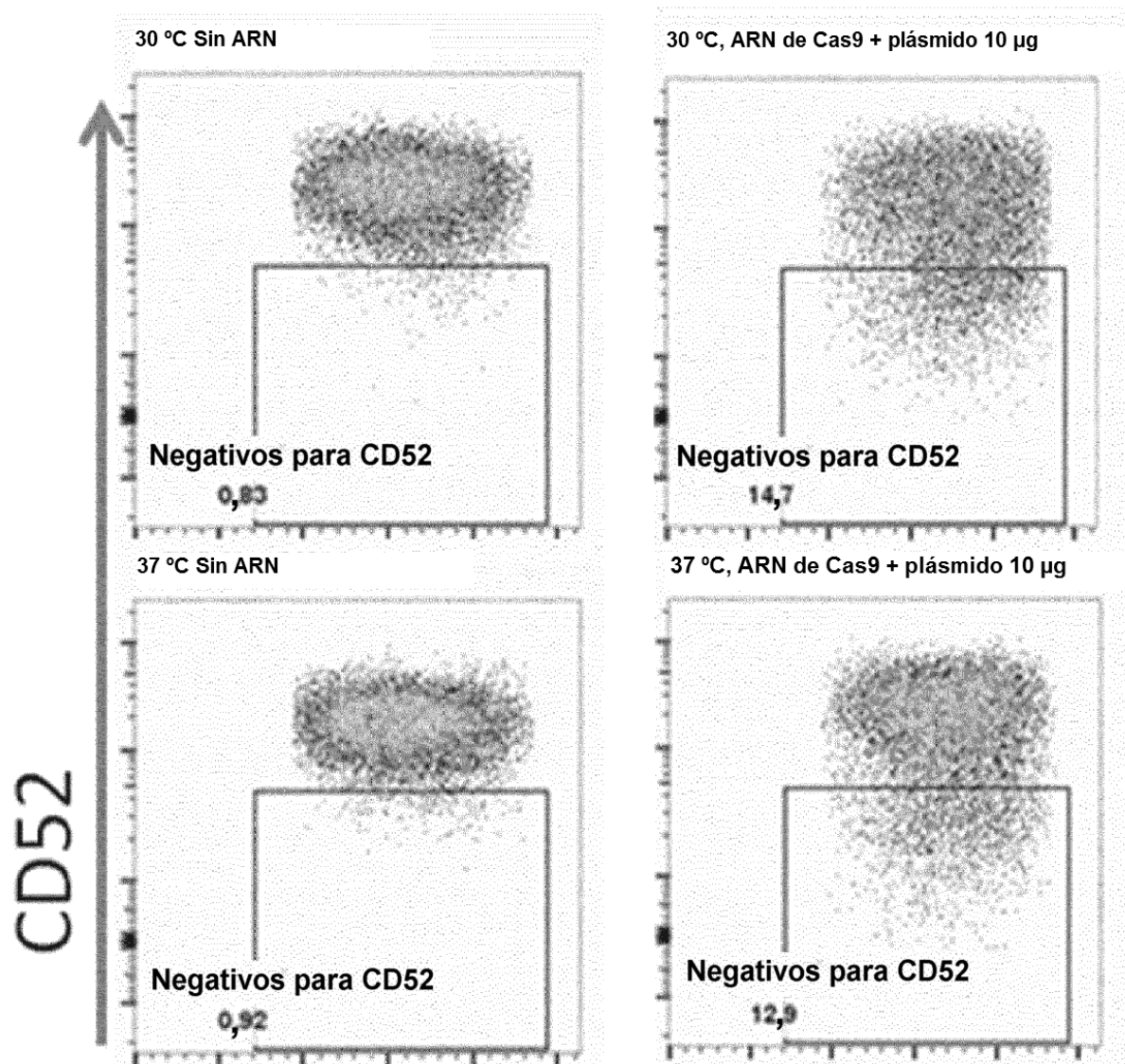


Figura 6