

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 747**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2016 PCT/US2016/033651**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16191315**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2016 E 16730086 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3297642**

54 Título: **Métodos de rastreo para dianas para la terapia contra el cáncer**

30 Prioridad:

22.05.2015 US 201562165784 P

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

23.04.2020

73 Titular/es:

**STCUBE & CO., INC. (50.0%)
7 floor (Samsung-dong, Jungsoek Building),
Samsung-ro 96 Gil 12, Gangnam-gu
Seoul 06168, KR y
BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LIN, STEVEN, HSESHENG y
YOO, STEPHEN, SUNGHAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 755 747 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 rastreo para dianas para la terapia contra el cáncer

1. Campo

En la presente memoria se proporcionan métodos para identificar dianas potenciales para la terapia contra el cáncer.

5 **2. Antecedentes**

El microambiente tumoral es intrínsecamente inhibitorio debido a la presencia de células supresoras derivadas de mieloides ("MDSC") y células T reguladoras ("T-reg") que se infiltran en el tumor y actúan suprimiendo las respuestas inmunes. Además, la expresión de determinadas moléculas inhibitorias en células T y células presentadoras de antígeno (APC) puede limitar las respuestas inmunes efectivas. La radiación actúa como mediadora en los efectos antitumorales a través de la inducción de apoptosis de células tumorales, senescencia, autofagia. La radiación puede modular el microambiente tumoral a través de factores que pueden servir como dianas para la terapia contra el cáncer. Por lo tanto, los métodos para rastrear estos factores y tratar el cáncer estableciendo estos factores como dianas representan necesidades insatisfechas. Los métodos proporcionados en la presente divulgación satisfacen estas necesidades y proporcionan otras ventajas relacionadas.

15 El documento WO 2014/201021 describe un método para identificar un gen a partir de un tumor no irradiado que inhibe la función de una célula T de respuesta inmune.

Khandelwal et al., EMBO Molecular Medicine, vol. 7: 4, pp. 450-463 describe una estrategia de rastreo de alto rendimiento basada en ARNip, que permite identificar ligandos en células cancerosas humanas que inhiben la eliminación de células tumorales mediada por CTL.

20 **3. Compendio**

En un aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que comprende medir una actividad de una célula T no modificada y de una célula T modificada; siendo puestas dicha célula T no modificada y dicha célula T modificada en cada caso en contacto con el microambiente tumoral de un individuo portador de tumor irradiado; teniendo dicha célula T modificada un gen candidato inactivado (*knocked-out*) o parcialmente inactivado (*knocked-down*); en donde dicho gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si dicha actividad ha aumentado cuando se compara dicha célula T modificada con dicha célula T no modificada.

30 En una realización, dicha actividad se selecciona entre el grupo que consiste en proliferación, activación del ciclo celular, inhibición de la muerte celular, producción de citocinas y una actividad citotóxica. En otra realización, el método comprende medir dicha actividad de dicha célula T no modificada y de dicha célula T modificada, cada una de ellas en contacto con el microambiente tumoral de un individuo portador de tumor no irradiado; en donde dicha actividad es sustancialmente igual en dicha célula T no modificada y en dicha célula T modificada.

35 En un segundo aspecto, la invención proporciona un método *in vivo* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que comprende: (i) inyectar una célula T no modificada y una célula T modificada en individuos de prueba no humanos portadores de tumor irradiado; teniendo dicha célula T modificada un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) medir una actividad de dicha célula T no modificada y de dicha célula T modificada en dichos individuos de prueba no humanos, en donde dicha actividad consiste en la actividad de proliferación o actividad antitumoral; en donde dicho gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si dicha actividad ha aumentado cuando se compara dicha célula T modificada con dicha célula T no modificada; en donde 40 dicha célula T modificada es opcionalmente una célula T de referencia.

En una realización, el método comprende además inyectar dicha célula T no modificada y dicha célula T modificada a individuos de prueba no irradiados, en donde dicha actividad es sustancialmente igual cuando se compara dicha célula T modificada con dicha célula T no modificada en dichos individuos de prueba no irradiados.

45 En una realización, dicho individuo ha recibido radiación dirigida a tumor en una dosis de 1 Gy a 20 Gy. En otra realización, dicha actividad es: (i) actividad de proliferación medida mediante acumulación de células T inyectadas; (ii) actividad antitumoral medida mediante la muerte de células tumorales o la reducción del tamaño del tumor; o (iii) actividad antitumoral medida mediante un aumento de la supervivencia de individuos sometidos a prueba. En otra realización, dicho individuo de prueba es un ratón, siendo dicho ratón preferiblemente un ratón con dos tumores, en donde únicamente un tumor ha recibido radiación dirigida.

50 Preferiblemente, dicha actividad es actividad antitumoral medida mediante la reducción del tamaño del tumor no irradiado.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método de rastreo de agrupaciones *in vitro* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que comprende: (i) preparar una población inicial de células T con diferentes

modificaciones genéticas, en donde cada célula T tiene a lo sumo un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) poner en contacto dicha población inicial de células T con el microambiente tumoral de un individuo portador de tumor irradiado, durante un período de tiempo para producir una población seleccionada de células T; en donde el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T se identifica como el gen diana para la terapia contra el cáncer.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método de rastreo de agrupaciones *in vivo* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que comprende: (i) preparar una población inicial de células T con diferentes modificaciones genéticas, en donde cada célula T tiene a lo sumo un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) inyectar dicha población inicial de células T en un individuo de prueba no humano portador de tumor irradiado, en el que dicha población inicial de células T produce una población seleccionada de células T; en donde el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T se identifica como el gen diana para la terapia contra el cáncer.

En una realización, dicho gen candidato se inactiva o se inactiva parcialmente en dicha célula T modificada o en dicha población inicial de células T: (i) utilizando una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN); (ii) utilizando CAS9 (CRISPR); o (iii) infectando células T con una genoteca de ARNhc, siendo la genoteca de ARNhc opcionalmente una genoteca de vectores de lentivirus. Preferiblemente, cada célula T de la población inicial en la parte (iii) tiene a lo sumo un ARNhc para un gen candidato, y un gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si el ARNhc para el gen candidato está enriquecido en la población seleccionada de células T en comparación con la población inicial de células T, en donde opcionalmente: (i) un gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si el ARNhc para el gen candidato está enriquecido en la población seleccionada de células T obtenida de una muestra tumoral en comparación con una muestra de tejido no tumoral; (ii) un gen candidato se identifica como un gen diana si el ARNhc para dicho gen candidato está enriquecido más de 2 veces en la muestra tumoral en comparación con la muestra de tejido no tumoral; o (iii) un gen candidato se identifica como un gen diana si el ARNhc para dicho gen candidato está enriquecido más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 10 veces, más de 15 veces, o más de 20 veces en la muestra tumoral en comparación con la muestra de tejido no tumoral, comprendiendo el método opcionalmente cuantificar el ARNhc en la población seleccionada de células T mediante NGS.

En otra realización, dichas células T o dicha población inicial de células T son: (i) células T naïfs; (ii) células T CD8+; o (iii) aisladas de un ratón, siendo dicho ratón opcionalmente de tipo silvestre o modificado por ingeniería genética para expresar un receptor de células T específico para un antígeno que no está presente de forma natural en los ratones, consistiendo dicho antígeno opcionalmente en ovoalbúmina. En otra realización, dichas células T o dicha población inicial de células T están marcadas, consistiendo dicha marcación opcionalmente en éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE).

En una realización, el método del tercer y el cuarto aspecto comprende además aislar dicha población seleccionada de células T de una muestra de dicho individuo de prueba, en donde opcionalmente: (i) dicha muestra es una muestra tumoral, en donde opcionalmente dicha muestra tumoral ha recibido radiación dirigida o el individuo de prueba es un modelo de dos tumores y dicha muestra tumoral no ha recibido radiación dirigida; o (ii) dicha muestra es una muestra no tumoral, consistiendo dicha muestra de tejido no tumoral opcionalmente en una muestra de bazo o una muestra de ganglios linfáticos. En otra realización, el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T se identifica mediante NGS de ADN genómicos aislados de la población seleccionada de células T.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un método *ex vivo* para activar una célula T mediante la inhibición del gen diana identificado en uno cualquiera de los anteriores aspectos o realizaciones de dicha célula T.

En la presente memoria se proporcionan métodos de rastreo *in vitro* de alto rendimiento para identificar una diana para la terapia contra el cáncer utilizando un ensayo de supresión de células T en combinación con tratamiento de radioterapia.

En la presente memoria también se proporcionan métodos de rastreo *in vitro* para identificar una diana para la terapia contra el cáncer utilizando un ensayo de supresión de células T en combinación con radioterapia, realizándose los ensayos mediante el uso de agrupaciones de dianas que se expresan en cultivos celulares.

En la presente memoria también se proporcionan métodos de rastreo *in vivo* para identificar una diana para la terapia contra el cáncer utilizando un ensayo de supresión de células T en combinación con radioterapia en individuos no humanos con tumor implantado.

En determinadas realizaciones, los métodos de rastreo *in vitro* e *in vivo* proporcionados en la presente memoria se pueden utilizar en combinación, por ejemplo, realizando secuencialmente un método *in vitro* proporcionado en la presente memoria, seguido de un método *in vivo* proporcionado en la presente memoria utilizando dianas candidatas identificadas a partir del método *in vitro*.

3.1 Definiciones

Tal como se utilizan en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, los artículos "un", "una", "el" y "la" se refieren a uno o más de uno de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, una célula T se refiere a una célula T o más de una célula T.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, el término "cáncer" o "canceroso" se refiere a la condición fisiológica que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado en un individuo. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cánceres hematológicos y tumores sólidos.

10 Tal como se utilizan en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, los términos "tratar", "que trata", "tratamiento", cuando se utilizan con referencia a un paciente con cáncer, se refieren a una acción que reduce la gravedad del cáncer, o retrasa o lentifica la progresión del cáncer, incluyendo (a) inhibir el crecimiento del cáncer o detener el desarrollo del cáncer y (b) provocar la regresión del cáncer o retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con la presencia del cáncer. El tratamiento del cáncer puede incluir uno o una combinación de dos o más tipos diferentes de terapias, incluyendo cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, etc.

15 La radioterapia es un tipo de tratamiento contra el cáncer que utiliza haces de energía intensa para dañar o matar células cancerosas. La radioterapia puede usar rayos X, protones u otros tipos de energía. En muchos casos, la radioterapia se refiere a la radioterapia de haz externo. Durante este tipo de radiación, los haces de alta energía son generados por una máquina fuera del cuerpo del paciente que apunta los haces a un punto preciso del tumor. En otros tipos de radioterapia, como la braquiterapia, la fuente de radiación también se puede colocar dentro del cuerpo del paciente.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, el término "individuo" o "paciente" se refiere a un animal que es objeto de tratamiento, observación y/o experimento. "Animal" incluye vertebrados e invertebrados, como peces, crustáceos, reptiles, aves y, en particular, mamíferos. "Mamífero" incluye, pero no se limita a, ratones, ratas, conejos, conejillos de indias, perros, gatos, ovejas, cabras, vacas, caballos, primates, como monos, chimpancés, simios y humanos. Un individuo se puede referir a un animal para utilizarlo en pruebas o experimentos *in vivo*. El individuo sometido a la prueba o experimentación también se puede designar como "individuo de prueba".

25 En el contexto de la invención se ha de entender que los términos individuo o paciente se refieren a un individuo o paciente no humano cuando se mencionan en las etapas de métodos *in vivo* descritas en la presente memoria.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, la expresión "individuo portador de tumor" se refiere a un individuo que tiene un tumor o células tumorales en su cuerpo. Estas células tumorales pueden ser externas al individuo e inoculadas en el individuo con fines de experimentación. El individuo portador de tumor puede tener más de un tumor. Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, la expresión "modelo de dos tumores" se refiere a un modelo animal en el que el animal portador de tumor tiene al menos dos tumores, con dos tumores en lugares distantes. Los dos tumores pueden ser contralaterales entre sí. Los dos tumores en lugares distantes pueden ser de un tamaño similar o igual. El modelo de dos tumores se puede utilizar, por ejemplo, en estudios relacionados con la radiación.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, la expresión "individuo irradiado" se refiere a un individuo que ha recibido radiación. La radiación puede ser radiación dirigida al tumor. En el modelo de dos tumores, el individuo irradiado se puede referir al individuo que ha recibido radiación en solo uno de los dos tumores distantes. Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, la expresión "individuo no irradiado" se refiere a un individuo que no ha recibido radiación. Un "individuo no irradiado" y un "individuo irradiado" se pueden referir al mismo individuo antes y después de la irradiación. Un "individuo no irradiado" y un "individuo irradiado" también se pueden referir a dos individuos de prueba que son utilizados en experimentos paralelos para estudiar los efectos de la radiación. Estos individuos de prueba en experimentos paralelos pueden ser individuos que tengan los mismos antecedentes genéticos y/o que hayan recibido el mismo tratamiento exceptuando la radiación.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, el término "gen" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras o de control apropiadas. Los límites del gen están determinados por un codón de inicio en el extremo 5 '(amino) y un codón de terminación de traducción en el extremo 3' (carboxi). Un gen puede incluir, pero no se limita a, ADNc procedente de ARNm procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico procedentes de ADN procariota o eucariota, e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de transcripción generalmente estará situada en dirección 3' con respecto a la secuencia del gen.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, la expresión "gen candidato" se refiere a un gen que se somete a los métodos de rastreo proporcionados en la presente memoria. El gen candidato se puede inactivar o inactivar parcialmente para evaluar la participación del gen en la modulación de la respuesta inmune de células T en combinación con radioterapia. Dependiendo del resultado del rastreo, el "gen candidato" o la proteína codificada por el "gen candidato" se identifican como una diana potencial adecuada para la terapia contra el cáncer.

Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, la expresión "gen diana" se refiere a un gen que puede servir como diana para la terapia contra el cáncer. El "gen diana" se puede identificar entre genes candidatos mediante métodos descritos en la presente memoria.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, el término "inactivar", cuando se usa en relación con un gen, significa que la expresión del gen indicado se suprime por completo o casi por completo. La expresión del gen indicado que está inactivado en una célula o tejido se puede reducir en al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100%, en comparación con su nivel de expresión normal en la célula o el tejido. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de un gen que está inactivado en una célula no es detectable mediante la utilización de medios ordinarios conocidos en la técnica para la detección de la expresión génica.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, la expresión "inactivar parcialmente", cuando se usa en relación con un gen, significa que la expresión del gen indicado se reduce significativamente. La expresión del gen indicado que está parcialmente inactivado en una célula o tejido se reduce en al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, o al menos un 90%, en comparación con su nivel de expresión normal en la célula o el tejido. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de un gen que está parcialmente inactivado en una célula o tejido se reduce al menos en un 50% en comparación con el nivel de expresión normal del gen en la célula o tejido.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, el término "aislar" se refiere al proceso durante el cual el objeto indicado se separa de al menos un componente presente en el entorno natural en el que el objeto está normalmente presente. El término "aislar", cuando se utiliza en relación con una célula o una población de células, se puede referir al proceso de obtención de una muestra que contiene la célula o la población de células del cuerpo de un individuo, y/o al proceso de separación de la célula o la población de células de otras células o de otro contenido en una muestra que contiene la célula o la población de células.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, el término "contacto", cuando se usa en relación con una célula, se refiere al proceso en el que la célula se coloca muy cerca de la sustancia indicada de tal modo que la célula pueda interactuar con la sustancia, y/o resultar afectada por la presencia de dicha sustancia. El contacto puede ser temporal o transitorio. El contacto también puede durar un período de tiempo o ser permanente. Por ejemplo, poner en contacto una célula T con una célula supresora se puede referir al proceso en el que la célula T y la célula supresora se cultivan juntas en un recipiente *in vitro*, donde las células están tan cerca que las moléculas receptoras en sus superficies pueden interactuar entre sí. El contacto puede durar tanto como la duración del cultivo *in vitro*. Poner en contacto una célula T con una célula supresora también se puede referir al proceso en el que la célula T se inyecta a un individuo que tiene células supresoras que interactuarían con la célula T inyectada. Este contacto puede ser transitorio.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, el término "vector" se refiere al vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula huésped, para promover la expresión (por ejemplo, transcripción y/o traducción) de la secuencia introducida o para inactivar o inactivar parcialmente un gen diana mediante recombinación u otros mecanismos. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, pseudovirus, etc.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, el término "transfección" pretende incluir cualquier medio, tal como, pero sin limitación, adsorción, microinyección, electroporación, lipofección y similares, para introducir una molécula de ácido nucleico exógeno en una célula huésped.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, el término "célula T" se refiere al tipo de leucocito que completa la maduración en el timo y que tiene varias funciones en el sistema inmunitario, incluyendo la identificación de antígenos extraños específicos en el cuerpo y la activación y desactivación de otras células inmunes. Las células T tienen una serie de subtipos, incluyendo células T citotóxicas, células T colaboradoras (Th) y células T reguladoras (Treg), basados en la función. La expresión diferencial de marcadores sobre la superficie celular proporciona pistas valiosas sobre la naturaleza y función diversas de las células T, y puede servir como herramientas útiles para el aislamiento de células T o subtipos específicos de células T. Por ejemplo, las células T se pueden aislar seleccionando células CD3+ mediante citometría de flujo. Además de los marcadores de superficie, los diferentes subtipos de células T también pueden tener distintos perfiles de función y de secreción de citocinas. Por ejemplo, las células T citotóxicas CD8+ destruyen las células diana infectadas a través de la liberación de perforina, granzimas y granulinsina, mientras que las células T colaboradoras CD4+ tienen poca actividad citotóxica y segregan citocinas que actúan sobre otros leucocitos tales como células B, macrófagos, eosinófilos o neutrófilos. Las Treg suprimen la función de las células T mediante diversos mecanismos, incluyendo la unión a subconjuntos de células T efectoras y la prevención de la secreción de sus citocinas.

40 A no ser que se especifique lo contrario, una célula T puede ser cualquier tipo de célula T y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, incluyendo, pero sin limitación, células T positivas dobles CD4+/CD8+, células T colaboradoras CD4+ (por ejemplo, células Th1 y Th2), células T CD8+ (por ejemplo células T citotóxicas), células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos de sangre periférica (PBL), linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), células T de

memoria, células T naïfs, células T reguladoras, T células gamma delta (células T $\gamma\delta$), y similares. Algunos tipos adicionales de células T colaboradoras incluyen células tales como células Th3, Th17, Th9 o Tfh. Algunos tipos adicionales de células T de memoria incluyen células tales como células T de memoria centrales (células TCM), células T de memoria efectoras (células TEM y células TEMRA).

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, la expresión "una célula T no modificada" se refiere a una célula T que no se ha modificado por ingeniería genética con referencia a los genes candidatos que están siendo probados o rastreados. La célula T no modificada puede ser una célula T de tipo silvestre. La célula T no modificada también puede ser una célula T de referencia que está genéticamente modificada con un gen de control. Por ejemplo, una célula T de referencia puede ser una célula T infectada con un vector viral que porta un ARNhc para un gen de control, tal como *LacZ*. La célula T no modificada se puede aislar directamente de una fuente natural, como una muestra de sangre de un individuo animal, o se puede obtener mediante el cultivo *in vitro* de una línea de células T. Una célula T no modificada también se puede diferenciar de una célula pluripotente *in vitro* mediante diferenciación inducida.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, la expresión "célula T modificada" se refiere a una célula T que ha sido modificada por ingeniería genética. La célula T modificada puede sobreexpresar o subexpresar un gen en comparación con una célula T de tipo silvestre. La célula T modificada puede tener un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado. Una población de células T modificadas puede consistir en una población de células T con diferentes modificaciones genéticas. Por ejemplo, una población de células T modificadas puede tener en cada caso diferentes firmas genéticas con, a lo sumo, un gen inactivado o parcialmente inactivado en comparación con una célula T de tipo silvestre.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, el término "actividad" se refiere a una actividad celular de las células T. La actividad puede consistir en actividad de proliferación, que puede ser una activación del ciclo celular potenciada, supresión de la muerte celular (por ejemplo, supresión de la apoptosis) y/o cualquier otra actividad que promueva la proliferación celular. La actividad también puede consistir en la inmunidad de las células T efectoras, incluyendo por ejemplo la actividad citotóxica o la actividad de producción de citocinas. La actividad también puede consistir en actividad antitumoral en general, que se puede medir, por ejemplo, mediante la reducción del tamaño del tumor o el aumento de la tasa de supervivencia de un individuo portador de tumor.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, y a no ser que se especifique lo contrario, la expresión "células supresoras" se refiere a poblaciones de células que suprimen la actividad de las células T. Por ejemplo, las células supresoras pueden suprimir la proliferación de células T. Las células supresoras también pueden inhibir o antagonizar la respuesta inmune natural provocada por las células T. Las "células supresoras" incluyen, pero no se limitan a, células T reguladoras (Treg) y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC).

4. Breve descripción de los dibujos

35 Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor con referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en esta memoria.

40 FIGURA 1 - La FIGURA 1 representa un flujo de trabajo ejemplar para el rastreo de ARNhc para inmunomoduladores con radiación. Como se muestra, el flujo de trabajo incluye la preparación de una genoteca de ARNhc con controles negativos; inyección intradérmica de $1,5 \times 10^5$ células B16-Ova en cada caso en la pata y el costado de ratones B6 en el Día 0; aislar células T OT-1 el Día 6; infectar células T OT-1 con Thy1.1 codificando la genoteca de ARNhc el Día 8; irradiar el tumor de la pata (5 mm) con 12 Gy el Día 10; realizar transferencia adoptiva de células T OT-1 de infección (5×10^6) el Día 11; cosechar células T de tumores del bazo, ganglios linfáticos y ganglios linfáticos drenantes el Día 18; clasificar FACS para células T Thy 1.1⁺; ensayar ADN genómico para las células T Thy 1.1⁺ mediante PCR, NGS y deconvolución de datos. Los tamaños de los tumores también se miden cada dos días.

45 FIGURA 2 - La FIGURA 2 representa un conjunto de cebadores anidados ejemplar para la amplificación por PCR de ARNhc integrado. Como se muestra, el cebador de PCR principal (294 pb) puede ser

5'-AAT GGA CTA TCA TAT GCT TAC CGT AAC TTG AAA GTA TTT CG-3'

5'-CTT TAG TTT GTA TGT CTG TTG CTA TTA TGT CTA CTA TTC TTT CCC-3';

50 y el cebador de PCR secundario (124 pb) puede ser

SecPCR_F: 5'-CGA AAC ACC GGT CCG CAG GTA TGC-3'

SecPCR_R: 5'-CCA TTT GTC TCG AGO TCG AAA ACT GG-3'

5. Descripción detallada

En la presente memoria se proporcionan métodos de rastreo *in vitro* e *in vivo* para identificar dianas génicas para la terapia contra el cáncer. Sin estar limitados por una teoría particular, se cree que una serie de factores contribuyen al microambiente inmunosupresor de las células tumorales, y dichos factores se pueden modular mediante radiación, que incluye pero se limita a la radiación dirigida al tumor. Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan métodos de rastreo *in vitro* e *in vivo* para que dichos factores sirvan como dianas génicas para su uso en la terapia contra el cáncer, bien individualmente, bien en combinación con radioterapia. En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer a través de la medición de una actividad de una célula T no modificada y de una célula T modificada; en donde la célula T no modificada y la célula T modificada se ponen en contacto en cada caso con una célula supresora procedente de un individuo portador de tumor irradiado; y en donde la célula T modificada tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado. El gen candidato se identifica después como un gen diana para la terapia contra el cáncer si la actividad ha aumentado cuando se compara la célula T modificada con la célula T no modificada.

En algunos casos, la radiación puede poner las células tumorales en un estado "estresado" que puede conducir a una mayor activación y/o a una mejora de la regulación de los factores inmunosupresores. Por consiguiente, en la presente memoria también se proporcionan métodos de rastreo de genes diana que consisten en factores inmunosupresores activados y/o con regulación mejorada por el tratamiento de radiación. Dado que la radiación se puede limitar específicamente al microambiente tumoral, cualquier perturbación dentro del tumor a causa de la radiación que provoca la mejora de la regulación de la diana de interés que interactúa con las células T para inducir la supresión de las células T se puede desenmascarar utilizando la estrategia de rastreo descrita en la presente memoria. Los métodos pueden incluir además la verificación de la función de los genes diana identificados en la mediación de la inmunosupresión.

En algunos casos, la radiación puede producir un efecto abscopal, el proceso fisiológico mediante el cual la radiación dirigida de un tumor primario induce una respuesta antitumoral en un sitio distante fuera del campo de radiación. El efecto abscopal, al menos en parte, puede implicar una mejor presentación de los antígenos tumorales a las células T, así como la liberación de citocinas y otros factores proinflamatorios que estimulan las respuestas inmunes locales y sistémicas. Por consiguiente, en la presente memoria también se proporcionan métodos de rastreo de dianas génicas implicadas en el efecto abscopal. Las dianas génicas identificadas mediante los métodos descritos en la presente memoria pueden ser factores que contribuyen a la naturaleza inmunosupresora del microambiente tumoral.

La inmunoterapia que activa el sistema inmune, en general, para destruir células cancerosas puede conducir en algunos casos a una toxicidad sistémica debido al bloqueo de los controles regulares del sistema inmune. En la presente memoria también se proporcionan métodos de rastreo de factores que, cuando están dirigidos solos, no dan como resultado una activación inmune sistemática, pero que sí pueden provocar una inmunidad antitumoral significativa cuando se utilizan en combinación con radioterapia. Por lo tanto, los agentes que se dirigen a estos factores genéticos pueden imitar o mejorar el efecto abscopal, mejorar el efecto terapéutico de la radioterapia y reducir los posibles efectos secundarios relacionados con el sistema inmune.

Los agentes inmunomoduladores para la respuesta antitumoral en un individuo portador de tumor pueden, al menos en parte, activar el sistema inmunitario mediante la inhibición de genes diana que pueden suprimir las actividades de las células T.

5.1 Métodos de rastreo

En la presente memoria se proporcionan métodos para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer a través de la medición de la actividad de una célula T no modificada y de una célula T modificada; en donde la célula T no modificada y la célula T modificada han sido puestas en contacto en cada caso con el microambiente tumoral; y en donde la célula T modificada tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si la actividad ha aumentado cuando se compara dicha célula T modificada con dicha célula T no modificada.

En la presente memoria se proporcionan métodos para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer a través de la medición de la actividad de una célula T no modificada y de una célula T modificada; en donde la célula T no modificada y la célula T modificada han sido puestas en contacto en cada caso con una célula supresora; en donde la célula T modificada tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si la actividad ha aumentado cuando se compara dicha célula T modificada con dicha célula T no modificada.

En algunas realizaciones, la actividad medida en los métodos descritos en la presente memoria puede ser la actividad de proliferación. En algunas realizaciones, la actividad de proliferación se mide mediante la activación del ciclo celular, en donde una mejora de la activación del ciclo celular indica un aumento de la actividad de proliferación celular. En algunas realizaciones, la actividad de proliferación se mide mediante la inhibición de la muerte celular, en donde una reducción de la muerte celular indica un aumento de la actividad de proliferación celular. En algunas realizaciones, la actividad de proliferación se mide mediante la inhibición de la apoptosis, en donde una reducción de la apoptosis indica un aumento de la actividad de proliferación celular.

Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan métodos para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer a través de la medición de la actividad de proliferación de una célula T no modificada y de una célula T modificada; en donde la célula T no modificada y la célula T modificada han sido puestas en contacto en cada caso con una célula supresora o microambiente tumoral; en donde la célula T modificada tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si las células T modificadas tienen una mayor actividad de proliferación en comparación con las células T no modificadas.

En algunas realizaciones, la actividad medida en los métodos descritos en la presente memoria puede ser la inmunidad de las células T efectoras. En algunas realizaciones, la actividad medida en los métodos descritos en la presente memoria es la actividad citotóxica. En algunas realizaciones, la actividad medida en los métodos descritos en la presente memoria es la actividad de producción de citocinas. En algunas realizaciones, la actividad medida en los métodos descritos en la presente memoria es la actividad antitumoral.

Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan métodos para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer a través de la medición de la inmunidad de una célula T no modificada y de una célula T modificada; en donde la célula T no modificada y la célula T modificada han sido puestas en contacto en cada caso con una célula supresora o microambiente tumoral; en donde la célula T modificada tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si las células T modificadas tienen una mayor inmunidad en comparación con las células T no modificadas.

En la presente memoria se proporcionan métodos para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer a través de la medición de la actividad citotóxica de una célula T no modificada y de una célula T modificada; en donde la célula T no modificada y la célula T modificada han sido puestas en contacto en cada caso con una célula supresora o microambiente tumoral; en donde la célula T modificada tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si las células T modificadas tienen una mayor actividad citotóxica en comparación con las células T no modificadas.

En la presente memoria también se proporcionan métodos para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer a través de la medición de la actividad de producción de citocinas de una célula T no modificada y de una célula T modificada; en donde la célula T no modificada y la célula T modificada han sido puestas en contacto en cada caso con una célula supresora o microambiente tumoral; en donde la célula T modificada tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si las células T modificadas tienen una mayor actividad de producción de citocinas en comparación con las células T no modificadas.

En la presente memoria también se proporcionan métodos para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer a través de la medición de la actividad antitumoral de una célula T no modificada y de una célula T modificada; en donde la célula T no modificada y la célula T modificada han sido puestas en contacto en cada caso con una célula supresora o microambiente tumoral; en donde la célula T modificada tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si las células T modificadas tienen una mayor actividad antitumoral en comparación con las células T no modificadas.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria incluyen además la obtención de células T de una fuente. Los métodos proporcionados en la presente memoria pueden incluir además la preparación de células T no modificadas y células T modificadas. En algunas realizaciones, la fuente es una muestra de un individuo. En algunas realizaciones, la fuente es una línea celular cultivada *in vitro*.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria incluyen medir la actividad de la célula T no modificada y de la célula T modificada, habiendo sido puesta en contacto cada una de ellas con el microambiente tumoral tanto de un individuo portador de tumor irradiado como de un individuo portador de tumor no irradiado; en donde el gen candidato se identifica como gen diana si, cuando se compara la célula T modificada con la célula T no modificada, el aumento de la actividad es más significativo cuando las células T han sido puestas en contacto con el microambiente tumoral de un individuo portador de tumor irradiado que cuando las células T han sido puestas en contacto con el microambiente tumoral de un individuo portador de tumor no irradiado. En algunas realizaciones, la actividad de la célula T no modificada y de la célula T modificada, habiendo sido puesta en contacto cada una de ellas con el microambiente tumoral de un individuo portador de tumor no irradiado, son sustancialmente iguales.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria incluyen el uso de una primera población de células supresoras de un individuo portador de tumor no irradiado, y una segunda población de células supresoras de un individuo portador de tumor irradiado. Los métodos pueden incluir medir el aumento de la actividad cuando se comparan las células T modificadas con las células T no modificadas, habiendo sido puesta en contacto cada una de ellas con la primera población de células supresoras, y también medir el aumento de la actividad cuando se comparan las células T modificadas con las células T no modificadas, habiendo sido puesta en contacto cada una de ellas con la segunda población de células supresoras; en donde el gen candidato se identifica como gen diana si el aumento es más significativo cuando las células T se han puesto en contacto con la segunda población de células supresoras que cuando las células T se han puesto en contacto con la primera población de células supresoras. En algunas

realizaciones, cuando se comparan la célula T modificada y la célula T no modificada, sus actividades son sustancialmente iguales cuando las células T se han puesto en contacto con la primera población de células supresoras, pero mayores en la célula T modificada cuando las células T se han puesto en contacto con la segunda población de células supresoras.

5 En algunas realizaciones, las células T utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria se aíslan de una muestra obtenida directamente de un individuo animal. La muestra puede ser una muestra de sangre. La muestra de sangre puede ser una muestra de sangre completa, una muestra de sangre parcialmente purificada o una muestra de sangre periférica. La muestra también puede ser una muestra de médula ósea. Las células T se pueden aislar de una muestra mediante sus marcadores de superficie. En algunas realizaciones, las células T utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria son células CD3+. En algunas realizaciones, las células T utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria son células CD8+. En algunas realizaciones, las células T son células CD4+. En algunas realizaciones, las células T son células T naífs. En algunas realizaciones, las células T son células T CD8+ naífs. En algunas realizaciones, las células T son células T CD4+ naífs. En algunas realizaciones, las células T son células T positivas dobles CD4+/CD8+. En algunas realizaciones, las células T son PBMC. En algunas realizaciones, las células T son PBL. En algunas realizaciones, las células T son TIL. En algunas realizaciones, las células T son células T de memoria. En algunas realizaciones, las células T son células T gamma delta. En algunas realizaciones, las células T son células Th3, Th17, Th9 o Tfh. En algunas realizaciones, las células T son células TCM, células TEM o células TEMRA. Las células T también pueden consistir en cualquier combinación de los tipos específicos de células T mencionadas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica.

20 En algunas realizaciones, las células T se aíslan de un individuo. El individuo puede ser un mamífero. En algunas realizaciones, las células T se aíslan de un ratón. El ratón puede ser un ratón de tipo silvestre o un ratón modificado por ingeniería genética. En algunas realizaciones, el ratón está modificado por ingeniería genética para expresar un receptor de células T. El receptor de células T puede ser específico para un antígeno que no está presente de forma natural en ratones. En algunas realizaciones, el antígeno puede ser ovoalbúmina. En algunas realizaciones, el individuo puede ser un ratón modificado por ingeniería genética para expresar un receptor de células T específico para la ovoalbúmina.

30 En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer a través de la medición de la actividad de una célula T CD8+ no modificada y de una célula T CD8+ modificada; habiendo sido puestas en contacto la célula T CD8+ no modificada y la célula T CD8+ modificada en cada caso con una célula supresora; en donde la célula T CD8+ modificada tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si la actividad ha aumentado en la célula T CD8+ modificada en comparación con la célula T CD8+ no modificada.

35 En algunas realizaciones, las células T se producen por diferenciación inducida a partir de una célula madre o célula progenitora. La célula madre o célula progenitora puede ser una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética. La célula madre o célula progenitora también puede ser una célula madre pluripotente inducida.

40 Las células T no modificadas se pueden modificar genéticamente utilizando métodos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica para producir células T modificadas. En algunas realizaciones, las células T se modifican para que un gen candidato sea inactivado o parcialmente inactivado por infección con un vector viral que contiene ARNhc. En algunas realizaciones, las células T no modificadas son células T de referencia con un gen de control inactivado o parcialmente inactivado. En una realización, el vector viral es un vector de lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es el vector de ARNhc lentiviral SMART, GIPZ, TRIPZ o TRC (GE Dharmacon). En algunas realizaciones, el gen en las células T aisladas se inactiva o se inactiva parcialmente mediante el uso de una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN). En algunas realizaciones, el gen en las células T aisladas se inactiva o se inactiva parcialmente mediante el uso de CAS9 (CRISPR). Como entendería un experto común en la técnica, en los métodos de rastreo descritos en la presente memoria se puede utilizar cualquier método para la modulación genética de células T descrito en la presente memoria o conocido de otro modo en la técnica.

45 En algunas realizaciones, las células T no modificadas se expanden *in vitro* antes de ser sometidas a modificación genética o a los métodos de rastreo descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, las células T modificadas se expanden *in vitro* antes de ser sometidas a los métodos de rastreo descritos en la presente memoria.

50 En una realización, las células T utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria se marcan. En algunas realizaciones, las células T se marcan con un agente fluorescente. En algunas realizaciones, las células T se marcan con una partícula de tamaño micrométrico. En algunas realizaciones, las células T se marcan con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE). En algunas realizaciones, las células T se marcan con partículas de óxido de hierro de tamaño micrométrico (MPIO). En algunas realizaciones, las células T se marcan con nanopartículas magnéticas. Existen diversos métodos para marcar células T muy conocidos en la técnica.

55 El gen candidato puede ser cualquier gen presente de forma natural en el genoma de una célula T. El gen candidato puede ser un gen humano. El gen candidato también puede ser un gen de un animal modelo. Por ejemplo, el gen candidato también puede ser un gen de células T de ratón.

En algunas realizaciones, los métodos de rastreo proporcionados en la presente memoria incluyen la preparación de una población inicial de células T, que incluye infectar células T no modificadas con una genoteca de ARNhc. En algunas realizaciones, la genoteca de ARNhc es una genoteca genómica, que incluye vectores virales que pueden rastrear todos los genes de un genoma de células T. En algunas realizaciones, la genoteca de ARNhc es una genoteca subgenómica que incluye una selección de genes de un genoma de células T. En algunas realizaciones, la genoteca de ARNhc incluye vectores virales que se dirigen a genes que codifican determinadas proteínas con características estructurales/funcionales particulares. Las genotecas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, genoteca de receptores acoplados a proteína G (GPCR), genoteca de superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), genoteca de superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), genoteca de factores de transcripción, genoteca de quinasas, genoteca de fosfatasa, genoteca de angiogénesis, genoteca de ciclos celulares, genoteca de apoptosis y/o genoteca de ubiquitina ligasas. Las genotecas ejemplares también se pueden centrar en genes conocidos por ser sobreexpresados o subexpresados en células T disfuncionales. Por ejemplo, la genoteca de genes candidatos puede ser una genoteca de genes sobreexpresados en anergia o agotamiento de células T. Las genotecas utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria también pueden consistir en cualquier combinación de las genotecas descritas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica.

En algunas realizaciones, las células supresoras incluyen células Treg. En algunas realizaciones, las células supresoras incluyen MSDC. En algunas realizaciones, las células supresoras incluyen tanto células Treg como MSDC. En algunas realizaciones, en las que los métodos de rastreo se llevan a cabo *in vitro*, las células supresoras se pueden aislar de un individuo. El animal puede ser un mamífero. En algunas realizaciones, las células supresoras se pueden aislar de un ratón. En algunas realizaciones, el individuo puede ser un individuo irradiado. En algunas realizaciones, el individuo puede ser un individuo no irradiado. En algunas realizaciones, las células supresoras son de un ratón irradiado. En algunas realizaciones, las células supresoras son de un ratón no irradiado. En algunas realizaciones, el ratón puede ser un ratón portador de tumor. El ratón puede ser un ratón portador de tumor no irradiado. El ratón puede ser un ratón portador de tumor irradiado. En algunas realizaciones, el individuo es un ratón que tiene al menos dos tumores, de los cuales solo un tumor ha recibido una dosis de radiación ablativa.

En algunas realizaciones, las células supresoras se aíslan de una muestra de sangre. La muestra de sangre puede ser una muestra de sangre completa, una muestra de sangre parcialmente purificada o una muestra de sangre periférica. Los métodos para obtener células supresoras aisladas de una muestra para ensayos de supresión de células T son muy conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, en las que los métodos de rastreo se llevan a cabo *in vivo*, las células supresoras pueden ser las células supresoras presentes de forma natural en el individuo de prueba, que también pueden incluir Treg, MSDC o ambas. El individuo puede ser un individuo irradiado o un individuo no irradiado.

En algunas realizaciones, las células supresoras son de un individuo portador de tumor no irradiado. En algunas realizaciones, las células supresoras son de un individuo portador de tumor irradiado. En algunas realizaciones, el individuo portador de tumor irradiado ha recibido radiación dirigida al tumor. En algunas realizaciones, la radiación ha sido administrada en una dosis ablativa. En algunas realizaciones, la radiación ha sido administrada en una dosis de 1 Gy a 45 Gy, 5 Gy a 35 Gy, 10 Gy a 25 Gy, 1 Gy a 25 Gy, 1 Gy a 20 Gy, o 5 Gy a 15 Gy. En algunas realizaciones, la radiación ha sido administrada en una dosis de 1 Gy a 20 Gy. En algunas realizaciones, la radiación ha sido administrada en una dosis de 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy, 5 Gy, 6 Gy, 7 Gy, 8 Gy, 9 Gy, 10 Gy, 11 Gy, 12 Gy, 13 Gy, 14 Gy, 15 Gy, 16 Gy, 17 Gy, 18 Gy, 19 Gy, 20 Gy, 25 Gy, 30 Gy, 35 Gy, 40 Gy o 45 Gy. En algunas realizaciones, las células supresoras son de un individuo portador de tumor que ha recibido una dosis de radiación ablativa dirigida a su tumor primario.

En algunas realizaciones, el individuo portador de tumor tiene un tumor. En algunas realizaciones, el individuo portador de tumor tiene dos o más tumores. En algunas realizaciones, el individuo portador de tumor es un modelo de dos tumores. En algunas realizaciones, el individuo portador de tumor irradiado que tiene dos o más tumores ha recibido radiación dirigida solo a uno de sus tumores. El tumor que recibe radiación puede ser el tumor primario del individuo portador de tumor.

En algunas realizaciones, el individuo puede ser un ratón. El ratón puede ser un ratón de tipo silvestre o un ratón modificado por ingeniería genética. En algunas realizaciones, el ratón está modificado por ingeniería genética para expresar un receptor de células T. El receptor de células T puede ser específico para un antígeno que no está presente de forma natural en ratones. En algunas realizaciones, el antígeno puede ser ovoalbúmina. En algunas realizaciones, el individuo puede ser un ratón modificado por ingeniería genética para expresar un receptor de células T específico para la ovoalbúmina. El ratón puede ser un ratón portador de tumor. El ratón puede ser un ratón portador de tumor no irradiado. El ratón puede ser un ratón portador de tumor irradiado. En algunas realizaciones, el individuo es un ratón que tiene al menos dos tumores, de los cuales un tumor ha recibido una dosis de radiación ablativa.

Los métodos de rastreo proporcionados en la presente memoria incluyen métodos *in vitro* y métodos *in vivo*. Como entendería un experto común en la técnica, los diferentes métodos *in vitro* e *in vivo* descritos en la presente memoria se pueden utilizar por separado o en combinación. Las dianas génicas identificadas mediante una combinación de más de un método pueden ser potencialmente más completas y más precisas. Además, los métodos descritos en la presente memoria pueden ser ensayos de rastreo de agrupaciones en formato de alto rendimiento. Por ejemplo, en primer lugar se puede realizar una prueba de rastreo *in vitro* proporcionada en la presente memoria para identificar un

grupo de genes candidatos para que sirvan como dianas para la terapéutica contra el cáncer, seguida de una prueba funcional *in vivo* para corroborar aún más su utilidad.

5.1.3 Ensayos *in vivo*

5 En algunas realizaciones, en la presente memoria se describen métodos *in vivo* para rastrear un gen diana para la terapia contra el cáncer. El ensayo *in vivo* se puede realizar en individuos de prueba no humanos. El individuo de prueba puede ser un modelo animal. El modelo animal puede ser un modelo de dos tumores. En algunas realizaciones, el modelo animal es un ratón. En algunas realizaciones, el modelo animal es un modelo animal portador de tumor. El modelo animal puede ser un ratón portador de tumor. El ratón portador de tumor puede ser irradiado o no irradiado.
10 En algunas realizaciones, el modelo animal es un ratón que tiene dos tumores en posiciones contralaterales, de los cuales solo un tumor ha recibido una dosis de radiación ablativa.

Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan métodos *in vivo* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que incluyen (i) inyectar células T no modificadas y células T modificadas a individuos de prueba, teniendo la célula T modificada un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) medir una actividad de la célula T no modificada y de la célula T modificada en los individuos de prueba, en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si la actividad ha aumentado cuando se compara la célula T modificada con la célula T no modificada. El individuo de prueba puede ser un individuo de prueba irradiado. El individuo de prueba puede ser un individuo de prueba no irradiado. En algunas realizaciones, el individuo de prueba irradiado recibe radiación antes de la inyección de células T. En algunas realizaciones, el individuo de prueba irradiado recibe radiación después de la inyección de células T, pero antes de medir la actividad. En algunas realizaciones, las células T no modificadas y las células T modificadas se inyectan en el mismo individuo de prueba. En algunas realizaciones, las células T no modificadas y las células T modificadas se inyectan a distintos individuos de prueba. En algunas realizaciones, las células T utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria están marcadas. En algunas realizaciones, las células T no modificadas son células T de referencia.

25 En algunas realizaciones, el individuo portador de tumor irradiado ha recibido radiación dirigida al tumor. En algunas realizaciones, la radiación ha sido administrada en una dosis ablativa. En algunas realizaciones, la radiación ha sido administrada en una dosis de 1 Gy a 45 Gy, 5 Gy a 35 Gy, 10 Gy a 25 Gy, 1 Gy a 25 Gy, 1 Gy a 20 Gy, o 5 Gy a 15 Gy. En algunas realizaciones, la radiación ha sido administrada en una dosis de 1 Gy a 20 Gy. En algunas realizaciones, la radiación ha sido administrada en una dosis de 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy, 5 Gy, 6 Gy, 7 Gy, 8 Gy, 9 Gy, 10 Gy, 11 Gy, 12 Gy, 13 Gy, 14 Gy, 15 Gy, 16 Gy, 17 Gy, 18 Gy, 19 Gy, 20 Gy, 25 Gy, 30 Gy, 35 Gy, 40 Gy o 45 Gy.
30 En algunas realizaciones, el individuo portador de tumor es un modelo de dos tumores que ha recibido una dosis de radiación ablativa dirigida solo a uno de sus tumores.

Las células T utilizadas en los métodos de rastreo *in vivo* descritos en la presente memoria pueden ser cualquier tipo específico de métodos de células T descritos en la presente memoria o conocidos de otro modo en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células T utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria son células CD3+. En algunas realizaciones, las células T utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria son células CD8+. En algunas realizaciones, las células T son células CD4+. En algunas realizaciones, las células T son células T naïfs. En algunas realizaciones, las células T son células T CD8+ naïfs. En algunas realizaciones, las células T son células T CD4+ naïfs.

40 En algunas realizaciones, la etapa de medición incluye obtener una muestra del individuo de prueba. La muestra puede ser una muestra tumoral, una muestra de tejido o una muestra de sangre. La muestra de tejido puede ser una muestra de ganglios linfáticos, una muestra de bazo, una muestra de hígado o una muestra de riñón. La muestra de ganglios linfáticos puede ser un ganglio linfático drenante o un ganglio linfático no drenante. La muestra tumoral puede ser una muestra de un tumor irradiado. La muestra tumoral también puede ser una muestra de un tumor no irradiado. El tumor no irradiado puede ser de un individuo de prueba que tiene un tumor irradiado.

45 En algunas realizaciones, los métodos de rastreo *in vivo* descritos en la presente memoria incluyen el uso de individuos no irradiados y de individuos irradiados. Los métodos pueden incluir medir el aumento de la actividad cuando se comparan las células T modificadas con las células T no modificadas inyectadas a individuos no irradiados, y también medir el aumento de la actividad cuando se comparan las células T modificadas con las células T no modificadas inyectadas a individuos irradiados; en donde el gen candidato se identifica como gen diana si el aumento es más significativo cuando las células T se inyectan a individuos irradiados que cuando las células T se inyectan a individuos no irradiados. En algunas realizaciones, las actividades de las células T son sustancialmente iguales cuando se comparan la célula T modificada y la célula T no modificada cuando las células T se inyectan a individuos no irradiados, pero mayores en las células T modificadas en comparación con las células T no modificadas cuando las células se inyectan a individuos irradiados.

55 En algunas realizaciones, la actividad medida mediante los métodos *in vivo* descritos en la presente memoria puede ser la actividad de proliferación de las células T. En algunas realizaciones, la actividad medida mediante los métodos *in vivo* descritos en la presente memoria puede ser la actividad antitumoral de las células T. La actividad de proliferación de las células T se puede medir mediante la acumulación de células T inyectadas en el individuo de prueba, después de la inyección. La acumulación de células T se puede medir 24 horas después de la inyección, 2

días después de la inyección, 3 días después de la inyección, 4 días después de la inyección, 5 días después de la inyección, 6 días después de la inyección, 7 días después de la inyección, 8 días después de la inyección, 9 días después de la inyección, 10 días después de la inyección, 11 días después de la inyección, 12 días después de la inyección, 13 días después de la inyección, 14 días después de la inyección, 2,5 semanas después de la inyección, 3 semanas después de la inyección, 3,5 semanas después de la inyección, 4 semanas después de la inyección, 5 semanas después de la inyección, 6 semanas después de la inyección, 7 semanas después de la inyección, 2 meses después de la inyección, 3 meses después de la inyección, o más tiempo después.

La acumulación de células T en el individuo se puede medir mediante una variedad de estrategias conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la acumulación de células T inyectadas en el individuo de prueba se puede medir mediante citometría celular. En algunas realizaciones, la acumulación de células T en el individuo de prueba se puede medir mediante secuenciación de la próxima generación (NGS) del ADN genómico de las células T acumuladas.

Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan métodos *in vivo* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que incluyen (i) inyectar células T no modificadas y células T modificadas a individuos de prueba, teniendo la célula T modificada un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) medir la acumulación de la célula T no modificada y de la célula T modificada en los individuos de prueba, en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si se acumula un mayor número de células T modificadas en comparación con las células T no modificadas. En algunas realizaciones, las células T no modificadas son células T de referencia. El individuo de prueba puede ser un ratón. El individuo de prueba puede ser portador de tumor. El individuo de prueba puede ser un individuo de prueba portador de tumor irradiado. En algunas realizaciones, el individuo de prueba irradiado recibe radiación antes de la inyección de células T. En algunas realizaciones, el individuo de prueba irradiado recibe radiación después de la inyección de células T pero antes de medir la actividad. En algunas realizaciones, las células T no modificadas y las células T modificadas se inyectan en el mismo individuo de prueba.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos *in vivo* para identificar un gen diana para terapia contra el cáncer, que incluyen (i) inyectar células T no modificadas y células T modificadas a individuos de prueba, teniendo la célula T modificada un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) medir el número de células T no modificadas que se infiltran en el tumor y el número de células T modificadas que se infiltran en el tumor en los individuos de prueba, en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si el número de células T modificadas que se infiltran en el tumor es mayor en comparación con el número de células T no modificadas que se infiltran en el tumor. En algunas realizaciones, las células T no modificadas son células T de referencia. El individuo de prueba puede ser un ratón portador de tumor. El individuo de prueba puede ser un individuo de prueba portador de tumor irradiado. En algunas realizaciones, el individuo de prueba irradiado recibe radiación antes de la inyección de células T. En algunas realizaciones, el individuo de prueba irradiado recibe radiación después de la inyección de células T pero antes de medir la actividad. En algunas realizaciones, las células T no modificadas y las células T modificadas se inyectan en el mismo individuo de prueba.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen además células T aisladas acumuladas/proliferadas a partir de las células T inyectadas de los individuos de prueba. Este paso de aislamiento puede incluir la obtención de una muestra de los individuos de prueba. La muestra puede ser una muestra tumoral, una muestra de sangre o una muestra de tejido. La muestra tumoral puede ser una muestra de un tumor irradiado o un tumor no irradiado. El tumor no irradiado puede ser de un individuo de prueba que tiene un tumor irradiado. La muestra de sangre puede ser una muestra de sangre periférica, sangre completa o sangre parcialmente purificada. La muestra de tejido puede ser una muestra de bazo o una muestra de ganglios linfáticos. La muestra de ganglios linfáticos puede ser una muestra de ganglios linfáticos drenantes o una muestra de ganglios linfáticos no drenantes.

En algunas realizaciones, la actividad medida mediante los métodos *in vivo* descritos en la presente memoria puede ser la actividad antitumoral de las células T inyectadas. La actividad antitumoral se puede medir mediante la reducción del tamaño del tumor a lo largo de un período de tiempo. El período de tiempo puede ser de 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 2,5 semanas, 3 semanas, 3,5 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 2 meses, 3 meses o más.

La actividad antitumoral también se puede medir mediante la tasa de supervivencia de una población de individuos de prueba. Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan métodos *in vivo* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que incluyen (i) inyectar células T no modificadas y células T modificadas a distintos individuos de prueba, teniendo la célula T modificada un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) medir el tamaño del tumor del individuo al que se le han inyectado células T no modificadas y del individuo al que se le han inyectado células T modificadas, en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si una reducción del tamaño del tumor es mayor en el individuo de prueba al que se le han inyectado células T modificadas en comparación con el individuo de prueba al que se le han inyectado células T no modificadas. En algunas realizaciones, las células T no modificadas son células T de referencia. El individuo de prueba puede ser un ratón portador de tumor. El individuo de prueba puede ser un individuo de prueba portador de tumor irradiado. En algunas realizaciones, el individuo de prueba irradiado recibe radiación antes de la inyección de células T. En algunas realizaciones, el individuo de prueba irradiado recibe radiación después de la inyección de células T pero antes de medir el tamaño del tumor. En algunas realizaciones, los individuos de prueba son modelos de dos tumores, en donde

únicamente un tumor ha recibido radiación dirigida. En alguna realización se mide el tamaño del tumor irradiado. En algunas realizaciones se mide el tamaño de un tumor no irradiado.

En la presente memoria también se proporcionan métodos *in vivo* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que incluyen (i) inyectar células T no modificadas y células T modificadas por separado a una población de individuos de prueba portadores de tumor, teniendo la célula T modificada un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) medir la tasa de supervivencia de la población de individuos portadores de tumor a los que se les han inyectado células T no modificadas y la tasa de supervivencia de la población de individuos portadores de tumores a los que se les han inyectado células T modificadas, en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si se logra una mayor tasa de supervivencia en la población de individuos a los que se les han inyectado células T modificadas en comparación con la población de individuos a los que se les han inyectado células T no modificadas. En algunas realizaciones, las células T no modificadas son células T de referencia. Los individuos de prueba pueden ser individuos de prueba irradiados. En algunas realizaciones, los individuos de prueba irradiados reciben radiación antes de la inyección de células T. En algunas realizaciones, el individuo de prueba irradiado recibe radiación después de la inyección de células T. En algunas realizaciones, los individuos de prueba son modelos de dos tumores, en donde únicamente un tumor ha recibido radiación dirigida. En algunas realizaciones, los individuos de prueba son ratones.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para identificar una diana para la terapia contra el cáncer, que comprende:

- (1) preparar un conjunto de células T de un individuo, en donde un gen candidato se inactiva o se inactiva parcialmente de forma selectiva en las células T aisladas;
- (2) implantar dos tumores en cada uno de los individuos de prueba de un grupo, en donde los dos tumores se implantan distalmente;
- (3) proporcionar un primer grupo de individuos de prueba, en el que los tumores no han sido tratados con radiación, y un segundo grupo de individuos de prueba, en el que solo uno de los tumores ha sido tratado con radiación;
- (4) transferir las células T a un individuo del primer grupo y evaluar la reducción del tumor; y
- (5) transferir las células T a un individuo del segundo grupo y evaluar la reducción del tumor que no ha sido tratado con radiación;

en donde el gen inactivado o parcialmente inactivado en las células T, o la proteína codificada por el mismo, se identifica como una diana para la terapia contra el cáncer si la reducción del tumor observada en el paso (5) es mayor que la reducción observada en el paso (4).

En una realización, el individuo es un ratón. En otra realización, el ratón es un ratón transgénico. En otra realización, el ratón es un ratón transgénico modificado por ingeniería genética para amplificar la respuesta inmune de las células T mediante la producción de una población monoclonal de células T específicas de antígeno.

En una realización, el tumor en el segundo grupo de individuos de prueba ha sido tratado con radiación en una dosis de 1 Gy a 45 Gy, 5 Gy a 35 Gy, 10 Gy a 25 Gy, 1 Gy a 25 Gy, 1 Gy a 20 Gy, o 5 Gy a 15 Gy. En una realización, la dosis es de 1 Gy a 20 Gy.

En una realización, el gen en las células T aisladas se inactiva o se inactiva parcialmente infectando las células T con un vector viral que contiene ARNhc. En una realización, el vector viral es un vector de lentivirus. En otra realización, el gen en las células T aisladas se inactiva o se inactiva parcialmente mediante el uso de una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN). En otra realización, el gen en las células T aisladas se inactiva o se inactiva parcialmente mediante el uso de CAS9 (CRISPR).

5.1.2 Ensayo *in vitro*

En algunas realizaciones, en la presente memoria se describen métodos *in vitro* para rastrear un gen diana para la terapia contra el cáncer. El ensayo *in vitro* puede ser un ensayo de supresión de células T. El ensayo *in vitro* puede incluir cultivar células T con células supresoras. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen además aislar células supresoras de un individuo. El individuo puede ser un individuo irradiado o un individuo no irradiado.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos *in vitro* para rastrear un gen diana para la terapia contra el cáncer, que incluyen cultivar por separado (a) células T no modificadas y células supresoras; y (b) células T modificadas y células supresoras; en donde las células T modificadas tienen un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y medir una actividad de las células T no modificadas y de las células T modificadas, en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si la actividad ha aumentado cuando se compara la célula T modificada con la célula T no modificada. En algunas realizaciones, las

células T no modificadas son células T de referencia. Los métodos pueden incluir proporcionar células supresoras aisladas. Las células supresoras se pueden aislar de una muestra de un individuo. El individuo puede ser un ratón. La muestra puede ser una muestra de sangre. Las células supresoras se pueden aislar sobre la base de su marcador de superficie.

- 5 Las células T y las células supresoras se pueden cultivar durante un período de tiempo. El período de tiempo puede ser de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más.

- 10 En algunas realizaciones, las células T se activan con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de células supresoras, en diversas proporciones de células T frente a células supresoras. En algunas realizaciones, las células T se activan con anti-CD3 y anti-CD28. En algunas realizaciones, los métodos incluyen cultivar células T y células supresoras en una relación de aproximadamente 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2 o 1:5. En algunas realizaciones, los métodos incluyen cultivar células T y células supresoras en una relación de aproximadamente 1:1.

- 15 En una realización, las células T utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria se marcan. En algunas realizaciones, las células T se marcan con un agente fluorescente. En algunas realizaciones, las células T se marcan con una partícula de tamaño micrométrico. En algunas realizaciones, las células T se marcan con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE). En algunas realizaciones, las células T se marcan con partículas de óxido de hierro de tamaño micrométrico (MPIO). En algunas realizaciones, las células T se marcan con nanopartículas magnéticas. Existen diversos métodos para marcar células T muy conocidos en la técnica.

- 20 Los métodos de rastreo *in vitro* pueden medir actividades que incluyen, pero no se limitan a, proliferación, activación del ciclo celular, muerte celular, producción de citocinas y/o actividad citotóxica.

- 25 La supresión de células T mediante células supresoras (por ejemplo Treg y MDSC) proporcionada en la presente memoria se puede ensayar utilizando diversos métodos muy conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Dolcetti *et al.*, *Current Protocols of Immunology*, 14.17.1-14.17.25 (2010); Bayne *et al.*, *Cold Spring Harb Protoc*, doi: 10.1101/pdb.prot077214 (2013); Kruisbeek *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, 3.12.1-3.12.20 (2004); y Collison *et al.*, *Methods Mol Biol.* 707: 21-37 (2011).

- 30 En algunas realizaciones, las células supresoras incluyen células Treg. En algunas realizaciones, las células supresoras incluyen MDSC. En algunas realizaciones, las células supresoras incluyen tanto células Treg como MDSC. En algunas realizaciones, en las que los métodos de rastreo se llevan a cabo *in vitro*, las células supresoras se pueden aislar de un individuo. El animal puede ser un mamífero. En algunas realizaciones, las células supresoras se pueden aislar de un ratón. En algunas realizaciones, el individuo puede ser un individuo irradiado. En algunas realizaciones, el individuo puede ser un individuo no irradiado. En algunas realizaciones, las células supresoras son de un ratón irradiado. En algunas realizaciones, las células supresoras son de un ratón no irradiado.

- 35 En algunas realizaciones, los métodos de rastreo *in vitro* descritos en la presente memoria incluyen el uso de una primera población de células supresoras aisladas de un individuo portador de tumor no irradiado, y una segunda población de células supresoras aisladas de un individuo portador de tumor irradiado. Los métodos pueden incluir medir el aumento de la actividad cuando se comparan las células T modificadas con las células T no modificadas, habiendo sido cultivada cada una de ellas con la primera población de células supresoras, y también medir el aumento de la actividad cuando se comparan las células T modificadas con las células T no modificadas, habiendo sido cultivada cada una de ellas con la segunda población de células supresoras; en donde el gen candidato se identifica como gen diana si el aumento es más significativo cuando las células T se han cultivado con la segunda población de células supresoras que cuando las células T se han cultivado con la primera población de células supresoras. En algunas realizaciones, cuando se comparan la célula T modificada y la célula T no modificada, sus actividades son sustancialmente iguales cuando las células T se han cultivado con la primera población de células supresoras, pero mayores en la célula T modificada en comparación con las células T no modificadas cuando las células T se han cultivado con la segunda población de células supresoras.

- 45 En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos *in vitro* para rastrear un gen diana para la terapia contra el cáncer mediante el análisis de la activación del ciclo celular de las células T. El método puede incluir cultivar por separado (a) células T no modificadas y células supresoras; y (b) células T modificadas y células supresoras; en donde las células T modificadas tienen un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y medir la activación del ciclo celular de las células T no modificadas y de las células T modificadas, en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si la activación del ciclo celular ha aumentado en la célula T modificada en comparación con la célula T no modificada. En algunas realizaciones, la activación del ciclo celular se mide mediante incorporación de 3[H]-timidina en el ADN de las células T. En algunas realizaciones, las células T no modificadas son células T de referencia. En algunas realizaciones, los métodos incluyen activar células T con anti-CD3 y anti-CD28.

- 50 En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos *in vitro* para rastrear un gen diana para la terapia contra el cáncer mediante el análisis de la muerte celular de las células T. En algunas realizaciones, los métodos incluyen activar células T con anti-CD3 y anti-CD28. El método puede incluir cultivar por separado (a) células

5 T no modificadas y células supresoras; y (b) células T modificadas y células supresoras; en donde las células T modificadas tienen un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y medir la muerte celular de las células T no modificadas y de las células T modificadas, en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si la muerte celular se ha reducido en la célula T modificada en comparación con la célula T no modificada. En algunas realizaciones, las células T no modificadas son células T de referencia.

10 La muerte celular puede consistir en apoptosis, muerte celular mitótica y necrosis. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria miden la apoptosis. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria miden la muerte celular mitótica de apoptosis. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria miden la necrosis. En la técnica se conocen diversos ensayos para medir la muerte celular, con kits disponibles comercialmente. En algunas realizaciones, la muerte celular se mide mediante un ensayo de caspasa. En algunas realizaciones, la muerte celular se mide mediante fragmentación de ADN o roturas de cadena. En algunas realizaciones, la muerte celular se mide por citometría celular. En algunas realizaciones, la muerte celular se mide mediante ELISA.

15 En otras realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos para evaluar el desarrollo de la función efectora de células T en respuesta a la activación específica de antígeno. La evaluación de la actividad citotóxica de las células T, provocada por la estimulación específica de antígeno *in vitro*, permite evaluar el potencial citolítico funcional de las células efectoras. En algunas realizaciones se puede evaluar la estimulación de aloantígeno o la activación específica de antígeno, con modificaciones menores. En determinadas realizaciones, la evaluación de la actividad citolítica mediante la liberación de ⁵¹Cr puede ser utilizada para investigar la función efectora específica de las células T y su modulación/inhibición por células inmunomoduladoras, al tiempo que preserva la simplicidad del ensayo y permite que el investigador trabaje con numerosas variables y poblaciones celulares poco comunes. El ensayo de liberación de cromo puede proporcionar una lectura funcional más específica.

25 En determinadas realizaciones, la transformación de la unidad lítica, que mide el grado de supresión normalizada al control interno sin células supresoras, proporciona una representación más útil de los resultados y permite comparar y promediar los resultados de diferentes experimentos. La evaluación de U. L. representa una medida más eficaz que el ensayo de proliferación o el valor de citotoxicidad simple de la relación efector-diana, ya que incluye una estimación tanto de la actividad funcional (actividad citolítica de cultivos) como de la proliferación celular (número de células recuperadas en cada cultivo).

30 En algunas realizaciones, el antígeno es una proteína que no está presente de forma natural en las células diana. En una realización, el antígeno es ovoalbúmina.

35 En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos *in vitro* para rastrear un gen diana para la terapia contra el cáncer mediante el análisis de la producción de citocinas de células T. En algunas realizaciones, los métodos incluyen activar células T con anti-CD3 y anti-CD28. El método puede incluir cultivar por separado (a) células T no modificadas y células supresoras; y (b) células T modificadas y células supresoras; en donde las células T modificadas tienen un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y medir la producción de citocinas de las células T no modificadas y de las células T modificadas, en donde el gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si la producción de citocinas ha aumentado en la célula T modificada en comparación con la célula T no modificada. En algunas realizaciones, la citocina medida en los métodos descritos en la presente memoria incluye interferón (IFN)- γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-2, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), o cualquier combinación de los mismos. En la técnica se conocen diversos métodos para analizar la producción de citocinas. Por ejemplo, las citocinas se pueden medir mediante un ensayo de inmunotransferencia (IB), un ensayo inmunofluorescente (IF), FACS, ELISA o tinción de citocina intracelular (ICS). También existen kits comercialmente disponibles para analizar la producción de citocinas.

45 En una realización, en la presente memoria se proporciona un método para identificar una diana para la terapia contra el cáncer, que comprende:

- (1) proporcionar un primer conjunto de células T de un individuo, en el que no se realiza ninguna modificación en las células T aisladas, y un segundo conjunto de células T, en el que un gen candidato se inactiva o se inactiva parcialmente de forma selectiva en las células T aisladas;
- 50 (2) poner en contacto el primer conjunto de células T con células supresoras aisladas de un individuo portador de tumor, en el que el tumor no ha sido tratado con radiación, y determinar el grado de supresión de células T en la muestra;
- (3) poner en contacto el primer conjunto de células T con células supresoras aisladas de un individuo portador de tumor, en el que el tumor ha sido tratado con radiación, y determinar el grado de supresión de células T en la muestra;
- 55 (4) poner en contacto el segundo conjunto de células T con células supresoras aisladas de un individuo portador de tumor, en el que el tumor ha sido tratado con radiación, y determinar el grado de supresión de células T en la muestra;

(5) determinar la reducción de la supresión de células T en el paso (3) en comparación con el paso (3);

(6) determinar la reducción de la supresión de células T en el paso (4) en comparación con el paso (3); y

(7) comparar la diferencia en la reducción determinada en el paso (5) con la diferencia en la reducción determinada en el paso (6);

5 en donde el gen inactivado o parcialmente inactivado en las células T, o la proteína codificada por el mismo, se identifica como una diana para la terapia contra el cáncer si la diferencia en la reducción de la supresión de células T determinada en el paso (6) es mayor que la reducción determinada en el paso (5).

En una realización, el individuo es un ratón.

10 En otra realización, el ratón está modificado por ingeniería genética para tener un receptor de células T con especificidad de antígeno particular. En otra realización, el antígeno es una proteína que no está presente de forma natural en ratones. En otra realización, el antígeno es ovoalbúmina.

En una realización, las células T se marcan. En otra realización, las células T se marcan con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE).

15 En una realización, el tumor ha sido tratado con una dosis de radiación ablativa. En otra realización, el tumor ha sido tratado con radiación en una dosis de 1 Gy a 45 Gy, 5 Gy a 35 Gy, 10 Gy a 25 Gy, 1 Gy a 25 Gy, 1 Gy a 20 Gy, o 5 Gy a 15 Gy. En una realización, el tumor ha sido tratado con radiación en una dosis de 1 Gy a 20 Gy.

20 En una realización, el gen candidato en las células T aisladas se inactiva o se inactiva parcialmente infectando las células T con un vector viral que contiene ARNhc. En una realización, el vector viral es un vector de lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es el vector de ARNhc lentiviral SMART, GIPZ, TRIPZ o TRC (GE Dharmacon). En algunas realizaciones, el gen en las células T aisladas se inactiva o se inactiva parcialmente mediante el uso de una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN). En algunas realizaciones, el gen en las células T aisladas se inactiva o se inactiva parcialmente mediante el uso de CAS9 (CRISPR).

25 En una realización, la supresión de células T se evalúa controlando la proliferación de células T. En una realización, la proliferación de células T se evalúa en presencia de anti-CD3 + anti-CD28. En una realización, la proliferación de células T se determina mediante la incorporación de ³[H]-timidina. En otra realización, la proliferación se determina mediante análisis flujocitométrico de células T marcadas con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE).

En una realización, la supresión de células T se evalúa midiendo la actividad citotóxica de las células T. En una realización, la actividad citotóxica se provoca mediante estimulación específica de antígeno. En una realización, el antígeno es ovoalbúmina.

30 En una realización, el método se lleva a cabo en formato ordenado en una configuración de alto rendimiento.

En determinadas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para identificar una diana para la terapia contra el cáncer, que comprende:

(1) cocultivar células T de un individuo con células supresoras aisladas de un individuo portador de tumor, en el que el tumor no ha sido tratado con radiación, en un primer cultivo celular;

35 (2) cocultivar las células T con células supresoras de un individuo portador de tumor, en el que el tumor ha sido tratado con radiación, en un segundo cultivo celular;

(3) infectar el primer y segundo cultivo con vectores virales diseñados para introducir una serie de inactivaciones o inactivaciones parciales de genes candidatos y continuar cultivando las células; y

(4) determinar los niveles relativos de construcciones de genes particulares en los cultivos;

40 en donde una construcción genética que se determina que está representada en un nivel superior en el segundo cultivo en comparación con el primer cultivo, o la proteína codificada por la misma, se identifica como una diana.

En una realización, los vectores virales son vectores de lentivirus.

En otra realización, los niveles relativos de construcciones genéticas particulares se determinan secuenciando los vectores. En una realización, la secuenciación es la secuenciación de la próxima generación.

45 Un experto común en la técnica entendería que los métodos de rastreo proporcionados en la presente memoria pueden incluir medir uno o más tipos de actividad de células T con cualquier combinación de ensayos *in vitro* descritos en la presente memoria o conocidos de otro modo en la técnica.

5.1.3 Ensayos con agrupaciones

5 En la presente memoria también se proporcionan métodos de rastreo de agrupaciones de alto rendimiento para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer. Los métodos de rastreo de agrupaciones pueden incluir i) preparar una población inicial de células T con diferentes modificaciones genéticas, en donde cada célula T tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) poner en contacto la población inicial de células T con el microambiente tumoral durante un período de tiempo para producir una población seleccionada de células T; en donde el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T se identifica como el gen diana para la terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, cada célula T en la población inicial tiene a lo sumo un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado.

10 En la presente memoria también se proporcionan métodos de rastreo de agrupaciones de alto rendimiento para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer. Los métodos de rastreo de agrupaciones pueden incluir i) preparar una población inicial de células T con diferentes modificaciones genéticas, en donde cada célula T tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) poner en contacto la población inicial de células T con células supresoras durante un período de tiempo para producir una población seleccionada de células T; en donde el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T se identifica como el gen diana para la terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, cada célula T en la población inicial tiene a lo sumo un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado.

15 Las células T utilizadas en los métodos de rastreo de agrupaciones descritos en la presente memoria pueden ser cualquier tipo específico de métodos de células T descritos en la presente memoria o conocidos de otro modo en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células T utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria son células CD3+. En algunas realizaciones, las células T utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria son células CD8+. En algunas realizaciones, las células T son células CD4+. En algunas realizaciones, las células T son células T naïfs. En algunas realizaciones, las células T son células T CD8+ naïfs. En algunas realizaciones, las células T naïfs son células T CD4+.

20 En algunas realizaciones, las células T se aíslan de un individuo. El individuo puede ser un mamífero. En algunas realizaciones, las células T se aíslan de un ratón. El ratón puede ser un ratón de tipo silvestre o un ratón modificado por ingeniería genética. En algunas realizaciones, el ratón está modificado por ingeniería genética para expresar un receptor de células T. El receptor de células T puede ser específico para un antígeno que no está presente de forma natural en ratones. En algunas realizaciones, el antígeno puede ser ovoalbúmina. En algunas realizaciones, el individuo puede ser un ratón modificado por ingeniería genética para expresar un receptor de células T específico para la ovoalbúmina.

25 En una realización, las células T utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria se marcan. En algunas realizaciones, las células T se marcan con un agente fluorescente. En algunas realizaciones, las células T se marcan con una partícula de tamaño micrométrico. En algunas realizaciones, las células T se marcan con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE). En algunas realizaciones, las células T se marcan con partículas de óxido de hierro de tamaño micrométrico (MPIO). En algunas realizaciones, las células T se marcan con nanopartículas magnéticas. Existen diversos métodos para marcar células T muy conocidos en la técnica.

30 La población seleccionada de células T resulta de la proliferación de la población inicial de células T. Las células T con modificaciones genéticas que aumentan la proliferación de las células T se acumulan en la población seleccionada de células T. Por lo tanto, el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T indica que el establecimiento de estos genes como diana puede mejorar la proliferación de células T en un individuo portador de tumor. En algunas realizaciones, el individuo portador de tumor puede ser un individuo portador de tumor irradiado.

35 En algunas realizaciones, el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T se identifica por NGS de ADN genómicos aislados de la población seleccionada de células T.

40 En algunas realizaciones, la preparación de una población inicial de células T incluye infectar células T no modificadas con una genoteca de ARNhc. En algunas realizaciones, la genoteca de ARNhc es una genoteca genómica, que incluye vectores virales que pueden rastrear todos los genes de un genoma de células T. En algunas realizaciones, la genoteca de ARNhc es una genoteca subgenómica, que incluye una selección de genes de un genoma de células T. En algunas realizaciones, la genoteca de ARNhc incluye vectores virales que se dirigen a genes que codifican determinadas proteínas con características estructurales/funcionales particulares. Las genotecas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, genoteca de receptores acoplados a proteína G (GPCR), genoteca de superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), genoteca de superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), genoteca de factores de transcripción, genoteca de quinasas, genoteca de fosfatasa, genoteca de angiogénesis, genoteca de ciclos celulares, genoteca de apoptosis y/o genoteca de ubiquitina ligasas. Las genotecas ejemplares también se pueden centrar en genes conocidos por ser sobreexpresados o subexpresados en células T disfuncionales. Por ejemplo, la genoteca de genes candidatos puede ser una genoteca de genes sobreexpresados en anergia o agotamiento de células T. Las genotecas utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria también pueden consistir en cualquier combinación de las genotecas descritas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica.

45 En algunas realizaciones, la genoteca de ARNhc puede incluir ARNhc de control, tal como ARNhc *LacZ*.

5 En algunas realizaciones, la preparación de una población inicial de células T incluye el uso de una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN). En algunas realizaciones, la preparación de una población inicial de células T incluye el uso de CAS9 (CRISPR). En algunas realizaciones, la preparación de una población inicial de células T incluye infectar células T con una genoteca de ARNhc. En algunas realizaciones, la genoteca ARNhc es una genoteca de vectores de lentivirus.

10 En algunas realizaciones, los métodos de rastreo de agrupaciones descritos en la presente memoria pueden consistir en un método *in vitro* en el que la etapa de contacto incluye el cultivo *in vitro* de la población inicial de células T con células supresoras. En algunas realizaciones, las células supresoras se pueden aislar de un individuo portador de tumor irradiado. En algunas realizaciones, las células supresoras se pueden aislar de un individuo portador de tumor no irradiado.

15 En algunas realizaciones, las células T se activan con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de células supresoras, en diversas relaciones de células T con respecto a células supresoras. En algunas realizaciones, las células T se activan con anti-CD3 y anti-CD28. En algunas realizaciones, los métodos incluyen el cultivo de células T y células supresoras en una relación de aproximadamente 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2 o 1:5. En algunas realizaciones, los métodos incluyen cultivar células T y células supresoras en una relación 1:1.

En algunas realizaciones, las células supresoras son de un individuo portador de tumor irradiado. En algunas realizaciones, las células supresoras son de un individuo portador de tumor no irradiado.

20 Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan métodos de rastreo de agrupaciones de alto rendimiento *in vitro* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer. Los métodos de rastreo de agrupaciones *in vitro* pueden incluir i) preparar una población inicial de células T con diferentes modificaciones genéticas, en donde cada célula T tiene un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) cultivar la población inicial de células T con células supresoras durante un período de tiempo para producir una población seleccionada de células T; en donde el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T se identifica como el gen diana para la terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, cada célula T en la población inicial tiene a lo sumo un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además aislar células supresoras de un individuo portador de tumor irradiado. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además aislar células supresoras de un individuo portador de tumor no irradiado.

30 En algunas realizaciones, el período de tiempo para cultivar las células T y las células supresoras puede ser de 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 2,5 semanas, 3 semanas, 3,5 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 2 meses, 3 meses o más.

Como entendería un experto común en la técnica, cualquier permutación de los métodos de rastreo *in vitro* descritos en la sección anterior también es aplicable a estos métodos de rastreo de agrupaciones *in vitro*.

35 En algunas realizaciones, los métodos de rastreo de agrupaciones descritos en la presente memoria pueden consistir en un método *in vivo* en el que la etapa de contacto incluye inyectar la población inicial de células T en un individuo de prueba no humano portador de tumor. Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan métodos de rastreo de agrupaciones de alto rendimiento *in vivo* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer. Los métodos de rastreo de agrupaciones *in vivo* pueden incluir i) preparar una población inicial de células T con diferentes modificaciones genéticas, en donde cada célula T tiene a lo sumo un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y (ii) inyectar la población inicial de células T con células supresoras a un individuo de prueba portador de tumor para producir una población seleccionada de células T; en donde el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T se identifica como el gen diana para la terapia contra el cáncer.

40 El individuo de prueba puede ser un modelo animal no humano. El modelo animal puede ser un modelo de dos tumores. En algunas realizaciones, el modelo animal es un ratón. El ratón portador de tumor puede estar irradiado o no irradiado. En algunas realizaciones, el modelo animal es un modelo de dos tumores. En algunas realizaciones, el modelo animal es un ratón que tiene dos tumores en posiciones contralaterales, de los cuales solo un tumor ha recibido una dosis de radiación ablativa.

45 Los métodos también pueden incluir aislar la agrupación seleccionada de células T del individuo después de la inyección. La agrupación seleccionada de células T se puede aislar de una muestra del individuo de prueba. La muestra puede ser una muestra tumoral, una muestra de sangre o una muestra de tejido. La muestra tumoral puede ser una muestra de un tumor irradiado o de un tumor no irradiado. La muestra de sangre puede ser una muestra de sangre periférica, sangre completa o sangre parcialmente purificada. La muestra de tejido puede ser una muestra de bazo o una muestra de ganglios linfáticos. La muestra de ganglios linfáticos puede ser una muestra de ganglios linfáticos drenantes o una muestra de ganglios linfáticos no drenantes.

50 En algunas realizaciones, los métodos comprenden aislar la población seleccionada de células T del individuo de prueba 24 horas después de la inyección, 2 días después de la inyección, 3 días después de la inyección, 4 días después de la inyección, 5 días después de la inyección, 6 días después de la inyección, 7 días después de la

inyección, 8 días después de la inyección, 9 días después de la inyección, 10 días después de la inyección, 11 días después de la inyección, 12 días después de la inyección, 13 días después de la inyección, 14 días después de la inyección, 2,5 semanas después de la inyección, 3 semanas después de la inyección, 3,5 semanas después de la inyección, 4 semanas después de la inyección, 5 semanas después de la inyección, 6 semanas después de la inyección, 7 semanas después de la inyección, 2 meses después de la inyección, 3 meses después de la inyección, o más tiempo después de la inyección.

La población seleccionada de células T en el individuo se puede medir mediante diversas estrategias conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la acumulación de células T inyectadas en el individuo de prueba se puede medir mediante citometría celular. En algunas realizaciones, la acumulación de células T en el individuo de prueba se puede medir mediante secuenciación de la próxima generación (NGS) del ADN genómico de las células T acumuladas.

En algunas realizaciones, cada célula T de la población inicial tiene a lo sumo un ARNhc para un gen candidato, y un gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si el ARNhc para el gen candidato se ha enriquecido en la población seleccionada de células T en comparación con la población inicial de células T. Las células T con estos genes diana inactivados o parcialmente inactivados pueden tener una proliferación mejorada independientemente del reconocimiento de TCR de un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, el gen candidato se enriquece en la población seleccionada de células T en comparación con la población inicial de células T en aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 12 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 25 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 35 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 45 veces, o aproximadamente 50 veces. En algunas realizaciones, el gen candidato se enriquece en la población seleccionada de células T en comparación con la población inicial de células T en al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 12 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces, al menos 40 veces, al menos 45 veces, al menos 50 veces o más.

El ARNhc que restaura la proliferación de células T en los tumores se puede enriquecer en el tumor pero no en otros tejidos, tal como un segundo órgano linfoide (por ejemplo el bazo). Por consiguiente, en algunas realizaciones, un gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si el ARNhc para el gen candidato se ha enriquecido en la población seleccionada de células T obtenidas de una muestra tumoral en comparación con una muestra de tejido no tumoral. La muestra tumoral puede ser una muestra de un tumor irradiado o de un tumor no irradiado. La muestra de tejido puede ser una muestra de un segundo órgano linfoide, como una muestra de bazo o una muestra de ganglios linfáticos. La muestra de ganglios linfáticos puede ser una muestra de ganglios linfáticos drenantes o una muestra de ganglios linfáticos no drenantes.

En algunas realizaciones, el gen candidato se enriquece en la muestra tumoral en comparación con la muestra de tejido no tumoral en aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 12 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 25 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 35 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 45 veces o aproximadamente 50 veces. En algunas realizaciones, el gen candidato se enriquece en la población seleccionada de células T en comparación con la población inicial de células T en al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 12 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces, al menos 40 veces, al menos 45 veces, al menos 50 veces o más.

En algunas realizaciones, la cuantificación de ARNhc en la población seleccionada de células T puede incluir el uso de NGS.

Como entendería un experto común en la técnica, cualquier permutación de los métodos de rastreo *in vivo* descritos en la sección anterior también es aplicable a estos métodos de rastreo de agrupaciones *in vivo*.

Como entendería un experto común en la técnica, los métodos de rastreo de agrupaciones descritos en la presente memoria también pueden incluir pruebas funcionales adicionales para corroborar los genes diana identificados en los mismos.

5.2 Inactivación o inactivación parcial de genes candidatos en células T

En algunas realizaciones, un gen candidato se inactiva o se inactiva parcialmente en las células T para evaluar el efecto de la ausencia de una proteína particular en la regulación de la función de las células T en combinación con la radiación. Cualquier método convencional conocido en la técnica para la edición de genes se puede emplear en conexión con los métodos proporcionados en la presente memoria.

5.2.1 Inactivación o inactivación parcial basadas en iARN

La inactivación o inactivación parcial (colectivamente "silenciamiento") de un gen candidato se puede lograr en una variedad de sistemas celulares usando ARN de interferencia pequeño (ARNip) sintetizado químicamente o transcrito *in vitro*, así como ARN de horquilla corta (ARNhc) basado en PCR o vector de ADN. Se ha informado de algunos promotores que impulsan la expresión de ARNhc en las células, incluyendo promotores basados en ARN polimerasa III, U6 y H1, y el promotor de ARN polimerasa II, CMV. Además, las moléculas de ARNhc proporcionadas en la presente memoria pueden estar unidas de forma operativa a un promotor específico de células T para lograr el direccionamiento específico de células T de las moléculas de ARNhc para lograr el silenciamiento de los genes candidatos.

En determinadas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos de silenciamiento génico por interferencia de ARN con un gen candidato. El método implica crear construcciones que codifican el ARN interferente (silenciador) en el que se utiliza un promotor que es activo en el tipo de célula al que se ha de suministrar la construcción (por ejemplo, células T) para dirigir la expresión del ARNhc.

En las construcciones de ARNhc utilizadas en los métodos proporcionados en la presente memoria hay pequeños tramos de nucleótidos que se dirigen contra el gen candidato y se utilizan para modular la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican el gen candidato. La inhibición de un gen candidato se logra proporcionando compuestos oligoméricos que hibridan con una o más moléculas de ácido nucleico diana que codifican el gen candidato.

El principio en que se basa la tecnología antisentido consiste en que un compuesto antisentido, que se hibrida con un ácido nucleico diana, modula las actividades de expresión génica, como la transcripción o la traducción. Esta especificidad de secuencia hace que los compuestos antisentido sean sumadamente atractivos como herramientas para la validación de dianas y la funcionalización de genes.

Sin estar limitados por una teoría particular, el mecanismo de acción para el silenciamiento de un gen candidato implica la hibridación de los compuestos de ARNhc con el ácido nucleico diana, en donde el resultado o efecto de la hibridación consiste en la degradación de la diana o la ocupación de la diana con estancamiento concomitante de la maquinaria celular que implica, por ejemplo, la transcripción o el empalme del gen candidato.

Los ejemplos de un mecanismo antisentido basado en la ocupación mediante el cual los compuestos antisentido se hibridan pero no provocan la escisión de la diana incluyen, pero no se limitan a, inhibición de traducción, modulación de empalme, modulación de la selección del sitio de poli(A) e interrupción de la estructura de ARN reguladora. Por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6,210,892 y la publicación de EE. UU. n° 20020049173 se describe un método para controlar el comportamiento de una célula a través de la modulación del procesamiento de una diana de ARNm poniendo en contacto la célula con un compuesto antisentido que actúa a través de un evento de no escisión.

En general, la secuencia paralela del ARNhc será de aproximadamente 19 a aproximadamente 22 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 19, 20, 21 o 22 nucleótidos) de longitud, la secuencia antiparalela será de aproximadamente 19 a aproximadamente 22 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 19, 20, 21 o 22 nucleótidos) de longitud, y la región del bucle será de aproximadamente 3 a aproximadamente 19 nucleótidos (por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 19 nucleótidos) de longitud. En algunas realizaciones, las secuencias paralela y antiparalela tienen la misma longitud, es decir, el ARNhc formará una horquilla simétrica. En otras realizaciones, la cadena paralela o antiparalela puede ser más corta que su cadena complementaria, y se puede formar una horquilla asimétrica. En algunas realizaciones, el emparejamiento de bases entre las secuencias paralela y antiparalela es exacto. En otras realizaciones puede ser tolerable o incluso deseable algún desajuste entre las secuencias, por ejemplo, para disminuir la fuerza del enlace de hidrógeno entre las dos cadenas. En algunas realizaciones, la molécula de ARNhc también puede comprender un grupo fosfato 5'-terminal que se puede modificar químicamente. Además, la parte de bucle de la molécula de ARNhc puede comprender, por ejemplo, nucleótidos, no nucleótidos, moléculas de enlace, moléculas conjugadas y similares.

Se puede utilizar cualquier vector adecuado en relación con el silenciamiento de iARN de un gen candidato. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: vectores basados en virus tales como vectores adenovirales, lentivirales, virales adenoasociados y retrovirales; y vectores basados en plásmidos y otros vectores tales como baculovirus, fagos, fagémidos, cósmidos, fósidos, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales basados en PI, plásmidos de levadura y cromosomas artificiales de levadura.

En una realización, el vector es un vector viral. En otra realización, el vector viral es un vector de lentivirus.

El suministro de vectores que expresan ARNhc puede tener lugar mediante administración a células diana o por cualquier otro medio que permita la introducción en la(s) célula(s) o el tejido diana deseados, por ejemplo, transfección o transducción.

5.2.2 Inactivación o inactivación parcial basadas en TALEN

En otras realizaciones, un gen candidato se puede silenciar utilizando un sistema basado en efector de tipo activador de la transcripción y nucleasa (TALEN). Las secuencias efectoras de tipo activador de la transcripción (TAL) se pueden ensamblar para unir dianas de ADN con especificidad ensamblando secuencias de dirresiduos variables repetitivos

(RVD). Las proteínas de fusión de los efectores TAL y nucleasas (TALEN) pueden hacer rupturas de doble cadena dirigidas en el ADN celular, que se pueden utilizar para realizar modificaciones genéticas específicas en las células. Se ha informado de que los TALEN son útiles para generar células modificadas de forma estable.

5 El dominio efector TAL que se une a una secuencia de nucleótidos específica dentro del ADN diana puede comprender 10 o más repeticiones de unión a ADN, o 15 o más repeticiones de unión a ADN. Cada repetición de unión a ADN puede incluir un RVD que determina el reconocimiento de un par de bases en la secuencia de ADN diana, en donde cada repetición de unión a ADN es responsable del reconocimiento de un par de bases en la secuencia de ADN diana, y en donde el RVD comprende uno o más de: HD para reconocer C; NG para reconocer T; NI para reconocer A; NN para reconocer G o A; NS para reconocer A o C o G o T; N* para reconocer C o T, donde * representa un intersticio en la segunda posición del RVD; HG para reconocer T; H* para reconocer T, donde * representa un intersticio en la segunda posición del RVD; IG para reconocer T; NK para reconocer G; HA para reconocer C; ND para reconocer C; HI para reconocer C; HN para reconocer G; NA para reconocer G; SN para reconocer G o A; e YG para reconocer T.

15 En algunas realizaciones, un TALEN puede comprender un dominio de endonucleasa y un dominio de unión a ADN de efector TAL específico para un ADN diana, en donde el dominio de unión a ADN comprende una pluralidad de repeticiones de unión a ADN, comprendiendo cada repetición un RVD que determina el reconocimiento de un par de bases en el ADN diana, en donde cada repetición de unión a ADN es responsable del reconocimiento de un par de bases en el ADN diana, y en donde el TALEN comprende uno o más de los siguientes RVD: HD para reconocer C; NG para reconocer T; NI para reconocer A; NN para reconocer G o A; NS para reconocer A o C o G o T; N* para reconocer C o T; HG para reconocer T; H* para reconocer T; IG para reconocer T; NK para reconocer G; HA para reconocer C; ND para reconocer C; HI para reconocer C; HN para reconocer G; NA para reconocer G; SN para reconocer G o A; e YG para reconocer T. El TALEN puede comprender uno o más de los siguientes RVD: HA para reconocer C; ND para reconocer C; HI para reconocer C; HN para reconocer G; NA para reconocer G; SN para reconocer G o A; YG para reconocer T; y NX para reconocer G, y uno o más de: HD para reconocer C; NG para reconocer T; NI para reconocer A; NN para reconocer G o A; NS para reconocer A o C o G o T; N* para reconocer C o T; HG para reconocer T; H* para reconocer T; e IG para reconocer T. El dominio de endonucleasa puede ser de una endonucleasa de restricción de tipo II (por ejemplo, FokI).

20 En algunas realizaciones, una célula se puede transformar transitoriamente, de modo que la construcción no se integra en su genoma. Por ejemplo, un vector plasmídico que contiene una secuencia de codificación TALEN se puede introducir en una célula, de modo que la secuencia de codificación TALEN es expresada, pero el vector no se integra de manera estable en el genoma. Las células transformadas transitoriamente suelen perder en cada división celular parte o la totalidad de la construcción de ácido nucleico introducida, de modo que el ácido nucleico introducido no se puede detectar en células hijas después de un número suficiente de divisiones celulares. Sin embargo, la expresión de la secuencia de codificación TALEN puede ser suficiente para lograr la recombinación homóloga entre una secuencia donante y una secuencia diana endógena. Tanto las células transformadas de forma transitoria como las transformadas de forma estable pueden ser útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria.

35 Los polinucleótidos y/o vectores recombinantes se pueden introducir en el genoma de un huésped utilizando cualquier método convencional conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, métodos de electroporación, microinyección y biolísticos. Además, cualquier otra técnica de transferencia y transformación génica convencionalmente conocida en este campo se puede utilizar en relación con los métodos proporcionados en la presente memoria. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, transformación de protoplastos a través de calcio o PEG, absorción mediada por electroporación de ADN desnudo, transfección mediada por liposomas, electroporación, transformación mediada por vectores virales y bombardeo con microproyectiles (véanse las patentes de EE. UU. nº 5,538,880, 5,204,253, 5,591,616 y 6,329,571). En algunas realizaciones, una enzima modificadora de ADN (por ejemplo, un TALEN) se puede introducir directamente en una célula. Por ejemplo, un polipéptido se puede introducir en una célula mediante inyección mecánica, mediante suministro a través de un sistema de secreción bacteriana de tipo III, o mediante electroporación.

40 En algunas realizaciones, la unión del ácido nucleico está enlazada, por ejemplo, con un dominio efector que incluye, pero no se limita a, una transposasa, integrasa, recombinasa, resolvasa, invertasa, proteasa, ADN metiltransferasa, ADN desmetilasa, histona acetilasa, histona desacetilasa, nucleasa, represor transcripcional, activador transcripcional, reclutamiento de factor de transcripción, señal de localización nuclear de proteínas o señal de absorción celular.

45 En algunas realizaciones, el dominio efector es un dominio de proteína que muestra actividades que incluyen, pero no se limitan a, actividad de transposasa, actividad de integrasa, actividad de recombinasa, actividad de resolvasa, actividad de invertasa, actividad de proteasa, actividad de ADN metiltransferasa, actividad de ADN desmetilasa, actividad de histona acetilasa, actividad de histona desacetilasa, actividad de nucleasa, actividad de señalización de localización nuclear, actividad represora transcripcional, actividad activadora transcripcional, actividad de reclutamiento de factor de transcripción o actividad de señalización de absorción celular. Otras realizaciones pueden incluir cualquier combinación de las actividades descritas en la presente memoria.

50 Se puede utilizar cualquier vector adecuado, incluyendo vectores de clonación y expresión, así como vectores virales y vectores integradores, en relación con los métodos proporcionados en la presente memoria. Un "vector de expresión" es un vector que incluye una o más secuencias de control de expresión, y una "secuencia de control de expresión" es

una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y/o traducción de otra secuencia de ADN. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a, plásmidos y vectores virales derivados de, por ejemplo, bacteriófagos, baculovirus, virus del mosaico del tabaco, virus herpes, citomegalovirus, retrovirus, virus vaccinia, adenovirus y virus adenoasociados. Numerosos vectores y sistemas de expresión están disponibles comercialmente. A modo de ejemplo, algunos vectores utilizados en técnicas de ADN recombinante permiten transferir entidades, tales como un segmento de ADN (tal como un segmento de ADN heterólogo, tal como un segmento de ADNc heterólogo), al interior de una célula diana.

Los vectores pueden tener uno o más sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción (ya sea tipo I, II o IIs) en los que las secuencias se pueden cortar de forma determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, y en los que un fragmento de ácido nucleico se puede empalmar o insertar para provocar su replicación y clonación. Los vectores también pueden comprender uno o más sitios de recombinación que permiten el intercambio de secuencias de ácido nucleico entre dos moléculas de ácido nucleico. Los vectores pueden proporcionar además sitios cebadores, por ejemplo, para PCR, sitios de iniciación y/o regulación transcripcionales y/o traduccionales, señales de recombinación, replicones y marcadores seleccionables. Los vectores pueden contener además uno o más marcadores seleccionables adecuados para su uso en la identificación de células transformadas con el vector.

En algunas realizaciones, cuando se requiere la traducción de la secuencia de ácido nucleico deseada, por ejemplo el ARNm que codifica un polipéptido TALE, el vector también puede comprender secuencias requeridas para la traducción adecuada de la secuencia de nucleótidos.

En algunas realizaciones, los vectores de expresión a menudo están en forma de "plásmidos", lo que se refiere a bucles de ADN bicatenarios circulares que, en su forma vectorial, no están unidos a un cromosoma. En algunas realizaciones, todos los componentes de un polipéptido TALE dado se pueden codificar en un solo vector. Por ejemplo, en algunas realizaciones se puede construir un vector que contiene o puede comprender todos los componentes necesarios para un polipéptido TALE funcional. En algunas realizaciones, los componentes individuales (por ejemplo, una o más unidades monoméricas y uno o más dominios efectores) se pueden codificar por separado en diferentes vectores e introducir en una o más células por separado. Además, cualquier vector descrito en la presente memoria puede comprender por sí mismo secuencias de componentes codificadores de polipéptidos TALE predeterminados, tales como un dominio efector y/o una unidad monomérica TALE, en cualquier lugar o combinación de lugares.

Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, episomas, bacteriófagos o vectores virales, y dichos vectores se pueden integrar en el genoma de una célula huésped o replicar de forma autónoma en el sistema celular particular utilizado. En algunas realizaciones, el vector utilizado es un vector episomal, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extracromosómica y puede incluir secuencias procedentes de bacterias, virus o fagos. En otras realizaciones, los vectores se derivan de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, elementos cromosómicos de levadura, y virus, vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, cósmidos y fagémidos. En algunas realizaciones, un vector puede ser un plásmido, bacteriófago, cromosoma artificial bacteriano (BAC) o cromosoma artificial de levadura (YAC). Un vector puede ser un vector de ADN, ARN o fago monocatenario o bicatenario.

Los vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores retrovirales, tales como vectores lentivirales o vectores gammaretrovirales, vectores adenovirales y vectores baculovirales. Por ejemplo, un vector lentiviral se puede utilizar en forma de partículas lentivirales. También se pueden utilizar otras formas de vectores de expresión conocidas por los expertos en la técnica que cumplen funciones equivalentes. Los vectores de expresión se pueden utilizar para la expresión estable o transitoria del polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico que se expresa. Un vector puede ser un vector extracromosómico autorreplicante o un vector que se integra en un genoma huésped. En una realización, el vector es un vector integrado genómico, o "vector integrado", que se puede integrar en el ADN o ARN cromosómico de una célula huésped, sistema celular o sistema no celular. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica los polipéptidos TALE o secuencias de componentes se integra en el ADN o ARN cromosómico de una célula huésped, sistema celular o sistema no celular junto con componentes de la secuencia del vector.

Los vectores de expresión recombinante proporcionados en la presente memoria pueden comprender un ácido nucleico TALE en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que indica que el o los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en función de la o las células huésped que se utilizarán para la expresión, que están unidas operativamente a la secuencia de ácido nucleico que ha de ser expresada.

5.2.3 Inactivación o inactivación parcial basadas en CRISPR/CAS9

En algunas realizaciones, un gen candidato se silencia utilizando el sistema de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interspaciadas (CRISPR)/CAS9 descrito, por ejemplo, en Wiedenheft *et al. Nature* 482 (7385): 331-8 (2012), cuya totalidad se incorpora aquí como referencia.

En pocas palabras, se proporciona un sistema CRISPR-Cas diseñado, programable y no natural que comprende una proteína Cas9 y uno o más ARN guía que establecen como diana los loci genómicos de moléculas de ADN que

codifican uno o más productos génicos en una célula eucariota, y la proteína Cas9 escinde los loci genómicos de las moléculas de ADN que codifican el o los productos génicos, alterando la expresión de uno o más productos génicos. (Véase la Patente de EE. UU. nº 8,697,359.)

5 Los vectores se pueden diseñar para la expresión de transcritos CRISPR (por ejemplo, transcritos de ácido nucleico, proteínas o enzimas) en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, los transcritos CRISPR se pueden expresar en células bacterianas tales como *Escherichia coli*, células de insectos (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamíferos. Además, en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, California (1990) se analizan células huésped adecuadas. Alternativamente, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y T7 polimerasa.

10 Los vectores se pueden introducir y propagar en un procariota. En algunas realizaciones se utiliza un procariota con el fin de amplificar copias de un vector para introducirlo en una célula eucariota o como un vector intermedio en la producción de un vector para introducirlo en una célula eucariota (por ejemplo, amplificar un plásmido como parte de un sistema de empaquetamiento de vectores virales). En algunas realizaciones se utiliza un procariota para amplificar copias de un vector y expresar uno o más ácidos nucleicos, por ejemplo con el fin de proporcionar una fuente de una o más proteínas para el suministro a una célula huésped u organismo huésped.

15 En algunas realizaciones, los vectores son vectores de expresión de fusión. Los ejemplos de estos vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores disponibles comercialmente tales como pGEX (Pharmacia Biotech Inc), pMAL (New England Biolabs) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N. J.), que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, con la proteína recombinante diana. Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* no fusionables inducibles adecuados incluyen, pero no se limitan a, pTrc (Amrann *et al.* Gene 69: 301-315 (1988)) y pET 11d (Studier *et al.*, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, California 60-89 (1990)).

20 En algunas realizaciones, un vector es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de estos vectores incluyen, pero no se limitan a, pYepSecl (Baldari *et al.*, EMBO J. 6: 229-234 (1987)), pMFa (Kuijaili y Herskowitz, 1982. Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, Gene 54: 113-123 (1987)), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, California) y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, California).

25 En algunas realizaciones, los vectores son vectores de expresión de mamíferos. Los ejemplos de estos vectores incluyen, pero no se limitan a, pCDM8 (Seed, Nature 329: 840 (1987)) y pMT2PC (Kaufman *et al.*, EMBO J. 6: 187-195 (1987)). Cuando se utilizan en células de mamíferos, las funciones de control del vector de expresión son proporcionadas normalmente por uno o más elementos reguladores. Por ejemplo, los promotores utilizados comúnmente se derivan de polioma, adenovirus 2, citomegalovirus, virus del simio 40 y otros conocidos en la técnica.

30 En algunas realizaciones, un elemento regulador está unido operativamente a uno o más elementos de un sistema CRISPR para dirigir la expresión de uno o más elementos del sistema CRISPR. Se han identificado loci CRISPR en más de 40 procariotas, que incluyen, pero no se limitan a, *Aeropyrum*, *Pyrobaculum*, *Sulfolobus*, *Archaeoglobus*, *Halocarcula*, *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanopyrus*, *Pyrococcus*, *Picrophilus*, *Thermoplasma*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Aquifex*, *Porphyrromonas*, *Chlorobium*, *Thermus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Mycoplasma*, *Fusobacterium*, *Azarcus*, *Chromobacterium*, *Neisseria*, *Nitrosomonas*, *Desulfovibrio*, *Geobacter*, *Myrococcus*, *Campylobacter*, *Wolinella*, *Acinetobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Legionella*, *Methylococcus*, *Pasteurella*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Xanthomonas*, *Yersinia*, *Treponema*, y *Thermotoga*.

35 En algunas realizaciones, uno o más elementos de un sistema CRISPR se derivan de un sistema CRISPR de tipo I, tipo II o tipo III. En algunas realizaciones, uno o más elementos de un sistema CRISPR se derivan de un organismo particular que comprende un sistema CRISPR endógeno, tal como *Streptococcus pyogenes*.

40 Normalmente, un sistema CRISPR se caracteriza por elementos que promueven la formación de un complejo CRISPR en el sitio de una secuencia diana (también denominado protoespaciador en el contexto de un sistema CRISPR endógeno). La expresión "secuencia diana", cuando se utiliza en conexión con el sistema CRISPR, se refiere a una secuencia para la cual está diseñada una secuencia guía de modo que tiene complementariedad, en donde la hibridación entre una secuencia diana y una secuencia guía promueve la formación de un complejo CRISPR. En algunas realizaciones puede no ser necesaria una complementariedad completa, siempre que haya suficiente complementariedad para provocar la hibridación y promover la formación de un complejo CRISPR.

45 Una secuencia diana puede comprender cualquier polinucleótido, tal como polinucleótidos de ADN o de ARN. En algunas realizaciones, una secuencia diana se sitúa en el núcleo o en el citoplasma de una célula. En algunas realizaciones, la secuencia diana se sitúa dentro de un orgánulo de una célula eucariota, por ejemplo, mitocondria o cloroplasto.

50 En algunas realizaciones, un vector comprende uno o más sitios de inserción, tal como una secuencia de reconocimiento de endonucleasa de restricción (también denominada "sitio de clonación"). En algunas realizaciones,

uno o más sitios de inserción (por ejemplo, aproximadamente o más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios de inserción) están situados en dirección 5' y/o en dirección 3' con respecto a uno o más elementos de secuencia de uno o más vectores. En algunas realizaciones, un vector comprende un sitio de inserción en dirección 5' con respecto a una secuencia de emparejamiento tracr, y opcionalmente en dirección 3' con respecto a un elemento regulador unido operativamente a la secuencia de emparejamiento tracr, de modo que, después de la inserción de una secuencia guía en el sitio de inserción y tras la expresión, la secuencia guía dirige la unión específica de secuencia de un complejo CRISPR a una secuencia diana en una célula eucariota. En algunas realizaciones, un vector comprende dos o más sitios de inserción, estando ubicado cada sitio de inserción entre dos secuencias de emparejamiento tracr para permitir la inserción de una secuencia guía en cada sitio. En una disposición de este tipo, las dos o más secuencias guía pueden comprender dos o más copias de una única secuencia guía, dos o más secuencias guía diferentes, o combinaciones de las mismas. Cuando se utilizan múltiples secuencias guía diferentes, se puede utilizar una única construcción de expresión para dirigir la actividad CRISPR a múltiples secuencias diana correspondientes diferentes dentro de una célula. Por ejemplo, un solo vector puede comprender aproximadamente o más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más secuencias guía. En algunas realizaciones se pueden proporcionar aproximadamente o más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de dichos vectores que contienen la secuencia guía, y se pueden suministrar opcionalmente a una célula.

En algunas realizaciones, un vector comprende un elemento regulador unido operativamente a una secuencia codificadora de enzima que codifica una enzima CRISPR, tal como una proteína Cas. Los ejemplos de proteínas Cas incluyen, pero no se limitan a, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocida como Csn1 y Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, y sus homólogos o derivados.

En algunas realizaciones, la enzima CRISPR es Cas9, y puede ser Cas9. En algunas realizaciones, la enzima CRISPR dirige la escisión de una o ambas cadenas en la posición de una secuencia diana, tal como dentro de la secuencia diana y/o dentro del complemento de la secuencia diana. En algunas realizaciones, la enzima CRISPR dirige la escisión de una o ambas cadenas dentro de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500, o más pares de bases del primer o el último nucleótido de una secuencia diana. En algunas realizaciones, un vector codifica una enzima CRISPR que está mutada con respecto a una enzima de tipo silvestre correspondiente de modo que la enzima CRISPR mutada carece de la capacidad de escindir una o ambas cadenas de un polinucleótido diana que contiene una secuencia diana.

En algunas realizaciones, una secuencia codificadora de enzima que codifica una enzima CRISPR consiste en un codón optimizado para la expresión en células particulares, tales como células eucariotas. Las células eucariotas pueden ser las de un organismo particular o se pueden derivar de éste, como un mamífero, que incluye, pro no se limita a, humanos, ratones, ratas, conejos, perros o primates no humanos. La optimización de codones se refiere a un proceso de modificación de una secuencia de ácido nucleico para mejorar la expresión en las células huésped de interés mediante la sustitución de al menos un codón de la secuencia nativa con codones que se utilizan con mayor frecuencia o con la mayor frecuencia en los genes de esa célula huésped mientras se mantiene la secuencia de aminoácidos nativa.

Diversas especies muestran una preferencia particular por determinados codones de un aminoácido particular. La preferencia por codones (diferencias en el uso de codones entre organismos) a menudo está en correlación con la eficiencia de la traducción del ARN mensajero (ARNm), que a su vez se cree que depende, entre otras cosas, de las propiedades de los codones que se están traduciendo y de la disponibilidad de las moléculas de ARN de transferencia (ARNt) particulares. El predominio de ARNt seleccionados en una célula es generalmente un reflejo de los codones utilizados con mayor frecuencia en la síntesis de péptidos. En consecuencia, los genes se pueden confeccionar para una expresión génica óptima en un organismo dado sobre la base de la optimización de codones.

Se puede seleccionar una secuencia guía para dirigir hacia cualquier secuencia diana. En algunas realizaciones, la secuencia diana es una secuencia dentro de un genoma de una célula. Las secuencias diana ejemplares incluyen aquellas que son únicas en el genoma diana. Por ejemplo, para el *S. pyogenes* Cas9, una secuencia diana única en un genoma puede incluir un sitio diana Cas9 con la forma MMMMMMMMNNNNNNNNNNNXG, donde NNNNNNNNNNNNXGG (N es A, G, T o C; y X puede ser cualquier cosa) tiene una presencia única en el genoma.

En la técnica están disponibles varios sistemas CRISPR/Cas9 disponibles comercialmente para la edición génica. Cualquiera de estos sistemas, y cualquier variación de los mismos, se puede utilizar en conexión con los métodos proporcionados en la presente memoria.

5.3 Métodos de uso

En la presente memoria también se proporcionan métodos de uso del gen diana identificado con los métodos de rastreo descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan métodos para activar una célula T mediante la inhibición del gen diana identificado a través de los métodos de rastreo descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula T está presente en un individuo portador de tumor. El individuo

portador de tumor puede recibir radiación dirigida al tumor antes, simultáneamente o después del tratamiento que inhibe el gen diana identificado mediante los métodos de rastreo descritos en la presente memoria.

En la presente memoria también se proporcionan métodos para tratar el cáncer en un individuo que lo necesita mediante la inhibición del gen diana identificado a través de los métodos de rastreo descritos en la presente memoria.

- 5 En algunas realizaciones, en la presente memoria también se proporcionan métodos para tratar el cáncer en un individuo que lo necesita mediante la administración de una terapia con células T utilizando células T que tienen un gen diana inactivado o parcialmente inactivado identificado a través de métodos de rastreo descritos en la presente memoria. En algunos casos, los métodos pueden incluir además administrar una terapia de radiación dirigida al tumor.

6. Ejemplos

- 10 Las realizaciones proporcionadas en la presente memoria se pueden entender más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos están destinados a ser ilustrativos de composiciones farmacéuticas y formas galénicas proporcionadas en la presente memoria, pero no son limitativos en modo alguno.

6.1 Ejemplo 1: Rastreo *in vitro* de alto rendimiento

- 15 Con el fin de identificar una diana para la terapia contra el cáncer, es decir, moléculas implicadas en la regulación de los mecanismos inhibidores de las células supresoras, se aíslan células T naïfs de un ratón no portador de tumor, modificado o no modificado por ingeniería genética, y se disponen en una placa de 96 pocillos. Las células T naïfs se diseñan para contener un gen particular de interés inactivado o parcialmente inactivado mediante la infección de células T utilizando vectores lentivirus que contienen un ARNhc de interés tal como se describe más arriba, o mediante el uso de sistemas que pueden inactivar el gen de interés, tales como los sistemas TALEN o CRISPR/CAS9, también descritos más arriba. La inactivación o inactivación parcial de un gen candidato particular se realiza en un pocillo en cada caso.

- 20 Después de adquirir un fenotipo estable, las células T tratadas con ARNhc se incuban con las células supresoras en presencia de antígeno o anti-CD3 + anti-CD28, utilizando dos conjuntos de células supresoras: (1) células supresoras aisladas de un animal irradiado; y (2) células supresoras aisladas de un animal no irradiado.
- 25 Después se evaluará la proliferación de células T en pocillos individuales mediante el control de la incorporación de ³[H]-timidina utilizando los procedimientos sustancialmente similares a los descritos en Dolcetti *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, 14.17.1-14.17.25 (2010), incorporado aquí como referencia.

- 30 Se espera que la proliferación se suprimirá en las células T tratadas con ARNhc de control no diana, mientras que la inactivación de genes diana que regulan negativamente (inhiben) la respuesta inmune dará como resultado una respuesta mejorada (supresión reducida). Además, las respuestas de las células T y/o las células supresoras aisladas de animales irradiados frente a animales no irradiados se comparan en el mismo ensayo de supresión *in vitro*. Se espera que se observe una proliferación de células T significativamente mejor (es decir, supresión reducida de células T) en muestras que incluyen inactivación o inactivación parcial de genes que participan en la inhibición de las respuestas de células T, cuando se combinan con células supresoras aisladas de un animal irradiado. Dichos genes se identifican como dianas para la terapia contra el cáncer, en particular como dianas cuya inhibición puede inducir potencialmente un efecto abscopal.

6.2 Ejemplo 2: Rastreo de agrupaciones *in vitro*

- 35 Otra estrategia *in vitro* podría utilizar esencialmente los mismos métodos arriba descritos, excepto que no se realiza en un formato ordenado en placas de 96 pocillos, sino que se lleva a cabo como agrupaciones de células T como un cocultivo con células supresoras. Las células T se infectan con lentivirus que contiene los vectores que podrían mediar en la inactivación o la inactivación parcial de genes candidatos, y exactamente una sola célula tendrá un solo gen que está atenuado. Cada gen tendrá una representación de al menos 500-1.000 células. Un ensayo de supresión de células T se lleva a cabo como una agrupación, de modo que cualquier célula que pueda escapar de la supresión y proliferar en el microambiente supresor se enriquecerá. Las células que portan el vector de interés se habrán integrado en el genoma y, por lo tanto, la secuenciación del vector determinará la representación relativa de cada vector en la agrupación, y cualquier sobrerrepresentación (o subrepresentación) de un vector particular se determina para evaluar la participación del gen candidato en los efectos inhibidores sobre la inmunidad de las células T.

6.3 Ejemplo 3: Rastreo *in vivo* de dianas para inducir efectos abscopales

- 40 La función de los genes candidatos, en algunos casos los genes candidatos identificados a partir de los ensayos *in vitro* arriba descritos, como los mediadores del efecto abscopal se prueba en un sistema *in vivo* en el que se implantan dos tumores en posiciones distales en el animal y solo un tumor será irradiado. Se medirá el efecto antitumoral sobre el tumor no irradiado. Si el gen es importante para mediar en la respuesta inmunosupresora con irradiación, inactivarlo o inactivarlo parcialmente en las células T mejorará en gran medida el efecto antitumoral del tumor no tratado.

- 55 Se aíslan células T naïfs de ratones de tipo silvestre o modificados por ingeniería genética TCR, y se transducen con el vector lentiviral de interés utilizando una estrategia lentiviral de agrupaciones, similar a la estrategia de rastreo agrupado *in vitro* tal como se describe más arriba. Después de la transducción estable del vector de interés en las

células T, en una representación de 500-1.000 para cada gen, estas células se inyectan de nuevo en los ratones portadores de tumor doble.

En un grupo de animales, solo uno de los dos tumores se irradia con una dosis única de radiación de 1 a 20 Gy. En un segundo grupo de animales, los tumores no se irradian. Tras un período de 7-20 días después de la irradiación, las células T transducidas (que se pueden identificar mediante la expresión de un marcador congénito específico en la superficie celular que no es expresado por células T endógenas del animal portador de tumor, o que coexpresado por el vector que se introduce en la célula) se aíslan de ganglios linfáticos drenantes, ganglios linfáticos no drenantes, el bazo y el tumor no irradiado.

Se extrae ADN genómico de las células T, y los vectores específicos se amplifican y secuencian utilizando secuenciación de próxima generación. Se espera que las células T que contienen genes candidatos que participan en la inducción del efecto abscopal muestren una proliferación mejorada. Se espera que la activación y expansión de las células T solo tenga lugar cuando el gen de interés sea inactivado o inactivado parcialmente y en presencia de irradiación ablativa del tumor primario. Por lo tanto, esta activación debería ser evidente en las células T que se infiltran en el tumor no tratado y también en la contracción del tumor no tratado cuando se irradia el tumor opuesto y se inactiva parcialmente el gen de interés. En cambio, se espera que la activación de las células T sea baja o insignificante en el ratón no irradiado.

6.4 Ejemplo 4: Rastreo de ARNhc *in vivo*

Se realizó un rastreo *in vivo* en un modelo de ratón con dos tumores fijando como dianas receptores acoplados a proteínas G (GPCR), la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF), y la genoteca de superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF). Se rastreó un total de 134 genes candidatos, representados por 650 ARNhc cercanos, estando representado cada gen candidato de estas familias por 4 a 5 ARNhc. En una serie de genes, los ARNhc estaban sobrerrepresentados en los tejidos de prueba en comparación con la población inicial de células T, lo que indica una mayor proliferación y acumulación del clon de células T que incorpora el ARNhc, independientemente del reconocimiento de TCR de un antígeno tumoral, y cuando un tumor del individuo de prueba había recibido radiación dirigida. Por lo tanto, estos genes se identificaron como dianas para la terapia contra el cáncer, solos o en combinación con radiación. La validez de estas dianas identificadas se puede corroborar aún más con pruebas adicionales. Por otro lado, los genes con una pérdida selectiva de ARNhc en el tejido de prueba indican que estos genes probablemente desempeñan papeles importantes en la activación e inhibición de las células T.

Construcción de la genoteca de ARNhc agrupada. Se crearon tres agrupaciones de ARNhc dirigidas a receptores acoplados a proteínas G (GPCR), la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF) y la genoteca de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) mediante 4 a 5 ARNhc subclonados contra cada gen diana. Todas las construcciones de ARNhc se diseñaron y construyeron ligando oligonucleótidos reasociados en el pLK0.3-Thy1.1, que coexpresa Thy1.1 y ARNhc mediante transducción lentiviral en células T CD8+ naífs de ratón. Cada agrupación de ARNhc contenía 82 ARNhc de control negativo, incluyendo 21 proteínas fluorescentes verdes (GFP), 16 proteínas fluorescentes rojas (RFP), 25 luciferasa y 20 *LacZ*.

Transducción lentiviral de células T CD8+ naífs de ratón primarias. Las células T CD8+ naífs de ratón primarias se aislaron de ratones transgénicos OT-1 (C57BL/6-Tg (TcraTcrb) 1100Mjb/J, laboratorio The Jackson) mediante el uso del kit de aislamiento de células T CD8+ naífs de ratón (Miltenyi Biotec), y se transdujeron con agrupación lentiviral con baja multiplicidad de infección (MOI). Antes de la transducción lentiviral, las células T CD8+ naífs aisladas se cultivaron con IL-7 (5 ng/ml) e IL 15 (100 ng/ml) en medio RPMI completo (RPMI 1640, FBS al 10%, HEPES 20 mM, piruvato sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, L-glutamina 2 mM, estreptomycin 100 µg/ml y penicilina 100 µg/ml) durante 48 horas. Siembra de células T CD8+ (8×10^6 células por pocillo) con agrupaciones lentivirales suplementadas con sulfato de protamina (5 µg/ml) en placa de 6 pocillos previamente revestida con reactivo RetroNectin (5 µg/ml) e infectadas por espinoculación con una MOI de 25 a 50. Las células T CD8+ de OT-1 se cultivaron adicionalmente en medio RPMI completo que contenía IL-7 (2,5 ng/ml), IL-15 (50 ng/ml) e IL-2 (2 ng/ml), seguido por infección lentiviral. A las 48 horas después de la infección se examinó la infectividad del virus mediante la expresión de Thy1.1, que se analizó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpo anti-Thy1.1-PE.

Tratamiento de tumores mediante transferencia adoptiva de células T CD8+ en ratones portadores de tumor. A unos ratones macho C57BL/6 (10 semanas de edad) se les inocularon células B16-Ova ($1,5 \times 10^5$ células en 50 µl) mediante inyección epidérmica, y el tamaño del tumor se midió cada tres días después de la inoculación y se calculó como longitud x anchura. El día 9, 30 ratones portadores de tumores con un tamaño de tumor similar en la pata y el costado se dividieron en 2 grupos como no irradiación (no IR) e irradiación (IR). El grupo de irradiación se trató con 12Gy IR en el tumor de la pata derecha utilizando un irradiador Shepherd Cesium en el día 9. El día 11, las células T CD8+ positivas de Thy1.1 infectadas con la agrupación de ARNhc se aislaron mediante selección PE-positiva utilizando Th1.1 como marcador de selección (kit de selección positiva PE EasySep™, Stem Cells Technologies) 72 horas después de la infección. Las células T CD8+ aisladas con una positividad de Thy1.1 de un 90% (5×10^6 células en 200 µl) se inyectaron en ratones C57BL/6 portadores de tumores B16-Ova mediante inyección retroorbital. El tamaño del tumor se midió cada dos días después de la transferencia y se calculó como longitud x anchura. Los ratones con tumores ≥ 20 mm en el eje más largo fueron sacrificados.

Aislamiento de células T CD8+ positivas de Thy1.1 de ratones C57BL/6 portadores de tumores de transferencia adoptivos. Los linfocitos se aislaron de los bazos, ganglios linfáticos drenantes, ganglios linfáticos no drenantes de los ratones no IR e IR. Los linfocitos infiltrados en tumor (TIL) se purificaron de tumores de la pata y el costado, se tomaron tumores B16-Ova de ratones y se lavaron con PBS con FBS al 2%. Los tumores se resuspendieron en 15 ml de RPMI que contenía FBS al 2%, 50 U/ml de colagenasa de tipo IV (Invitrogen) y 20 U/ml de DNaseI (Roche) y se incubaron a 37 C durante 2 h. Los TIL se aislaron adicionalmente utilizando Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories). Los linfocitos purificados se marcaron con fluorescencia utilizando anticuerpos anti-V α 2-FITC, anti-Thy1.1-PE, anti- β 5V-PerCP, anti-CD45-APC y anti-CD8-eFlour450. Las células T CD8+ positivas de Thy1.1 que expresaban ARNhc (CD8⁺V α 2⁺V β 5⁺Thy1.1⁺) se clasificaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de cada muestra utilizando un FACSAria (BD Biosciences).

Secuenciación profunda utilizando el Illumina MiSeq genetic Analyzer. El ADN genómico de las muestras recogidas se aisló (kit de sangre y tejido DNeasy, QIAGEN) y sirvió como plantilla para generar amplicones de PCR a partir de un casete de ARNhc para el ensayo de secuenciación profunda. La representación de ARNhc en cada agrupación se analizó mediante secuenciación profunda utilizando el MiSeq de Illumina. Los datos se normalizaron utilizando las lecturas medias de los ARNhc de control en cada grupo.

Análisis estadístico de datos de secuenciación profunda. Las lecturas se asignaron al archivo FASTA de la genoteca de ARNhc de agrupación utilizando Bowtie2. Para evitar dividir por cero en el cálculo del cambio incremental, se agregó 1 unidad al recuento bruto para cada clon. Después, para cada muestra, los datos del recuento se normalizaron al número total de lecturas de esa muestra. El recuento de lectura normalizado para cada clon se representó como Lecturas por Millón ("RPM"). Los recuentos de lectura normalizados se usaron para calcular el cambio incremental.

Tal como se muestra a continuación en las Tablas 1-3, durante este rastreo, que cubrió 134 genes (650 clones de ARNhc), se identificó una serie de dianas génicas. Por ejemplo, se identificaron 22 genes diana en los que los niveles de expresión de dos clones de ARNhc asociados eran más de 2 veces mayores en células T CD8+ positivas de Thy1.1 obtenidas del tumor de la pata en comparación con las obtenidas del bazo de los ratones que habían recibido irradiación en sus tumores de pata.

Tabla 1: Incremento diferencial en la expresión de ARNhc de células T: tumor de la pata no irradiado frente a bazo no irradiado

Diferencia incremental	Nº de dianas con 4 clones de ARNhc identificados	Nº de dianas con 3 clones de ARNhc identificados	Nº de dianas con 2 clones de ARNhc identificados
Más de 4 veces mayor (pata NR/bazo NR)	3	5	22
Aproximadamente de 2 a 4 veces mayor (pata NR/bazo NR)	1	5	10
Aproximadamente 2 veces mayor (pata NR/bazo NR)	4	11	28

NR: no irradiado

Pata NR: tumor de la pata no irradiado

Bazo NR: bazo de ratón no irradiado

* Solo se irradia el tumor de la pata, no el tumor de costado

Tabla 2: Incremento diferencial en la expresión de ARNhc de células T: tumor de costado no irradiado frente a bazo no irradiado

Diferencia incremental	Nº de dianas con 4 clones de ARNhc identificados	Nº de dianas con 3 clones de ARNhc identificados	Nº de dianas con 2 clones de ARNhc identificados
Más de 4 veces mayor (costado NR/bazo NR)	0	1	7

Diferencia incremental	Nº de dianas con 4 clones de ARNhc identificados	Nº de dianas con 3 clones de ARNhc identificados	Nº de dianas con 2 clones de ARNhc identificados
Aproximadamente de 2 a 4 veces mayor (pata NR/bazo NR)	1	3	12
Aproximadamente 2 veces mayor (pata NR/bazo NR)	0	7	16

NR: no irradiado

Pata NR: tumor de la pata no irradiado

Bazo NR: bazo de ratón no irradiado

5 * Solo se irradia el tumor de la pata, no el tumor de costado

Tabla 3: Incremento diferencial en la expresión de ARNhc de células T: tumor de la pata irradiado frente a bazo con tumor de la pata irradiado

Diferencia incremental	Nº de dianas con 4 clones de ARNhc identificados	Nº de dianas con 3 clones de ARNhc identificados	Nº de dianas con 2 clones de ARNhc identificados
Más de 4 veces mayor (pata R/bazo R)	0	0	6
Aproximadamente de 2 a 4 veces mayor (pata R/bazo R)	0	0	5
Aproximadamente 2 veces mayor (pata R/bazo R)	0	3	22

Pata R: tumor ratón irradiado en tumor de la pata

10 Bazo R: bazo de ratón irradiado en tumor de la pata

* Solo se irradia el tumor de la pata, no el tumor de costado

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que comprende medir una actividad de una célula T no modificada y de una célula T modificada; siendo puestas dicha célula T no modificada y dicha célula T modificada en cada caso en contacto con el microambiente tumoral de un individuo portador de tumor irradiado; teniendo dicha célula T modificada un gen candidato inactivado (*knocked-out*) o parcialmente inactivado (*knocked-down*); en donde dicho gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si dicha actividad ha aumentado cuando se compara dicha célula T modificada con dicha célula T no modificada; y en donde dicha actividad se selecciona entre el grupo que consiste en proliferación, activación del ciclo celular, inhibición de la muerte celular, producción de citocinas y una actividad citotóxica.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además medir dicha actividad de dicha célula T no modificada y de dicha célula T modificada, cada una de ellas en contacto con el microambiente tumoral de un individuo portador de tumor no irradiado; en donde dicha actividad es sustancialmente igual en dicha célula T no modificada y en dicha célula T modificada.
3. Un método *in vivo* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que comprende:
 - (i) inyectar una célula T no modificada y una célula T modificada en individuos de prueba no humanos portadores de tumor irradiado; teniendo dicha célula T modificada un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y
 - (ii) medir una actividad de dicha célula T no modificada y de dicha célula T modificada en dichos individuos de prueba no humanos, en donde dicha actividad consiste en la actividad de proliferación o actividad antitumoral;

en donde dicho gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si dicha actividad ha aumentado cuando se compara dicha célula T modificada con dicha célula T no modificada.
4. El método de la reivindicación 3, en donde dicha célula T modificada es una célula T de referencia.
5. El método de la reivindicación 3 o 4, que comprende además inyectar dicha célula T no modificada y dicha célula T modificada a individuos de prueba no irradiados, en donde dicha actividad es sustancialmente igual cuando se compara dicha célula T modificada con dicha célula T no modificada en dichos individuos de prueba no irradiados.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho individuo ha recibido radiación dirigida a tumor en una dosis de 1 Gy a 20 Gy.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicha actividad es:
 - (i) actividad de proliferación medida mediante acumulación de células T inyectadas;
 - (ii) actividad antitumoral medida mediante la muerte de células tumorales o la reducción del tamaño del tumor; o
 - (iii) actividad antitumoral medida mediante un aumento de la supervivencia de individuos sometidos a prueba.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde dicho individuo de prueba es un ratón, siendo dicho ratón preferiblemente un ratón con dos tumores, en donde únicamente un tumor ha recibido radiación dirigida.
9. El método de la reivindicación 8, en donde dicha actividad es actividad antitumoral medida mediante la reducción del tamaño del tumor no irradiado.
10. Un método de rastreo de agrupaciones *in vitro* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que comprende:
 - (i) preparar una población inicial de células T con diferentes modificaciones genéticas, en donde cada célula T tiene a lo sumo un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y
 - (ii) poner en contacto dicha población inicial de células T con el microambiente tumoral de un individuo portador de tumor irradiado, durante un período de tiempo para producir una población seleccionada de células T;

en donde el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T se identifica como el gen diana para la terapia contra el cáncer.

11. Un método de rastreo de agrupaciones *in vivo* para identificar un gen diana para la terapia contra el cáncer, que comprende:
- 5 (i) preparar una población inicial de células T con diferentes modificaciones genéticas, en donde cada célula T tiene a lo sumo un gen candidato inactivado o parcialmente inactivado; y
- (ii) 5 inyectar dicha población inicial de células T en un individuo de prueba no humano portador de tumor irradiado, en el que dicha población inicial de células T produce una población seleccionada de células T;
- en donde el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T se identifica como el gen diana para la terapia contra el cáncer.
- 10 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho gen candidato se inactiva o se inactiva parcialmente en dicha célula T modificada o en dicha población inicial de células T:
- (i) utilizando una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN);
- (ii) utilizando CAS9 (CRISPR); o
- 15 (iii) infectando células T con una genoteca de ARNhc, siendo la genoteca de ARNhc una genoteca de vectores de lentivirus.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dichas células T o dicha población inicial de células T son:
- (i) células T naïfs;
- (ii) células T CD8+; o
- 20 (iii) aisladas de un ratón, siendo dicho ratón opcionalmente de tipo silvestre o modificado por ingeniería genética para expresar un receptor de células T específico para un antígeno que no está presente de forma natural en los ratones, consistiendo dicho antígeno opcionalmente en ovoalbúmina.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dichas células T o dicha población inicial de células T están marcadas, consistiendo dicha marcación opcionalmente en éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE).
- 25 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende además aislar dicha población seleccionada de células T de una muestra de dicho individuo de prueba, en donde opcionalmente:
- (i) dicha muestra es una muestra tumoral, en donde opcionalmente dicha muestra tumoral ha recibido radiación dirigida o el individuo de prueba es un modelo de dos tumores y dicha muestra tumoral no ha recibido radiación dirigida; o
- 30 (ii) dicha muestra es una muestra no tumoral, consistiendo dicha muestra de tejido no tumoral opcionalmente en una muestra de bazo o una muestra de ganglios linfáticos.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde el gen candidato que está inactivado o parcialmente inactivado en la población seleccionada de células T se identifica mediante NGS de ADN genómicos aislados de la población seleccionada de células T.
- 35 17. El método de la reivindicación 12(iii), en donde cada célula T de la población inicial tiene a lo sumo un ARNhc para un gen candidato, y un gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si el ARNhc para el gen candidato está enriquecido en la población seleccionada de células T en comparación con la población inicial de células T, en donde opcionalmente:
- 40 (i) un gen candidato se identifica como un gen diana para la terapia contra el cáncer si el ARNhc para el gen candidato está enriquecido en la población seleccionada de células T obtenida de una muestra tumoral en comparación con una muestra de tejido no tumoral;
- (ii) un gen candidato se identifica como un gen diana si el ARNhc para dicho gen candidato está enriquecido más de 2 veces en la muestra tumoral en comparación con la muestra de tejido no tumoral; o
- 45 (iii) un gen candidato se identifica como un gen diana si el ARNhc para dicho gen candidato está enriquecido más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 10 veces, más de 15 veces, o más de 20 veces en la muestra tumoral en comparación con la muestra de tejido no tumoral.

18. El método de la reivindicación 17, en donde el método comprende cuantificar el ARNhc en la población seleccionada de células T mediante NGS.

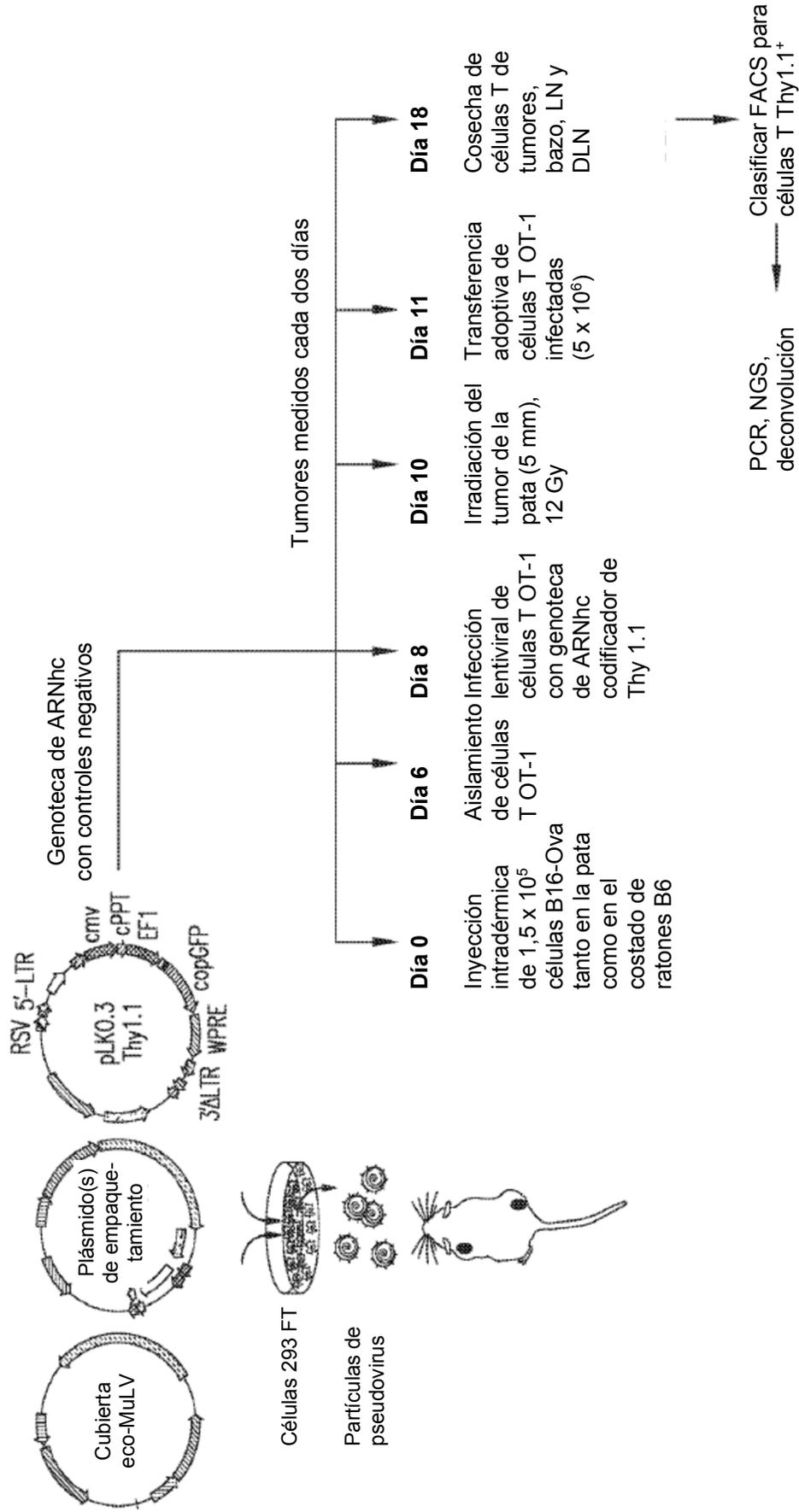
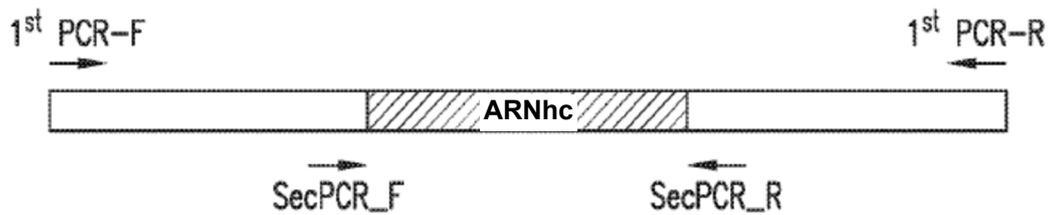


FIG.1



Cebador de PCR principal (de TRC): 294 bp

5'-AAT GGA CTA TCA TAT GCT TAC CGT AAC TTG AAA GTA TTT CG-3'

5'-CTT TAG TTT GTA TGT CTG TTG CTA TTA TGT CTA CTA TTC TTT CCC-3'

Cebador de PCR secundario (de Lin Lab): 124 bp

SecPCR_F: 5'-CGA AAC ACC GGT CCG CAG GTA TGC-3'

SecPCR_R: 5'-CCA TTT GTC TCG AGG TCG AAA ACT GG-3'

FIG.2